

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Toxicidad del fungicida Kresoxim - metil
sobre siete bioindicadores de calidad
ambiental**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en
Biología

Maricarmen del Rosario Valera Quiroz

Lima – Perú

2017

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis queridos padres José Valera y Mary Carmen Quiroz. Gracias por su apoyo incondicional, su infinito amor, sus consejos, por motivarme a nunca rendirme y guiarme en la vida. Gracias a su aliento he podido llegar hasta aquí, concluyendo así una etapa importante de mi vida. Los amo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi asesor de tesis Dr. José Oliver Iannacone por guiarme en el desarrollo de la tesis, compartir sus conocimientos y siempre haber estado dispuesto a ayudarme.

Y agradezco a Harvey López por su aliento en esta etapa académica, por motivarme cada día a ser mejor persona e impulsarme a ser mejor profesional.

RESUMEN

Kresoxim-metil es un fungicida del grupo estrobilurina conocido por afectar los ambientes acuáticos y terrestres. El objetivo de este trabajo fue determinar la toxicidad de Kresoxim-metil sobre siete bioindicadores de calidad ambiental. Se realizaron bioensayos ecotoxicológicos con los siete modelos usando protocolos estandarizados. Kresoxim-metil afectó la mortandad de *Artemia franciscana*, presentando a 48h un CL_{50} de 58 mg i.a·L⁻¹. En *Carassius auratus* a los 26 días se observó que la mortandad se vio afectada a la concentración de 0,067 mg i.a·L⁻¹, la eclosión se vio alterada a 0,134 mg i.a·L⁻¹; en el peso y longitud de los peces sobrevivientes se observó efectos en la concentración más alta a 0,26 mg i.a·L⁻¹; no se vio efecto en el número de larvas deformadas y en el porcentaje de juveniles de *C. auratus*, el comportamiento anormal se vio afectado en la mayor concentración a 0,26 mg i.a·L⁻¹. En *Chlorella vulgaris* se observó efecto inhibitor de crecimiento a las 96 h con $CL_{50} > 0,12 \times 10^{-1}$ mg i.a·L⁻¹. No se observó efecto de Kresoxim-metil sobre la mortalidad de *Chrysoperla externa* y en la inhibición de nitratos en las comunidades microbianas de suelo. En *Daphnia magna* la CL_{50} de mortandad fue 1,04 mg i.a·L⁻¹ a las 48 h de exposición. En *Poecilia reticulata* la CL_{50} a las 96 h fue 6,51 mg i.a·L⁻¹. Kresoxim-metil es más perjudicial en los ambientes acuáticos que en los terrestres.

Palabras claves: *Artemia franciscana*, *Carassius auratus*, *Chlorella vulgaris*, *Chrysoperla externa*, Comunidades microbianas, *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata*.

ABSTRACT

Kresoxim-methyl is a fungicide of the strobilurin group known to affect aquatic and terrestrial environments. The objective of this work was to determine the toxicity of kresoxim-methyl on seven bioindicators of environmental quality. Ecotoxicological bioassays were performed with the seven models using standardized protocols. Kresoxim-methyl affected the mortality of *Artemia franciscana*, presenting at 48h a CL_{50} of 58 mg i.a • L⁻¹. In *Carassius auratus* at 26 days, was observed that the mortality was affected at the concentration 0.067 mg i.a.L⁻¹, hatching was altered at 0.134 mg i.a.L⁻¹ as well as in surviving fish weights and length of surviving fish was observed effect at the highest concentration at 0.26 mg i.a.L⁻¹. There was no effects on the number of deformed larvae and finally the percentage of juveniles of *C. auratus*, abnormal behavior was affected in the highest concentration 0.26 mg i.a.L⁻¹. *Chlorella vulgaris* showed a growth inhibitory effect at 96 h with $CL_{50} > 0.12 \times 10^{-1}$ mg i.a.L⁻¹. No effect of Kresoxim-methyl on the mortality of *Chrysoperla externa* and in the inhibition of nitrates in microbial communities of soil were observed. In *Daphnia magna* the CL_{50} mortality was 1.04 mg i.a.L⁻¹ at 48 h of exposure. In *Poecilia reticulata* the CL_{50} at 96 h was 6.51 mg i.a.L⁻¹. Kresoxim-methyl is more harmful to aquatic than to the terrestrial environments.

Key words: *Artemia franciscana*, *Carassius auratus*, *Chlorella vulgaris*, *Chrysoperla externa*, *Daphnia magna*, microbial communities, *Poecilia reticulata*.

ÍNDICE

ÍNDICE	6
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	10
I. INTRODUCCIÓN	11
II. MARCO TEÓRICO	14
2.1. Ecotoxicología	14
2.2. Bioindicadores	15
2.3. Kresoxim-metil	15
2.4. Toxicidad aguda	16
2.5. Toxicidad crónica	17
2.6. NOEC y LOEC	17
2.7. Cl_{50}	18
2.8. CL_{50}	18
2.9. Calidad ambiental	18
2.10. <i>Artemia franciscana</i> "Artemia"	19
2.11. <i>Carassius auratus</i> "Goldfish"	19
2.12. <i>Chlorella vulgaris</i> "Clorela"	19
2.13. <i>Chrysoperla externa</i> "Crisopa o León de los áfidos"	20
2.14. Comunidades microbianas	20
2.15. <i>Daphnia magna</i> "pulga de agua"	21
2.16. <i>Poecilia reticulata</i> "guppy"	21
III. ANTECEDENTES	22

3.1.	Artemia franciscana	24
3.2.	Cariassus auratus	25
3.3.	Chlorella vulgaris	26
3.4.	Crysoperla externa	27
3.5.	Comunidades microbianas del suelo	28
3.6.	Daphnia magna	28
3.7.	Poecilia reticulata	29
IV.	HIPOTESIS	32
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
5.1.	Lugar de ejecución	33
5.2.	Tipos de investigación	34
5.3.	Diseños de investigación	35
5.4.	Muestreo - Modelos bioindicadores	35
5.4.1.	Artemia franciscana	35
5.4.2.	Carassius auratus	37
5.4.3.	Chlorella vulgaris	41
5.4.4.	Chrysoperla externa.	43
5.4.5.	Comunidades microbianas	45
5.4.6.	Daphnia magna	47
5.5.	Poecilia reticulata	50
5.6.	Procedimiento y análisis de datos	53
5.7.	Aspectos éticos	54
VI.	RESULTADOS	55
6.1.	Artemia franciscana	55
6.2.	Carassius auratus	56
6.3.	Chlorella vulgaris	57
6.4.	Chrysoperla externa	58

