

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA



**EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA AGUDA DEL HERBICIDA N-
(FOSFONOMETIL) GLICINA SOBRE REPRESENTANTES DEL PRIMER NIVEL
TRÓFICO**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICO
FARMACOBIOLOGÍA

PRESENTA:

p. QFB GERARDO SOLÍS GONZÁLEZ

ASESORA: **DC MARÍA CARMEN BARTOLOMÉ CAMACHO¹**

CO-ASESORA: **MC ALONDRA ALELIE CORTÉS TÉLLEZ²**

COMITÉ SINODAL:

MC ELVIRA RAMOS LÓPEZ³

MC MARÍA GRICELDA PÉREZ ORDAZ⁴

MC ROSA MARÍA GARCÍA MARTÍNEZ⁵

MC MIREYA RAMOS RENDÓN⁶

DC HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES⁷

MORELIA, MICHOACÁN. FEBRERO DE 2019

¹ Profesor-Investigador Titular B, Laboratorio de Toxicología, Facultad de Químico-Farmacobiología, UMSNH.

² Estudiante de PIDCB, Facultad de Químico-Farmacobiología, UMSNH.

³ Técnico Académico Tiempo Completo, Facultad de Químico-Farmacobiología, UMSNH.

⁴ Técnico Académico Asociado C Tiempo Completo, Facultad de Químico-Farmacobiología, UMSNH.

⁵ Profesor-Investigador Asociado C Tiempo Completo, Facultad de Químico-Farmacobiología, UMSNH.

⁶ Técnico Académico Asociado A Tiempo Completo, Facultad de Químico-Farmacobiología, UMSNH.

⁷ Profesor-Investigador Asociado C, Director, Facultad de Químico-Farmacobiología, UMSNH.

A Dios.

Por haberme dado vida y la inteligencia para culminar con mis estudios.

A mi mamá María.

Por haber confiado en mí y haberme alentado día con día para no renunciar nunca.

A mi papá Ariel.

Por haberme dado la oportunidad de cultivar en mí la mejor de las herencias: el estudio.

A mi hermana Yesenia.

Por permitirme ser ejemplo y guía en su camino.

A mi tía Emi.

Por ser un gran apoyo, quererme tanto y nunca dejarme solo en momentos de necesidad.

A mi abuelo Antonio †.

Por darme siempre un buen consejo.

AGRADECIMIENTOS

A:

Dios, por haberme dado vida, fuerza y coraje para enfrentar los retos que tuve, así como por haberme dado la sabiduría para alcanzar mis objetivos.

Mamá y papá, por confiar en mí y darme las herramientas necesarias para cumplir mi sueño, siempre con su consejo, cariño y cuidado.

Mi hermana Yesi, por alentarme a seguir cuando no podía más recordándome el esfuerzo de mamá y papá para que logremos lo que queremos.

Mi tía Emi, por quererme como si fuera un hijo y brindarme siempre su apoyo incondicional sin esperar nada a cambio.

Mis abuelos, Teresa y Antonio†, porque gracias a ustedes nunca me faltó una tortilla que llevarme a la boca. Además a mi abuelo Salvador, por siempre brindarme su consejo para no rendirme nunca, y mi abuela Melania porque gracias a su insistencia de que estudiara “otra cosa más fácil”, pude encontrar mi verdadera vocación.

La Doctora Carmen, por haber confiado en mí al aceptarme como tesista en su grupo de trabajo y su gran apoyo en mi formación académica.

La Maestra Alondra, por ser guía y amiga en la elaboración de esta tesis.

Mis tíos, Fernando, Tista, Alejandro, Toño, Liz, Amada, Reyes, Beatriz y Silvia por no dejar solo a mi papá y apoyarnos siempre; asimismo a mis tíos Fernando, Carmen y Soco por apoyarnos a mamá y a mí siempre. Y a mis primos que, para nombrarlos a todos, necesitaría una página completa.

Mi comité sinodal, a las maestras Elvira, Gricelda, Rosy y Mireya y al doctor Héctor por sus consejos y apoyo en la culminación de este trabajo.

Mis amigos, por haber hecho de esta etapa un momento más llevadero y alegre, en especial a Amalia, Becky, Chuy, Cinthya, Dani, Diana, Irazú, Lupita, Pandi, Vane y Yara. Además a Abi, Itzel, Monse, Toño, Rebe y Dalia, por haberse sumado en esta aventura y haber hecho de “la orientación” la gran etapa que fue.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	VII
GLOSARIO.....	VIII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Contaminación del agua.....	5
2.2. Plaguicidas	8
2.3. Herbicidas	15
2.3.1. Organofosforados	16
2.3.1.1. Glifosato	16
2.4. Aplicación de los bioensayos.....	26
2.5. Bioindicadores	28
2.5.1. Bioindicadores y calidad del agua.....	29
2.5.2. Microalgas verde-azules como bioindicadores	31
2.6. Cianobacterias.....	34
2.6.1. <i>Microcystis aeruginosa</i>	37
2.7. Género <i>Artemia</i>	40
2.7.1. Morfología y ciclo de vida de <i>Artemia</i>	44
2.7.2. <i>Artemia franciscana</i>	47
3. Justificación	49
3.1. Hipótesis	49
4. OBJETIVOS	50
4.1. Objetivo General.....	50

4.2. Objetivos Específicos	50
5. MATERIAL Y MÉTODOS	51
5.1. Sustancias de ensayo.....	51
5.2. Agua marina sintética	51
5.3. Medio de cultivo BG-11	51
5.4. Material biológico.....	52
5.5. Determinación de mortalidad en <i>Artemia franciscana</i>	52
5.6. Ensayos de inhibición de tasa de crecimiento	53
5.7. Análisis de morfología celular	53
5.8. Análisis estadístico	54
6. RESULTADOS.....	56
6.1. Respuesta del glifosato sobre nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	56
6.2. Respuesta del glifosato sobre <i>Microcystis aeruginosa</i>	57
6.3. Análisis de morfología celular de <i>Microcystis aeruginosa</i>	59
7. DISCUSIÓN.....	64
8. CONCLUSIONES.....	73
9. RECOMENDACIONES.....	74
10. BIBLIOGRAFÍA	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de los usos del agua sobre su calidad.....	7
Tabla 2. Categorización de sustancias de acuerdo con la CL ₅₀	9
Tabla 3. Clasificación de plaguicidas según naturaleza química	9
Tabla 4. Empresas con mayor número de registro de plaguicidas altamente peligrosos autorizados en México.....	11
Tabla 5. Plaguicidas altamente peligrosos con mayor número de registros en todos los usos en México	12
Tabla 6. Clasificación de los herbicidas	15
Tabla 7. Identidad, propiedades físicas y químicas del glifosato	18
Tabla 8. Criterios para la selección de pruebas biológicas en el laboratorio para la evaluación toxicológica	27
Tabla 9. Diversidad ecológica de Algas verde-azules de agua dulce.....	33
Tabla 10. Taxonomía de <i>Microcystis aeruginosa</i>	38
Tabla 11. Taxonomía de <i>Artemia</i>	43
Tabla 12. Composición porcentual del glifosato (La Fam).....	51
Tabla 13. Composición del medio BG-11 solución estéril, 100x concentrado	52
Tabla 14. Modelo geométrico esférico para la determinación del volumen y superficie celular	54
Tabla 15. Categorización de sustancias de acuerdo con la CL ₅₀ o CI ₅₀	56
Tabla 16. Valores de la CL ₅₀₍₂₄₎ y 24h-NOEC del glifosato sobre <i>Artemia franciscana</i> a 24 horas de exposición.....	56
Tabla 17. Valores de la CI ₅₀₍₇₂₎ y 72h-NOEC del glifosato sobre <i>Microcystis aeruginosa</i> a 72 horas de exposición.....	57
Tabla 18. Resumen de resultados de la toxicidad aguda del glifosato.	58
Tabla 19. Parámetros medidos y coeficiente de forma (CF) de <i>Microcystis aeruginosa</i>	59
Tabla 20. Toxicidad aguda del Malatión y Roundup® sobre nauplios del orden Anostraca.	65
Tabla 21. Toxicidad del Malatión y Glifosato en branquiópodos.	66
Tabla 22. Ensayos de toxicidad aguda.....	68

Tabla 23. CI_{50} de la sal isopropilamina de glifosato y formulación Ron-do sobre ambas especies de <i>Scenedesmus</i>	70
Tabla 24. CI_{50} de la sal isopropilamina de glifosato sobre cuatro especies de fitoplancton de agua dulce.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo del agua.....	6
Figura 2. Fuentes de contaminación no puntuales.....	7
Figura 3. Estructura base de un fosfonato y estructura base de un organofosforado	16
Figura 4. Sal de Isopropilamina de Glifosato	17
Figura 5. Ácido aminometil-fosfónico (AMPA)	19
Figura 6. Fórmula comercial de glifosato (La Fam).....	20
Figura 7. Vía del Shikimato.....	23
Figura 8. Inhibición de la enzima EPSPS	24
Figura 9. Respuestas jerárquicas de las algas al cambio ambiental.....	30
Figura 10. Diversas especies de fitoplancton	32
Figura 11. <i>Microcystis aeruginosa</i>	38
Figura 12. Microcistina producida por <i>Microcystis aeruginosa</i> característica por ser hepatotóxica.....	39
Figura 13. Mapa de la distribución mundial de las diferentes especies de <i>Artemia</i>	40
Figura 14. Distribución de <i>Artemia</i> en México y Centroamérica.....	41
Figura 15. Estados de la eclosión de <i>Artemia</i>	42
Figura 16. Morfología de <i>Artemia</i>	44
Figura 17. Ciclo de vida de <i>Artemia</i>	46
Figura 18. Célula control de <i>Microcystis aeruginosa</i>	62
Figura 19. Célula de <i>M. aeruginosa</i> expuesta a la Concentración Máxima sin Efecto Observado del glifosato a las 72h (72h-NOEC).....	62
Figura 20. Célula de <i>M. aeruginosa</i> expuesta a la Concentración Inhibitoria media del glifosato a las 72h (CI ₅₀₍₇₂₎)	63

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de <i>Artemia franciscana</i> con el herbicida glifosato.....	57
Gráfica 2. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de <i>Microcystis aeruginosa</i> con el herbicida glifosato.....	58
Gráfica 3. Diferencias entre el área de las células de <i>Microcystis aeruginosa</i>	60
Gráfica 4. Diferencias entre el diámetro de las células de <i>Microcystis aeruginosa</i>	60
Gráfica 5. Diferencias entre el perímetro de las células de <i>Microcystis aeruginosa</i>	61
Gráfica 6. Diferencia entre el volumen de las células de <i>Microcystis aeruginosa</i>	61

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo del volumen (V) y superficie celular (A) de acuerdo con el modelo esférico (1H)	54
Ecuación 2. Cálculo del Coeficiente de Forma (CF).....	55

ABREVIATURAS

AMPA: Ácido aminometil-fosfónico

CI₅₀: Concentración Inhibitoria media

CI₅₀₍₇₂₎: Concentración Inhibitoria media a 72 horas de exposición

CL₅₀: Concentración Letal media

CL₅₀₍₂₄₎: Concentración Inhibitoria media a 24 horas de exposición

COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

COP: Compuestos Orgánicos Persistentes

EPA: Agencia de Protección Ambiental

EPSPS: 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa

GP: Glifosato

IPA: Isopropilamina

MCs: Microcistina

NOEC: Concentración sin Efecto Observado

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (Organization for Economic Co-operation and Development)

OGM: Organismos Genéticamente Modificados

PAN: Red de Acción de Plaguicidas Internacional (Pesticide Action Network International)

PAP: Plaguicidas Altamente Peligrosos

POEA: Polioxietilenamina

SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

WHO: Organización Mundial de la Salud

GLOSARIO

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

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

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

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

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

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

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

Biodegradación. Destrucción *in vivo* o *in vitro* de una sustancia, por acción enzimática. Puede caracterizarse como: 1. Primaria. La alteración de la estructura química de la sustancia que supone la pérdida de una propiedad específica. 2. Aceptable desde el punto de vista ambiental. Se eliminan propiedades indeseables del compuesto. 3. Total. La sustancia se

transforma completamente en moléculas o iones simples (como dióxido de carbono, metano, nitrato, amonio, agua, etc.).

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

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

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

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

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

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

Concentración efectiva (CE). Proporción de una sustancia en un medio que causa un determinado efecto en un sistema dado; la CE_{50} es la concentración que causa el 50% del efecto máximo.

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

Concentración letal (LC). Proporción de una sustancia tóxica en un medio, que causa la muerte después de un cierto período de exposición.

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

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

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

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

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

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

Diapausa. *Ver Criptobiosis.*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMEN

El uso de herbicidas basados en glifosato [N – (fosfonometil) glicina] modifican la estructura y funcionalidad de ecosistemas acuáticos, dichas alteraciones dependen de la especie u organismo, tipo de compuesto, la concentración de glifosato en agua y el tiempo de exposición. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar a través de la $CL_{50(24)}$ y la $CI_{50(72)}$ el riesgo tóxico agudo de ecosistemas acuáticos, por medio de bioindicadores del primer nivel trófico (microcrustáceo *Artemia franciscana* y microalga *Microcystis aeruginosa*) y su posterior exposición a glifosato, resultando en una respuesta altamente tóxica sobre *Artemia franciscana* $CL_{50(24)}$ 0.31 mg L^{-1} ($0.30 - 0.32$) que de acuerdo con la clasificación de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) fue de categoría I: sustancias muy tóxicas para organismos acuáticos; y muy peligrosa sobre *Microcystis aeruginosa* $CI_{50(72)}$ 53.95 mg L^{-1} ($36.31 - 95.72$) englobada en la categoría III de acuerdo con la EPA: sustancias peligrosas para el ambiente acuático. Además, se realizó un análisis de la morfología celular de *Microcystis aeruginosa* donde se obtuvo un $CF \approx 1$ para las células control, así como para las células enfrentadas a las concentraciones de glifosato 72h-NOEC (2.95 mg L^{-1}) y $CI_{50(72)}$ (53.95 mg L^{-1}), lo que indica que las células se mantienen esféricas, sin embargo, hay cambios significativos en su volumen y superficie celular.

Palabras clave: glifosato, *Artemia franciscana*, *Microcystis aeruginosa*, toxicidad aguda, coeficiente de forma.

ABSTRACT

The use of glyphosate-based herbicides [N – (phosphonomethyl) glycine] modify the structure and functionality of aquatic environments, these alterations depend of the species or organisms, type of compound, the glyphosate concentration on water and the time of exposure. Therefore, the objective of the present work was to evaluate through the $LC_{50(24)}$ and $IC_{50(72)}$ the acute toxic risk of aquatic environments, through bioindicators of the first trophic level (micro shrimp *Artemia franciscana* and microalgal *Microcystis aeruginosa*) and the subsequent exposure to glyphosate, resulting in a highly toxic response on *Artemia franciscana* $LC_{50(24)}$ 0.31 mg L^{-1} ($0.30 - 0.32$) according to the classification of the Environmental Protection Agency (EPA) it was category I: very toxic substances for aquatic organisms; and very dangerous on *Microcystis aeruginosa* $IC_{50(72)}$ 53.95 mg L^{-1} ($36.31 - 95.72$) encompassing in the category III according to the EPA: dangerous substances for the aquatic environment. In addition, an analysis of the cell morphology of *Microcystis aeruginosa* was performed where a $CF \approx 1$ was obtained for the control cells, as well as for the cells facing glyphosate concentrations 72h-NOEC (2.95 mg L^{-1}) and $IC_{50(72)}$ (53.95 mg L^{-1}), which indicates that the cells remain spherical, however, there are significant changes in their volume and cell surface.

Key words: glyphosate, *Artemia franciscana*, *Microcystis aeruginosa*, acute toxicity

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación se caracteriza por la introducción o incremento de sustancias que pueden causar daño sobre la salud humana, perjudicar los recursos vivos y los sistemas ecológicos; la contaminación está relacionada frecuentemente con la actividad del hombre (Alloway y Ayres, 1997; Bautista, 1999).

La contaminación del agua procede de la adición de materia extraña indeseable que deteriora su calidad y se da por la liberación de residuos y contaminantes que drenan a las escorrentías y luego son transportados hacia ríos, penetrando en aguas subterráneas o descargando en lagos o mares. Los principales contaminantes son detergentes, insecticidas, grasas, colorantes, disolventes, metales, plaguicidas, sales inorgánicas, fertilizantes y descargas de residuos sólidos (Solís y López, 2003).

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

La mejor información sobre las relaciones concentración y respuesta de los compuestos químicos en el medio es sin lugar a duda la CL_{50} (Concentración Letal media) y CI_{50} (Concentración Inhibitoria media), expresando los efectos letales e inhibitorios a corto plazo. Puesto que hay muchas dificultades en el mantenimiento y cultivo de organismos, la mayoría de los ensayos se realizan con un número limitado de especies las cuales son fáciles de mantener, de manipular y de cultivar en el laboratorio (Bayne, 1986).

El abuso en el uso de herbicidas o la utilización de sustancias reguladas e inclusive prohibidas por los gobiernos de diferentes países (México, Brasil, Venezuela), provocan una interacción negativa con la planta, suelo y aguas subterráneas del área donde se están aplicando. Algunos plaguicidas según su estructura y características fisicoquímicas persisten en el ambiente, propiciando con ello la acumulación en agua y suelo principalmente, subiendo después por la cadena trófica y llegando hasta los seres humanos (Jaramillo *et al.*, 2009).

Es por ello por lo que se plantea la necesidad de contar con información toxicológica de uno de los herbicidas más usados en el mundo como lo es el glifosato (COFEPRIS, 2016), y

por ello se propone su evaluación a través de dos bioindicadores pertenecientes al plancton: *Artemia franciscana* y *Microcystis aeruginosa*. Por un lado, *Artemia franciscana* es un consumidor primario perteneciente al zooplancton del ambiente marino, además de ser cosmopolita, fácil de cultivar en el laboratorio y tener poblaciones similares en tamaño y fisiología debido a la eclosión simultánea de quistes (Papadopoulos *et al.*, 2004). Además, por vivir en condiciones de alta salinidad y en un número enorme de ecosistemas y poder generar quistes en criptobiosis, *Artemia franciscana* puede ser cultivada controladamente en un laboratorio (Panagoula *et al.*, 2002). Por otra parte, *Microcystis aeruginosa* es un productor primario y su importancia como bioindicador radica en que el fitoplancton responde rápidamente a los cambios ambientales por su ciclo de vida corto, además, es de amplia distribución y en casos donde hay eutroficación de las aguas que habitan, se desencadenan floraciones algales pudiendo ser nocivas para el ambiente donde se desarrollan (Vázquez *et al.*, 2006).

2. MARCO TEÓRICO

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

La contaminación se caracteriza por la introducción o incremento de sustancias que pueden causar daño sobre la salud humana, perjudicar los recursos vivos y los sistemas ecológicos. A veces, la contaminación es de origen natural, pero en general, está relacionada con la actividad del hombre, que en su búsqueda de supervivencia y bienestar dispersa sustancias agresivas, algunas de las cuales pueden ser transformadas por los organismos vivos (biodegradables) y otras que son persistentes (no biodegradables). Dependiendo del medio en que se acumulen los contaminantes, se puede hablar de contaminación en aire, suelo y agua; y en cada caso presenta características propias, debido a factores ambientales y su comportamiento con materia orgánica e inorgánica, que requieren medidas de prevención (Alloway y Ayres, 1997; Bautista, 1999).

Como protección del medio ambiente hay que entender la preservación de las aguas, del suelo y del aire así como de los seres vivos que en ellos se hallan, frente a los posibles daños producidos por emisiones en la fabricación de productos o por la presencia de estos en aguas residuales, en los residuos sólidos y en el aire residual (Riva, 1991).

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

nitrógeno producidos por la industria y por los gases producidos en la combustión de los vehículos (Alfaro, 1999).

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

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

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

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

2.1. Contaminación del agua

El agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente, que, como consecuencia del rápido desarrollo humano y económico y del uso inadecuado que se ha hecho de ella como medio de eliminación, ha sufrido un alarmante deterioro. Durante décadas, toneladas de sustancias biológicamente activas, sintetizadas para su uso en la agricultura, la industria, la medicina, etc., han sido vertidas al medio ambiente sin reparar en las posibles consecuencias. Al problema de la contaminación, que comenzó a hacerse notable ya a principios del siglo XIX, cabe añadir el problema de la escasez, aspecto éste que está adquiriendo proporciones alarmantes a causa del cambio climático y la creciente desertización que está sufriendo el planeta (Barceló y López, 2007).

Las medidas legislativas que se han ido adoptando progresivamente para evitar la contaminación química del agua y los riesgos que se derivan de ella han contribuido a paliar parcialmente esta situación. Sin embargo, la creciente demanda de agua y el descubrimiento continuo de nuevos contaminantes potencialmente peligrosos dejan clara la necesidad de seguir investigando en todas aquellas áreas que puedan contribuir a proteger la salud humana y la del medio ambiente, conseguir un uso sostenible del agua y atenuar los efectos de la sequías y el cambio climático (Pizzolato *et al.*, 2007).

La aparición de elementos "no deseables" y tóxicos, y la variación en las concentraciones de los constituyentes comunes, tiene su origen en el denominado "ciclo del agua" (**Figura 1**). En alguna parte de este ciclo, en el cual confluyen distintos compartimentos ambientales y actividades humanas, es donde se produce la contaminación del agua, o mejor dicho, la alteración de su calidad. De acuerdo con este ciclo, las principales vías de entrada de contaminantes en el medio ambiente acuático son las aguas residuales, entre las que se incluyen las urbanas, industriales, y las de origen agrícola o ganadero. La prevalencia de una u otra depende en gran medida del tipo de contaminación de que se trate y del nivel de depuración o atenuación natural (si existe) que experimentan (Barceló y López, 2007).

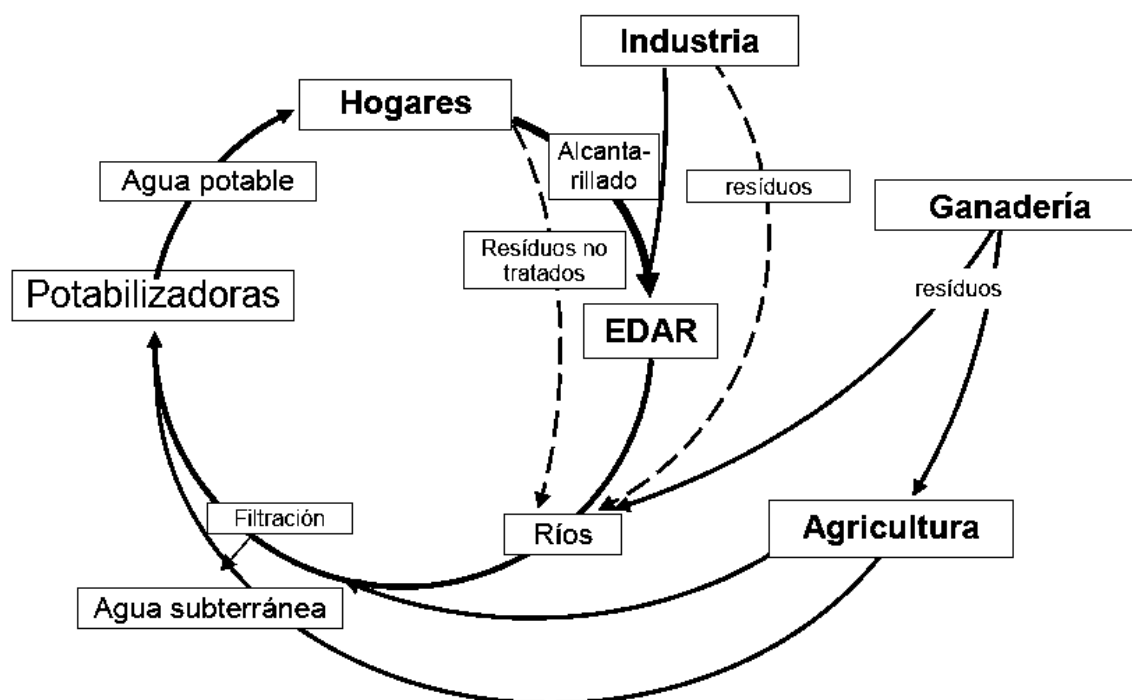


Figura 1. Ciclo del agua (Barceló y López, 2007)

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

- Acción tóxica y cancerígena
- Incidencia sobre la producción de alimentos
- Limitación del uso del agua con fines recreativos
- Reducción de las posibilidades de su uso industrial y agropecuario

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

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

Tabla 1. Efecto de los usos del agua sobre su calidad (Spiro y Stigliani, 2004).