6.5.	Comunidades microbianas	59
6.6.	<i>Daphnia magna</i> (Toxicidad aguda)	60
6.7.	<i>Daphnia magna</i> (Toxicidad crónico)	61
6.8.	<i>Poecilia reticulata</i>	63
VII.	DISCUSIÓN	64
7.1.	<i>Artemia franciscana</i>	64
7.2.	<i>Carassius auratus</i>	64
7.3.	<i>Chlorella vulgaris</i>	65
7.4.	<i>Chrysoperla externa</i>	66
7.5.	Comunidades microbianas	66
7.6.	<i>Daphnia magna</i>	67
7.7.	<i>Poecilia reticulata</i>	68
7.8.	Análisis Global	69
VIII.	CONCLUSIONES	71
IX.	RECOMENDACIONES	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variable independiente y en el proyecto de calidad ambiental. _____	33
Tabla 2. Operacionalización de las variables del proyecto de calidad ambiental. _____	34
Tabla 3. Condiciones y criterios de bioensayo sobre <i>Artemia franciscana</i> . _____	37
Tabla 4. Principales características físico-químicas del medio ADAM (Aachener Daphnien Medium) usado en los bioensayos. _____	39
Tabla 5. Condiciones y criterios de bioensayo sobre <i>Carassius auratus</i> . _____	40
Tabla 6. Condiciones y criterios de bioensayo sobre <i>Chlorella vulgaris</i> . _____	42
Tabla 7. Condiciones y criterios de bioensayo sobre <i>Chrysoperla externa</i> . _____	44
Tabla 8. Condiciones y criterios de bioensayo sobre comunidades microbianas. _____	46
Tabla 9. Condiciones y criterios de bioensayo agudo sobre <i>Daphnia magna</i> . _____	48
Tabla 10. Condiciones y criterios de bioensayo crónico sobre <i>Daphnia magna</i> . _____	50
Tabla 11. Condiciones y criterios de bioensayo sobre <i>Poecilia reticulata</i> . _____	52
Tabla 12. Efecto del kresoxim-metil sobre la mortandad de <i>A. franciscana</i> a 24 y 48 h de exposición. _____	55
Tabla 13. Efecto de Kresoxim-metil en la mortandad acumulada, N° días que inicia la eclosión, longitud y peso de peces sobrevivientes, N° de larvas deformadas y porcentaje de <i>C. auratus</i> "Goldfish" con comportamiento anormal a exposición. _____	56
Tabla 14. Efecto del Kresoxim-metil sobre la inhibición del crecimiento algal de <i>C. vulgaris</i> a 24, 48, 72 y 96 h de exposición. _____	57
Tabla 15. Efecto del Kresoxim-metil sobre la mortandad de <i>Chrysoperla externa</i> a 72 h de exposición. _____	58
Tabla 16. Efecto del Kresoxim-metil sobre las comunidades microbianas del suelo a 120 h de exposición. _____	59
Tabla 17. Efecto del kresoxim-metil sobre la mortandad de <i>D. magna</i> a 24 y 48 h de exposición. _____	60
Tabla 18. Efecto del Kresoxim-metil sobre el n° de crías vivas, porcentaje de mortandad y longitud de las hembras de <i>Daphnia magna</i> . _____	61
Tabla 19. Efecto del kresoxim-metil sobre la mortandad de <i>P. reticulata</i> a 96 h de exposición. _____	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Ritmo de mortandad diario de D. magna en ensayo de toxicidad crónica a los 21 días de exposición.* _____ 62

I. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son sustancias o mezclas de sustancias de origen natural o sintético, destinados a prevenir, destruir o controlar cualquier tipo de plaga que ocasione un impacto económico significativo en el rendimiento y calidad de las plantas. Los fungicidas son un tipo particular de plaguicida que controlan enfermedades producidas por hongos, inhibiendo o eliminando al hongo que causa la enfermedad en la planta. Estos fungicidas son usados extensamente en la industria, la agricultura, el hogar y jardín para un número de propósitos que incluyen: protección de las semillas de granos durante su almacenamiento, transporte y germinación; protección de los cultivos maduros y eliminación de enfermedades de la planta. Kresoxim-metil ($C_{18}H_{19}NO_4$), es un fungicida sintético de amplio espectro derivado de la estrobilurina, sustancia segregada por el hongo *Strobilurus tenacellus* (Pers.). Kresoxim-metil es considerado tóxico. Diversos estudios y análisis estadísticos revelan su persistencia en el agua, que requiere años para degradarse generando así la alteración de la fauna acuática, que a su vez al ser consumida por los humanos, se expone a intoxicación, convirtiéndose de esta manera en un problema de importancia ambiental y de salud pública. Ante este panorama, es necesario llevar a cabo un monitoreo y control del impacto ambiental que tienen los fungicidas sobre el ecosistema, para determinar la alteración de los seres vivos en su entorno. Como resultado de esta necesidad se han establecido una serie de indicadores de carácter mecánico y otros de tipo biológico (bioindicador).

Un bioindicador es un organismo o un conjunto de organismos que muestra la propiedad de responder a la variación de un determinado factor abiótico o biótico del ecosistema. Diversos estudios señalan la aplicabilidad del uso de pruebas con bioindicadores de invertebrados (*Daphnia magna* Straus, 1820 y *Artemia franciscana* Kellogg, 1906), lo

que reduce considerablemente el número de ensayos de toxicidad en mamíferos (ratas). Además se puede utilizar una mayor cantidad de individuos a un menor costo, con facilidad de manipulación y condiciones de laboratorio controladas.

Hasta la actualidad, en el Perú no se han realizado investigaciones del efecto ecotóxico de Kresoxim- metil sobre la calidad ambiental, por lo tanto el objetivo de esta investigación fue determinar la toxicidad del fungicida Kresoxim-metil sobre siete bioindicadores de calidad ambiental, siendo los bioindicadores:

- *Artemia franciscana* "Artemia"
- *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) "Goldfish"
- *Chlorella vulgaris* Beijerinck, 1890 "Clorela"
- *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) "Crisopa o león de los áfidos"
- Comunidades microbianas del suelo.
- *Daphnia magna* "Pulga de agua".
- *Poecilia reticulata* Peters, 1859 "Guppy".

Por lo que se busca determinar el efecto tóxico de Kresoxim-metil en el la mortandad del crustáceo *A. franciscana* a las 48h de exposición. Evaluar el efecto de Kresoxim-metil sobre la mortandad del pez *C. auratus* a los 26 días de exposición. Establecer la CI_{50} a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición por acción del Kresoxim-metil en la microalga *C. vulgaris*. Identificar el efecto tóxico de la exposición del Kresoxim-metil a las 72 h de exposición sobre la mortandad en el depredador terrestre *C. externa*. Observar el efecto tóxico de Kresoxim-metil en el porcentaje de inhibición de nitratos en comunidades microbianas a las 120 h de exposición. Hallar la toxicidad aguda (mortandad) a 48 h y toxicidad crónica (N° crías vivas, mortandad de los padres y longitud de hembras) a

los 21 días de exposición de Kresoxim-metil sobre *D. magna*. Finalmente conocer el efecto tóxico de Kresoxim-metil en la mortandad de *P. reticulata* a las 96 h de exposición.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Ecotoxicología

La ecotoxicología tiene como materia fundamental de estudio a la contaminación, los sistemas bióticos en forma de toxicidad, alteración de especies, reducción de una determinada productividad, entre otras, puesto que no siempre un polutante se comporta como un tóxico neto, sino que puede suponer solo la creación de un nivel indeseable en un determinado ecosistema (Martí, 2003).

Capó (2002), cita a Truhaut (1975), quien estableció el término de ecotoxicología en lugar de toxicología ambiental, usada hasta ese tiempo.

Los estudios ecotoxicológicos, se componen de tres secuencias (Truhaut, 1975).

- La liberación del polutante, abarcando su formación y la génesis en esas fuentes de polución, los medios y vías de transporte (suelo, aire, agua, alimentos, etc.), los factores que influyen en su difusión, sus absorciones geológicas y las posibles alteraciones de sus propiedades fisicoquímicas debidas a los diversos componentes abióticos del ecosistema, dando lugar a su acumulación o degradación.
- El ingreso de los polutantes en el medio biológico, es decir, su entrada en las cadenas biológicas, alimentarias, de comunidad, etc, con cinéticas propias.
- Calificación y cuantificación de los efectos patológicos sobre los seres vivos y sus ecosistemas, con las consiguientes deducciones epidemiológicas y profilácticas.

2.2. Bioindicadores

Un bioindicador es un organismo o un conjunto de ellos (Baltanas, 2009) de diferentes especies que presentan mayor fragilidad en el ambiente desde el punto de vista biótico, la comunidad hidrobiológica y la edafofauna (González & Lozano, 2004). De tal manera que la respuesta quede reflejada en el cambio de valor en una o más variables de cualquier nivel del organismo; estas variables o características, o sus cambios, pueden llamarse también variables bioindicadoras (Baltanas, 2009). Los bioindicadores deben poseer las siguientes características: presentar alta sensibilidad ante sustancias tóxicas, ser de fácil manejo, amplia distribución, fácilmente disponible (cultivo/captura), poseer una alta adaptación a diversos ecosistemas y condiciones de laboratorio y presentar ciclos de vida cortos.

Estos indicadores permiten simplificar, cuantificar, evaluar, seguir, comparar y comunicar fenómenos muy complejos (Albert, 2004).

2.3. Kresoxim-metil

Fungicida con nombre C.A.: metil (αE) -α- (metoximino) -2- [(2-metilfenoxi) metil] benceneacetato y nombre IUPAC: metil (E)-metoxiimina [α-(o-toliloxi)-o-tolil] acetato. Tiene fórmula química: $C_{18}H_{19}NO_4$, peso molecular: 313,4 y está catalogado como tipo toxicológico: IV. (Capeagro, 2017)

Es un fungicida sintético derivado de la estrobilurina A con actividad preventiva, curativa y erradicante contra hongos de todos los grupos, presentado en forma de gránulos dispersables para aplicar en pulverización. Resulta efectivo en el control de estenfiliosis, numerosos oídios, moteados, repilo y otras enfermedades de origen fúngico. (BASF, 2017)

Propiedades físicas y químicas:

- Se presenta en cristales de colores que va desde incoloros a blancos, sin olor.
- Su punto de fusión se encuentra entre los 97,2 a 101,7 °C.
- Su solubilidad en agua es igual a 2 mg·L⁻¹ a 20 °C.
- Tiene una densidad específica de 1,258 kg·L⁻¹. Es soluble en n-heptano, tolueno, diclorometano, metanol, acetona y acetato de etilo.
- Su presión de vapor es igual a 1,72x10⁻⁸ mm Hg a 20°C.
- Para que el producto actúe eficientemente recomendamos que el pH del agua esté en 6-7. (Capeagro,2017)

Flexibilidad:

- Kresoxim-metil puede aplicarse en cualquier momento del año.
- Pueden realizarse hasta tres tratamientos.

2.4. Toxicidad aguda

La toxicidad aguda de una sustancia se refiere a la habilidad de ésta para producir daño sistémico como resultado de una exposición única a cantidades relativamente altas de la sustancia (Malachowski, 1995). Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50, que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50% de los animales (Peña *et al.*, 2001). Si una prueba de toxicidad aguda no detecta efecto alguno de mortandad o inmovilización esto no siempre

significa que la sustancia analizada no sea capaz de producir otro tipo de daño (Castillo, 2004).

2.5. Toxicidad crónica

La toxicidad crónica se refiere a la habilidad de una sustancia de producir daño sistémico como resultado de varias exposiciones repetidas durante un periodo prolongado de tiempo, en niveles relativamente bajos (Malachowski, 1995). Los bioensayos de toxicidad crónica permiten evidenciar diferentes respuestas como: capacidad reproductiva, crecimiento de individuos, conducta, desarrollo, bioacumulación, etc. Es posible entonces, con estas técnicas, dar en pocas horas una respuesta sobre la incidencia de efluentes industriales en un ambiente acuático (Castillo, 2004).

2.6. NOEC y LOEC

La OECD recomendó que la forma principal de resumir el riesgo que un químico de prueba podría presentar al medio ambiente es a través de la reporte de la concentración de efecto no observado (NOEC) y la menor concentración de efecto observado (LOEC) (QB, 2017).

La LOEC es la concentración más baja a la cual se observa efecto (Vargas & Yaro, 2011) es significativamente diferente del control (QB, 2017).

La NOEC es la concentración ensayada inmediatamente debajo de la LOEC que, comparada con el control, no tiene efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) dentro de un tiempo de exposición dado.

NOEC es la concentración más alta que es utilizado en una prueba en particular que no causa un efecto que sea estadísticamente

significativamente diferente del control durante el período de tiempo de la prueba (QB, 2017).

2.7. CI_{50}

Se define como concentración inhibitoria media a la concentración capaz de generar la inhibición de una o varias funciones biológicas, al 50% de los organismos utilizados en pruebas de laboratorio, bajo condiciones determinadas (Vargas, 2009).

2.8. CL_{50}

Se define como la concentración letal media (CL_{50}), a la concentración del compuesto tóxico evaluado que afecta al 50% de la población de la especie modelo, causando su muerte bajo condiciones de prueba en un tiempo determinado (Vargas & Perea, 2011). Este valor es determinado estadísticamente a partir de los porcentajes de mortandad obtenidos de la lectura final del bioensayo (López, 2009).

2.9. Calidad ambiental

Se puede definir bien con un carácter ecológico (mantenimiento de la biodiversidad) o bien utilitario (capacidad para producir bienes). Está íntimamente relacionada con la productividad edáfica y la salud biológica (Gallardo, 2004).

Agua: La alteración de la calidad de agua debido al uso de fungicidas ocurre sobre el agua, sedimento y la biota del sistema y no sólo depende de las características del tóxico y de su concentración, sino también de la naturaleza del ecosistema (Albert, 2004).

Suelo: El concepto de calidad de suelo ha estado ligado a producción, por lo tanto relacionado con el concepto de fertilidad edáfica. Actualmente se ha ampliado el concepto y comprende aspectos de conservación de suelos (ausencia de erosión), biodiversidad (alta riqueza biológica) y salud biológica (como actividad microbiana); por ello se dice que la calidad del suelo está íntimamente relacionado con la capacidad del suelo para funcionar, es decir, para cumplir con todas sus posibles funciones (producir, conservar, amortiguar, filtrar, depurar, embellecer, etc.) (Gallardo, 2004).

2.10.Artemia franciscana "Artemia"

Se utilizan las larvas de *Artemia salina* como método aplicado a la ecotoxicología para medir la emisión de cromatos y dicromatos (cromo VI) debido al potencial impacto que representa para el ambiente. Estos son productos de la actividad de diferentes sectores industriales (Pérez & Gilling, 2001).

2.11.Carassius auratus "Goldfish"

El goldfish es un pez de origen asiático y de gran importancia en el mercado de peces ornamentales (Royero, 1993) Es considerado como uno de los bioindicadores más significativos en los sistemas acuáticos debido a la alimentación y la vida en el entorno acuático de este pez.

2.12.Chlorella vulgaris "Clorela"

Son organismos unicelulares cuyo rol esencial está ligada a los ciclos de los nutrientes, producción de oxígeno y la posición ecológica en la base de los niveles tróficos en ambientes acuáticos, por ello son considerados

importantes en ensayos ecotoxicológicos, para estimar el riesgo de los pesticidas en los ecosistemas acuáticos (Hellawell, 1986).

2.13. *Chrysoperla externa* "Crisopa o León de los áfidos"

Su amplia distribución y preferencia de hábitat lo hacen adecuado para un mayor uso en el control biológico en muchos países y en una variedad de sistemas de cultivo (Olazo, 1987). *C. externa* tiene gran distribución en el Perú, con presencia de adultos a través de todo el año, fácil crianza en cautiverio, potencial para adaptarse a varios ambientes de cultivos y aparente resistencia a numerosos plaguicidas (Núñez, 1988a; Fernández, 2000).

2.14. Comunidades microbianas

La degradación del suelo es un claro síntoma del mal uso y del manejo inapropiado de los sistemas productivos. Debido a que la pérdida de fertilidad está asociada a la alteración de numerosos procesos biológicos realizados por la biota edáfica, se ha propuesto que los microorganismos del suelo pueden ser indicadores de calidad válidos para el diagnóstico de impacto y restauración en los ecosistemas (Abril, 2003), debido a que los microorganismos son indicadores muy sensibles y un incremento en la densidad poblacional está relacionado con la recuperación de zonas degradadas y el restablecimiento de los ciclos biogeoquímicos (Nieto & García, 2010). Los organismos más comunes son *Cyanobacteria* sp, *Bacillus* sp. Conhn, 1872, *Pseudomonas* sp Migula. 1984. Para bacterias y hongos, *Penicillium* Link 1809, *Mucor* Fresen, *Fusarium* Link ex Grey 1821 y especies de *Aspergillus* Micheli. 1729 (MacNaughton *et al.*, 1999).