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

En la actualidad el problema más serio procede de las fuentes no puntuales. Éstas incluyen emisiones procedentes de vehículos, escorrentía agrícola, que vierte una elevada cantidad de nutrientes y arcillas a las corrientes de agua y agua subterráneas y escorrentía urbano que descarga, mediante arrastre por el agua de lluvia, compuestos orgánicos y metales a las plantas de tratamiento, ríos y lagos (**Figura 2**) (Spiro y Stigliani, 2004).

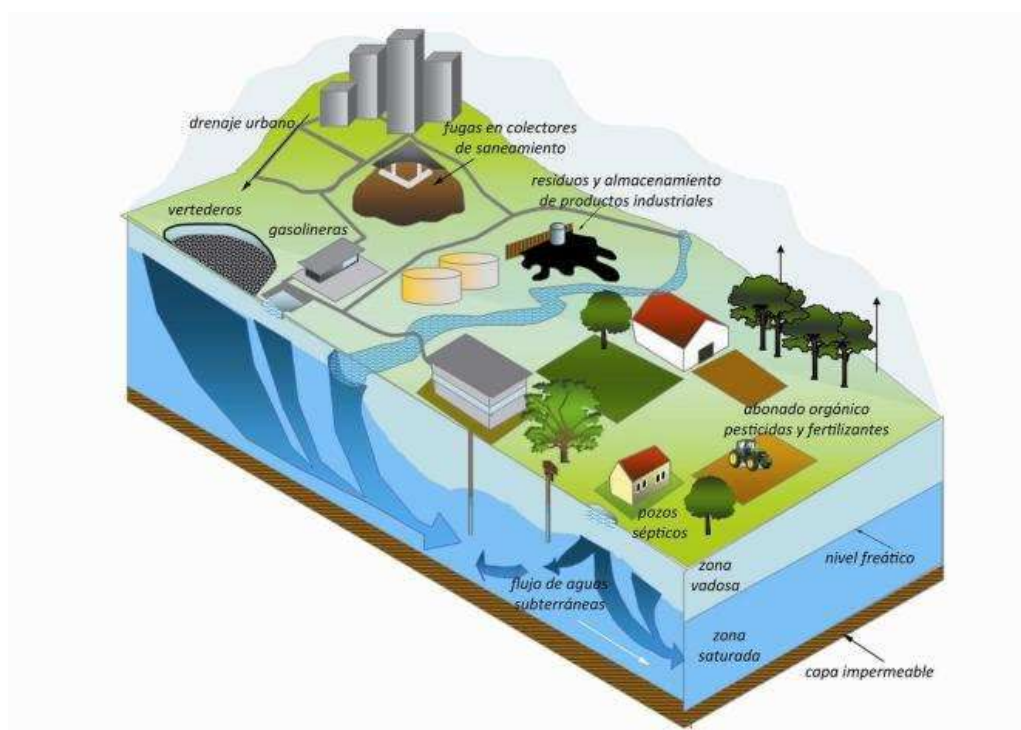


Figura 2. Fuentes de contaminación no puntuales (Tomado de: <https://liferuralsupplies.files.wordpress.com/2014/02/02-aba1.jpg?w=665&h=470>)

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

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

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

2.2.Plaguicidas

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

Clasificación según toxicidad: para su clasificación se tiene en cuenta la concentración letal 50 (CL₅₀), la cual se define como la cantidad de una sustancia que al ser suministrada a bioindicadores de experimentación mata al 50% de esa población (Eddleston *et al.*, 2005). En Estados Unidos, la EPA (Environmental Protection Agency) realizó una categorización

de las sustancias tóxicas para el ambiente acuático de acuerdo con la concentración del tóxico necesaria para matar a la mitad de la población de ensayo (**Tabla 2**).

Tabla 2. Categorización de sustancias de acuerdo con la CL₅₀ (EPA, 1996)

Toxicidad aguda (CL ₅₀ mg L ⁻¹)	Categoría
≤1	I: Sustancias muy tóxicas para el ambiente acuático
1-10	II: Sustancias tóxicas para el ambiente acuático
10-100	III: Sustancias peligrosas para el ambiente acuático
≥100	IV: Se consideran no tóxicas

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

Tabla 3. Clasificación de plaguicidas según naturaleza química

Tipo	Características
Inorgánicos	Fabricados a partir de metales como cobre, plomo, arsénico
Vegetales	Extraídos de diversas partes de vegetales, como las piretrinas
Organosintéticos	Sintetizados por el hombre en el laboratorio (organoclorados, organofosforados, carbamatos)
Microorganismos vivos	Virus, bacterias y hongos utilizados en el control biológico de plagas

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

Insecticidas:

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

Fungicidas:

- Sales de cobre: oxiclورو de cobre y sulfato de cobre.
- Derivados de la ftalimida: captafol.
- Dinitrofenoles: dinitro-orto-cresol.
- Dithiocarbamatos: maneb, zineb, mancozeb.

Herbicidas:

- Bipiridilos: paraquat, Diquat.
- Glifosato.

Rodenticidas:

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

En el Catálogo de Plaguicidas de 2016 en México se encuentran 282 empresas que cuentan con un total de 3,140 registros sanitarios vigentes de ingredientes activos incluidos en la lista de plaguicidas altamente peligrosos de PAN Internacional (Red de Acción de Plaguicidas, por sus siglas en inglés) y autorizados por COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios). Esto incluye a todos los tipos de plaguicidas (insecticidas, herbicidas, fungicidas etc.), y para todos los usos: agrícola, forestal, pecuario, doméstico, jardinería, urbano e industrial (Bejarano *et al.*, 2017). El que estén registrados tal cantidad de plaguicidas por estas empresas no significa que actualmente se encuentren a la venta, puede que hayan sido retiradas por éstas sin previo aviso, lo que sí indica ese número es la cantidad de fórmulas y productos a los que han sido expuestos la población y el ambiente.

Hay un alto grado de concentración de los registros de los plaguicidas altamente peligrosos por unas decenas de empresas, lo que refleja la concentración del mercado de plaguicidas. Del total de 282 empresas, las primeras 12 concentran la tercera parte (33.28%) del total de los registros autorizados de plaguicidas altamente peligrosos y 30 de ellas un poco más de la mitad (54.94%) con 1,726 registros autorizados, ver **Tabla 4**.

Tabla 4. Empresas con mayor número de registro de plaguicidas altamente peligrosos autorizados en México (COFEPRIS, 2016).

	Empresas	Uso Agrícola, Forestal y Pecuario	Uso doméstico, Jardinería y Urbano	Uso Industrial	Total Registros
1	Bayer de México	150	40	12	202
2	Syngenta Agro	112	20	1	133
3	FMC Agroquímica de México	72	18	3	93
4	Dow Agrosiences de México	73	12	7	92
5	BASF Mexicana	67	17	1	85
6	Velsimex	64	9	3	76
7	Agricultura Nacional	53	6	13	72
8	United Phosphorus de México	61	2	0	63
9	Agroquímicos Versa	51	9	2	62
10	Agrevo Mexicana	38	20	4	62
11	Cheminova Agro de México/Cheminova Agroquímica	47	4	2	53
12	Makhteshim-Agan de México	52	1	0	53
13	Cyanamid Agrícola de México	41	6	1	48
14	Koor Internacional	49	2	0	51
15	Agricultura Nacional de Jalisco	48	2	0	50
16	Dupont México	47	2	0	49
17	Novartis Agro y Novartis Salud Animal	35	11	0	46
18	Agroquímica Tridente	27	14	3	44
19	Química Lucava	37	4	1	42
20	Agromundo	31	9	1	41
21	Internacional Química de Cobre	38	0	0	38
22	Tekchem	28	7	2	37
23	SC Johnson and Son	2	30	1	33
24	Rhone Poulenc Agro	29	3	0	32

25	Ingeniería Industrial	31	0	0	31
26	Monsanto Comercial	23	8	0	31
27	Gowan Mexicana	29	0	1	30
28	Síntesis y Formulaciones de Alta Tecnología	26	0	0	26
29	Química Amvac de México	23	0	3	26
30	Polaquimia	22	0	3	25
SUBTOTAL		1,406	256	64	1,726
Total del registro de la 282 empresas					3,140

Los ingredientes activos de los plaguicidas que tienen un mayor número de registros no significan necesariamente que sean los usados en mayor volumen, aunque sí lo podemos considerar como un indicador de su demanda y del interés comercial para su formulación y venta (**Tabla 5**). En México no contamos con información accesible al público sobre el nombre, tipo y cantidad de cada plaguicida autorizado que se aplica a nivel nacional (Bejarano *et al.*, 2017).

Tabla 5. Plaguicidas altamente peligrosos con mayor número de registros en todos los usos en México

	Ingrediente activo	Tipo	Categoría toxicológica	Clasificación	Uso	Total Reg.
1	Paratión metílico	Insecticida	II	Organofosforado	Agrícola e industrial	166
2	Clorpirifós etil	Insecticida	III	Organofosforado	Agrícola, doméstico, pecuario, urbano e industrial	165
3	Cipermetrina	Insecticida Acaricida	III	Piretroide	Agrícola, pecuario, doméstico, jardinería, urbano e industrial	156
4	Malatión	Insecticida	IV*	Organofosforado	Agrícola, urbano y jardinería	139

5	Permetrina	Insecticida	IV	Piretroide	Agrícola, pecuario, doméstico, jardinería, urbano e industrial	139
6	Mancozeb	Fungicida	IV	Ditiocarbamato	Agrícola e industrial	122
7	Clorotalonil	Fungicida	IV*	Aromático Policlorado	Agrícola e industrial	119
8	Glifosato	Herbicida	IV*	Fosfonometilglicina	Agrícola, urbano y jardinería	110
9	Atrazina	Herbicida	IV	Triazina	Agrícola e industrial	92
10	Deltametrina	Insecticida	III	Piretroide	Agrícola, pecuario, doméstico, urbano e industrial	88
11	Metamidofós	Insecticida Acaricida	II	Organofosforado	Agrícola e industrial	82
12	Dimetoato	Insecticida	III	Organofosforado	Agrícola, industrial y jardinería	80
13	Diclorvós	Insecticida	II	Organofosforado	Agrícola, pecuario, doméstico, urbano e industrial	65
14	Diurón	Herbicida	IV*	Derivado de la urea	Agrícola e industrial	64
15	Imidacloprid	Insecticida	IV	Imida	Agrícola, industrial, pecuario y urbano	60
16	Hidróxido cúprico	Fungicida	IV	Inorgánico	Agrícola	53
17	Carbofuran	Insecticida- Nematicida	II	Carbamato	Agrícola e industrial	47

18	Endosulfan (**)	Insecticida Acaricida	II	Organoclorado	Agrícola e industrial	47
19	Bromadiolona	Rodenticida	I	Cumarina	Agrícola	40
20	Abamectina	Insecticida Acaricida	II	Pentaciclina	Agrícola, pecuario, doméstico, industrial	37
21	Metomilo	Insecticida	II	Carbamato	Agrícola, doméstico, pecuario, urbano e industrial	37
22	Monocrotofós	Insecticida Acaricida	II	Organofosforado	Agrícola e industrial	36
23	Bifentrina	Insecticida Acaricida	III	Piretroide	Agrícola, jardinería, urbano e industrial	33
24	Lambda cyalotrina	Insecticida	III	Piretroide	Agrícola, pecuario, urbano	32
25	Tetrametrina	Insecticida	IV*	Piretroide	Industrial y pecuario	32
26	Propoxur	Insecticida	III	Carbamato	Pecuario, urbano, industrial	30
27	Fenvalerato	Insecticida	III	Piretroide	Agrícola e industrial	28
28	Carbendazim	Fungicida	IV*	Benzimidazol	Agrícola, urbano e industrial	27
29	Trifluralina	Herbicida	IV*	Nitrosamina	Agrícola	27
30	Acefate	Insecticida	IV	Organofosforado	Agrícola, pecuario e industrial	26
Total						2179
Resto de los PAP						961
Total de los PAP						3140

(*) Autorizaciones que cuentan con registros con vigencia indeterminada, en revisión o vigentes en el momento de la consulta del Catálogo de Plaguicidas, de COFEPRIS al 19 de septiembre de 2018.

(**) También se clasifica como del grupo de los neonicotinoides según otras fuentes.

2.3. Herbicidas

Tal como afirma (Albert, 2013), los herbicidas son sustancias usadas con el fin de destruir o controlar el crecimiento de las malezas o hierbas que se consideran indeseables, principalmente en la agricultura, porque causan problemas al competir con el cultivo por agua, nutrimentos, luz y espacio o por la fitotoxicidad de algunas de ellas en la producción de alimento, principalmente, cuyo empleo ha sustituido las prácticas de eliminación manual o mecánica de hierbas, todo lo cual causa un incremento del costo de la cosecha y la disminución de su valor.

El abuso en el uso de herbicidas o la utilización de sustancias reguladas e inclusive prohibidas por los gobiernos de diferentes países (México, Brasil, Venezuela), provocan una interacción negativa con la planta, suelo y aguas subterráneas del área donde se están aplicando. Algunos plaguicidas según su estructura y características fisicoquímicas persisten en el ambiente, propiciando con ello la acumulación en agua y suelo principalmente subiendo por la cadena trófica y llegando hasta los seres humanos (Jaramillo *et al.*, 2009).

La contaminación ambiental también puede llevar a la exposición humana debido al consumo de restos de plaguicidas en los alimentos y, posiblemente, en el agua potable. Si bien los países desarrollados cuentan con sistemas para registrar los plaguicidas y controlar su comercialización y uso (USA, Alemania), esto no siempre sucede en otros casos (WHO, 1994).

Tabla 6. Clasificación de los herbicidas (Albert, 2013. Modificado por Solís G.)

Función	No selectivos
	Selectivos
Modo de acción	De contacto
	De translocación (sistémicos)

Momento de aplicación	De preemergencia
	De emergencia
	De post-emergencia
Constitución química	Inorgánicos
	Orgánicos

2.3.1. Organofosforados

El glifosato es uno de los fosfonatos, los cuales son compuestos estructuralmente similares a los organofosforados, excepto en que está ausente un átomo de oxígeno de los cuatro que rodean el fósforo, siendo reemplazado por un grupo orgánico (en este caso el aminoácido simple llamado glicina; **Figura 3**) (Baird, 2001).

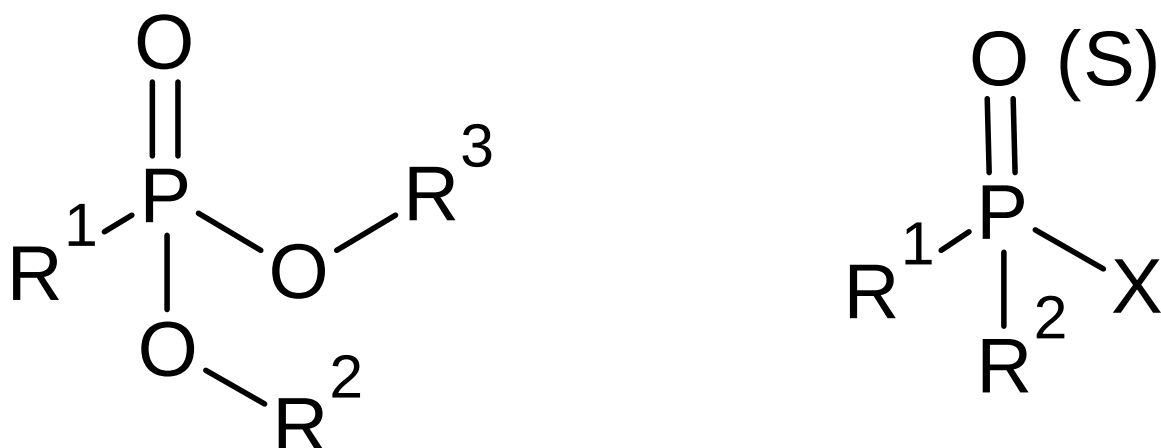


Figura 3. Estructura base de un fosfonato (izquierda) y estructura base de un organofosforado (derecha).

2.3.1.1. Glifosato

El glifosato [N-(fosfonometil) glicina] es un herbicida no selectivo con actividad sistémica de post emergencia (Barbosa y Aiassa, 2017). Fue sintetizado en 1970 por un grupo de científicos de MONSANTO dirigidos por el doctor J. Franz (Baird *et al.*, 2001).

El glifosato es un ácido pero es más comunmente usado en la forma de sal isopropilamina (**Figura 4**) (Nivia, 2001; Eslava *et al.*, 2003). Este puede ser también disponible como sal de trimesium, difenilamina, monoamonio (APVMA, 1996), trimetilsulfonio o ácido y es generalmente distribuido como polvo y concentrado soluble en agua. La sal de isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina tiene un peso molecular de $228.18 \text{ g mol}^{-1}$, además de ser un herbicida no selectivo, como se mencionó anteriormente, es un herbicida sistémico de acción foliar, es decir, que ingresa a la planta a través de las hojas para después migrar a otras partes del tejido vegetal donde será mínimamente metabolizado (COFEPRIS, 2016).

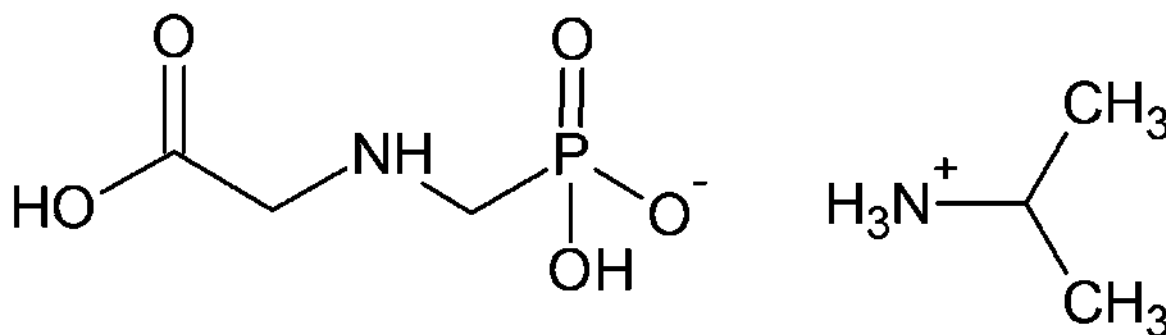
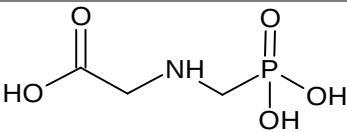


Figura 4. Sal de Isopropilamina de Glifosato

Carlisle y Trevors (1998) se refieren al glifosato como un herbicida sistémico no selectivo de amplio espectro que mata o suprime muchos tipos de pasto, hierbas, vides, arbustos y árboles. Es una sustancia de baja persistencia y limitada potencialidad de bioacumulación y toxicidad sobre organismos no blanco. Estos autores comentan que, su uso masivo y extendido necesita una evaluación constante de corto, mediano y largo plazo, referente a sus potenciales efectos nocivos sobre la salud humana y el ambiente, comprendiendo las interacciones entre organismos, la posible pérdida de hábitats en agroecosistemas, así como su interacción con otros agroquímicos. Sus propiedades físico-químicas se presentan en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Identidad, propiedades físicas y químicas del glifosato
(http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph_ps/pro/eva/existing/list1_glyphosate_en.pdf).

Nombre común (ISO)	Glifosato	
Nombre químico (IUPAC)	N-(fosfonometil) glicina	
Pureza mínima	950 g Kg ⁻¹	
Fórmula molecular	C ₃ H ₈ NO ₅ P	
Masa molecular	169.08 g mol ⁻¹	
Fórmula estructural		
Punto de fusión	189.5 °C (999 g Kg ⁻¹)	
Punto de ebullición	Descomposición	
Apariencia	Cristal incoloro	
Densidad relativa	1.075 (995 g Kg ⁻¹)	
Presión de vapor	1.31 x 10 ⁻⁵ Pa (25 °C ácido)	
Constante ley de Henry	2.1 x 10 ⁻⁷ Pa m ³ mol ⁻¹	
Solubilidad en agua	pH 2: 10.5 ± 0.2 g L ⁻¹ (20 °C, 995 g Kg ⁻¹)	
Solubilidad en solventes orgánicos	Acetona	0.078 g L ⁻¹
	Diclorometano	0.233 g L ⁻¹
	Etilacetato	0.012 g L ⁻¹
	Hexano	0.026 g L ⁻¹
	Metanol	0.231 g L ⁻¹
	n-octanol	0.020 g L ⁻¹
	Propan-2-ol	0.020 g L ⁻¹
	Tolueno	0.036 g L ⁻¹
Coeficiente de partición (log P_{ow})	pH 5 – 9: -3.2 a 25 °C (999 g Kg ⁻¹)	
Estabilidad hidrolítica (DT₅₀)	pH 5: estable (25 °C)	
	pH 7: estable (25 °C)	
	pH 9: estable (25 °C)	
Constante de disociación	Pka: 2.34 (20 °C), 5.73 (20 °C) 10.2 (25 °C)	

Flamabilidad	No altamente inflamable
Propiedades explosivas	No explosivo
Absorción UV/VIS (máx.)	0.086 (265 nm)
Fotoestabilidad en agua (DT₅₀)	33 d (pH 5), 69 d (pH 7), 77 d (pH 9) (lámpara de xenón)
Coefficiente de absorción (g g⁻¹)	24,000 (estimado)

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

El herbicida es degradado en el suelo por acción principalmente bacteriana a su metabolito el ácido aminometil-fosfónico (AMPA) (Figura 5) y dióxido de carbono (Sprankle *et al.*, 1975; Rueppel *et al.*, 1977; Mueller *et al.*, 2003). El AMPA también es tóxico y algo más móvil en el suelo, pero se descompone rápidamente, lo cual resulta en la lixiviación de cantidades mínimas en los suelos destinados a la agricultura normal (CONICET, 2009).

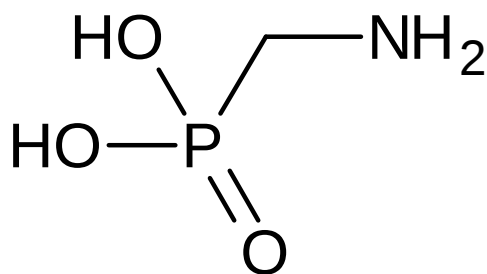


Figura 5. Ácido aminometil-fosfónico (AMPA) (Zavitsanos *et al.*, 2006; modificado por Solís G.)

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

El glifosato se encuentra entre los herbicidas altamente peligrosos con mayor número de registros autorizados en México, 110 registros autorizados para uso urbano, en jardinería, para uso industrial en plantas formuladoras y uso agrícola. En este último para la destrucción de arvenses de los cultivos de maíz, frijol, trigo, cítricos, tomate, vid, sorgo y papa, entre otros. Es comercializado bajo los nombres de Aquamaster, Faena, La Fam (**Figura 6**), Mamba, Sankill, Glyfos, Roundup y Ramrod en presentaciones de concentrado soluble, gránulo soluble, líquido soluble, polvo soluble, solución concentrada y solución acuosa las cuales se expenden en concentraciones de 350 a 720 g i. a. L⁻¹ Kg⁻¹ (COFEPRIS, 2016; Bejarano *et al.*, 2017).



Figura 6. Fórmula comercial de glifosato (La Fam)

La comercialización del glifosato se autoriza a 45 empresas. Entre ellas destaca la transnacional Monsanto con 20 registros con vigencia indeterminada que incluye

autorizaciones para uso agrícola, control de “malezas” en áreas urbanas e industriales, control de lirio acuático, en vías de comunicación, en jardinería y en productos destinados exclusivamente para exportación. Otras empresas que comercializan herbicidas con glifosato en México son: las trasnacionales Dow, FMC y Syngenta, y empresas formuladoras nacionales como Agricultura Nacional, Agri-Estrella, Agroquímicos Versa, Polaquimia, Química Agrícola de Morelos, Similia Defensivos Agrícolas y Velsimex, entre otras (COFEPRIS, 2016).

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

El glifosato es el herbicida de mayor uso en el mundo, en más de 150 cultivos. En 1974 fue patentado como herbicida por la empresa transnacional Monsanto e introducido al mercado con la marca Roundup. Aunque la patente del glifosato venció en 1991, sigue siendo rentable para dicha transnacional (a pesar de la competencia de otras empresas que pueden producirlo y formularlo) debido a que es parte del paquete tecnológico de Monsanto en los cultivos modificados genéticamente tolerantes a este herbicida, en las variedades “Roundup Ready” usadas principalmente en soya, pero también en algodón, maíz, canola, alfalfa, sorgo, y recientemente promovido en trigo (Bejarano *et al.*, 2017).

El uso intensivo y repetido de glifosato ha provocado la resistencia en 22 especies de “malezas” en 27 países (Watts *et al.*, 2016), incluyendo Brasil y Argentina, donde el uso de soya transgénica ha tenido un crecimiento espectacular en las últimas décadas. La resistencia al glifosato y a los herbicidas en general también se presenta con su uso continuo en cultivos no modificados genéticamente. Es decir, las plantas consideradas como “malezas” desarrollan una capacidad natural heredable por la cual sobreviven a dosis del herbicida que antes eran letales.

En México se ha documentado cómo la expansión de soya transgénica tolerante al glifosato está causando la contaminación de los mantos freáticos en Campeche, donde se han encontrado residuos del herbicida en agua potable, orina y sangre de residentes de comunidades campesinas vecinas a los lugares donde se usa (Rendón, 2015; Chim, 2016).

En 2015 la Agencia Internacional de Investigación de Cáncer (IARC) de la OMS (Organización Mundial de la Salud) reclasificó al glifosato como probable carcinógeno para el ser humano (grupo 2A). La evaluación realizada por un grupo de trabajo de 17 expertos de 11 países de la IARC concluye que hay “evidencia limitada” en humanos y “suficiente evidencia” en la experimentación con animales, así como en “fuerte evidencia” de los dos mecanismos de acción asociados con la carcinogenicidad: la genotoxicidad y la habilidad de causar estrés oxidativo (IARC, 2015). Sin embargo, meses más tarde la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA por su sigla en inglés) publicó la decisión de que era poco probable que el glifosato fuera carcinógeno en humanos, y que la evidencia no apoya su clasificación como potencial carcinógeno, en contradicción con la conclusión de la IARC (EFSA, 2015). CropLife América Latina y Monsanto dieron la bienvenida a la evaluación de la EFSA y criticaron la clasificación de la IARC (Rodríguez, 2015).

El mecanismo de acción del glifosato es por medio de la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas (triptófano, fenilalanina y tirosina) mediante la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSPS), con lo que se reduce la producción de proteína y el desarrollo de ésta (**Figura 7**). El descontrol en la catálisis por la enzima EPSPS en el penúltimo paso en la vía del shikimato, reduce también la biosíntesis de otros compuestos tales como tetrahidrofolato, ubiquinona y vitamina K (Eslava et al., 2007).

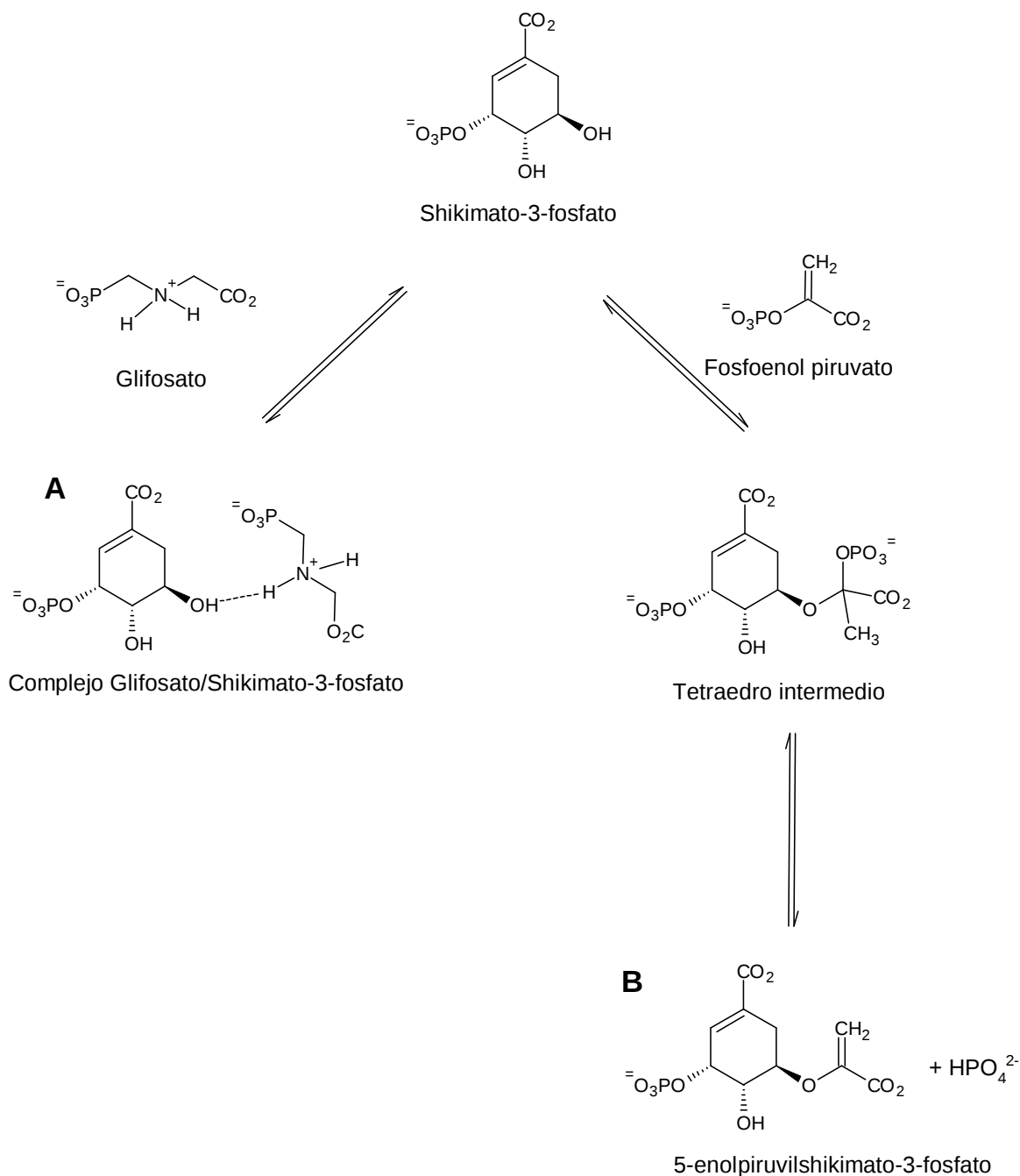


Figura 7. Vía del Shikimato. Al ingresar el glifosato en esta vía inhibe la acción de la enzima EPSPS formando el complejo Glifosato/Shikimato (A); en la ruta normal actúa el fosfoenol piruvato y la enzima EPSPS (B). (Monheit, 2003. Modificado por Solís G.)

La inhibición de la EPSPS causa una escasez de proteínas (**Figura 8**), y consecuentemente la muerte de la planta. Como la vía del ácido shikímico no se encuentra en vertebrados, varios científicos y muchos reguladores asumen que el glifosato es seguro para mamíferos,

incluyendo humanos (Williams *et al.*, 2000; Aparicio *et al.*, 2013; Vera *et al.*, 2014; Mesnage *et al.*, 2015; Myers *et al.*, 2016).

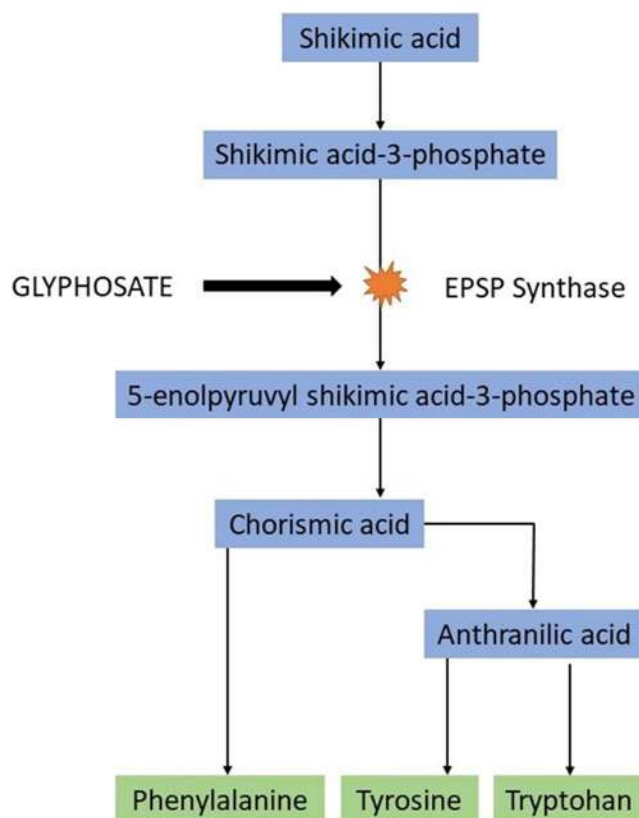


Figura 8. Inhibición de la enzima EPSPS (Glyphosate facts, 2013).

El uso de herbicidas basados en glifosato (La Fam), afecta la calidad del agua y a organismos no diana, modificando con esto la estructura y funcionalidad de ecosistemas acuáticos. Estas alteraciones incluyen: retardo en el crecimiento de organismos como algas y peces, inhibición de la eclosión en erizos, cambios histopatológicos en branquias de peces como proliferación de células filamentosas e hiperplasia celular, vacuolización de hepatocitos y picnosis nuclear en hígado y en riñón, dilatación del espacio de Bowman y acumulación de gotas de hialina en las células del epitelio tubular de peces, alteraciones de parámetros enzimáticos como acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa, carboxilesterasa y glutatión S-transferasa (GST), alteración de la actividad sexual y de transaminasas en peces (TGO, TGP), así como distorsiones metabólicas, hematológicas y bioquímicas de algunos órganos y constituyentes de tejidos como lípidos totales, glucosa, entre otros. Dichas alteraciones dependen de la especie u organismo, tipo de compuesto, la concentración de

glifosato en agua y el tiempo de exposición (Jiraungkoorskula *et al.*, 2002; Frontera *et al.*, 2011; Lajmanovich *et al.*, 2011).

Por otra parte, Goldsborough y Beck (1989), afirman que el glifosato se degrada rápidamente de las aguas superficiales de sistemas lénticos (estáticos, lagos o lagunas), y sugiere que las principales formas de pérdida de glifosato en la columna de agua se deben a la adsorción por el sedimento y a la biodegradación. Mann y Bidwell (1999), determinaron que la isopropilamina de glifosato es prácticamente no tóxica al no presentarse mortalidad entre los renacuajos (*C. insignifera*) y mencionan la importancia de evaluar la persistencia de los componentes surfactantes en las formulaciones comerciales de glifosato debido a que este factor, es el principal contribuyente de su toxicidad aguda; en el caso del surfactante POEA (polioxietilenamina) utilizado en Roundup se espera que este, sea removido rápidamente de la columna de agua, no obstante, su vida media es de varios días o semanas en sistemas lénticos.

La Comisión Europea intentó que se aprobara una reautorización del glifosato por 15 años en la Unión Europea, basada en el visto bueno de la EFSA, pero no obtuvo el consenso para lograr una mayoría calificada en el Comité Permanente de Plantas Animales y Piensos compuesto por oficiales de los ministerios relacionados con la seguridad alimentaria o agricultura de los gobiernos. Ante esta negativa, y basada en nuevas recomendaciones de dicho Comité, la Comisión Europea optó por extender la licencia de uso del glifosato en la Unión Europea por 18 meses, hasta finales de 2017, a la espera de un nuevo estudio sobre su toxicidad elaborado por la Agencia Europea de Sustancias Químicas (ECHA) y, mientras tanto, impuso ciertas restricciones al glifosato (comitology.eu Núm. 28 june 2016; Europa Press 29 junio 2016). La Comisión Europea ha prohibido el uso del surfactante POEA (tallowamina polietoxilada o amina de sebo polietoxilada) usado por décadas en las formulaciones de glifosato; recomienda que el glifosato se ajuste a “las buenas prácticas agrícolas” en su uso previo a la cosecha, como desecante por ejemplo, y restringe su uso en parques y lugares públicos; además establece que se ponga atención especial a la protección de las aguas subterráneas en zonas vulnerables, sobre todo en los usos no agrícolas, del herbicida (UE, 2016).

Sri Lanka es el único país que ha prohibido totalmente el glifosato en todos sus usos; también ha habido intentos para lograr su prohibición en El Salvador (Bejarano *et al.*, 2017).

2.4. Aplicación de los bioensayos

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

El conocimiento de la toxicidad de las sustancias sólo puede obtenerse, aparte de las previsiones teóricas, por dos vías: estudios retrospectivos de casos de intoxicación y ensayos experimentales con animales y plantas. Sólo en muy contadas ocasiones se efectúa experimentación con seres humanos, debido a las implicaciones éticas y legales que ello ocasiona; de estudios retrospectivos sobre intoxicaciones ocurridas en humanos se obtienen los datos de ‘toxicidad humana estimada’ (Repetto, 1988).

Los estudios toxicológicos con plantas están promovidos no sólo en interés de los productos fitosanitarios y del conocimiento de la fitotoxicidad de productos de uso agrícola (y sus frecuentes contaminaciones), sino también por la necesidad de conocer el metabolismo, transformación, y retención de las sustancias tóxicas por los vegetales de consumo animal o humano (Riva, 1991).

Algunas técnicas utilizan plantas inferiores para el análisis toxicológico, como la desarrollada por Repetto y Sanz (1977) para la detección de herbicidas en sangre de intoxicados, u otras muestras mediante cultivos de algas en placas de agar, al estilo de los antibiogramas. Sobre placas de agar sembradas con microalgas se colocan pequeños discos de material sospechoso. Algunos compuestos inducen la aparición de halos de inhibición del crecimiento del cultivo, mientras que otros como los herbicidas hormonales, etcétera, estimulan el crecimiento por lo cual se originan halos de gran densidad (Riva, 1991).

El diseño de los bioensayos para la predicción del riesgo de la presencia de xenobióticos (sustancia extraña) en el medio ambiente, se hará teniendo en cuenta los fines que se persigan, según se pretenda conocer la cinética, la toxicidad o las interacciones que puedan producirse (Riva, 1991).

La mejor información sobre las relaciones concentración y respuesta de los compuestos químicos en el medio es sin lugar a duda la CL_{50} , expresando los efectos letales a corto plazo. Puesto que hay muchas dificultades en el mantenimiento y cultivo de organismos, la mayoría de los ensayos se realizan con un número limitado de especies las cuales son fáciles de mantener, de manipular y de cultivar en el laboratorio (Bayne, 1986).

Existen criterios que nos pueden ayudar a la selección de las pruebas biológicas que podemos utilizar en el laboratorio para la evaluación de sustancias tóxicas como las enlistadas en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Criterios para la selección de pruebas biológicas en el laboratorio para la evaluación toxicológica (Ramírez & Mendoza, 2008)

Factibilidad	- Bajo costo - Materiales y reactivos disponibles en la localidad - Tiempo máximo de desarrollo (5 días) - Procedimiento de prueba simple - Facilidad en la evaluación de la respuesta a medir
Organismos	- Fácil obtención - Fácil mantenimiento - Representatividad ecológica: de un grupo funcional, grupo taxonómico (bacterias, peces, insectos, etc.), ruta de exposición (dérmica, ingestión, branquial, combinadas, etc.) - Con información sobre su sensibilidad a compuestos tóxicos (base de datos) - Respuesta relevante a los compuestos tóxicos - Sensibilidad a bajas concentraciones, a una amplia variedad de compuestos tóxicos - Información sobre su biología

Pruebas	- Condiciones presentes en los ecosistemas mexicanos (temperatura, salinidad, dureza, etc.) - Concentraciones químicas reales en el medio ambiente - Técnicamente seguros y no contaminantes - Posibilidad de ser estandarizada - Buena exactitud y precisión analíticas - Significado ecológico de los resultados - Requerimientos mínimos de sobrevivencia/reproducción en pruebas y testigos - Comprobación de concentraciones nominales - Sensibilidad y replicación (depende del número de réplicas por concentración, nivel de significancia establecido y tipo de análisis estadístico que se lleve a cabo)
----------------	--

2.5.Bioindicadores

Los indicadores biológicos (bioindicadores) pueden ser definidos como especies particulares o comunidades de éstas, las cuales, por su presencia, proporcionan información sobre el entorno físico y químico circundante en un sitio en particular. Además de la presencia diagnóstica de especies indicadoras, el tamaño de las células también puede ser usado para monitorear las condiciones ambientales en los lagos y humedales (Bellinger y Sigeo, 2015).

La denominación de una especie como indicadora requiere de conocimiento previo respecto a su composición comunitaria bajo condiciones normales, incluyendo el ciclo de vida de las especies, su estacionalidad y sus variaciones naturales, de manera que sea posible comparar las condiciones antes y después de una perturbación ambiental (Raz-Guzmán, 2000).

El concepto de organismo indicador se refiere a especies seleccionadas por su sensibilidad o tolerancia (normalmente es la sensibilidad) a varios parámetros. Usualmente los biólogos emplean bioindicadores de contaminación debido a su especificidad y fácil monitoreo

(Washington, 1984). Odum (1972), define a los organismos indicadores como la presencia de una especie en particular, que demuestre la existencia de ciertas condiciones en el medio, mientras que su ausencia es la consecuencia de la alteración de tales condiciones.

Roldán (1999) menciona que no se dispone de bioindicadores que cumplan con las características ideales requeridas y que sólo unos pocos organismos podrían estrictamente llenar estos requerimientos.

2.5.1. Bioindicadores y calidad del agua

Se considera que un organismo es un indicador de calidad de agua, cuando este se encuentra invariablemente en un ecosistema de características definidas y cuando su población es porcentualmente superior o ligeramente similar al resto de los organismos con los que comparte el mismo hábitat (Roldán, 1999).

Así como lo afirma Roldán (1999), para poder definir un bioindicador que servirá para conocer la calidad del agua, primeramente, es necesario conocer la flora y fauna acuática de la región motivo de estudio. Por ejemplo, para regiones templadas como Europa y Estados Unidos ya existen organismos plenamente identificados hasta nivel de especie con su valor y peso indicativo, al igual que en regiones de América como México bajo pruebas estandarizadas (NMX-AA-110-SCFI-1995).

Las algas de agua dulce proporcionan dos principales tipos de información acerca de la calidad del agua (**Figura 9**) (Bellinger y Sigeo, 2015):

- Información a largo plazo. En el caso de un lago templado, por ejemplo, la detección de una intensa floración en verano de colonias del microalga verde-azul *Microcystis* es indicativo de la preexistencia de un alto grado de nutrientes (eutrófico).
- Información a corto plazo, cambio ambiental. En un caso diferente de un lago, la detección del cambio en los años subsecuentes desde un bajo a un alto dominio de microalgas verde-azules (con incremento de biomasa algal) puede indicar un cambio en el estado eutrófico. Esta puede ser una transición adversa (posiblemente causada por actividad humana) que requiere de cambios en la gestión de prácticas y en la restauración del lago.

En un contexto de cambio, los bioindicadores pueden servir como marcadores de advertencia tempranos que reflejan el estado de ‘salud’ de un sistema acuático (Bellinger & Sigeo, 2015).

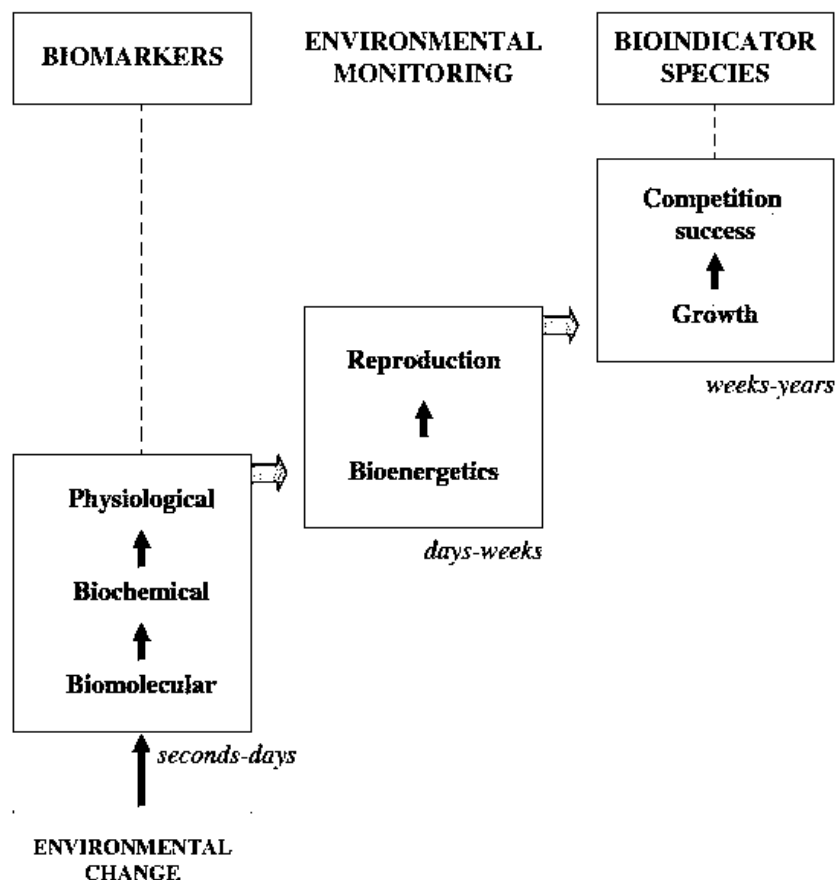


Figura 9. Respuestas jerárquicas de las algas al cambio ambiental, como alteraciones en la calidad del agua. Los cambios en el tiempo de respuesta relacionan a los aspectos de la comunidad algal como suborganismos (izquierda), individuos (en medio) y poblaciones (derecha). El monitoreo ambiental de la respuesta de las algas puede ser sustentado por el nivel de especies biomarcadoras o bioindicadoras (Adams, 2005).

Las principales fuentes de perturbaciones causadas en los ecosistemas acuáticos por el hombre están relacionadas con la contaminación de origen doméstico, industrial, agrícola, minero y deforestación, como las más importantes. Estas perturbaciones pueden resumirse de la siguiente manera:

Directo del lecho del río

- Regulación del flujo y desviación

- Destrucción del hábitat: dragado, revestimiento, canalización, construcción de presas
- Alteración de la temperatura, del pH, salinidad
- Vertimiento de agua servidas
- Vertimiento de tóxicos (metales pesados, pesticidas)
- Elementos radiactivos
- Manipulación de la cadena alimenticia (especies exóticas)

Indirecto

- a) En el área de captación:
 - Prácticas forestales (erosión, arrastre de sedimentos)
 - Quemas
 - Construcción de vías
 - Substracción de agua y canales de desvío
 - Contaminación del aire
 - Prácticas agrícolas
- b) En la zona riparia
 - Insolación (efectos de la productividad primaria)
 - Alteración de la temperatura del agua
 - Dinámica de nutrientes
 - Aportes alóctonos
 - Dinámica de los sedimentos
 - Morfología del cauce

Los anteriores impactos pueden medirse y cuantificarse mediante el uso de bioindicadores cuyo valor y peso indicativo debe previamente definirse (Roldán, 1999).

2.5.2. Microalgas verde-azules como bioindicadores

El fitoplancton responde rápidamente los cambios ambientales por su ciclo de vida corto. Estos cambios alteran la estructura de sus comunidades, repercute en el interés socioeconómico del sistema acuático en tiempos relativamente cortos, sobre todo por su papel de productores primarios. Algunas algas microscópicas del fitoplancton muestran una

distribución amplia, otras, ciertas preferencias ambientales, y unas terceras alta frecuencia de taxón en aguas fuertemente contaminadas, lo que sugiere su tolerancia por algún compuesto químico o bioquímico. Si algún taxón se reconoce como cosmopolita diferenciado, puede evidenciarse cualquier cambio físico o químico en las masas de agua al ocurrir una alteración por contaminantes (Vázquez *et al.*, 2006).