2.15. *Daphnia magna* "pulga de agua"

Daphnia magna está establecida como una especie de modelo en ecotoxicología. Este crustáceo de agua dulce se utiliza comúnmente para la vigilancia del medio ambiente de contaminantes en todo el globo terrestre. Los dáfnidos representan el 8% de todos los datos experimentales de los animales acuáticos dentro de las bases de datos toxicológicos (Shaw *et al.*, 2008). Este modelo es valioso para la evaluación de la toxicidad de efluentes y riesgo en un cuerpo acuático, debido a que es altamente sensible a los contaminantes (Tyagi *et al.*, 2007).

2.16. *Poecilia reticulata* "guppy"

Especie conocida comúnmente como "guppy " es un pez muy popular en el ámbito acuarístico. Hoy en día se ha logrado desarrollar una gran cantidad de variedades que van desde cambios en su coloración hasta su tipo y forma de la colas (Morales, 1996).

III. ANTECEDENTES

La agricultura en el siglo XXI se enfrenta a múltiples retos: producir más alimentos a fin de alimentar a una población creciente con una mano de obra menor, contribuir al desarrollo global de los numerosos países en desarrollo dependientes de la agricultura, adoptar métodos de producción más eficaces y sostenibles y por último adaptarse al cambio climático (FAO, 2009).

La agricultura constituye uno de los sectores más peligrosos en todo el mundo. El uso intensivo de maquinaria, plaguicidas y otros productos agroquímicos ha aumentado el riesgo. La exposición a plaguicidas y otros productos agroquímicos constituye uno de los principales riesgos profesionales. Estos provocan intoxicación, muerte, y en algunos casos, cáncer y trastornos de la función reproductora (SafeWork, 2011).

La Food and Agriculture Organization (FAO) de las Naciones Unidas, establece que un plaguicida: es la sustancia o mezcla de ellas, destinada a prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo los vectores de enfermedad humana o animal (FAO, 2015).

Cuando un plaguicida es aplicado a un cultivo, solamente alcanza el organismo "blanco" aproximadamente el 1%, mientras que el 25 % es retenido en el follaje, el 30 % llega al suelo y el 44 % restante es exportado a los sistemas acuáticos por escorrentía y lixiviación y a la atmósfera (Brady & Weil, 1996) donde regresan con la lluvia a otros lugares (López-Geta *et al.*, 1992). Al paso de algunos años se han hecho evidentes los efectos indeseables de los plaguicidas sobre la salud del ser humano y sobre el medio ambiente (Ramírez & Lacasaña, 2001).

Atendiendo a la acción específica de los plaguicidas pueden efectuarse múltiples clasificaciones, siendo una de las más utilizadas la decimal, en la que se consideran (Bartual & Berennguer, 1981):

- I. Insecticidas
- II. Acaricidas
- III. Fungicidas
- IV. Nematicidas, desinfectantes y fumigantes en general
- V. Herbicidas
- VI. Fitorreguladores y productos afines
- VII. Molusquicidas, rodenticidas y varios
- VIII. Específicos post-cosecha y simientes
- IX. Protectores de maderas, fibras y derivados
- X. Plaguicidas específicos varios

Las enfermedades son una de las principales fuentes de daño de plantas y cultivos, causadas por un número diverso de organismos fitopatógenos. A nivel mundial, los hongos son la principal causa de pérdidas en cultivos. Los fungicidas, herbicidas e insecticidas son plaguicidas utilizados en la protección de cultivos. Un fungicida es un tipo particular de plaguicida que controla enfermedades ocasionadas por hongos, inhibiendo o eliminando al hongo causante de la enfermedad (McGrath, 2004).

Araujo (2012) indica que Kresoxim-metil (metoximino- α -(o-toliloxi)-o-tolilacetato de metilo) es un fungicida perteneciente al grupo de las estrobilurinas de amplio espectro y actividad preventiva, curativa y erradicante sobre diversos grupos de hongos, en especial aquellos cuyo

cuerpo vegetativo se desarrolla más o menos superficialmente como ocurre con los oídios y otros ascomicetos, las royas y numerosos mildius. Entre los numerosos hongos que controla se cuentan *Erysiphe cichoriacearum* (DC.) (1805), *Podosphaera leucotricha* (Ellis & Everh.) E.S. Salmon, (1900), *Uncinula necator* (Schwein.) Burrell, *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter (1875) y *Venturia pyrina* Aderh. (1896) en cultivos de uvas, berenjenas, tomates, pimientos, peras, manzanas, etc. (De Liñan, 2000; Bartlett *et al.*, 2002).

La actividad fungicida de las estrobilurinas, se deriva de su capacidad para inhibir la respiración mitocondrial mediante la unión en el llamado sitio de Q₀ del citocromo b, el citocromo b es parte del complejo de citocromo bc1, situada en la membrana mitocondrial interna de hongos otros eucariotas (Bartlett *et al.*, 2002).

En la actualidad, uno de los mayores problemas es el uso indiscriminado y sin control de estos compuestos, tan solo en 1992 la producción mundial de plaguicidas se estimó en 10 mill. de tnas (López-Geta *et al.*, 1992).

Con el objetivo de determinar la toxicidad de Kresoxim- metil se seleccionaron siete especies bioindicadoras de contaminación ambiental:

3.1. Artemia franciscana

Artemia es un pequeño crustáceo filtrador, propio de hábitats acuáticos de elevada salinidad, que se encuentra ampliamente distribuido sobre los cinco continentes en variedades de biotopos aislados, tales como lagos interiores de sal, albuferas y lagunas costeras y especialmente salinas (Vanhaecke *et al.*, 1987). Su principal uso es como alimentación en la acuicultura ya que es una fuente de proteínas y lípidos (Sorgeloos *et al.*, 1991).

Arencibia-Carballo *et al.* (2010) determinaron la toxicidad de los insecticidas piretroides, cipermetrina y permetrina, indicando que el uso de pruebas con *Artemia* demuestran su versatilidad práctica y economía para la utilización en las evaluaciones de los mismos tóxicos, mientras que Iannacone *et al.* (2016) evaluaron la toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre *A. franciscana* para establecer la concentración prevista que no causa efectos (PNEC) sobre los organismos marinos y obtener los niveles guía para la protección de la vida acuática. Jaramillo *et al.* (2013) evaluó la concentración letal media de diecisiete compuestos organofosforados en *A. franciscana*. Alves (2015) determinó y comparó la toxicidad de la sustancia activa azoxistrobina y su formulación comercial Ortiva® sobre la biota marina-estuarios. La evaluación de la toxicidad de estos compuestos se determinó mediante la realización de ensayos ecotoxicológicos de corta duración sobre microalgas, *A. franciscana* y bacterias.

3.2. *Cariassus auratus*

Vásquez *et al.* (2005) utilizaron como bioindicadores a los peces juveniles de *C. auratus* y evaluaron si producían estrés frente al tratamiento con sulfato de cobre. Li *et al.* (2008) examinaron mediante el experimento de cultivo tóxico los efectos ecotoxicológicos de clorpromazina (CPZ) en peces Goldfish (*C. auratus*).

Authman *et al.* (2015) presentaron una breve reseña de los efectos tóxicos de metales pesados en los peces. En ecosistemas acuáticos, los metales pesados son considerados como los contaminantes más importantes, debido a que están presentes en todo el ecosistema y son detectables en cantidades críticas.

Los peces se utilizan como bioindicadores y juegan un papel importante en el control de la contaminación por metales pesados. En esta revisión

se utilizó *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758), *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842), *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) y *C. auratus* como bioindicadores. La mayoría de estos metales se caracterizan por ser acumulados en los tejidos, y conducen al envenenamiento de los peces. Estos metales pueden influir de manera efectiva las operaciones vitales y reproducción de los peces; debilitar el sistema inmune, e inducir cambios patológicos. Por último, se dan algunas recomendaciones para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales y desechos agrícolas antes de ser vertidos en los sistemas acuáticos.