El fitoplancton puede adquirir mayor resistencia o tolerancia a diversas sustancias, por ejemplo fertilizantes, e incrementar su desarrollo y abundancia repercutiendo en la eutroficación de las aguas, donde ciertas especies muestran el estado trófico de arroyos, ríos y lagos (De la Lanza *et al.*, 2000).

Existen muchos ejemplos de algas microscópicas para inferir sobre la calidad de los ambientes acuáticos, éstas permiten conocer las fluctuaciones en las masas de agua, lo que ha permitido trascender en la caracterización de especies tolerantes o afines a la materia orgánica y en su capacidad de descomponerla (**Figura 10**) (Vázquez *et al.*, 2006).



**Figura 10. Diversas especies de fitoplancton (Tomado de:
<https://clotdegalyany.es/ver/fitoplancton/>)**

Al igual que con otros grupos algales, la presencia o ausencia de especies en particular puede ser un indicador útil del estado ecológico (**Tabla 9**). La presencia dominante de colonias fitoplanctónicas verde-azules en lagos proporciona un indicador útil de un estado alto de nutrientes donde estas algas son un componente clave de varios índices tróficos. Por el contrario, las poblaciones de algas verde-azules planctónicas unicelulares son indicativo de condiciones oligotróficas a mesotróficas. En corrientes, la abundancia relativa de bentónicos verde-azules fijadores de N₂ (heterocystous) puede ser usada para un rápido biomonitoreo de nutrientes (concentración de nitrógeno) (Bellinger y Sigeo, 2015).

Tabla 9. Diversidad ecológica de Algas verde-azules de agua dulce (Bellinger y Sigeo, 2015)

Ecosistemas	Condiciones específicas	Algas bentónicas	Algas planctónicas
Aguas inmóviles, lagos y estanques	Mesotrófico a eutrófico	<i>Gloeotrichia</i> : Adjunto a sustratos. Separado de colonias planctónicas	Colonias verde-azules: <i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i>
	Oligotrófico		Verde-azules unicelulares: <i>Synechococcus</i>
	Aguas duras y blandas Lagos ácidos	<i>Cylindrospermum</i> : a menudo formando parches oscuros en vegetación sumergida	<i>Aphanothece</i> <i>Tolypothrix</i> : Planctónico o en vegetación sumergida
Humedales	Aguas blandas, común en lodazales	<i>Chroococcus</i> – Adjunto a sustratos, mezclado con marañas de algas filamentosas o de libre flote <i>Merismopedia</i> – típico de comunidades de lodazales	<i>Aphanocapsa</i>
Aguas móviles, corrientes y ríos	Agua abierta en lodazales Bajas concentraciones de N, alta proporción N:P	Alfombrilla bentónica: <i>Nostoc</i> , <i>Calothrix</i> (Stancheva <i>et al.</i> , 2013)	<i>Oscillatoria rubescens</i>
Ambientes extremos			
Lagos polares, estanques, suelos	Baja temperatura, baja luminosidad (cubierta de hielo)	Alfombrilla bentónica: <i>Calothrix</i> , <i>Phormidium</i> . <i>Leptolyngbya</i> (Martineau <i>et al.</i> , 2013)	
Manantiales	45 °C o mayor	<i>Mastigocladus laminosus</i> <i>Oscillatoria</i> (pigmentada) (Darley, 1982)	<i>Synechococcus lividus</i> (Stal., 1995)
Aguas salobres, lagos salinos	Rango de salinidad		<i>Aphanothece halophytica</i> (Yopp <i>et al.</i> , 1978)
Combustible nuclear gastado, estanques de almacenamiento	Alta radioactividad, rango de radionucleidos incluidos ¹³⁷ Cs y ⁶⁰ Co	Biopelícula dominada por <i>Leptolyngbya</i> (Evans, 2013)	

Los cambios en la población de colonias verde-azules en lagos y estuarios podrían también actuar como un indicador del cambio climático. Un incremento en las floraciones de *Microcystis* en la bahía de San Francisco (USA), por ejemplo, fue predicho debido al

incremento de las temperaturas y el bajo flujo de corrientes durante la creciente incidencia de las sequías (Lehman *et al.*, 2013).

2.6. Cianobacterias

Las cianobacterias son microorganismos procariotas Gramnegativas que fueron originalmente referidas como “microalgas verde-azules”. Estos microorganismos son muy estrechamente relacionados a las bacterias en términos de estructura celular, con núcleo no definido u organelos presentes unidos a la membrana. Las cianobacterias tienen una pared celular que contiene peptidoglicano que es frecuentemente rodeado por una envoltura mucilaginoso. Dentro de la pared celular se encuentra una membrana celular típica. Generalmente, las cianobacterias son más grandes que otras bacterias, variando en tamaño desde 1 μm para tipos unicelulares, hasta 30 μm para especies multicelulares (Singh y Montgomery, 2011).

Las cianobacterias son fotoautótrofas, lo que significa que usan la energía lumínica en la fotosíntesis (principalmente por clorofila-a) en orden de generar su material celular de carbón, y durante el proceso producirá oxígeno. Otras especies también pueden crecer heterotróficamente usando compuestos orgánicos como fuente de carbono (Halm *et al.*, 2011). Bajo condiciones ricas de fósforo (P) y nitrógeno (N), las cianobacterias absorben y después, intracelularmente, guardan estos componentes; una propiedad que ha evolucionado durante millones de años para permitirles explotar condiciones ambientales extremas (Shi *et al.*, 2003; Llácer *et al.*, 2008).

Algunas cianobacterias producen vacuolas proteínicas de gas que les permiten flotar en ambientes acuáticos. Estas vacuolas son cilíndricas y selladas con cubiertas cónicas (Hayes, 1988).

Es importante destacar que las cianobacterias pueden crecer prolíficamente bajo condiciones adecuadas, generando así las llamadas ‘blooms’ algales (en español, floraciones) en lagos de agua dulce eutrófica y pantanos (Reichwaldt y Ghadouani, 2012). Un gran número de metabolitos secundarios producidos por cianobacterias son potencialmente tóxicos y, durante las floraciones algales, puede conducir a efectos nocivos tanto a la ecología local como también a la salud de animales y humanos (Percival y Williams, 2014).

Las cianobacterias tienen un rol crucial como componente significativo del ciclo del nitrógeno como productoras primarias en muchas áreas en el océano (van den Hoek *et al.*, 1995). Algunas cianobacterias son observadas en muchos entornos extremos como aguas termales, lagos salados y biotopos expuestos a alta radiación solar (Cronberg y Annadotter, 2006).

La fijación de nitrógeno es el proceso de reducción del gas nitrógeno a través de la acción del complejo enzimático nitrogenasa. El nitrógeno, además de ser altamente abundante en el ambiente, es altamente inerte y, por lo tanto, su conversión a un producto de nitrógeno que se puede incorporar en el material celular y sus procesos requiere reducción (Postgate, 1998). Los géneros de cianobacterias que son reconocidas por ser capaces de fijar nitrógeno incluyen *Anabaena*, *Aphanizomenon* y *Gloeotrichia*. Los géneros *Microcystis*, *Coelosphaerium* y *Oscilhtoria* parecen no poder fijar nitrógeno (Percival y Williams, 2014).

Una gama de cianotoxinas puede ser producida por cianobacterias y estas pueden ser concebidas como neurotoxinas (*e. g.* anatoxina-a, saxitoxina y neosaxitoxina; Wiese *et al.*, 2010), hepatotoxinas (*e. g.* microcistinas, nodularinas y cilindrospermopsina; Labine y Minuk, 2009), toxinas tumorígenas (*e. g.* microcistinas; Zegura *et al.*, 2011), y toxinas que son irritantes afectando la piel y el tracto gastrointestinal (*e. g.* lipopolisacáridos; Stewart *et al.*, 2006). Las cianotoxinas, normalmente, son generadas intracelularmente y después, generalmente, liberadas al ambiente cuando las células se lisan (Percival y Williams, 2014).

Las cianobacterias no son agentes infecciosos por sí solos, sin embargo, algunas especies producen toxinas durante las floraciones algales, las cuales son activadas por enriquecimiento de nutrientes de aguas naturales y efluentes industriales (Percival y Williams, 2014). Existen cerca de 25 especies de cianobacterias asociadas con efectos adversos a la salud (Gold *et al.*, 1989).

El primer registro de floraciones algales fue en el siglo XII en Lake Llangors en Gales, RU. Desde entonces, floraciones algales tóxicas han sido reportadas en varias partes de Europa, USA, Australia, África, Asia y Nueva Zelanda. Un estudio en el Reino Unido encontró que 75% de las floraciones algales contienen toxinas (Baxter, 1991).

Dentro de las floraciones algales, quizá las toxinas más frecuentemente encontradas son las microcistinas además, son las toxinas con mayor frecuencia vinculadas con incidencias de envenenamiento animal y humano. El problema de las microcistinas se ve agravado por su alto grado de estabilidad química dentro del agua en amplios rangos de temperaturas y pH (Percival y Williams, 2014).

Las dos principales categorías de toxinas producidas por cianobacterias son las neurotoxinas y las hepatotoxinas. Las observaciones de envenenamiento de animales domésticos muestran que, cuando las membranas mucosas son expuestas a neurotoxinas cianobacteriales, los síntomas se desarrollan de 4-10 minutos y la muerte dentro de 30 minutos. Los efectos de las hepatotoxinas pueden causar síntomas en animales expuestos dentro de 30 minutos y la muerte dentro de 24 horas. Usando veneno de cobra como punto de referencia, las neurotoxinas alcaloides producidas por especies de *Anabaena flos-aquae* y *Nodularia spumigena* pueden ser igual de potentes, con 20 pg por kg de peso corporal siendo la dosis letal (DL_{50} de 200 pg kg⁻¹). Las hepatotoxinas producidas por *Microcystis aeruginosa* y algunas cepas de *Aphanizomenon flos-aquae* son de hecho dos veces más potentes que el veneno de cobra con 9 pg kg⁻¹ siendo la DL_{50} . Se ha encontrado que cierto número de estas toxinas son promotores tumorales y oncogénicos en animales de laboratorio. Una de las toxinas aisladas de *Microcystis aeruginosa* afecta el sistema cardiovascular y produce lesiones en los hígados de una variedad de animales de laboratorio cuando les es administrado por vía oral o por inyección intraperitoneal (Percival y Williams, 2014).

El control de las cianobacterias es un problema, las investigaciones han demostrado que las toxinas pueden permanecer potentes por días, incluso después de que los microorganismos han sido destruidos por cloración y tratamiento con sulfato de cobre (El Saadi *et al.*, 1995).

Ya que las cianobacterias no dependen de una fuente fija de carbono, están distribuidas ampliamente a lo largo de ambientes acuáticos. Sus hábitats incluyen aguas dulces, ambientes marinos y algunos suelos. De hecho, las cianobacterias se encuentran en los estadios tempranos de la formación del suelo, siendo asociadas con su conversión o descomposición. El agua estancada, los sedimentos y el suelo parecen ser los reservorios significantes de estos organismos. En el ambiente, las cianobacterias muestran una ventaja selectiva sobre

eucariotas, debido a la habilidad de fijar nitrógeno bajo condiciones adversas (Percival y Williams, 2014).

El crecimiento de Cianobacterias es estimulado por agua a alta temperatura y altas concentraciones de nitrógeno (N) y fósforo (P) inorgánicos. En efecto, para este fin, las cianobacterias son capaces de explotar un amplio rango de formas orgánicas disueltas de ambos compuestos de fósforo y nitrógeno a través de fosfatasas y aminopeptidasas extracelulares. Su habilidad de ser una fuente biológica de fijación de nitrógeno en suelos y agua son también un significativo contribuidor de supervivencia a largo término y juega un rol importante en la sucesión de microorganismos en el ambiente (Percival y Williams, 2014).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos o los gobiernos europeos no regulan ni a las cianobacterias ni a sus metabolitos, excepto bajo pautas, afirmando que el agua para consumo debe ser potable. Como es definido, el agua potable no sólo debe ser segura, también debe estar libre de cualquier olor o sabor objetable, independientemente de su origen (Percival y Williams, 2014).

El monitoreo de agua de la presencia de cianobacterias es un aspecto importante para reducir los efectos perjudiciales en la salud de humanos y animales. El análisis cuantitativo de estos microorganismos y de los niveles de cianotoxinas son medidas clave (Percival y Williams, 2014).

Existe una variedad de medios minerales seleccionados disponibles (D-medium, ASM-1, BG-11 y WC) donde las cianobacterias son incubadas a 25 °C bajo luz blanca, fluorescente y tibia. Las cianobacterias pueden crecer extremadamente lento, y pueden requerir varios meses de cultivo para generar colonias visibles (Castenholz, 1998).

2.6.1. *Microcystis aeruginosa*

Como representante del fitoplancton tenemos a *Microcystis aeruginosa*, que se trata de una microalga procariota verde-azul del género *Microcystis* de la familia *Microcystaceae* pertenecientes al filum *Cyanobacteria* (**Tabla 10**). Estas microalgas pertenecen a un grupo que comúnmente se denomina Cianobacterias. Las cianobacterias son los organismos fotosintéticos más primitivos con una larga historia evolutiva que se extiende al menos 3.5 mil millones de años en el pasado (Cronberg y Annadotter, 2006).

Tabla 10. Taxonomía de *Microcystis aeruginosa* (Kützing, 1846).

Imperio	Procariota
Reino	Eubacteria
Subreino	Negibacteria
Filum	Cianobacteria
Clase	Cyanophyceae
Subclase	Oscillatoriophyceae
Orden	Chroococcales
Familia	Microcystaceae
Género	Microcystis
Especie	<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing)

Microcystis aeruginosa es una especie nociva de agua dulce, cosmopolita y muy común en regiones templadas y tropicales (**Figura 11**). *Microcystis aeruginosa* está favorecida por temperaturas cálidas, pero su toxicidad y las tasas de crecimiento máximo no están totalmente acopladas, ya que las cianobacterias tienen la mayor tasa de crecimiento en el laboratorio a 32 °C, mientras su mayor toxicidad es a 28 °C, disminuyendo la toxicidad en función de incrementar la temperatura por encima de 28 °C. Se ha encontrado que el crecimiento está limitado por debajo de 15 °C (Kützing, 1846).

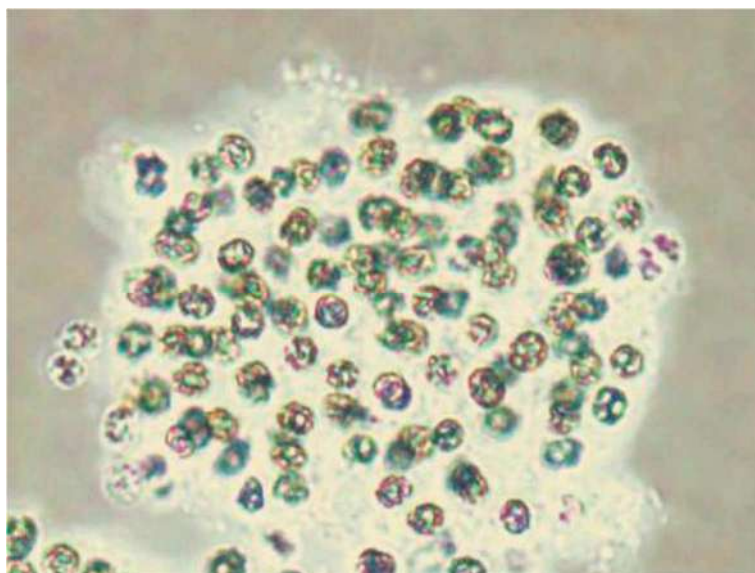


Figura 11. *Microcystis aeruginosa* (Bellinger y Sigee, 2015)

La pigmentación de éstas incluye clorofila-a, rojas y azules ficobilinas (ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina) y carotenoides. Estos pigmentos accesorios se encuentran en los ficobilisomas, ubicados en filas en la superficie exterior de los tilacoides. Sus tilacoides, que se encuentran libres en el citoplasma, no están dispuestos en pilas. Su reproducción en ambas divisiones es estrictamente asexual por división celular simple, fragmentación de la colonia o filamentos (Kützing, 1846).

Microcystis aeruginosa es una especie formadora de floraciones (*blooms*) que también puede producir microcistinas y a su vez pueden ser perjudiciales para humanos y animales (**Figura 12**). La exposición aguda a altas concentraciones de microcistina puede conducir a falla hepática y, posteriormente, la muerte. La exposición subcrónica a la microcistina está asociada con la formación de tumores (Bellinger y Sigee, 2015).

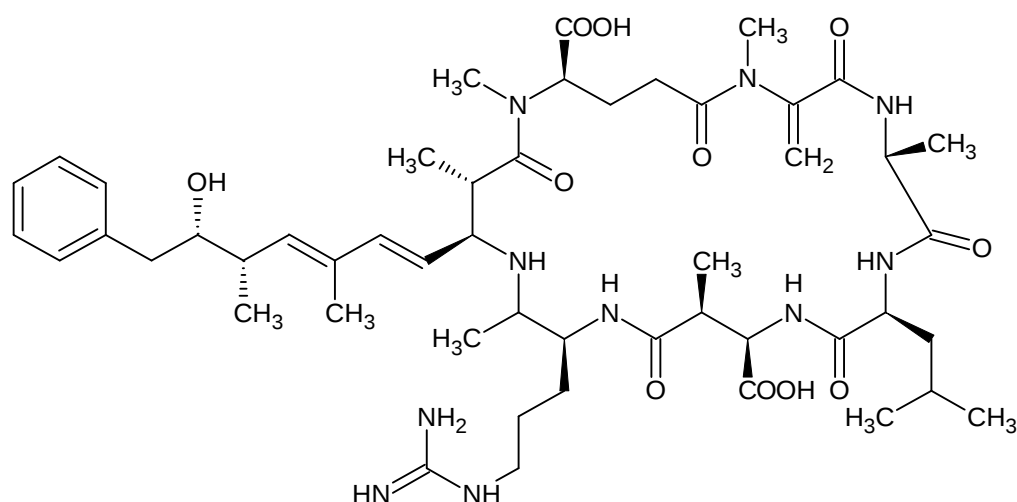


Figura 12. Microcistina producida por *Microcystis aeruginosa* característica por ser hepatotóxica (Peleato et al., 2005).

2.7. Género *Artemia*

El microcrustáceo *Artemia* es un género con una amplia distribución mundial (**Figura 13**), que vive al interior de hábitats acuáticos de alta salinidad (Vanhaecke *et al.*, 1987). Es uno de los pocos organismos que pueden adaptarse a muy diversas condiciones de vida que envuelve salinidades desde 10 g L^{-1} hasta 340 g L^{-1} (Abatzopoulos *et al.*, 2006; Post y Youssef, 1997). Su adaptación a ambientes hipersalinos y agua con una composición química específica en donde habitan se debe principalmente a una medida de protección contra sus depredadores para poder garantizar su desarrollo adecuadamente. Esta adaptación, ocasiona que las poblaciones de *Artemia* puedan desarrollarse adecuadamente, solamente en un hábitat salado específico, ya que las actividades fisiológicas del animal funcionan correctamente bajo ciertas condiciones de salinidad (Castro *et al.*, 2006), así estos animales poseen el sistemas osmorregulatorio más eficiente conocido en todo el reino animal; además son capaces de sintetizar eficazmente pigmentos respiratorios (hemoglobina) y poder hacer frente a los bajos niveles de oxígeno disuelto que existen en los ambientes hipersalinos; finalmente estos organismos tienen la capacidad de producir quistes en fase de latencia cuando las condiciones ambientales ponen en peligro la supervivencia de la especie (Salgado, 2001).

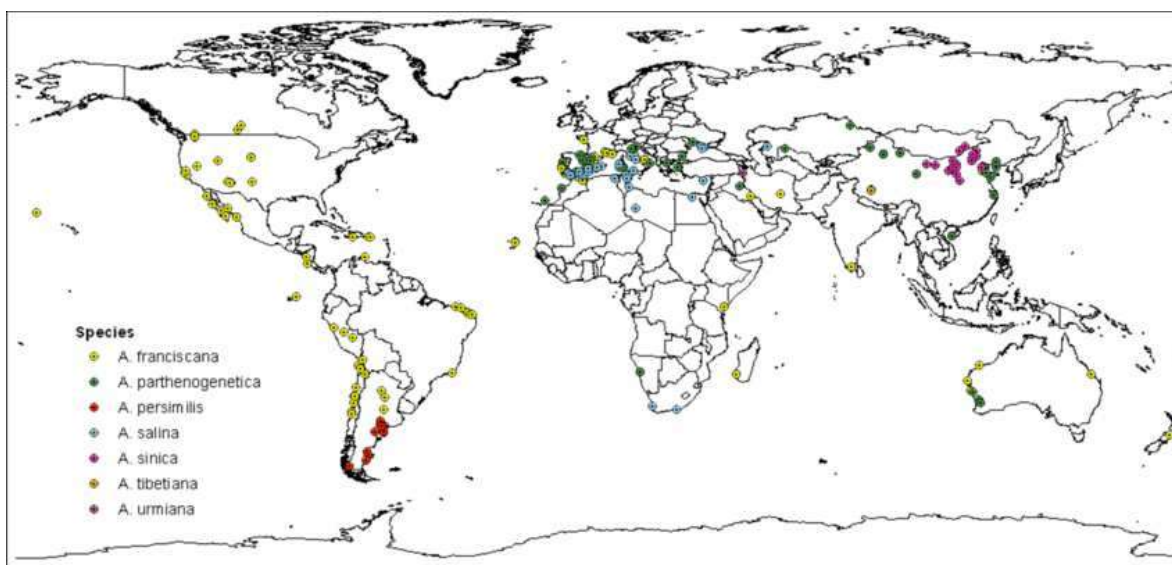


Figura 13. Mapa de la distribución mundial de las diferentes especies de *Artemia* (Muñoz, 2009).

Como lo menciona Castro *et al.* (2001), en México se encuentran 17 sitios salinos donde se puede encontrar este pequeño crustáceo; estos sitios se clasifican en dos categorías: talasohalinos, donde el componente principal es el cloruro de sodio (14 zonas costeras) y atalosohalinos, donde el componente principal no es el cloruro de sodio, por ejemplo, Cuatro Ciénegas, Coahuila que presenta aguas con fosfato de sodio (**Figura 14**).

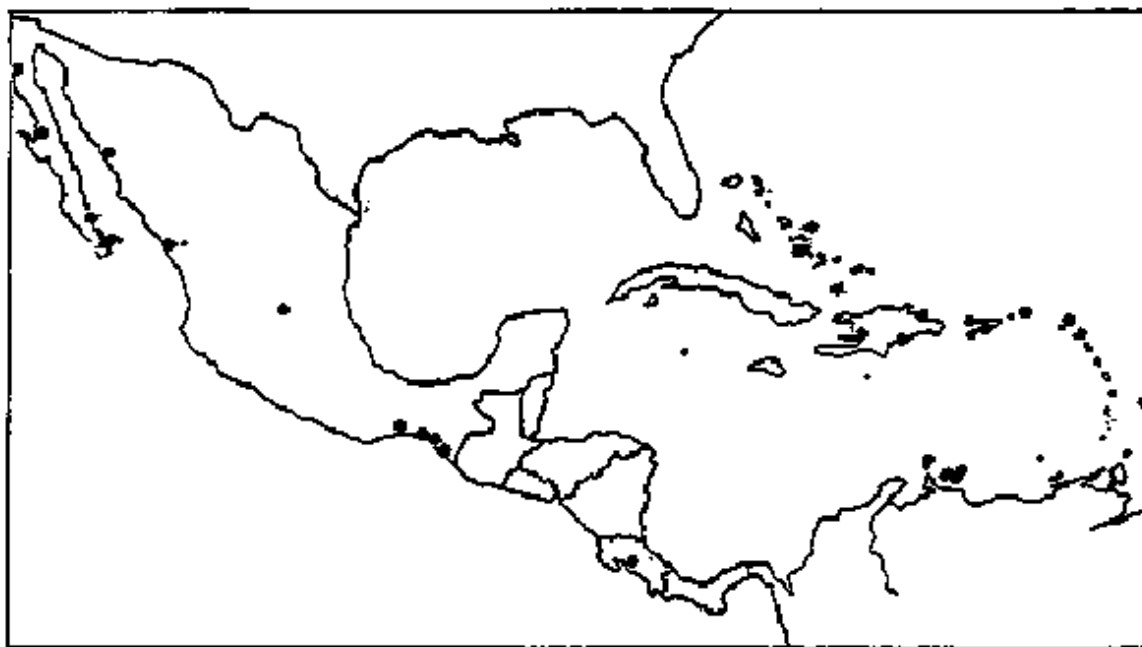


Figura 14. Distribución de *Artemia* en México y Centroamérica (FAO, 1986).