3.3. *Chlorella vulgaris*

Las algas son capaces de bioconcentrarse y metabolizar los contaminantes acuáticos como insecticidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Jonsson *et al.*, 2001). Debido al hecho de que *C. vulgaris* es un alga aceptada como bioindicadora de la contaminación del medio ambiente (Ma *et al.*, 2004)

Riva *et al.* (1998) utilizaron dos especies algales unicelulares: *C. vulgaris* y *Scenedesmus sp* Chodat 1926 como sistemas bioindicadores, que se expusieron a cinco formulaciones comerciales de plaguicidas organofosforados: Clorpirifos, Metilparatión, Azinfós metil, Metamidofos y Diazinón. Para la determinación de sus efectos se aplicó el método de inhibición del crecimiento alga, Iannacone & Gutiérrez (1999) que midieron la toxicidad de plaguicidas (lindano, clorpirifos y pirofilita) sobre tres bioindicadores, midiendo la sobrevivencia, maduración de *Panagrellus redivivus* (Samoiloff, 1990), la tasa de fotosíntesis de *C. vulgaris* e inhibición de las raíces *Allium cepa* (Fiskejo, 1993). Mientras que (Antón *et al.*, 1993) estudiaron los efectos ecotóxicos de varios herbicidas en una especie de la familia Chlorophyceae, *Chlorella pyrenoidosa*. Todos los herbicidas (glifosato, clortolurón con terbutrilo, isoproturón y alaclor) eran productos comerciales y técnicos. Saenz &

Marzio (2009) evaluaron la ecotoxicidad del herbicida glifosato puro y comercial (Roundup) en cuatro algas verdes de agua dulce entre ellas *C. vulgaris*. Los efectos tóxicos del glifosato se evaluaron a corto plazo (tasas fotosintéticas, determinadas como producción de oxígeno) y a largo plazo (crecimiento de las poblaciones, determinado como el número de células).

También *C. vulgaris* sirve para medir estrés por metales pesados como cadmio, plomo, cobre (Bajguz, 2011).

3.4. *Crysoperla externa*

Es un eficiente depredador en el manejo ecológico e integrado de plagas. Sus larvas y adultos son considerados depredadores muy voraces, oófagos y larvífagos, alimentándose de amplia diversidad de presas, tales como pulgones, moscas blancas, huevos y larvas de lepidópteros, entre otros.

Chrysoperla externa tiene amplia distribución en la costa y sierra del Perú con presencia de adultos a través de todo el año, son de fácil crianza en cautiverio, tiene potencial para adaptarse a varios ambientes de cultivos. (Schumuck, 1997; Iannacone & Lamas, 2002; Carvalho *et al.*, 2002; Godoy *et al.*, 2004) y aparente resistencia a numerosos plaguicidas. Núñez (1988a) y Bueno & Freitas (2004) estudiaron los efectos secundarios de los dos insecticidas / acaricidas, abamectina y lufenurón en los huevos y larvas de *C. externa* en el laboratorio.

Adicionalmente, existen trabajos que han evaluado su sensibilidad a varios plaguicidas.

3.5. Comunidades microbianas del suelo

Según Lizarazo (2005), el papel de los microorganismos en la nutrición y disponibilidad de nutrientes en el suelo ha sido ampliamente estudiada, especialmente orientada a aquellos microorganismos que hacen mutualismo con plantas, pero poco se ha analizado la interacción de otros grupos funcionales de microorganismos que al igual juegan un papel importante en la transformación y dinámica de los nutrientes en el suelo. (Wainwright & Pugh, 1973) utilizaron tres fungicidas (Captan, Thiram y Verdasan), se evaluaron cuatro concentraciones a las 120h sobre comunidades microbianas. Yeomans & Bremner (1985) estudiaron los efectos de siete insecticidas y seis fungicidas sobre la desnitrificación de nitratos en suelos. Los insecticidas utilizados fueron lindano, fenitrotión, fonofos, malatión, forato, terbufos y carbofurano. Los fungicidas utilizados fueron mancozeb, maneb, thiram, benomyl, captan y terrazole.

3.6. Daphnia magna

Daphnia se ubica dentro del orden cladóceras de la clase crustácea, y la especie *D. magna*, es utilizada extensivamente en pruebas de toxicidad (Granados *et al.*, 2004).

Granados *et al.* (2004) realizaron cuyos ensayos de toxicidad con *D. magna* determinaron la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros. Además, Romero *et al.* (2006) determinó la capacidad de detección de compuestos tóxicos presentes en agua a través de un ensayo *online* sobre *D. magna*, similar a Tyagi *et al.* (2007) que utilizó *D. magna* en plantas de tratamiento de aguas residuales, con especial referencia a la reducción de la toxicidad.

Warming *et al.* (2009) evaluaron los efectos agudos y crónicos del fungicida azoxistrobina de estrobilurina en tres clones de *D. magna* procedentes de diferentes lagos daneses. Martínez (2008) realizó un ensayo de toxicidad agua con cladóceros de la familia Daphnidae, analizando inmovilización o mortandad, con diferentes sustancias. Persoone *et al.* (2009) indicaron que uno de los bioensayos utilizados con mayor proyección internacional para la detección de toxicidad de los productos químicos y para el monitoreo de toxicidad de los efluentes y aguas contaminadas es el ensayo de toxicidad aguda con crustáceos dáfnidos, y en particular la realizada con *D. magna* y Norma Mexicana (2010) estableció un método para la medición de la toxicidad aguda, utilizando al organismo dulceacuícola *D. magna* (Crustacea – Cladóceras). Este método es aplicable para la evaluación de toxicidad aguda en aguas, en sustancias solubles en agua, en cuerpos de agua dulce, aguas residuales industriales y municipales, efluentes agrícolas y sustancias puras o combinadas disolubles o lixiviados y la fracción solubilizable en suelos y sedimentos. Además, se basa en la medición de la toxicidad aguda, donde la respuesta que se evalúa es la ausencia de movilidad o muerte, bajo condiciones de exposición controlada del crustáceo *D. magna* durante 48 h de exposición. Cui, (2017) investigó la toxicidad acuática de 3 fungicidas comunes de estrobilurina (kresoxim-metil, piraclostrobina y trifloxistrobina) en *D. magna*. Sancho *et al.* (2016) utilizaron pruebas crónicas para evaluar respuestas a largo plazo de contaminantes en *D. magna*.

3.7. Poecilia reticulata

Se encuentra en diversos hábitats, que van desde el agua muy turbia en estanques, canales y zanjas en las elevaciones más bajas prístinas arroyos de montaña a gran altitud. Se alimentan de zooplancton, pequeños insectos y detritus. Uno de los peces de acuario más populares

con muchas variedades estandarizadas. Utilizado en la investigación genética (Allen, 1991).

El guppy, es muy tolerante lo que le confiere grandes posibilidades de dispersión para colonizar diversos ambientes. Tolera bajas concentraciones de oxígeno disuelto y pueden respirar oxígeno del aire, acepta un pH de 5,5 a 8,5; y temperatura de 20 a 30 °C (Meffe & Snelson, 1989). Actualmente se utiliza a *P. reticulata* como biomonitor en la restauración medio ambiental de un ecosistema acuático (Elías *et al.*, 2006). En peces el valor establecido de la CL₅₀ es 1mg·L⁻¹ (Anasac, 2016). Iannacone & Alvarino (1998) señalaron que los peces son extremadamente sensibles a la perturbación ambiental. Por lo tanto numerosos peces han sido propuestos como modelos biológicos para evaluar la ecotoxicidad de sustancias químicas contaminantes, como, *Poecilia reticulata* Peters, 1859, tal como Bretaud *et al.* (2000) señalan que los peces se utilizan como bioindicadores y juegan un papel importante en el control de la contaminación principalmente por metales pesados.

Baser *et al.* (2003) utilizaron permetrina en bioensayos de toxicidad aguda en *P. reticulata*. Iannacone *et al.* (2007) evaluaron el impacto ecotoxicológico del insecticida carbámico cartap sobre dos especies de peces del ecosistema acuático continental. *P. reticulata* "guppy" (Poeciliidae) y *Paracheirodon innesi* (Myers 1936). Sarıkaya *et al.* (2007) utilizaron fenitrotión que tiene un gran potencial contaminante tóxico para los ecosistemas acuáticos. Se investigó la toxicidad aguda sobre peces Guppy (*P. reticulata*). Finalmente, Álvarez *et al.* (2012) evaluaron la toxicidad aguda de dos herbicidas comerciales formulados con glifosato y una solución pura frente a *P. reticulata*. (Kreutz, 2008). Los riesgos de toxicidad de los plaguicidas agrícolas para los peces son esenciales. Actualmente, muchas preguntas siguen sin resolverse. Han sido diseñados para investigar la toxicidad aguda y la concentración letal (CL₅₀) de cuatro herbicidas, dos fungicidas y dos insecticidas para los

alevines de bagre de plata. Napan *et al.* (2010) indican que metomil es uno de los productos químicos más utilizados, como el insecticida-acaricida para el control de una amplia gama. Por ello se evaluó la toxicidad aguda del metomil en los peces introducidos *Poecilia latipinna* (Lesueur, 1821).

IV. HIPOTESIS

1.1 Ho: (H+) La toxicidad del fungicida Kresoxim-metil sí tiene efecto sobre los siete bioindicadores de contaminación ambiental

1.2 Ha: (H-) La toxicidad del fungicida Kresoxim-metil no tiene efecto sobre los siete bioindicadores de contaminación ambiental

2.1 (H+) La exposición a las 48 h de Kresoxim-metil tiene efecto tóxico en la mortandad del crustáceo *A. franciscana*.

2.2 (H+) La exposición a los 26 días de Kresoxim-metil tiene efecto en la mortandad del pez *C. auratus*.

2.3 (H+) La exposición a las 96h de Kresoxim-metil tiene efecto en la inhibición de la concentración en *C. vulgaris*.

2.4 (H+) La exposición a las 72 h de Kresoxim-metil tiene efecto la mortandad en el depredador *C. externa*.

2.5 (H+) El efecto tóxico a las 120h de exposición de Kresoxim-metil tiene efecto en los nitratos en comunidades microbianas del suelo.

2.6 (H+) La exposición a las 48 h de Kresoxim-metil tiene efecto en la mortandad del crustáceo *D. magna*.

2.7 (H+) La exposición a los 21 días de Kresoxim-metil tiene efecto sobre n° crías vivas, mortandad de los padres y longitud de las hembras en *D. magna*.

2.8 (H+) La exposición a las 96 h de Kresoxim-metil tiene efecto en la mortandad del pez *P. reticulata*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lugar de ejecución

Para la presente investigación se analizaron siete modelos bioindicadores: *A. franciscana*, *C. auratus*, *C. vulgaris*, *C. externa*, Comunidades microbianas, *D. magna* y *P. reticulata*.

Los cuales fueron obtenidos en distintos establecimientos de Lima, trasladados y analizados en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Ricardo Palma. Surco, Lima- Perú.

Tabla1. Variable independiente y en el proyecto de calidad ambiental.

Variable	Dimensiones
Independiente	Kresoxim-metil: concentración del fungicida en 95%
Dependiente	<i>Artemia franciscana</i> : porcentaje de mortandad. <i>Cariassus auratus</i> : mortandad acumulada, N° días que inicia la eclosión, longitud y peso de peces sobrevivientes, N° de larvas deformadas y porcentaje de <i>C. auratus</i> con comportamiento anormal a exposición. <i>Chlorella vulgaris</i> : inhibición del crecimiento. Comunidades microbianas: nitrificación microbiana. <i>Chrysoperla externa</i> : porcentajes de mortandad. <i>Daphnia magna</i> (aguda): porcentaje de mortandad. <i>Daphnia magna</i> (crónica): número de crías vivas, mortandad de los y longitud de las hembras de <i>D. magna</i> . <i>Poecilia reticulata</i> : porcentaje de mortandad.

Tabla 2. Operacionalización de las variables del proyecto de calidad ambiental.

Variable	Dimensiones
<i>A. franciscana</i> :	Porcentaje de mortandad: mg de i.a. \cdot L ⁻¹
<i>C. auratus</i> :	Mortandad acumulada: mg i.a. \cdot L ⁻¹ N° días que inicia a eclosión: días, longitud y peso de peces sobrevivientes. N° de larvas deformadas: número. Porcentaje de <i>C. auratus</i> con comportamiento anormal a exposición. Porcentaje de mortandad.
<i>C. vulgaris</i> :	Inhibición del crecimiento: cantidad de células \cdot mL ⁻¹
<i>C. externa</i> :	Porcentajes de mortandad: mg de i.a. \cdot L ⁻¹
Comunidades microbianas:	Cantidad de nitratos: mg \cdot L ⁻¹
<i>D. magna</i> (aguda):	Porcentaje de mortandad: mg de i.a. \cdot L ⁻¹
<i>D. magna</i> (crónica):	Número de crías vivas: Número mortandad de los padres: Porcentaje longitud de las hembras de <i>Daphnia magna</i> : mm
<i>P. reticulata</i> :	Porcentaje de mortandad: mg de i.a. \cdot L ⁻¹

5.2. Tipos de investigación

La presente investigación es de tipo experimental, ya que se emplea el razonamiento hipotético- deductivo.

Se utilizó el método experimental.

5.3. Diseños de investigación

Investigación de laboratorio y experimental:

Se utilizó la variable independiente kresoxim-metil, en condiciones controladas de laboratorio, sobre siete modelos bioindicadores. Con el fin de describir cual es el efecto tóxico del fungicida sobre los modelos acuáticos y terrestres.

5.4. Muestreo - Modelos bioindicadores

5.4.1. Artemia franciscana

Se obtuvieron huevos de *A. franciscana* de Sera-Artemia Mix, Salt Lake USA, comercializado por Zoofarma® Lima, Perú. Laboratorio-Acuario de la ciudad de Lima, Perú.

Se prepararon las condiciones para la eclosión de los huevos, con el fin de obtener los individuos en estadio nauplio II. Se incorporaron los huevos en un vaso de precipitado de 500 mL con agua embotellada y se expuso a luz intensa por 1 h. Luego, se utilizó hipoclorito de sodio a una concentración de 5,25%. En proporción 100 mL por 900 mL de agua, se agitó constantemente por espacio de 30 min con el fin de facilitar la eclosión de los huevos. Seguido se enjuagaron los huevos con agua, fueron trasladados a un vaso de precipitado de 1000 mL conteniendo agua de mar filtrada y 7,5 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), y luego se llevó a la incubadora a 21°C durante un periodo de 24 h. Pasado el tiempo de incubación se sometieron los huevos a una fuerte aireación hasta su eclosión, se mantuvieron a temperatura ambiente (21°C). Se verificó y seleccionó para los bioensayos solo los nauplios II de *A. franciscana* dentro de las 24 h de eclosión. Una vez obtenidos los nauplios II de *A. franciscana* se procedió a realizar los bioensayos

preliminares de toxicidad aguda por 48 h de exposición. Los individuos de *A. franciscana* fueron expuestos en recipientes de plástico de 25 mL de capacidad con 20 mL de solución, se colocó diez neonatos por unidad experimental y fueron expuestos a ocho concentraciones de Kresoxim-metil (0,1625; 0,325; 0,65; 1,25; 2,5; 5, 10, 20 mg de i.a. \cdot L⁻¹) y un control negativo (Cn) con cuatro réplicas por concentración. Se utilizaron un total de 240 individuos de *A. franciscana*. Los nauplios II no se alimentaron durante el bioensayo. Se contó el número de nauplios vivos y muertos en cada una de las diluciones a las 24 h y 48 h de exposición. Se usó como criterio de mortandad la carencia de movilidad a 15 s de observación al estereoscopio. Se empleó el dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) como control positivo determinándose una CL₅₀ con rangos entre 8 a 15 mg \cdot L⁻¹. (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones y criterios de bioensayo sobre *Artemia franciscana*.