En México, la diversidad de hábitats con características específicas de temperatura, pH, clima, suelo, etc., imprimen en las diferentes poblaciones de *Artemia* una capacidad ecológica adaptativa diferente a las condiciones aplicables en su cultivo a nivel laboratorio (Castro *et al.*, 2001).

En la actualidad, *Artemia* sp es el microcrustáceo más empleado como alimento vivo para larvas de muchos peces y crustáceos marinos en cultivo desde nauplio hasta la etapa adulta (Persoone *et al.*, 1989).

La *Artemia* es un filtrador no selectivo, productor primario y consumidor secundario que se alimenta tanto de materia orgánica particulada (*e. g.* detritos biológicos procedentes de

aguas de manglares) como de organismos vivos de tamaño apropiado (microalgas y bacterias) (Salgado, 2001).

La *Artemia* es un crustáceo braquiópodo de aguas saladas oceánicas, conocido popularmente debido a que una subespecie, *A. nyos*, híbrida de *A. salina* es comercializada bajo el nombre de *Sea Monkeys* como curiosidad (Sorgeloos *et al.*, 1986).

La *Artemia* fue descubierta en Lymington, Inglaterra en 1755. Aunque existe controversia acerca de si las variedades de *Artemia* pueden ser consideradas especies separadas o por el contrario si deben verse como hibridaciones de una única rama (**Tabla 11**) (Sorgeloos *et al.*, 1986).

Los huevos de *Artemia* pueden permanecer metabólicamente inactivos durante largos periodos (incluso varios años) en condiciones de total ausencia de agua y oxígeno y a temperaturas por debajo del punto de congelación. Esta característica inusual se conoce como criptobiosis o diapausa; una vez en el entorno adecuado, la eclosión no se demora más de unas horas (**Figura 15**); el adulto alcanza un centímetro de largo en promedio y su vida media es de un año (Sorgeloos *et al.*, 1986).

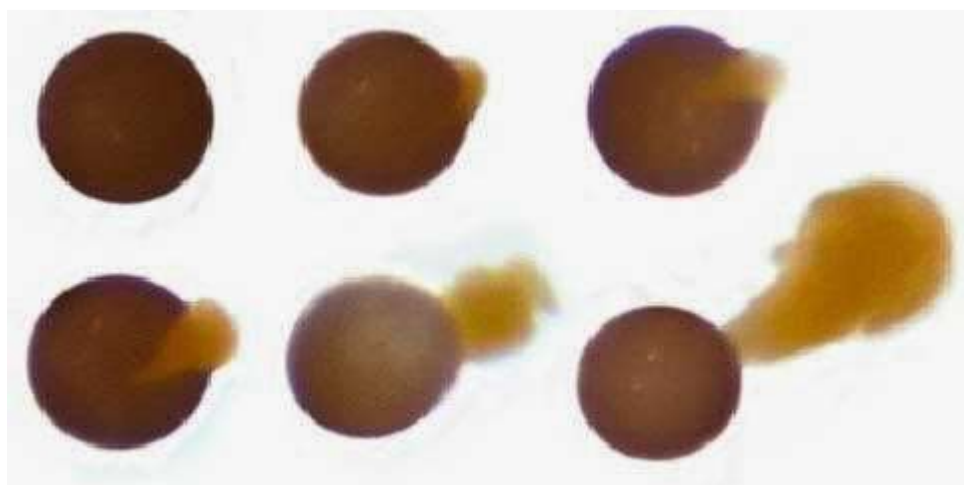


Figura 15. Estados de la eclosión de Artemia (Aquaria, 2018).

Sus apéndices torácicos llamados filópodos, además para nadar, le sirven para crear corrientes de agua que filtran para adquirir alimento disuelto como microalgas, rotíferos, detritos, aunque no realizan filtrado selectivo. Su reproducción es por partenogénesis o sexual

dependiendo de la hostilidad del medio y la especie. Su progenie puede darse en forma ovovivípara y ovípara, siendo llamados huevos o quistes. Cuando aumenta la salinidad del agua o existe escasez de comida suele darse la reproducción ovípara, pudiendo en este caso resistir la deshidratación durante años y temperaturas de entre -273 a 60 °C debido a que los embriones se encuentran en un estado de diapausa (Persone *et al.*, 1980).

Tabla 11. Taxonomía de *Artemia* (Triantaphyllidis *et al.*, 1988; Browne y Bowen, 1991; Martin y Davis, 2001)

Phylum	Arthropoda
Clase	Crustacea
Subclase	Branchiopoda
Orden	Anostraca
Familia	Artemidae
Género	<i>Artemia</i>

El nombre específico *Artemia salina* no es taxonómicamente válido en la actualidad (Bowen y Sterling, 1978). Experiencias entre cruzamiento entre diferentes poblaciones de *Artemia* han demostrado el aislamiento reproductivo de algunos grupos de poblaciones (Barigozzi, 1974; Clark y Bowen, 1976) y esto ha llevado al reconocimiento de especies hermanas (*sibling*) a las que se les ha dado nombres diferentes (Bowen *et al.*, 2006).

Entre las cepas bisexuales o zigogenéticas de *Artemia* (poblaciones compuestas por individuos machos y hembras) se han descrito hasta la fecha 6 especies de hermanas:

- *Artemia salina*: Lymington, Inglaterra (extinta).
- *Artemia tunisiana*: Europa.
- *Artemia franciscana*: América (Norte, Centro y Sur).
- *Artemia permisilis*: Argentina.
- *Artemia urmiana*: Irán
- *Artemia monica*: Mono Lake, CA-USA.

Algunas cepas partenogenéticas (poblaciones compuestas exclusivamente por hembras; no siendo necesaria la fertilización de los huevos para la reproducción) han sido encontradas

en Europa y Asia. Existen importantes diferencias genéticas (*e. g.* en el número de cromosomas y en el tipo de isoenzimas) que hacen muy difícil la clasificación sistemática conjunta bajo el nombre de “*Artemia* partenogenética” (Abreu-Grobois y Beardmore, 1980). Por esta razón fue sugerido que, salvo que las especies *sibling* de cepas partenogenéticas puedan ser identificadas (por medio de pruebas de entrecruzamiento con hermanas conocidas), y hasta que la especiación de estos animales sea comprendida de forma más clara, solamente se use la denominación *Artemia* (Persoone *et al.*, 1986).

2.7.1. Morfología y ciclo de vida de *Artemia*

El cuerpo de *Artemia*, puede distinguirse tres partes bien diferenciadas: cabeza, tórax y abdomen como se observa en la **Figura 16**. Su tamaño oscila entre 7 y 12 mm de longitud, aunque puede alcanzar los 17-18 mm (Sarabia, 2002).

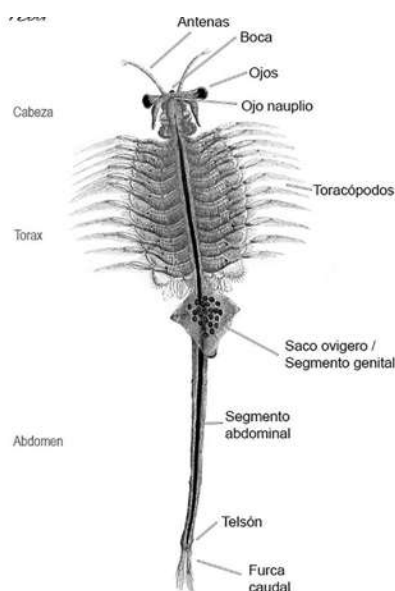


Figura 16. Morfología de *Artemia* (Neli, 2015).

En la cabeza se distinguen los restos del ojo naupliar, los ojos compuestos, anténulas y antenas que en las hembras adoptan una forma sencilla y que en los machos presentan una porción anterior ensanchada en forma de tenaza (es una de las diferencias entre *Artemia* macho y hembra).

Su tórax consta de once segmentos bien definidos dotados, cada uno, de un par de apéndices torácicos (toracópodos), son los que le permiten la natación, la respiración y la alimentación ya que producen pequeñas corrientes de agua que hacen que la comida llegue a su boca.

Por último, el abdomen está formado por ocho segmentos, siendo los dos más próximos al tórax los segmentos genitales. Estos dos primeros segmentos abdominales están hipertrofiados en su cara ventral, dando lugar a los respectivos aparatos sexuales: bolsa ovígera o útero en las hembras y vesícula seminal y pene en los machos. El último de los segmentos corresponde al telson el cual a su vez lleva un par de furcas caudales en su fin (Sarabia, 2002).

Una peculiaridad de *Artemia* es la capacidad de producir huevos císticos, de larga duración y resistencia, también llamados quistes. Los quistes pueden ser desecados y mantenidos en condiciones adecuadas, y mantenerse viables durante largos periodos de tiempo. Una vez hidratados, se reinicia el metabolismo interno, después de 24 h la membrana externa del quiste se rompe y aparece el embrión rodeado de la membrana de eclosión, después el embrión abandona la cáscara del quiste colgado del cascarón vacío al que todavía se encuentra unido. Dentro de la membrana de eclosión se completa el desarrollo del nauplio, y culmina cuando se rompe dicha membrana y sale, nadando libremente, alcanzando el estado de nauplio (Sarabia, 2002).

En el primer estado larvario (estado I), conocido como nauplio, tiene un tamaño entre 400 y 500 micras de longitud, de color pardo anaranjado y posee tres pares de apéndices: el primer par de antenas (también llamadas anténulas, tienen una función sensorial), el segundo par de antenas (con función locomotora y filtradora) y las mandíbulas (con una función de toma de alimento). Su aparato digestivo no es todavía funcional (permaneciendo aún cerrados la boca y el ano) (**Figura 17**).

A las 24 h, se produce una muda, pasando al segundo estado larvario (estado II). En esta fase el aparato digestivo ya es funcional y el segundo par de antenas filtra partículas alimenticias de un tamaño de 1 a 40 micras. Además *Artemia* es un crustáceo filtrador pasivo que basa su alimentación en la captura de bacterias, algas unicelulares, pequeños protozoos

y detritos del medio en que vive. Durante su desarrollo, la larva realiza 15 mudas, durante las cuales van apareciendo los toracópodos y se desarrollan los dos ojos laterales complejos. En este estado ya se pueden observar las antenas en forma de pinzas en los machos y las antenas en las hembras pasan a ser órganos sensoriales. Cuando los toracópodos ya están completamente formados presentan tres partes funcionales: los telopoditos y endopoditos con acciones locomotrices y filtradoras y los exopoditos que actúan como branquias.



Figura 17. Ciclo de vida de *Artemia* (Neli, 2015).

La *Artemia* adulta se caracteriza por un cuerpo alargado con dos ojos complejos pedunculados, un aparato digestivo lineal, unas anténulas sensoriales y 11 pares de toracópodos funcionales. Puede llegar a vivir por un tiempo aproximado de cuatro meses. El macho posee un par de piezas prensiles musculadas muy características (segundo par de antenas) en la región cefálica mientras que en la parte posterior del tórax se puede observar un par de penes. La hembra es fácilmente reconocida por su útero que está situado inmediatamente detrás del undécimo par de toracópodos. La precópula de los adultos se inicia cuando el macho sujeta a la hembra entre el útero y el último par de toracópodos, con sus antenas curvas. Las parejas pueden nadar de esta forma durante largo tiempo es lo que se conoce como posición de monta, para lo cual mueven sus toracópodos de forma sincrónica. La cópula es un rápido acto reflejo donde la parte ventral del macho se dobla hacia delante y uno de los penes se introduce en la abertura del útero, fertilizando los huevos. Los huevos se

desarrollan en dos ovarios tubulares situados en el abdomen, pueden contener hasta más de 200 huevos. Una vez maduros, tienen forma esférica y se desplazan hasta el útero a través de dos oviductos (también llamados sacos laterales).

Después de esta fertilización se pueden presentar dos tipos de reproducción: si las condiciones ambientales son favorables se inicia el metabolismo embrionario, desarrollándose los nauplios nadadores que luego son depositados por la hembra (a esto se le llama reproducción Ovovivípara); si las condiciones ambientales son adversas, las glándulas de útero de la hembra secretan una sustancia color café que enquistas los embriones o quistes, los cuales entran en un estado de latencia y son liberados en forma de quistes (a este proceso se le llama reproducción Ovípara). El desarrollo del embrión hasta la eclosión dura aproximadamente 24 h en condiciones adecuadas, llegando a su fase adulta en 20-30 días de vida libre alcanzando un tamaño de 7 mm (Sorgeloos, 1986; Castro y Córdova, 2003).

2.7.2. *Artemia franciscana*

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

La norma mexicana NMX-AA-110-1995-SCFI establece un método biológico para la evaluación de la calidad del agua mediante pruebas de toxicidad aguda utilizando como bioindicador *A. franciscana*. Aplicable para la evaluación de toxicidad aguda en cuerpos de agua salobres y marinos, así como aguas residuales industriales, municipales y agrícolas,

lixiviados, sustancias puras o combinadas y extractos acuosos con salinidades mayores a diez.

Debido a la facilidad de su cultivo, corto ciclo de vida, y a su distribución cosmopolita, *Artemia* ha ganado popularidad como organismo de prueba en estudios de toxicología y es una alternativa al uso de otros invertebrados por la posibilidad de obtener organismos neonatos de forma sincrónica y con una condición fisiológica uniforme. Otra característica que hace a este organismo útil en estudios en toxicología es que puede ser cultivado en salinidades que varían entre 5 y 150 ups y se adapta a un amplio intervalo de condiciones ambientales (Panagoula *et al.*, 2002; Papadopoulus *et al.*, 2004).

3. Justificación

A través de los años, la agricultura ha sido transformada radicalmente. Debido al incremento de la población y a factores comerciales como la competencia que existe entre diferentes proveedores de productos alimenticios, se requiere que ésta sea más eficiente tanto en la calidad como en la cantidad de alimentos que se cosechan anualmente. El cambio climático y la instalación de diversas plagas en los campos de siembra (arvenses, en este caso), han conducido a que los productores de alimentos utilicen de manera desmedida sustancias que ayudan a la destrucción de estas plagas, además de que significan un ahorro económico al prescindir de trabajadores para la eliminación manual de arvenses. Los herbicidas utilizados para este fin son poco metabolizados y esparcidos por todo el suelo llegando a efluentes marinos por medio de lixiviación o diseminación directa sobre mantos acuíferos provocando problemas de toxicidad aguda sobre las especies marinas. El análisis químico de estas sustancias sobre ecosistemas acuáticos y los datos obtenidos son una necesidad incluida en el Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (IPCS). Los bioensayos utilizados en las pruebas ecotoxicológicas para la obtención de datos son de gran importancia debido a los bioindicadores planctónicos utilizados, microalga verde-azul *Microcystis aeruginosa* y microcrustáceo *Artemia franciscana*, uno perteneciente al fitoplancton y el otro perteneciente al zooplancton, respectivamente. Ya que ambos forman parte del primer nivel de la cadena trófica, los datos obtenidos pueden informar sobre una amenaza latente en especies superiores y, en general, alertar sobre el peligro de contaminación del ambiente. Los datos obtenidos sobre concentración letal media del herbicida N-(fosfonometil) glicina son de gran utilidad ya que pueden ayudar a las autoridades a reclasificar dicha sustancia activa de acuerdo con su verdadero potencial peligroso.

3.1. Hipótesis

La presencia de glifosato en el ambiente marino ocasiona un efecto tóxico agudo sobre el primer nivel trófico a nivel del plancton: microcrustáceo *Artemia franciscana* y microalga verde-azul *Microcystis aeruginosa*, además de provocar la eutroficación de las aguas y con ello cambios en el tamaño y volumen de *Microcystis aeruginosa*.

4. OBJETIVOS

4.1.Objetivo General

- Evaluar la toxicidad aguda del herbicida N-(fosfonometil) glicina utilizando como bioindicadores un representante del zooplancton (*Artemia franciscana*) y un representante del fitoplancton (*Microcystis aeruginosa*).

4.2.Objetivos Específicos

- Determinar la CL₅₀ del herbicida N-(fosfonometil) glicina sobre nauplios de *Artemia franciscana* tras 24 horas de exposición.
- Señalar la concentración más alta a la cual no se observan efectos (24h-NOEC) sobre nauplios de *Artemia franciscana*.
- Determinar la CI₅₀ del herbicida N-(fosfonometil) glicina sobre el alga verde-azul *Microcystis aeruginosa* tras 72 horas de exposición.
- Señalar la concentración más alta a la cual no se observan efectos (72h-NOEC) sobre *Microcystis aeruginosa*.
- Analizar el efecto en el coeficiente de forma tanto en área y volumen de las células de *Microcystis aeruginosa* sobre un control, 72h-NOEC y CI₅₀.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Sustancias de ensayo

La sustancia de ensayo utilizada fue el herbicida organofosforado glifosato con una pureza del 97% [C₃H₈NO₃P] (La FAM®; **Tabla 12**) con un contenido de glifosato ácido [N-(fosfonometil) glicina] no menor de 74% en concentración de 480 g L⁻¹ de sal de isopropilamina de glifosato. Se trabajó a concentraciones crecientes del herbicida en un rango de 0.25 a 0.32 mg L⁻¹ en las pruebas realizadas sobre *Artemia franciscana* y concentraciones crecientes de 10 a 110 mg L⁻¹ en las pruebas realizadas sobre *Microcystis aeruginosa*.

Tabla 12. Composición porcentual del glifosato (La Fam)

Ingrediente activo	Porcentaje en peso
Glifosato: Sal isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina, con un contenido de N-(fosfonometil) glicina no menor de 74% (Equivalente a 360 g de i. a. L ⁻¹ del ácido a 20 °C) (Contiene 480 g L ⁻¹ de sal isopropilamina de glifosato)	41%
Ingredientes inertes	
Diluyentes (agua), humectante e impurezas	59%
Total	100%

5.2. Agua marina sintética

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

5.3. Medio de cultivo BG-11

El medio de cultivo BG-11 (**Tabla 13**) se preparó bajo condiciones asépticas, esterilizando agua tridestilada (o destilada) y dejando enfriar. Posteriormente se hizo una disolución 1:100, es decir, para 1000 ml se disolvió 10 ml de BG-11 Broth en 990 ml de agua

tridestilada estéril. El pH se ajustó a 7.1 con solución de NaOH 1 M. Una vez preparada la solución se debe mantener en refrigeración (2-8 °C) en frascos estériles.

Tabla 13. Composición del medio BG-11 solución estéril, 100x concentrado (Fluka Analytical)

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

5.4. Material biológico

Nauplios de 24 horas de *Artemia franciscana* obtenidos a partir de la eclosión de quistes (Argent Chemical Laboratories, Washington, USA) por incubación en agua marina (Sera Premium, Germany) a 34 g L⁻¹ de salinidad, pH de 8.4 ± 0.2 a 24 horas a una intensidad lumínica de 1000 lux.

Microcystis aeruginosa (Ma), se mantienen en cultivo axénico a 21 °C y periodo de luz-oscuridad de 12:12h a una intensidad fotónica de 60 μmol m⁻² s⁻¹, en matraces de cultivo (Greiner; Bio-One; GmbH, Germany), con 20 ml de medio de cultivo BG-11 (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

5.5. Determinación de mortalidad en *Artemia franciscana*

Se determinó la Concentración Letal 50 (CL₅₀), la cual consiste en la determinación de la concentración que causa la muerte del 50% de nauplios de *Artemia franciscana* de 24 horas, realizada por intoxicación aguda con el herbicida en una placa multipocillo (Sarstedt Inc., USA) según la técnica descrita por Persoone *et al.* (1989). En cada pocillo se incluyeron 10 nauplios de *Artemia* los cuales fueron expuestas a distintas concentraciones del agente tóxico

(glifosato) en un volumen total de 1 mL. Se incluyó una línea de pocillos de control (sin agente tóxico) para corroborar la veracidad de la prueba, y se realizaron nueve repeticiones ($n=9$), en incubación a 28 °C por 24 horas en ausencia de luz. Para cuantificar el número de nauplios muertos en cada pocillo, se realizó la lectura a través de estereoscopio (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) posterior al tiempo de incubación.

5.6. Ensayos de inhibición de tasa de crecimiento

El ensayo de inhibición se basó en las pautas para el ensayo de productos químicos 201 de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos; OECD, 2011) que establece los parámetros para los ensayos de inhibición de crecimiento de microalgas de agua dulce y cianobacterias.

Para estudiar el efecto inhibitorio se utilizaron tubos de doble cierre estériles y de poliestireno (Sarstedt, AG & Co. Germany) se establecieron 14 réplicas por cada concentración ensayada y un control sin xenobiótico.

Inicialmente, en cada tubo se incluye una concentración de 10^5 cel mL^{-1} en volumen total de 3 mL. Las células se obtienen de cultivos madre, y la concentración se ajusta por recuento sobre cámara de Neubauer (BlauBrand, GmbH + CO KG, Germany) en microscopio óptico (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). Los sets son expuestos a las concentraciones crecientes del xenobiótico. Tubos control y tubos expuestos al tóxico son mantenidos durante todo el ensayo a 21°C e iluminación en ciclo 12:12 de luz-oscuridad. Tras 72h (3d) de exposición se midió la biomasa celular en cámara de Neubauer.

5.7. Análisis de morfología celular

Fue obtenido el diámetro, área, volumen y perímetro de 30 células de *Microcystis aeruginosa* directamente medidas usando un sistema de análisis de imagen por observación a 100x en microscopio óptico (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) por medio de una cámara para microscopio (AmScope Microscope Digital Camera, Model Number: MU1000, FMA050, 5mm, 10MP, Color CMOS) e interpretación por el software (AmScope versión 3.7.3377, United Scope LLC, Irvine CA, U. S.), del cultivo axénico, 72h-NOEC y CI_{50} , respectivamente.

5.8. Análisis estadístico

Tanto los valores de las $CL_{50(24)}$ y 24h-NOEC sobre *Artemia franciscana* como de la $CI_{50(72)}$ y 72h-NOEC en *Microcystis aeruginosa* fueron obtenidos por regresión lineal a través de la relación de Concentración-Respuesta. La prueba de distribución normal de los datos se realiza a través de la prueba D'Agostino y Pearson, utilizando un intervalo de confianza de $p < 0.05$. Los cálculos estadísticos son realizados por el paquete estadístico Graphpad Prism v7.0 (Graph-Pad Software Inc., USA).

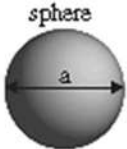
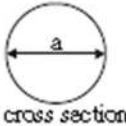
Para la determinación de diferencias morfológicas en superficie y volumen celular exhibidas se evalúa a través de los modelos geométricos propuestos por Hillebrand *et al.*, (1999) y Sun y Liu, (2003). *Microcystis aeruginosa* muestra una forma esférica (modelo 1H- **Tabla 14**) para el cálculo de su volumen y superficie celular se basa de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

Ecuación 1. Cálculo del volumen (V) y superficie celular (A) de acuerdo con el modelo esférico (1H) (Hillebrand *et al.*, 1999; Sun y Liu, 2003)

$$V = \frac{(a^3)\pi}{6}$$

$$A = a^2\pi$$

Tabla 14. Modelo geométrico esférico para la determinación del volumen y superficie celular (Hillebrand *et al.*, 1999; Sun y Liu, 2003)

Código de forma	Forma simulada	
1H		

Como medida de la forma de las células, el coeficiente de forma (CF) propuesto por Renau-Piqueras *et al.* (1985) fue calculado por:

Ecuación 2. Cálculo del Coeficiente de Forma (CF) (Renau-Piqueras *et al.*, 1985)

$$CF = \frac{4\pi A}{P^2}$$

Los cálculos estadísticos de volumen y superficie celular son realizados por medio de un ANOVA de 1 vía por test Dunnett en el paquete estadístico Graphpad Prism v7.0 (Graph-Pad Software Inc., USA).

6. RESULTADOS

6.1. Respuesta del glifosato sobre nauplios de *Artemia franciscana*

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) propone un sistema de categorización de sustancias o contaminantes en ambientes acuáticos en pruebas de toxicidad aguda (CL_{50} o CI_{50} expresado en $mg\ L^{-1}$). Dicha categorización segmenta a las sustancias de ensayo en cuatro categorías tal y como se muestra en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Categorización de sustancias de acuerdo con la CL_{50} o CI_{50} (EPA, 1996)

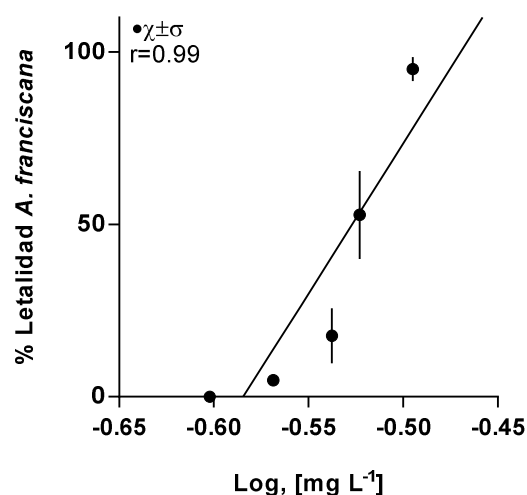
Toxicidad aguda (CL_{50} o CI_{50} $mg\ L^{-1}$)	Categoría
≤ 1	I: Sustancias muy tóxicas para el ambiente acuático
1-10	II: Sustancias tóxicas para el ambiente acuático
10-100	III: Sustancias peligrosas para el ambiente acuático
≥ 100	IV: Se consideran no tóxicas

Se obtuvo una $CL_{50(24)}$ del herbicida glifosato de $0.3054\ mg\ L^{-1}$ ($0.2983 - 0.3151$) y una 24h-NOEC de $0.2488\ mg\ L^{-1}$ ($0.2370 - 0.2569$) sobre *Artemia franciscana* tras 24 de exposición, lo que lo incluye dentro de la Categoría I como una sustancia muy tóxica para el ambiente acuático de acuerdo a la clasificación propuesta por la EPA para la categorización de los contaminantes acuáticos por toxicidad aguda tal como se muestra en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Valores de la $CL_{50(24)}$ y 24h-NOEC del glifosato sobre *Artemia franciscana* a 24 horas de exposición.

$CL_{50(24)} [C_3H_8NO_5P]$	24h-NOEC $[C_3H_8NO_5P]$
$0.31\ mg\ L^{-1}$ ($0.30 - 0.32$)	$0.25\ mg\ L^{-1}$ ($0.24 - 0.26$)
(L. C. 95%) Clasificación I EPA	

El efecto de la exposición aguda de *Artemia franciscana* con el herbicida glifosato [N – (fosfonometil) glicina] resultó en una potente respuesta tóxica sobre los nauplios de *Artemia*, observados en la **Gráfica 1**, en donde a mayor concentración del herbicida mayor es la respuesta tóxica.



Gráfica 1. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de *Artemia franciscana* con el herbicida glifosato.

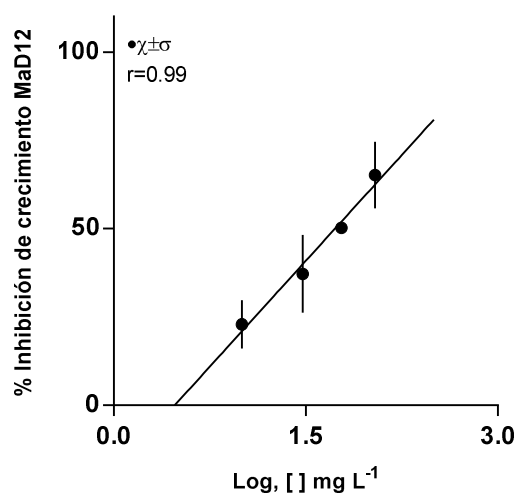
6.2.Respuesta del glifosato sobre *Microcystis aeruginosa*

Se obtuvo una $CI_{50(72)}$ del herbicida [N – (fosfonometil) glicina] de 53.95 mg L^{-1} ($36.31 - 95.72$) y una 72h-NOEC de 2.95 mg L^{-1} ($0.36 - 6.89$) sobre *Microcystis aeruginosa* tras 72 horas de exposición tal como se muestra en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Valores de la $CI_{50(72)}$ y 72h-NOEC del glifosato sobre *Microcystis aeruginosa* a 72 horas de exposición.

$CI_{50(72)}$ [C ₃ H ₈ NO ₅ P]	72h-NOEC [C ₃ H ₈ NO ₅ P]
53.95 mg L^{-1} ($36.31 - 95.72$)	2.95 mg L^{-1} ($0.36 - 6.89$)
(L. C. 95%) Clasificación III EPA	

El efecto de la exposición aguda de *Microcystis aeruginosa* con el herbicida en estudio [N – (fosfonometil) glicina] resultó en una respuesta altamente tóxica, donde al aumentar la concentración del tóxico sobre el bioindicador se fue inhibiendo el crecimiento de éste (**Gráfica 2**).



Gráfica 2. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de *Microcystis aeruginosa* con el herbicida glifosato.

Al comparar los datos obtenidos de la toxicidad aguda del glifosato a través de la $CL_{50(24)}$ para *Artemia franciscana* y $CI_{50(72)}$ para *Microcystis aeruginosa*, se puede observar que existe una diferencia significativa en la concentración efectiva media para ambos bioindicadores, primeramente, para *Artemia franciscana* la $CL_{50(24)}$ se encuentra en la categoría I de la EPA mientras que para *Microcystis aeruginosa* la $CI_{50(72)}$ se encuentra en la categoría III de la EPA, es decir, para el bioindicador de agua salada (*A. franciscana*) resulta ser más tóxico el glifosato, al tiempo que para el bioindicador de agua dulce (*M. aeruginosa*) el glifosato tiene menos potencial tóxico, sin embargo, a bajas concentraciones la microalga *Microcystis aeruginosa* presenta una elevación en la biomasa celular además de cambios significativos en su morfología. Un resumen de estos aspectos se presenta en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Resumen de resultados de la toxicidad aguda del glifosato.

Bioindicador	mg L ⁻¹	NOEC	Categoría EPA
<i>Artemia franciscana</i>	CL_{50} 0.31	0.25	I
	(0.30 – 0.32)	(0.24 – 0.26)	
<i>Microcystis aeruginosa</i>	CI_{50} 53.95	2.95	III
	(36.31 – 95.72)	(0.36 – 6.89)	

6.3. Análisis de morfología celular de *Microcystis aeruginosa*

A partir de las cantidades obtenidas de los parámetros medidos (**Tabla 19**), y con el uso de la ecuación propuesta por Renau-Piqueras *et al* (1985), se obtuvo un coeficiente de forma $CF \approx 1$ para las células control así como para la expuestas a la CI_{50} y a la 72h-NOEC, lo que indica que las células tienen una forma esférica.

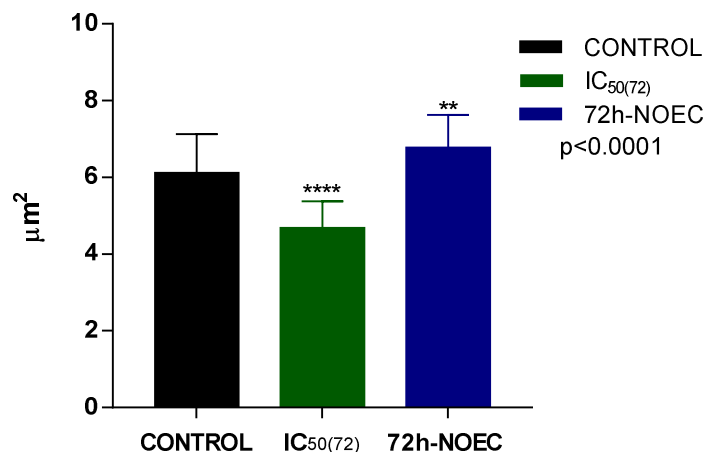
Tabla 19. Parámetros medidos y coeficiente de forma (CF) de *Microcystis aeruginosa*.

	Control	CI_{50}	72h-NOEC
Diámetro máx. (μm)	3.00 ± 0.23	$2.62 \pm 0.18^{**}$	$3.12 \pm 0.18^*$
Diámetro mín. (μm)	2.55 ± 0.23	$2.25 \pm 0.18^{**}$	$2.75 \pm 0.18^*$
Perímetro máx. (μm)	9.45 ± 0.71	$8.23 \pm 0.58^{**}$	$9.79 \pm 0.56^*$
Perímetro mín. (μm)	8.03 ± 0.71	$7.07 \pm 0.58^{**}$	$8.66 \pm 0.56^*$
Área máx. (μm^2)	7.13 ± 1.01	$5.39 \pm 0.70^{**}$	$7.63 \pm 0.85^*$
Área mín. (μm^2)	5.11 ± 1.01	$3.99 \pm 0.70^{**}$	$5.94 \pm 0.85^*$
Volumen máx. (μm^3)	14.37 ± 2.88	$9.38 \pm 1.69^{**}$	$16.00 \pm 2.56^*$
Volumen mín. (μm^3)	8.61 ± 2.88	$6.00 \pm 1.69^{**}$	$10.88 \pm 2.56^*$
CF (adimensional)	1.00 ± 0.001	1.00 ± 0.001	0.99 ± 0.001

* diferencias significativas con una $p < 0.05$ con respecto a las células control.

** diferencias significativas con una $p < 0.0001$ con respecto al control

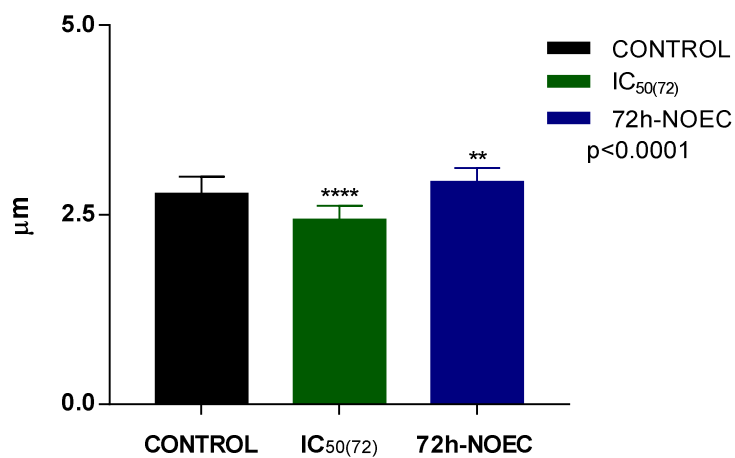
Además, según los datos obtenidos de las mediciones de las células de *Microcystis aeruginosa*, mediante análisis estadístico, se puede observar que los valores tanto de diámetro, volumen, área y perímetro de las células expuestas a las concentraciones de glifosato 72h-NOEC (2.95 mg L^{-1}) y $CI_{50(72)}$ (53.95 mg L^{-1}) en comparación con las células control, presentan diferencias significativas en cuanto a los parámetros medidos. Estas diferencias se presentan en la **Gráfica 3**, **Gráfica 4**, **Gráfica 5** y **Gráfica 6**.



Gráfica 3. Diferencias entre el área de las células de *Microcystis aeruginosa* (p<0.0001, n=30)

** diferencias significativas con una p<0.05 con respecto a las células control.

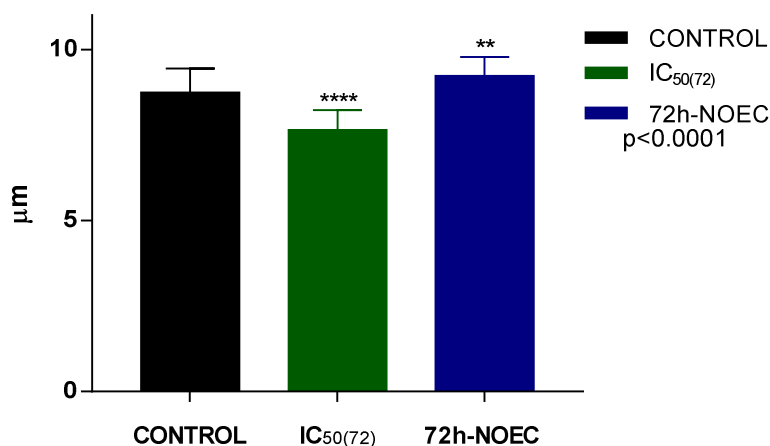
**** diferencias significativas con una p<0.0001 con respecto al control



Gráfica 4. Diferencias entre el diámetro de las células de *Microcystis aeruginosa* (p<0.0001, n=30)

** diferencias significativas con una p<0.05 con respecto a las células control.

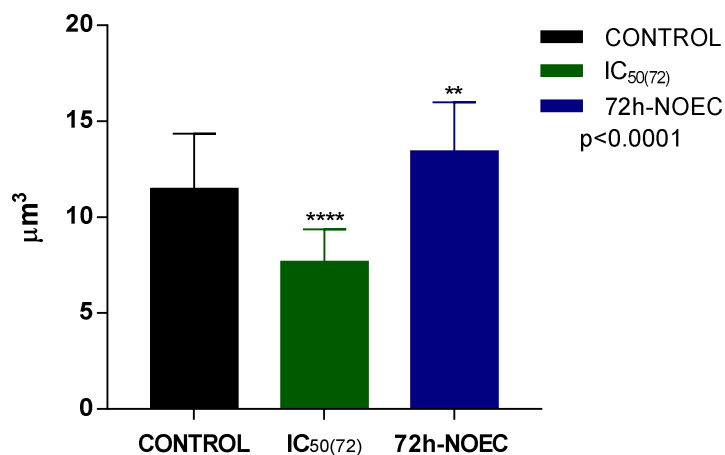
**** diferencias significativas con una p<0.0001 con respecto al control



Gráfica 5. Diferencias entre el perímetro de las células de *Microcystis aeruginosa* (p<0.0001, n=30)

** diferencias significativas con una p<0.05 con respecto a las células control.

**** diferencias significativas con una p<0.0001 con respecto al control



Gráfica 6. Diferencia entre el volumen de las células de *Microcystis aeruginosa* (p<0.0001, n=30)

** diferencias significativas con una p<0.05 con respecto a las células control.

**** diferencias significativas con una p<0.0001 con respecto al control

En la **Figura 18**, **Figura 19** y **Figura 20** se muestran células de *Microcystis aeruginosa* del cultivo control, expuestas a la 72h-NOEC y a la $CI_{50(72)}$.

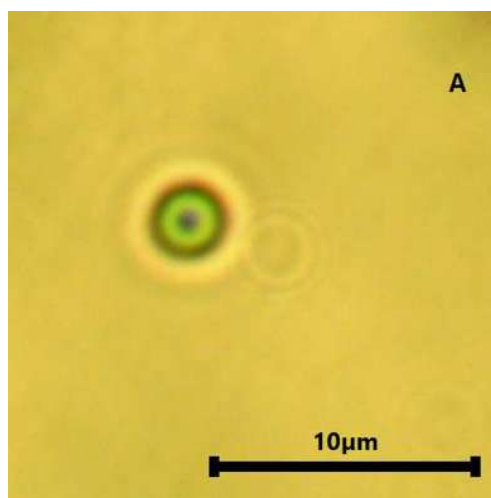


Figura 18. Célula control de *Microcystis aeruginosa*.

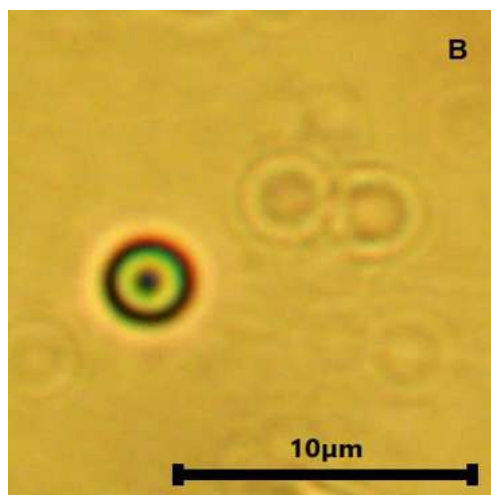


Figura 19. Célula de *M. aeruginosa* expuesta a la Concentración Máxima sin Efecto Observado del glifosato a las 72h (72h-NOEC)

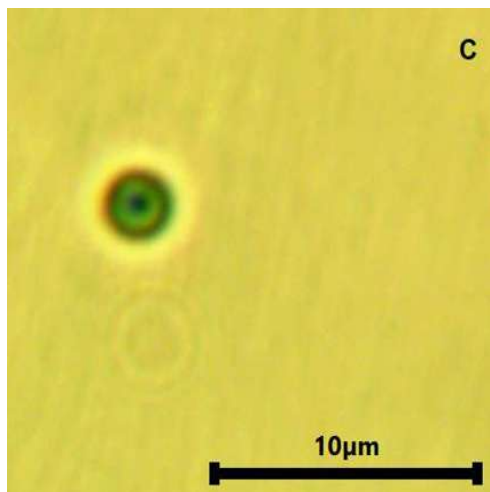


Figura 20. Célula de *M. aeruginosa* expuesta a la Concentración Inhibitoria media del glifosato a las 72h ($CI_{50(72)}$)

De acuerdo con los datos obtenidos de área, volumen, diámetro y perímetro, y al observar los gráficos y figuras de las células de *Microcystis aeruginosa*, se puede concluir que, a concentraciones bajas de glifosato, *M. aeruginosa* aumenta en todos estos parámetros, es decir, utiliza al glifosato como fuente de fósforo (P), mientras que al aumentar la concentración de glifosato, *M. aeruginosa*, disminuye tanto en área, volumen, diámetro y perímetro, debido al efecto tóxico del glifosato produciéndose un fenómeno de hormesis.

7. DISCUSIÓN

El herbicida N-(fosfonometil) glicina, genéricamente denominado glifosato, es un herbicida sistémico no selectivo de post-emergencia de acción foliar considerado dentro del grupo de los fosfonatos (Baird, 2001; Barbosa y Aiassa, 2017), además de que es utilizado de manera desmedida debido a la falta regulatoria en su uso y por ser barato y efectivo para eliminar arvenses (Carlisle y Trevors, 1998). El glifosato es un ácido, pero es más comunmente utilizado en su forma de sal IPA de glifosato (Nivia, 2001; Eslava *et al.*, 2003). A pesar de haber sido reportado como no tóxico en estudios anteriores por autores como Goldsborough & Beck (1989) y Mann y Bidwell (1999), ahora hay mayor número de estudios que demuestran que el glifosato es tóxico para el ambiente marino.

La evaluación de la toxicidad aguda del glifosato, en este estudio, se realizó sobre dos bioindicadores, el primero un representante del zooplancton (microcrustáceo *Artemia franciscana*) y el segundo un representante del fitoplancton (microalga verde-azul *Microcystis aeruginosa*).

En este estudio, se obtuvo una $CL_{50(24)}$ de 0.31 mg L^{-1} sobre nauplios de 24h del bioindicador *Artemia franciscana* y tras 24h de exposición al glifosato.

En un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud sobre el bioindicador de agua dulce microcrustáceo *Daphnia magna*, tras 24h de exposición al glifosato obtuvieron una $CL_{50(24)}$ de 9.34 mg L^{-1} (WHO, 1994) que, según la clasificación de riesgos para el ambiente acuático de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA) y dada la CL_{50} obtenida, reclasifica al glifosato dentro de la categoría II como sustancia tóxica para el ambiente acuático (anteriormente categoría IV; WHO, 1994). Mientras tanto, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) mantiene su declaratoria y clasifica al glifosato en la categoría IV como sustancia no tóxica (COFEPRIS, 2016).

En comparación con un estudio de toxicidad aguda de los herbicidas glifosato (Roundup®) y Carbosulfan sobre nauplios de 24 horas de *Branchinella thailandesis* realizado por Boonsoong y Bullangpoti (2012), obtuvieron una $CL_{50(24)}$ de 0.32 mg L^{-1} y 0.70 mg L^{-1} , respectivamente. Es de observarse que los resultados obtenidos por estos autores en

comparación con los obtenidos en este estudio son prácticamente similares habiendo apenas una diferencia de 0.01 mg L^{-1} con respecto a *Artemia franciscana*.

Ripley *et al.* (2003) realizaron un estudio de toxicidad aguda sobre los microcrustáceos *Branchinecta sandiegonensis* y *Thamnocephalus platyurus*. Utilizaron como sustancia de ensayo una formulación comercial del glifosato bajo la marca de Roundup®, además realizaron ensayos de la toxicidad aguda del Malatión el cual es un compuesto organofosforado. Los resultados que obtuvieron se muestran en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Toxicidad aguda del Malatión y Roundup® sobre nauplios del orden Anostraca (Ripley *et al.*, 2003).

Especie	Compuesto	Ensayo (h)	CL ₅₀ (mg L ⁻¹)
<i>B. sandiegonensis</i>	Malatión	24	48.90
<i>B. sandiegonensis</i>	Roundup®	24	1.18
<i>T. platyurus</i>	Malatión	24	50.10
<i>T. platyurus</i>	Roundup®	24	576

Se puede observar que, al enfrentar los bioindicadores al Malatión, las respuestas tóxicas de ambas sustancias de ensayo son muy parecidas, a diferencia de la respuesta del glifosato (Roundup®) donde se muestran diferencias muy grandes siendo 488 veces más tóxico para *B. sandiegonensis* que para *T. platyurus*, donde a este último, según la clasificación de la EPA no se le considera tóxico.

El glifosato es uno de los fosfonatos, los cuales son compuestos estructuralmente similares a los organofosforados, excepto en que está ausente un átomo de oxígeno de los cuatro que rodean el fósforo, siendo reemplazado por un grupo orgánico (en este caso el aminoácido simple llamado glicina) (Baird, 2001). Otro organofosforado es el Malatión que ha sido estudiado por varios autores recalando su potencial toxicidad para el ambiente acuático con una CL₅₀₍₄₈₎ de 0.001 mg L^{-1} sobre dáfnidos (Manual de Plaguicidas de Centroamérica). Sin embargo, en estudios realizados por Crisinei *et al.* (1994) y Lahr *et al.* (2001) sobre nauplios de microcrustáceos del orden Anostraca obtuvieron CL₅₀₍₂₄₎ de 54.60 mg L^{-1} sobre *Streptocephalus texanus*, 73.70 mg L^{-1} sobre *Streptocephalus rubricaudatus* y 145 mg L^{-1}

sobre *Streptocephalus sudanicus*, es decir, la respuesta tóxica del glifosato es aún mayor que la del organofosforado Malatión.

Jawahar *et al.*, en 2018 realizaron un estudio de toxicidad aguda de los herbicidas organofosforados glifosato y malatión sobre nauplios del bioindicador *Artemia* sp a 24 y 48 horas. Para el Malatión obtuvieron una $CL_{50(24)}$ de 58.30 mg L⁻¹ y una $CL_{50(48)}$ de 17.30 mg L⁻¹ mientras que para el glifosato (Roundup®) obtuvieron una $CL_{50(24)}$ de 0.03 mg L⁻¹ y una $CL_{50(48)}$ de 0.02 mg L⁻¹. Es de notarse el gran potencial tóxico del glifosato contra el malatión según los datos obtenidos por Jawahar *et al.*, (2018) además de que al aumentar el tiempo de exposición del bioindicador a ambos herbicidas la CL_{50} se veía reducida, es decir, era menor la cantidad de herbicida para provocar la muerte de la mitad de los organismos enfrentados a éste. Por otra parte, al comparar la $CL_{50(24)}$ del glifosato en los datos obtenidos por Jawahar *et al.*, (2018) y los datos obtenidos en este estudio, el potencial tóxico del glifosato es 11 veces mayor. Varios autores más realizaron ensayos de toxicidad aguda del glifosato y malatión sobre diferentes bioindicadores del orden Anostraca también conocidos como branquiópodos, a continuación se presenta un resumen de sus resultados en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Toxicidad del Malatión y Glifosato en branquiópodos.