Tipo de bioensayo	estático
Tiempo de exposición	24 y 48h
Temperatura	21°C
pH de la solución	7,5
Humedad	75%
Dureza de agua	170 mg CaCO ₃ L ⁻¹
Fotoperiodo	Oscuridad total
Tamaño de envase	30 mL
Tamaño de muestra	20 mL
Edad de organismos	nauplios II<24h
N° de réplicas por concentración	4
N° de concentración más control	6
N° de organismos por concentración	40
N° de organismos por envase	10
Régimen de alimentación	ausencia
Agua control y de dilución	agua de mar
Respuesta letal	porcentaje de mortandad
Criterio de aceptabilidad	Sobre 90% de supervivencia de los controles

5.4.2. Carassius auratus

Se emplearon individuos provenientes del acuario Neptuno, San Borja - Lima, Perú con un cultivo estable y saludable. Se cultivaron en el laboratorio en un medio denominado ADAM (Aachener Daphnien Medium), características señaladas en la tabla 4 y se aclimataron por dos semanas previas al bioensayo. Posteriormente se aplicaron sobre los

huevos, las siguientes cinco concentraciones del Kresoxim-metil en agua: 0,26; 0,134; 0,067; 0,033 y 0,016 mg de i.a.-L⁻¹. La temperatura ambiental de los ensayos fue de 21°C. Bajo 12 h de luz / 12 h de oscuridad. Calidad de luz fluorescente, blanco-frío. El agua tuvo un pH de 7,5; OD: 6 mg·L⁻¹ y una dureza: 170 mg CaCO₃ L⁻¹. Se tomó como referencia fundamental para la realización de los bioensayos la guía 210 OECD (1992).

La alimentación de las larvas fue a base de Tetramin® disuelto (1/10) a una dosis de alimento de 2 gotas de preparado alimenticio diario y de *A. franciscana*. La frecuencia de recambio del medio fue de tres veces por semana (condiciones semi-estáticas). Los recipientes de mantenimiento del cultivo fueron de 20 L de capacidad. La unidad de muestra para los bioensayos fueron recipientes de plástico de 1000 mL, con 800 mL de medio de cultivo.

Los bioensayos se iniciaron con huevos de estado embrionario-temprano de desarrollo. La eclosión de los huevos y la supervivencia fueron evaluadas diariamente. Los embriones, las larvas y los juveniles muertos se retiraron de los envases para evitar que su descomposición pueda afectar a los supervivientes. Se empleó como medio de ensayo agua embotellada en medio ADAM® (Características señaladas en tabla 4) con dos gotas de alimento (Tetramin y Nauplios de *A. franciscana ad libitum*). Se emplearon las cinco concentraciones mencionadas anteriormente y un total de 40 huevos por concentración. Los bioensayos se iniciaron colocando huevos individualmente en cada uno de los envases. La duración del bioensayo de toxicidad fue de 26 días. Al final del ensayo, en *C. auratus* se evaluó: la mortandad acumulada (embriones, larvas y juveniles), el N° días que inicia la eclosión de los huevos, la longitud y el peso de los sobrevivientes (juveniles), el número de larvas deformadas y el porcentaje de *C. auratus* (Cyprinidae) "Goldfish" con comportamiento anormal. El comportamiento anormal incluyó hiperventilación y nado no coordinado. Para la validez del ensayo, el éxito en la eclosión fue sobre 80% y el éxito en la post-eclosión fue de 70% en el bioensayo (Tabla 5).

Tabla 4. Principales características fisico-químicas del medio ADAM (Aachener Daphnien Medium) usado en los bioensayos.

Parámetro Físico-químico	Valores
pH	8,15
CE (dS m ⁻¹)	1,42
Calcio (me L ⁻¹)	7,42
Magnesio (me L ⁻¹)	1,13
Potasio (me L ⁻¹)	0,20
Sodio (me L ⁻¹)	6,87
Suma de Cationes	15,62
Nitratos (me L ⁻¹)	0,01
Carbonatos (me L ⁻¹)	0,03
Bicarbonatos (me L ⁻¹)	3,02
Sulfatos (me L ⁻¹)	3,12
Cloruros (me L ⁻¹)	8,70
Suma de Aniones	14,88
Sodio	43,95
SAR (Relación de Absorción de Sodio)	3,31
Boro	0,30
Fe (mg L ⁻¹)	0,02
Cu (mg L ⁻¹)	0,01
Zn (mg L ⁻¹)	0,05
Mn (mg L ⁻¹)	0,00

Medio ADAM: 19,9 g de sales obtenidos de agua de mar. 60 L de agua que deben de ser reposadas y hiperoxigenada durante 24 h. 138 mL de solución A (Cloruro de Calcio a 117,6 g L⁻¹). 132 mL de solución B (Bicarbonato de sodio a 25,2 g L⁻¹) y 6 mL de solución C (Oxido de Selenio a 0.07 g L⁻¹). Este medio fue preparado según indicaciones de Klüttgen, B., U. Dülmer, M. Engels, y H. T. Ratt. Los resultados indicados corresponden al promedio dos análisis de agua.

Tabla 5. Condiciones y criterios de bioensayo sobre *Carassius auratus*.

Tipo de bioensayo	Semi-estático
Tiempo de exposición	26d
Temperatura	21C
pH de la solución	7,5
Humedad	70%
Dureza de agua	170 mg CaCO ₃ L ⁻²
Fotoperiodo	12 h de luz / 12 h de oscuridad
Tamaño de envase, área interna	1000mL
Edad de organismos	Huevos embrionados
N° de réplicas por concentración	4
N° de concentración más control	6
N° de organismos por concentración	40
N° de organismos por envase	1
Régimen de alimentación	Tetramin®
Agua control y de dilución	Agua embotellada y declorada.
Respuestas sub-letales	N° días que inicia la eclosión, Longitud y peso de peces sobrevivientes, N° de larvas deformadas. Porcentaje de <i>C. auratus</i> con comportamiento anormal.
Respuesta letal	Porcentaje de mortandad.
Criterio de aceptabilidad	Sobre 80% de supervivencia de los controles.

5.4.3. *Chlorella vulgaris*

Las microalgas fueron obtenidas en el acuario Neptuno, San Borja- Lima, Perú.

Se tuvieron a *C. vulgaris* a una concentración inicial de 41875 células $\text{m}\cdot\text{L}^{-1}$ al inicio del bioensayo. Luego las algas fueron trasladadas a tubos de vidrio de 12 mL de capacidad para el diseño experimental.

Se trabajó con cinco concentraciones (0,00059; 0,000118; 0,000237; 0,000473 y 0,00947 mg de $\text{i.a}\cdot\text{L}^{-1}$) de Kresoxim-metil y un control negativo (Cn) con tres réplicas por concentración. Este ensayo se realizó a una temperatura constante de 21°C y una humedad relativa 75% con una iluminación permanente hasta las 96 h de exposición. Se siguió como referencia el protocolo de EPA. OPPTS 850.4500. Las lecturas fueron realizadas hasta las 96 h de exposición. Finalmente se determinó la Cl_{50} en $\text{ug}\cdot\text{L}^{-1}$ del producto Kresoxim-metil a 96 h de exposición empleando un ensayo de toxicidad de inhibición del crecimiento de microalgas (Tabla 6).

Tabla 6. Condiciones y criterios de bioensayo sobre *Chlorella vulgaris*.