Especie	Compuesto	Ensayo (h)	CL_{50} (mg L ⁻¹)	Fuente
<i>S. proboscidius</i>	Malatión	24	81.50	Crisinel <i>et al.</i> (1994)
<i>S. sudanicus</i>	Malatión	48	67.70	Lahr <i>et al.</i> (2001)
<i>S. proboscidius</i>	Malatión	24	6.40	Verschueren (2001)
<i>B. sandiegonensis</i>	Malatión	24	24.50	Ripley <i>et al.</i> (2003)
<i>S. dichotomus</i>	Malatión	24	14.10	Arun y Jawahar (2014)
<i>S. dichotomus</i>	Malatión	48	12.30	Arun y Jawahar (2014)
<i>Artemia</i>	Malatión	48	1.00	Sidharta (1997)
<i>C. dubia</i>	Malatión	24	0.0032	Nelson y Roline (1998)
<i>D. magna</i>	Malatión	48	0.003	Rassoulzadegan y Akyurtlakli (2002)

<i>Artemia</i>	Malatión	24	58.30	Jawahar <i>et al.</i> , (2018)
<i>Artemia</i>	Malatión	48	17.30	Jawahar <i>et al.</i> , (2018)
<i>T. platyurus</i>	Glifosato	24	0.35	Fochtman <i>et al.</i> (2000)
<i>B. sandiegonensis</i>	Glifosato	24	0.012	Ripley <i>et al.</i> (2003)
<i>B. thailandensis</i>	Glifosato	24	0.32	Boonsoong y Bullangpoti (2012)
<i>S. dichotomus</i>	Glifosato	24	0.03	Arun y Jawahar (2014)
<i>S. dichotomus</i>	Glifosato	48	0.01	Arun y Jawahar (2014)
<i>D. magna</i>	Glifosato	48	42	Alberdi <i>et al.</i> (1996)
<i>D. magna</i>	Glifosato	48	250	Raipulis <i>et al.</i> (2009)
<i>Artemia</i>	Glifosato	24	0.03	Jawahar <i>et al.</i> (2018)
<i>Artemia</i>	Glifosato	48	0.02	Jawahar <i>et al.</i> (2018)
<i>A. franciscana</i>	Glifosato	24	0.31	Presente estudio

De las CL₅₀ anteriores se puede observar que, en el caso del Malatión sobre el bioindicador *Artemia*, éste presenta una alta toxicidad al contrario de los demás branquiópodos que son característicos de agua dulce, con excepción de *C. dubia* donde la toxicidad del malatión sobre este bioindicador fue aún mayor. Por otro lado, al enfrentar a *Artemia* contra glifosato, éste tiene un alto potencial tóxico en comparación con otros branquiópodos como *D. magna* donde, según los datos obtenidos por Raipulis *et al.* (2009), la CL₅₀ se clasifica en la Categoría IV de la EPA como sustancia no tóxica. La toxicidad de los xenobióticos está dada por varios factores como la temperatura del agua, la pureza de la toxina, etapa de vida del organismo, tamaño del individuo, etcétera. A partir de estos resultados es claro que *Artemia* sp es más sensible a la exposición del organofosforado Glifosato que al Malatión. Los residuos de organofosfatos pueden acumularse fácilmente en los tejidos de *Artemia*, ya sea por contacto directo o por ingestión, y los efectos secundarios pueden ser observados en depredadores de *Artemia* en ambientes acuáticos (Obregón y Vargas, 2010).

Tsiu M. y Chu L. M. (2003) realizaron un estudio de la toxicidad de los componentes de la fórmula base del glifosato comercial (sal isopropilamina de glifosato y surfactante POEA), del ingrediente activo (glifosato ácido) y lo compararon con los resultados que obtuvieron de la evaluación de la toxicidad aguda del glifosato comercial de la marca Roundup®. Estos autores utilizaron siete bioindicadores diferentes, de los cuales dos son microcrustáceos, uno es *Ceriodaphnia dubia* (agua dulce) y el otro *Acartia tonsa* (ambiente marino); además, dos más de estos siete bioindicadores son microalgas, *Selenastrum capricornutum* (alga verde de agua dulce) y *Skeletonema costatum* (diatomea de ambiente marino). Los resultados que obtuvieron se resumen en la **Tabla 22**, la primera cantidad reportada corresponde a la CI_{50} (para microalgas) y CL_{50} (para microcrustáceos) y las cantidades entre paréntesis corresponden a los intervalos de confianza.

Tabla 22. Ensayos de toxicidad aguda (Tsiu M. y Chu L. M., 2003).

Especies	Ensayo (tiempo)	Glifosato ácido (mg L ⁻¹)	IPA de GP (mg L ⁻¹)	POEA (mg L ⁻¹)	Roundup® (mg L ⁻¹)
<i>S. capricornutum</i>	96h CI_{50}	24.70 (22.80-26.70)	41 (29.4-59.1)	3.92 (1.57-9.58)	5.81 (2.36-8.14)
<i>S. costatum</i>	96h CI_{50}	2.27 (0.82-11.10)	5.89 (3.14-10.40)	3.35 (2.02-5.40)	1.85 (0.3-10.49)
<i>C. dubia</i>	48h CL_{50}	147 (141-153)	415 (339-508)	1.15 (1.04-1.27)	5.39 (4.81-6.05)
<i>A. tonsa</i>	48h CL_{50}	35.30 (30.9-40.3)	49.30 (38.4-63.1)	0.57 (0.50-0.65)	1.77 (1.33-2.34)

De los resultados anteriores, es de recalcar que los organismos bioindicadores de agua salada tienen una CI_{50} y CL_{50} alta, es decir, se requiere de una menor concentración de las sustancias de ensayo para provocar la muerte del 50% de los organismos enfrentados al herbicida. Además, sólo en el ensayo sobre *C. dubia* los autores obtuvieron una CL_{50} superior a los rangos establecidos en la clasificación de sustancias tóxicas de la EPA, es decir, se engloba dentro de la categoría IV como sustancia no tóxica, únicamente para el glifosato

ácido y la sal isopropilamina de glifosato, no así para el surfactante POEA o la mezcla comercial de glifosato.

En 2007, Brausch y Smith realizaron un estudio de toxicidad aguda de la Tallowamina Polietoxilada o Polioxietilenamina (POEA) sobre nauplios de *Thamnocephalus platyurus* donde obtuvieron una $CL_{50(24)}$ de 0.002 mg L^{-1} , donde se reafirma el potencial tóxico de la POEA siendo un riesgo el integrarlo en las formulaciones del glifosato.

El branquiópodo *Artemia franciscana* ha probado ser un excelente bioindicador de ambientes marinos contaminados con residuos de organofosforados y puede ser considerado como una herramienta importante de biomonitoreo para futuros análisis toxicológicos.

En este estudio se obtuvo una $CI_{50(72)}$ de 53.95 mg L^{-1} ($36.31\text{-}95.72$) del herbicida glifosato sobre el microalga verde-azul *Microcystis aeruginosa* que, según la EPA, se encuentra en la categoría III como sustancia peligrosa para el ambiente acuático. Según un estudio realizado por Qiu *et al.* (2013) el glifosato presenta un fenómeno de hormesis, es decir, dependiendo de la concentración a la cual se enfrenta el bioindicador (*Microcystis aeruginosa*) será el efecto sobre este ya sea como tóxico e inhibidor de su crecimiento o como fuente de fósforo; sus resultados fueron que, al aumentar la concentración de sal isopropilamina de glifosato de 0.01 a 5 mg P L^{-1} hubo un aumento en el número de células; al utilizar la mezcla comercial Roundup® como sustancia de ensayo obtuvieron que, en concentraciones menores a 1 mg P L^{-1} hubo un incremento en la biomasa de *Microcystis aeruginosa*, y al aumentar la concentración sobre 1 mg P L^{-1} hubo una inhibición en el crecimiento de *M. aeruginosa*. Los resultados obtenidos sugieren que el glifosato es una fuente adecuada de fósforo (P) para el crecimiento de *M. aeruginosa* en el rango de 0.01 a 5 mg P L^{-1} .

Una concentración apropiada de glifosato podría estimular el crecimiento de otro tipo de algas como el microalga verde *Scenedesmus quadricauda* con $0.004 \text{ mg P L}^{-1}$ (Wong, 2000), *Leptolyngbya boryana* a 6.20 mg P L^{-1} y *Nostoc punctiforme* a 3.10 mg P L^{-1} (Forlani *et al.*, 2008); por lo tanto, de acuerdo con estos estudios, si existe una concentración apropiada de glifosato en un lago con limitada concentración de fósforo estimulará la formación de floraciones algales.

En otro estudio realizado por Sáenz *et al.* (1997) sobre algas verdes de agua dulce *Scenedesmus acutus* y *Scenedesmus quadricauda*, utilizaron como sustancias de ensayo sal isopropilamina de glifosato y la mezcla comercial Ron-do® donde, en un ensayo a 96h, obtuvieron los siguientes resultados que se muestran en la **Tabla 23**.

Tabla 23. CI₅₀ de la sal isopropilamina de glifosato y formulación Ron-do sobre ambas especies de *Scenedesmus* (Sáenz *et al.*, 1997).

Especie	Compuesto	Ensayo (h)	CI ₅₀ (mg L ⁻¹)
<i>S. acutus</i>	IPA de GP	96	10.20 (10.40-11.20)
	Ron-do®	96	9.08 (8.40-9.70)
<i>S. quadricauda</i>	IPA de GP	96	7.20 (4.40-8.90)
	Ron-do®	96	9.09 (8.06-10.20)

En 2009, Vendrell *et al* realizaron un estudio sobre cuatro especies de microalgas de agua dulce *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella saccharophila* y *Chlorella vulgaris*. Utilizaron como sustancia de ensayo sal isopropilamina de glifosato (los resultados que obtuvieron se muestran en la **Tabla 24**).

Tabla 24. CI₅₀ de la sal isopropilamina de glifosato sobre cuatro especies de fitoplancton de agua dulce (Vendrell *et al.*, 2009)

Especie	Compuesto	Ensayo (h)	CL ₅₀ (mg L ⁻¹)
<i>C. saccharophila</i>	IPA de GP	96	40.60 (36.70-45.20)
<i>C. vulgaris</i>	IPA de GP	96	41.70 (37.50-46.60)
<i>S. acutus</i>	IPA de GP	96	24.50 (21.90-27.70)
<i>S. subspicatus</i>	IPA de GP	96	26.00 (23.50-28.90)

Los resultados obtenidos por Sáenz *et al.* (1997) muestran una toxicidad alta (Categoría II EPA), lo cual contrasta con los estudios realizados en esta investigación donde la CI₅₀₍₇₂₎ sobre *Microcystis aeruginosa* es cerca de 6 veces menor al comparar la formula comercial Ron-do y la utilizada en este estudio (La Fam®), esto puede ser debido al tipo de bioindicador y a su mecanismo de resistencia al glifosato. Además, al comparar los resultados obtenidos por Sáenz *et al.* (1997) con los obtenidos por Vendrell *et al.* (2009) acerca de la sal

isopropilamina de glifosato, es de notarse la diferencia que existe según las concentraciones reportadas, pues los resultados de Sáenz *et al.* (1997) se engloban dentro de la Categoría II de la EPA (sustancias tóxicas para el ambiente acuático), mientras que los resultados de Vendrell *et al.* (2009) se encuentran en la Categoría III (sustancias peligrosas para el ambiente acuático). Además, ambos grupos de autores utilizan el alga verde *Scenedesmus acutus* donde se aprecia que la toxicidad reportada es dos veces mayor en el estudio realizado por Sáenz *et al.* (1997) en comparación con lo reportado por Vendrell *et al.* (2009).

En 2011, Romero *et al.* realizaron un estudio a 96 horas sobre el alga verde *Chlorella kessleri* utilizando como sustancia de ensayo la mezcla comercial ATANOR®, obteniendo una $CI_{50(96)}$ de 55.62 (53.08-57.56) mg L⁻¹. En comparación con los resultados obtenidos en este estudio, la fórmula La Fam® y ATANOR® tienen una toxicidad similar. Además, estos mismos autores realizaron un análisis de la morfología de *C. kessleri* donde observaron importantes alteraciones en las células expuestas a diferentes concentraciones del herbicida. Las células del cultivo control mostraron la forma y tamaño típicos de la especie. El daño se hizo evidente desde bajas concentraciones del herbicida donde las células vegetativas mostraron un incremento en el tamaño así como un incremento del largo de las vacuolas dentro de las células en un 10-30% de las células expuestas a concentraciones de 40 y 70 mg L⁻¹ de glifosato, respectivamente. Caso contrario con este estudio, donde el CF ≈ 1 indica que las células de *Microcystis aeruginosa* tanto del control como de las concentraciones 72h-NOEC y CI_{50} no muestran alteraciones en la forma, es decir, se mantienen esféricas lisas sin rugosidad aparente o disminución de su volumen.

En un estudio realizado por López-Rodas *et al.* (2007) utilizaron dos cepas de *Microcystis aeruginosa* (Ma3D y Ma7D) de las cuales, a su vez había dos cultivos de cada cepa, uno resistente a glifosato (G^r) y el otro sensible al mismo herbicida (G^s). Enfrentaron estas cepas al glifosato en concentraciones de 0-110 mg L⁻¹ por 7 días, donde ambas cepas resistentes a glifosato tuvieron un efecto tóxico análogo, en concentraciones de 10 a 60 mg L⁻¹ se indujo una drástica disminución de la biomasa y, a la concentración de 110 mg L⁻¹, el crecimiento fue totalmente inhibido. Además, realizaron un análisis de la morfología celular de ambas cepas tanto de las glifosato-resistentes como de las glifosato-sensibles. Para la cepa Ma3D G^s obtuvieron un CF de 1.00 ± 0.01 y de G^r un CF de 0.96 ± 0.01 . Para la cepa Ma7D G^s

obtuvieron un CF de 0.99 ± 0.01 y para G^r un CF de 0.90 ± 0.002 , es decir, las células glifosato-resistentes de ambas cepas exhibieron un crecimiento significativo en comparación con las células glifosato-sensibles. Como ambas cepas glifosato-sensibles tienen un CF ≈ 1 es indicativo de que son células de forma esférica al contrario de las variantes glifosato-resistentes que tienen un valor de CF significativamente menor, lo que corresponde a células ligeramente elípticas. En el caso de este estudio, tanto para las células control como a las enfrentadas a las concentraciones 72h-NOEC y $CI_{50(72)}$ de glifosato, el CF ≈ 1 por lo que las células se mantienen esféricas, sin embargo, sí cambian en tamaño pues las células enfrentadas a la concentración 72-NOEC son significativamente más grandes en comparación con las células control y las células expuestas a la CI_{50} son significativamente más pequeñas en comparación con el control.

Whitton (2002) señala que en un ambiente contaminado con glifosato las poblaciones podrían estar constituidas de células de tamaño menor y una ligera diferencia morfológica de las típicas células esféricas de *Microcystis aeruginosa*. Se puede suponer que el mecanismo vinculado a la resistencia al glifosato es un gen pleiotrópico que también está implicado en la disposición de análogos de proteínas microtubulares en las células, pero este punto aún no se ha investigado (López-Rodas, 2007).

8. CONCLUSIONES

El glifosato es un herbicida tóxico cuya toxicidad se ve potenciada debido a la solubilidad adquirida al agregar aditamentos que le ayuden a obtener estas características, además de su uso excesivo y la falta de regulación, puede llegar a generar daños ecotoxicológicos graves. El uso continuo de este herbicida y la falta de una evaluación de los efectos sobre organismos no objetivo puede incurrir en un daño grave a ecosistemas acuáticos debido a la lixiviación del glifosato por efluentes de aguas subterráneas o por su vertido directo.

La evaluación de la toxicidad aguda sobre *Artemia franciscana* y sobre *Microcystis aeruginosa* en este estudio, genera datos reales posibles a presentarse en caso del uso continuo de herbicidas basados en la sal isopropilamina de N- (fosfonometil) glicina, con resultados muy tóxicos para el ambiente acuático debido a la concentración letal media obtenida para organismos zooplanctónicos y a la concentración inhibitoria media para organismos fitoplanctónicos. Estos representantes del primer nivel trófico resultan altamente útiles para afirmar que es posible la afección de consumidores secundarios y niveles tróficos superiores, pudiendo llegar a establecerse un proceso de biomagnificación.

Los resultados del coeficiente de forma de *Microcystis aeruginosa* indican que no hay cambios morfológicos en las células, sin embargo, el glifosato provoca cambios significativos en el diámetro, volumen, área y perímetro de las células medidas a diferentes concentraciones de glifosato debido a un proceso de hormesis.

La información existente advierte que se requiere de un mayor número de pruebas respecto a los efectos a largo plazo y de exposición a poblaciones de manera tanto aguda como crónica, además de la evaluación del uso de aditamentos (surfactantes) para poder determinar su efecto tóxico sobre los organismos involucrados, tanto del medio acuático como del medio terrestre.

9. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos, se recomienda el estudio por separado de los aditamentos agregados a las formulaciones de glifosato pues, como se pudo observar, existen surfactantes que ayudan a que el glifosato se adhiera y penetre a través de las hojas de la planta a la cual se dirige, por lo que algunos autores han dado a conocer que por sí solos son más tóxicos que el mismo glifosato.

Demostrar que el glifosato por sí solo no tiene efecto tóxico alguno como lo afirman varios autores haciendo pruebas de toxicidad aguda a organismos tanto de agua dulce como de agua salada pues, como se pudo observar, existe una tendencia de mayor toxicidad hacia organismos de agua salada que de agua dulce.

Evitar el uso de este herbicida cerca de sistemas lénticos o estanques pues, debido a que no hay movilidad de las aguas, el glifosato es degradado por bacterias de los alrededores y provoca la eutroficación de las aguas generando la formación de floraciones algales que, en algunos casos, pueden ser tóxicas haciendo que el agua deje de ser potable.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abatzopoulos, T. J., N. Agh, G. Van Stappen, S. M. Razavi Rouhani & P. Sorgeloos. (2006). *Artemia* sites in Iran. J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom, 86: 299-307.
- Abreu-Grobois, F.A.; Beardmore, J.A. (1980). International Study on *Artemia*. II. Genetic characterization of *Artemia* populations - an electrophoretic approach: 133–146. In: The brine shrimp *Artemia*. Vol. 1. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Persoone, G.; Sorgeloos, P.; Roels, O.; Jaspers, E. (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium, 345 pp.
- Adams, S.M. (2005). Using multiple response bioindicators to assess the health of estuarine ecosystems: an operational framework. In Bortone, S.A. (ed.). *Estuarine Indicators*. Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 5–18.
- Alberdi, J.L., Saenz, M.E., Dimarzio, W.D., Trotorelli, M.C. (1996). Comparative Acute toxicity of two Herbicides, Paraquat and Glyphosate, to *Daphnia magna* and *D. spinulata*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 57 (2), 229-235.
- Albert, L. A. (2013). *Curso Básico de Toxicología Ambiental*. México: LIMUSA. ISBN: 978-968-18-2609-3
- Alfaro, M. (1999). Contaminación del aire: emisiones vehiculares, situación actual y alternativas (Primera ed.). San José, C. R.: EUNED.
- Alloway, B., & Ayres, D. (1997). Chemical principles of environmental pollution (Second ed.). New York: CRC Press.
- Aparicio, V., Costa, J. L., (2013). Soil quality indicators under continuous cropping systems in the Argentinean Pampas. Soil Till. Res. 96, 155-165.
- APVMA: Special Review of Glyphosate. En: NRA Special Review Series 96.1 Junio de 1996 (www.apvma.gov.au/chemrep/glyphosate.shtml#2).

- Aquaria. (2018). Ciclo de vida de *Artemia*. En: <https://www.aquariavirtual.com/blog/alimento-marino/3-ciclo-de-vida-de-la-artemia>. [Última visita: 22 de noviembre de 2018].
- Arun Kumar, M.S., Jawahar, A.A. (2014). Effect of two organophosphorus pesticides on the reproductive bionomics of freshwater fairy shrimp *Streptocephalus dichotomus* (Baird, 1860) (Crustacea: Anostraca). *International Journal of Bioassays*, 3 (09), 3307-3312.
- Baird, C. (2001). *Química ambiental*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Baird, D.D.; Upelrem, R.P.; Homesley, W.B. & Franz, J.E. (1971). En: Murtza, F.; Stallings, W. 2001. Closing down on Glyphosate inhibition – with a new structure for drug discovery. *PNAS*. 8 (6): 2944-2946. (www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.061025898).
- Barata, C., Hontoria, F., & Amat, F. (1996). Estimation of the biomass production of *Artemia* with regard to its use in aquaculture: Temperature and strain effects. *Aquaculture*, 142(3-4), 171-189. doi:10.1016/0044-8486(95)01250-8
- Barbosa C., & Aiassa, D. (2017). EVALUACIÓN DE DAÑO AL ADN EN LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA EXPUESTOS AL HERBICIDA GLIFOSATO. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(3), 403-410. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.03.04>
- Barceló, D., y López, M. J. (2007). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Convenio Universidad de Sevilla-Ministerio de Medio Ambiente. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona.
- Barigozzi, C. (1974). *Artemia*: A survey of its significance in genetic problems: 221– 252. In: *Evolutionary Biology*. Vol. 7. Dobzhansky, T.; Hecht, M.K.; Steere, W.C. (Eds). Plenum Press, New York, USA, 314 pp.

- Baudouin, M. F., & Scoppa, P. (1974). Acute toxicity of various metals to freshwater zooplankton. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 12(6), 745-751. doi:10.1007/BF01685925
- Bautista, F. Z. (1999). Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados (Primera ed.). Mérida, Yucatán: UADY.
- Baxter, P.J., (1991). Toxic marine and freshwater algae: an occupational hazard? *Br. J. Ind. Med.* 49, 505–506.
- Bayne (1986). En *Toxicología fundamental*. Ed. Científico Médicas. 2ª edición. 1988, p. 408.
- Bejarano, F. G., Márquez, D. A., Solís, J. D. Á., Meraz, E. A., Aguilar, O. A., Arriaga, J. A. L., ... Rodríguez, I. E. M. (2017). Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México, 364.
- Bellinger, E. G., & Sigeo, D. C. (2015). *Freshwater Algae: Identification, Enumeration and Use as Bioindicators* (Segunda ed.). Oxford, United Kingdom: WILEY Blackwell.
- Boonsoong, B.; Bullangpoti, V. (2012). Acute toxicity of Roundup® and carbosulfan to the Thai fairy shrimp, *Branchinella thailandensis*. *Biopesticides Toxicology Specialty Research Unit (BTSRU) Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University. Bangkok, Thailand.*
- Bowen, S.T.; Sterling, G. (1978). Esterase and malate dehydrogenase isozyme polymorphisms in 15 *Artemia* populations. *Comp. Biochem. Physiol.*, 61B: 593–595.
- Brausch, J. M.; Smith, P. N. (2007). Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 52: 217-221.
- Browne, R. A., & Bowen, S. T. (1991). Taxonomy and population genetics. En R. A. Browne, P. Sorgeloos, & C. N. Trotman, *Artemia Biology* (págs. 221-235). Florida: CRC PRESS.
- Carlisle, S. M. and Trevors, J. T.: (1986). *Water, Air, and Soil Pollut.* 29, 189.

- Castenholz, R.W., (1988). Culturing methods for cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167, 68–93.
- Castro, I. I., & Córdova, M. M. (2001). Investigación de la actividad citotóxica de las fracciones de los extractos de cinco especies vegetales mediante el bioensayo de *Artemia salina*. Tesis (Licenciado en Química y Farmacia), Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador.
- Castro J., Castro G., Castro T., Monroy M. y Lara R. (2006). Cultivo semi-intensivo de *Artemia franciscana* proveniente de la salinera Istmo, Juchitán, Oaxaca, bajo condiciones controladas en laboratorio. *Contactos* 60: 49-54.
- Chim, L. (2016). “Encuentran glifosato en manto freático, agua embotellada y orina de habitantes de Hopelchén” en *La Jornada*. 30 de agosto de 2016, p. 28 En: <http://www.jornada.unam.mx/2016/08/30/estados/028n1est> consultado el 30 de agosto 2016.
- Clark, L.S.; Bowen, S.T. (1976). The genetics of *Artemia salina*. VII. Reproductive isolation. *J. Hered.* 67(6): 385–388.
- COFEPRIS. (2016). Catálogo de Plaguicidas. http://www.cofepris.gob.mx/wb/cfp/catalogo_de_plaguicidas (Página visitada el 01-10-2018).
- CONICET. (2009). Informe - Evaluación de la información científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Correa, F., Bückle, R., & De la Rosa, V. (1993). Hibridación en algunas poblaciones de *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae). *Rev. Biol.*, 41, 97-101.
- Crisinel, A., Delaunay, D., Rossel, J., Tarradellas, H., Meye, H., Saiah, P., Vogel, C., Delisle, Blaise, C. (1994). Cyst based ecotoxicological tests using anostracans: Comparison of two species of *Streptocephalus*. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 9, 317-326.
- Cronberg G, Annadotter H, (2006). Manual on aquatic cyanobacteria. Lund: Institute of Ecology/Limnology.

- Darley, W.M. (1982). *Algal Biology: A Physiological Approach*. Oxford, UK, Blackwell Scientific.
- De la Lanza, E. G., Hernández, P. S. y Carbajal, P. J. L. (2000). *Organismos Indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (Bioindicadores)*. Plaza y Valdés. México. 633 p.
- Eddleston M, Singh S, Buckley N. (2005). Organophosphorous Poisoning (Acute). *Clinical Evidence*. 2005; 13:1744-55
- EFSA (2015). News 12 Nov 2015. Glyphosate: EFSA updates toxicological profile. En <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/151112> consultada 15 septiembre 2018.
- El Saadi, O., Easterman, A.J., Camerson, S., Roder, D.M., (1995). Murray River water raised cyanobacterial cell counts and gastrointestinal and dermatological symptoms. *Med. J. Aust.* 162, 122–125.
- Eslava, P., Ramírez, W. y Rondón, I. (2003). Efectos del glifosato (GP) con énfasis en organismos acuáticos (Revisión de literatura). Instituto de Acuicultura de los Llanos. Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana. Pp70-100.
- Eslava, P., Ramírez, W. y Rondón, I. (2007). Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos. Instituto de Acuicultura de los Llanos. Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana. Pp34-43.
- Evans, V. (2013). *The microbial ecology and biogeochemistry of nuclear waste storage facilities in the UK*. PhD thesis, University of Manchester.
- FAO. (1986). *Manual para el Cultivo y Uso de Artemia para la Acuicultura*. En: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB474S/AB474S00.htm>. Último acceso: Noviembre, 2018.
- Fargašová, A. (2001). Winter Third- to Fourth-Instar Larvae of *Chironomus plumosus* as Bioassay Tools for Assessment of Acute Toxicity of Metals and Their Binary Combinations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48(1), 1-5. doi:10.1006/eesa.2000.1980

- Fochtman, P.; Raszka, A.; Nierzedzka, E. (2000). The use of conventional bioassays, microbiotests, and some "rapid" methods in the selection of an optimal test battery for the assessment of pesticides toxicity. *Environmental toxicology*. 15: 376-384.
- Forlani, G.; Pavan, M.; Gramek, M.; Kafarski, P.; Lipok, J. (2008). Biochemical bases for a widespread tolerance of cyanobacteria to the phosphonate herbicide glyphosate, *Plant Cell Physiol*. 49 443–456.
- Frontera, J., Vatnick, I., Chaulet, A. y Rodríguez, E. (2011). Effects of Glyphosate and polyoxyethylenamine on growth and energetic reserves in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*: 1-9. Publicado online: (<http://www.springerlink.com>)
- FUSAGRI. (1985). Control de malezas serie petróleo y agricultura. Fundación servicio para el agricultor. FUSAGRI, 1985, vol. 2, no. 8, p. 9-26.
- Glyphosate facts. (2013). Sitio de internet: <https://www.glifosato.es/mecanismo-de-accion-del-glifosato>.
- Gold, G.A., Bell, S.G., Brooks, W.P., (1989). Cyanobacterial toxins in water. *Water Sci. Technol*. 21, 1–13.
- Goldsborough, L.G. y Beck, A.E. (1989). Rapid dissipation of glyphosate in small forest ponds. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 18(4): 537-544.
- Guidelines for Legislation on the Control of Pesticides. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1989). <http://www.fao.org/AG/AGP/AGPP/Pesticid>.
- Halm, H., Lam, P., Ferdelman, T.G., et al., (2011). Heterotrophic organisms dominate nitrogen fixation in the South Pacific Gyre. *ISME J*. 15.
- Hayes, P.K., (1988). Gas vesicles: chemical and physical properties. *Methods Enzymol*. 167, 213–222.
- IARC, (2015). Boletín de Prensa. 20 March 2015. IARC Monographs Vol. 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. Some organophosphate

- insecticides and herbicides: diazinon, glyphosate, malathion, parathion and tetrachlorvinphos. En: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/index.php>
- INIFAP (2014) Desecación química de sorgo para grano. SAGARPA-INIFAP. Sept. 2014. En <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/988.pdf>
- Jaramillo, F., Meléndrez, M.E. y Aldana, M.L. (2009). Toxicología de los Plaguicidas. En Toxicología Ambiental. Jaramillo, F., Rincón, A.R. y Rico, R.M. (ed.), pp. 270. Textos Universitarios. Universidad Autónoma de Aguascalientes - Universidad de Guadalajara. México.
- Jawahar, A.; Jamal, M.; Arun, K.; Akbar, J. (2018). Organophosphorus pesticides toxicity on brine shrimp, *Artemia*. Journal CleanWAS 2 (1) 23-26.
- Jiraungkoorskula, W., Suchart, E.U., Kruatrachuea, M., Sahaphongc, S., Vichasri-Gramsa, S. y Pokethitiyooka, P. (2002). Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Science Asia. 28: 121-127.
- Jones OA, Voulvoulis N, Lester JN (2001) Environ. Toxicol. 22, 1383.
- Kützing, F.T. (1846). Tabulae phycologicae; oder, Abbildungen der Tange. Vol. I, fasc. 1 pp. 1-8, pls 1-10. Nordhausen: Gedruckt auf kosten des Verfassers (in commission bei W. Köhne).
- Labine, M.A., Minuk, G.Y., (2009). Cyanobacterial toxins and liver disease. Can. J. Physiol. Pharmacol. 87 (10), 773–788.
- Lahr, J.A., Badji, S., Marquénine, E., Schuiling, K.B., Ndour, Diallo, O., Everts, J.W. (2001). Acute toxicity of Locust insecticides to two indigenous invertebrates from sahelian temporary ponds. Ecotoxicology and Environmental Safety, 48, 66-75.
- Lajmanovich, R., Attademo, A., Peltzer, P., Junges, C. y Cabagna, M. (2011). Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) Tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase inhibitors. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 60(4): 681-689.

- Lehman, P.W., Marr, K., Boyer, G.L. (2013). Long-term trends and causal factors associated with *Microcystis* abundance and toxicity in San Francisco Estuary and implications for climate change impacts. *Hydrobiologia* 718, 141–158.
- Llácer, J.L., Fita, I., Rubio, V., (2008). Arginine and nitrogen storage. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18 (6), 673–681.
- López-Rodas, V.; Flores-Moya, A.; Maneiro, E.; Perdignes, N.; Marva, F.; García, M. E.; Costas, E. (2007). Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of pre-selective mutations. *Evol Ecol.* 21: 535-547 DOI: 10.1007/s10682-006-9134-8.
- Malpica, A. S., Castro, T. B., Sandoval, H. T., Castro, J. M., De Lara, R. A., & Castro Mejía, G. (2004). Composición del contenido de ácidos grasos en tres poblaciones mexicanas de *Artemia franciscana* de aguas epicontinentales. *Revista de Biología Tropical*, 52(1), 297-300.
- Mann, R.M. y Bidwell, J.R. (1999). The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 36(2): 193-199.
- Manual de Plaguicidas de Centroamérica. Universidad Nacional Costa Rica. Malatión, en: <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/358-malation> [Última visita: 22 de noviembre de 2018].
- Martin, J. W., & Davis, G. E. (2001). An updated classification of the Recent Crustacea. Los Angeles California: Nat. Hist. Mus. Los Angeles County.
- Martineau, E., Wood, S.A., Miller, M.R., et al. (2013). Characterisation of Antarctic cyanobacteria and comparison with New Zealand strains. *Hydrobiologia* 711, 139–154.
- Mesnage, Robin & Defarge, Nicolas & Vendômois, Joël & Séralini, Gilles-Eric. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology.* 84. 10.1016/j.fct.2015.08.012.

- Monheit, Susan; CDFA – IPC. (2003). Glyphosate - based aquatic herbicides an overview of risk. Pág. 1-10 (http://tearamundo.org/control_manage/docs/glyphosate_aqua_risk.pdf).
- Mueller TC, Massey JH, Hayes RM, Main CL, Stewart CN. (2003). “Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.)”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 680-684.
- Muñoz, Joaquín. (2009). Implicaciones de la dispersión actual e histórica para la biología evolutiva y conservación de *Artemia* y otros invertebrados acuáticos con estadio de diapausa (Implications of the current and historical dispersal for evolutionary biology in *Artemia* and..).
- Myers JP, Zoeller RT, Vom Saal FS. (2016). A clash of old and new scientific concepts in toxicity, with important implications for public health. *Environ Health Perspect.* 2009;117(11):1652–5.
- Neli. (2015). Biología de la *Artemia*. En: <https://www.bioartemia.com/2017/03/03/biologia-de-la-artemia-sp/> [Última visita: 22 de noviembre de 2018].
- Nelson, S., Roline, R.A. (1998). Evaluation of sensitivity of rapid toxicity tests relative to daphnid acute lethality tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60, 292-299.
- Nivia, E. (2001). Las fumigaciones aéreas sobre cultivos ilícitos sí son peligrosas – Algunas aproximaciones Conferencia “Las Guerras en Colombia: Drogas, Armas y Petróleo” (The Wars in Colombia: Drugs, Guns and Oil).
- NORMA MEXICANA NMX-AA-110-SCFI-1995, Análisis de agua – evaluación de toxicidad aguda con *artemia franciscana kellogg* (crustacea – anostraca) – método de prueba.
- Obregón, E.B., Vargas, A. (2010). Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate Diazinon. *Biological Research*, 43, 357-362.

- OCDE. (2011). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. En: <http://www.oecd.org/env/test-no-201-alga-growth-inhibition-test-9789264069923-en.htm>
- Odum, E. P. (1972). Ecología. Interamericana. México. p. 639
- Panagoula, B., Panayioti, M., & Iliopoulou-Georgudaki, J. (2002). Acute Toxicity of Tbt and Irgarol in *Artemia salina*. International Journal of Toxicology, 21(3), 231-233. doi:10.1080/10915810290096360
- Papadopoulos, A., Lazaridou, E., Mauridou, G., & Touraki, M. (2004). Glutathione S-transferase in the branchiopod *Artemia salina*. Marine Biology, 144(2), 295-301. doi:10.1007/s00227-003-1203-8
- Peleato, M.; Sevilla, E.; López, S. (2005). Nuevos riesgos para el agua potable: Microcistina. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza.
- Percival, S. L., y Williams, D. W. (2014). Cyanobacteria. En *Microbiology of Waterborne Diseases* (pp. 79-88). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00005-6>
- Persoone, G.; Sorgeloos, P.; Roels, O.; Jaspers, E. (Eds)-(1980). The brine shrimp *Artemia*. Volume 1, 2, 3. Universa Press, Wetteren, Belgium, 345, 664, 456 pp.
- Persoone, G., Van de Vel, A., Van Steertegem, M., & De Nayer, B. (1989). Predictive value of laboratory tests with aquatic invertebrates: influence of experimental conditions. Aquatic Toxicology, 14(2), 149-167. doi:10.1016/0166445X(89)90025-8.
- Pitty, A. y Muñoz, L. (1991). Guía práctica para el manejo de malezas. El Zamorano. Escuela Agrícola Panamericana. Tegucigalpa. 1991, 223 p.
- Pizzolato TM, Lopez de Alda MJ, Barceló D (2007) TrAC-Trends Anal. Chem. 26, 609.
- Post, F. J. & N. N. Youssef. (1997). A prokaryotic intracellular symbiont of the Great Salt Lake brine shrimp *Artemia salina* L. Can. J. Microbiol., 23: 1232-1236.
- Postgate, J.R., (1998). Nitrogen fixation, third ed. Cambridge Univ Press, Cambridge.

- Qiu, H., Geng, J., Ren, H., Xia, X., Wang, X., & Yu, Y. (2013). Physiological and biochemical responses of *Microcystis aeruginosa* to glyphosate and its Roundup® formulation. *Journal of Hazardous Materials*, 248-249, 172-176. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.12.033>
- Raipulis, J., Toma, M.M., Balode, M. (2009). Toxicity and genotoxicity testing of roundup proceedings of the Lat. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B, (63), 29-32.
- Ramírez, P. R., & Mendoza, A. C. (2008). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. México, D.F.: Secretaria de medio ambiente y recursos naturales. Instituto Nacional de Ecología.
- Rassoulzadegan, M., Akyurtlakli, N. (2002). An investigation on the toxic effects of Malathion organophosphate insecticide on the *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea: Cladocera). *Turkish Journal of Zoology*, 26, 349-355.
- Raz, G. A. (2000). Crustáceos y Poliquetos. p. 265-307. En: Organismos Indicadores de la Calidad del Agua y de la Contaminación (Bioindicadores). De la Lanza, E. G., Hernández, P. S. y Carbajal, P. J. L. (Eds). Plaza y Valdés. México. 633 pp.
- Reichwaldt, E.S., Ghadouani, A., (2012). Effects of rainfall patterns on toxic cyanobacterial blooms in a changing climate: between simplistic scenarios and complex dynamics. *Water Res.* 46 (5), 1372–1393.
- Renau-Piqueras J, Gómez-Perretta C, Guerri C, Sanchis R (1985) Qualitative and quantitative ultrastructural alterations in hepatocytes of rats prenatally exposed to ethanol with special reference to mitochondria, golgi apparatus and peroxisomes. *Virchows Arch* 405:237–251
- Rendón, J. (2015). Estudio sobre residuos de glifosato en muestras de agua y orina de habitantes de la zona de Holpechén. Campeche. Instituto EPOMEX, Universidad Autónoma de Campeche, PNUD. Fundación Río Arronte.
- Repetto, M. (1988). Toxicología fundamental. Ed. Científico Médicas. 2ª edición. 1988, p. 408.

- Repetto, M. y Sanz, P. (1988). En: Toxicología fundamental. Ed. Científico Médicas. 2ª edición. 1988, p. 408.
- Ripley, B. J. (2003). Toxicity of Malathion and Roundup® to the San Diego fairy shrimp. Transactions of the western section of the wildlife society. 38/39: 133-21.
- Riva Juan, María del Carmen. (1991). Nociones y planteamientos toxicológicos en la preservación del medio ambiente acuático. Bol. Intexter No. 99. U. P. C.
- Rodríguez, M. (2015). Agencias ambientales y de salud contradicen a la Organización Mundial de la Salud. Director de Asuntos Científicos de CropLife Latin America. En <http://www.croplifela.org/es/documentos/articulosrecomendados/agencias-ambientales-y-de-salud-contradicen-a-laorganizacion-mundial-de-la-salud-mauricio-rodriguez-noviembre-2015.html>
- Roldán Pérez, G. (1999). Los macroinvertebrados y su valor como indicadores de la calidad del agua. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 23(88): 375-387. ISSN 0370-3908.
- Romero, D. M.; Ríos de Molina, M. C.; Juárez, Á. B. (2011). Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. Ecotoxicology and Environmental Safety. Elsevier. 74: 741-747.
- Ronco, A., & Díaz, M. C. B. (2004). Interpretación y manejo de resultados. En G. Castillo Morales, Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua (págs. 146-147). México: IMTA.
- Rosenthal, P. (1990). Protección del medio ambiente e higiene laboral desde el punto de vista del fabricante de colorantes. ¿Hasta qué punto son peligrosos los colorantes textiles? ITB Tintorería/Acabado/Estampado 1990 pp. 58-66.
- Rueppel ML, Brightwell BB, Schaefer J, Marvel JT. (1997). "Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water". Journal of Agricultural and Food Chemistry 1997; 25:517-528.
- Sáenz, M. E.; Di Marzio, W. D.; Alberdi, J. L.; Tortorelli, M. C. (1997). Effects of Technical Grade and Commercial Formulation of Glyphosate on Algal Population Growth.

- Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. New York Inc. 59: 638-644.
- Salgado, I. (2001). La *Artemia* y su cultivo en el Perú. Universidad Nacional de Piura. Perú. 113 pp.
- San Juan, E. M. (2010). Movilidad de Pb y Ni en suelos contaminados del valle del Mezquital Hidalgo. Tesis (Ingeniero Agrónomo especialista en suelos), Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México.
- Sánchez-Fortún, S., Sanz-Barrera, F., & Barahona-Gomariz, M. (1995). Acute toxicities of selected insecticides to the aquatic arthropod *Artemia salina*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 54(1), 76-82. doi:10.1007/BF00196272.
- Sarabia, R. A. (2002). Toxicidad y acumulación de cadmio en poblaciones de diferentes especies de *Artemia*. Tesis (Doctor en Ciencias Biológicas), Unidad de Fisiología Animal del Departamento de Biología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València, Burjassot, Valencia.
- SIAVI. (2014). Sistema de información Arancelaria Vía Internet. Fracción 2931.90.19 Sal isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina. Sal de glifosato.
- Shi, X., Yang, L., Niu, X., et al., (2003). Intracellular phosphorus metabolism of *Microcystis aeruginosa* under various redox potential in darkness. Microbiol. Res. 158 (4), 345-352.
- Sidharta, R.B. (1997). Effects of Malathion on Brine shrimp (*Artemia salina* L.). A preliminary lethal toxicity test. Biota, 11 (2), 61-66.
- Singh, S.P., Montgomery, B.L., (2011). Determining cell shape: adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. Trends. Microbiol. 19 (6), 278–285.
- Solís, L. M., & López, J. A. (2003). Principios básicos de contaminación ambiental (Primera ed.). Toluca, México: UAEM.

- Sorgeloos, P. L. (1986). Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. Prepared for the Belgian Administration for Development Cooperation. The Food and Agricultural Organization of the United Nations. Gante, Bélgica.
- Spiro, T. G., & Stigliani, W. M. (2004). *Química Medioambiental*. Madrir: PRENTICE HALL.
- Sprankle, P., Meggitt, W.F. y Penner, D. (1975). "Rapid inactivation of glyphosate in soils". *Weed Sci.* 1975; 23: 224-228.
- Stal, L.J. (1995). Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *NewPhytologist* 131, 1–32.
- Stancheva, R., Sheath, R.G., Read, B.A., et al. (2013). Nitrogen-fixing cyanobacteria (free-living and diatom endosymbionts): their use in southern California stream bioassessment. *Hydrobiologia* 720, 111–127.
- Stewart, I., Schluter, P.J., Shaw, G.R., (2006). Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. *Environ. Health* 24 (5), 7.
- Suárez, M. V., & González, V. A. (2014). *Desarrollo Sustentable: Un Nuevo Mañana* (Primera ed.). México: Grupo Editorial Patria.
- Triantaphyllidis, G., Abatzopoulos, T., & Sorgeloos, P. (1988). Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *Journal of Biogeography*, 25(2), 213-226. doi:10.1046/j.1365-2699.1998.252190.x
- Triantaphyllidis, G., Pouloupoulou, K., Abatzopoulos, T., Pinto Pérez, C., & Sorgeloos, P. (1995). International study on *Artemia* XLIX. Salinity effects on survival, maturity, growth, biometrics, reproductive and lifespan characteristics of a bisexual and a parthenogenetic population of *Artemia*. *Hydrobiologia*, 302(3), 215-227. doi:10.1007/BF00032111
- Tsui, M. T. K., Chu, L. M. (2003). Acuatric toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52 pp. 1189-1197, Hong Kong, China.

- UNEP. (2000). América Latina y el Caribe. Perspectivas del Medio Ambiente. GEO 2000.
- UNEP (2013). Cost of Inaction on the Sound Management of Chemicals. Geneve. Division of Technology, Industry and Economics. Chemicals Branch.
- US Environmental Protection Agency. (1996). Technical Overview of Ecological Risk Assessment - Analysis Phase: Ecological Effects Characterization. Ecotoxicity Categories for Terrestrial and Aquatic Organisms. Federal Register 63(93): 26846-26924. Guidelines for Ecological Risk Assessment; Risk Assessment Forum; Washington, D.C.
- US. EPA. (2002). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Environmental Monitoring and Support Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T) 1200. Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460. EPA-821-R-02-012.
- Vanhaecke, P., W. Tackaret & P. Sorgeloos. (1987). The biogeography of *Artemia*: An updated review. *Artemia Res. Applic.*, 1: 129-155.
- Vázquez, G., Castro, G., González, I., Pérez, R. y Castro, T. (2006). Bioindicadores como herramientas para determinar la calidad del agua. UAM-X.
- Vendrell, E.; Gómez de Barreda Ferraz, D.; Sabater, C.; Carrasco, J. M. (2009). Effect of Glyphosate on Growth of Four Freshwater Species of Phytoplankton: A Microplate Bioassay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 82: 538-542 DOI 10.1007/s00128-009-9674-z
- Vera, M., langomarsino, L., Sylvester M., Pérez, G., Zagarese, H., Ferrano, M. (2014). New evidences of Roundup (glyphosate formulation) impact on the periphyton communiti in the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* 19 (4): 710-721.
- Verschuere, K. (2001). Hand book of Environmental Data on organic chemicals, fourth edition. John Wiley & sons, New York.
- Visviki, I., & Rachlin, J. W. (1991). The toxic action and interactions of copper and cadmium to the marine Alga *Dunaliella minuta*, in both acute and chronic exposure. *Archives*

- of Environmental Contamination and Toxicology, 20(2), 271-275.
doi:10.1007/BF01055915
- Washington, H. G. (1984). Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. Water Research. 18(6):653-694.
- Watts, M. et al. (2016) Glyphosate, PAN Asia Pacific, PAN Germany, PAN UK, PAN Europe, PAN North America, October 2016, en: <http://pan-international.org/wp-content/uploads/Glyphosate-monograph.pdf>
- Whitton BA (2002) Phylum Cyanophyta (Blue Green Algae/Cyanobacteria). In: John DJ, Whitton BA, Brook AJ (eds) The freshwater algal flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 25–122.
- WHO. (1990) Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture. Ginebra: WHO 1990. <http://www.who.int/heli/risks/toxics/chemicals/en/index.html>
- WHO. (1994). Glyphosate. Environmental Health Criteria No. 159. Geneva: World Health Organization.USA.
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., et al., (2010). Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. Mar. Drugs 8 (7), 2185–2211.
- Williams, W., & Geddes, M. (1881). Anostracans of Australan Salt Lake, with particular reference, to a comparison of Parartemia and Artemia. En R. Browne, P. Sorgeloos, & C. Trotman, Artemia Biology (págs. 351-368). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Williams, G.M., Kroesb, R. y Munro, I.C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 31(2): 117-165.
- Wong, P. (2000). Effect of 2, 4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614, Chemosphere 41 177–182.

- Yopp, J.H., Tindall, D.R., Miller, D.M., et al. (1978). Isolation, purification and evidence for a halophilic nature of the blue-green alga *Aphanothece halophytica* Frey (Chroococcales). *Phycologia* 17, 172–178.
- Zavitsanos, P.; Meng, Chin-Kai.; Grey, L.; Nguyen, B.; Yang, P. (2006). Analysis of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid by liquid chromatography/mass spectrometry. En: Agilent Technologies (www.bst.com.au/resources/lcms%20glyphosate%20&%20aminometil.pdf).
- Zegura, B., Straser, A., Filipic, M., (2011). Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins – a review. *Mutat. Res.* 727 (1-2), 16–41.