Tipo de bioensayo	Estático
Tiempo de exposición	96 h
Temperatura	21°±2C
pH de la solución	7
Humedad	75%
Dureza de agua	175 mg CaCO ₃ L ⁻¹
Fotoperiodo	Iluminación permanente
Tamaño de envase	12mL
Tamaño de la muestra	10mL
Concentración inicial de organismos	41875 células.mL ⁻¹
Nº de réplicas por concentración	3
Nº de concentración más control	6
Régimen de alimentación	NR
Agua control y de dilución	Agua embotellada
Respuesta sub-letal	Inhibición del crecimiento en microalgas al 50% (CI ₅₀)
Criterio de aceptabilidad sugerida	Densidad óptima del control a 72h de iniciado el ensayo sobre 40.10 ³ org.mL ⁻¹

5.4.4. Chrysoperla externa.

Se obtuvieron larvas de *C. externa* de menos de 24 h de eclosionadas, en el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), Ate - Vitarte, Lima. La aclimatación de los individuos consistió en mantenerlos en un ambiente con condiciones semi-controladas a una temperatura de 21°C y con una humedad relativa de 75 % y bajo oscuridad total. Se tomó en cuenta el protocolo de EPPO PP 1/180 (2)-1998. PP 1/142 (2)-(1998). Se mantuvo en estas condiciones hasta su eclosión y durante el bioensayo. Posteriormente los bioensayos se iniciaron colocando larvas de primer estadio por envase de plástico de 30 mL aproximadamente. Para los ensayos con *C. externa* se usaron cinco concentraciones de Kresoxim - metil (0,508; 0,254; 0,127; 0,0635 y 0,03175 mg de i.a. \cdot L⁻¹) y un control negativo (Cn). Se realizaron cuatro réplicas por concentración. Las lecturas se realizaron a las 24 72 h (se evaluará la mortandad) (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones y criterios de bioensayo sobre *Chrysoperla externa*.

Tipo de bioensayo	Estático
Tiempo de exposición	72h
Temperatura	21°C
pH de la solución	7,5
Humedad	75%
Dureza de agua	175 mg CaCO ₃ L ⁻¹
Fotoperiodo	Oscuridad permanente
Tamaño de envase	30mL
Tamaño de muestra	10 mL
Edad de organismos	larvas<24h
N° de réplicas por concentración	4
N° de concentración más control	6
N° de organismos por concentración	40
N° de organismos por envase	10
Régimen de alimentación	NR
Agua control y de dilución	Agua embotellada
Respuesta letal	Porcentaje de mortandad
Criterio de aceptabilidad	Sobre 80% de supervivencia en controles

NR=No requerido.

5.4.5. Comunidades microbianas

Se obtuvo una muestra de suelo y se trabajó una serie de cinco réplicas por concentración y un control, a cinco días de exposición, se cubrió con parafilm® las unidades de ensayo. Las condiciones del ensayo fueron a oscuridad total, temperatura de incubación constante de 21°C, pH: 6, suelo artificial: 34 g de arena lavada, 10 g aserrín y 5 g musgo (el cual proporciona la materia orgánica o las comunidades microbianas del suelo), 1 g carbonato de calcio y 6 g agua embotellada conteniendo alfalfa filtrada, según lo indicado en el ítem 3. iii e ítem 4. ii del protocolo de la EPA 850.5110 y del protocolo de OECD TG 217 (2000).

Se agregó 80 mL de KCl a 1N a cada unidad de muestra y por un lapso de una hora en movimiento frecuente. Seguidamente se filtró y añadió un sachet del kit Hanna® de medición de nitratos por el método colorimétrico, en unidades de $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y posterior transformación a $\text{ug}\cdot\text{g}^{-1}$ de suelo. Se evaluaron cuatro concentraciones (0,153; 0,306; 0,612; 1,244 mg de i.a. $\cdot\text{g}^{-1}$ de suelo) con Kresoxim-metil y un control negativo (Cn. Las lecturas fueron a las 120 h (Tabla 8).

Tabla 8. Condiciones y criterios de bioensayo sobre comunidades microbianas.

Tipo de bioensayo	Estático
Tiempo de exposición	120 h
Temperatura	21°C
pH de la solución	6
Humedad	75%
Dureza de agua	170 mg CaCO ₃ L ⁻¹
Fotoperiodo	Oscuridad total
Tamaño de envase	250mL
Tamaño de la muestra	200mL
Edad de organismos	NR
Nº de réplicas por concentración	5
Nº de concentración más control	6
Agua control y de dilución	Agua embotellada
Respuesta sub-letal	Nitrificación microbiana en base al NOEC y LOEC
Criterio de aceptabilidad sugerida	Incremento en la nitrificación en el control en comparación con el inicial

NR=No requerido.

LOEC=Concentración más baja de efecto observables.

NOEC=Concentración de efectos no observables e inmediatamente debajo del LOEC.

5.4.6. Daphnia magna

a) Toxicidad aguda

Para la muestra *D. magna* se obtuvo neonatos de menos de 24 h de nacidos, provenientes en el acuario Neptuno, San Borja - Lima, Perú. En el laboratorio, las pulgas de agua fueron puestas en recipientes de plástico de 30 mL conteniendo diez neonatos por unidad experimental y fueron expuestos a cinco concentraciones de Kresoxim-metil (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 mg de i.a. \cdot L⁻¹) y un control negativo (Cn) con cuatro réplicas por concentración. Las condiciones a las que se mantuvo el ensayo fueron de temperatura a 21°C, con humedad relativa de 75% y el agua presentó un pH de 7. Todo esto bajo oscuridad. La duración del bioensayo de toxicidad aguda fue de 48 h. Según el protocolo de EPA OPPTS N°850.1010. La lectura se realizó a las 24h y 48 h (Tabla 9).

Tabla 9. Condiciones y criterios de bioensayo agudo sobre *Daphnia magna*.

Tipo de bioensayo	Estático
Tiempo de exposición	24 y 48 h
Temperatura	21°C
pH de la solución	7,5
Humedad	75%
Dureza de agua	170 mg CaCO ₃ L ⁻¹
Fotoperiodo	12h luz/ 12h oscuridad
Tamaño de envase	30mL
Tamaño de muestra	20mL
Edad de organismos	Neonatos < 24 h
N° de réplicas por concentración	4
N° de concentración más control	6
N° de organismos por concentración	40
N° de organismos por envase	10
Régimen de alimentación	N.R
Agua control y de dilución	Agua embotellada
Respuesta letal	Porcentaje de mortandad
Criterio de aceptabilidad	Sobre 90% de supervivencia de los controles

NR=No requerido.

b) Toxicidad crónica

Se empleó a *D. magna* provenientes del acuario Neptuno, San Borja - Lima, Perú. Se buscó un cultivo estable y saludable por más de un año. En el laboratorio se cultivó en un medio denominado ADAM (Aachener Daphnien Medium), (tabla 4) y se aclimató en el laboratorio por dos semanas previas al bioensayo.

Se aplicaron las siguientes cinco concentraciones del Kresoxim-metil en agua destilada (0,026; 0,0134; 0,0067; 0,0033 y 0,0016 mg de i.a. \cdot L⁻¹). La temperatura ambiental de los ensayos fue de 21°C. Bajo 12 h luz / 12 h oscuridad, calidad de luz de fluorescente, blanco-frío. El agua presentó un pH de 7,5; OD: 6 mg \cdot L⁻¹ y una dureza de 170 mg CaCO₃ L⁻¹. Se tomó como referencia fundamental para la realización de los bioensayos la guía 211 OECD (1998). La alimentación de las hembras-neonatas fueron a base de Tetramin® disuelto (1/10) a una dosis de alimento de 2 gotas de preparado alimenticio diario. La frecuencia de recambio del medio fueron tres veces por semana (condiciones semi-estáticas). Los recipientes de mantenimiento del cultivo fueron de 5 L de capacidad. La unidad de muestra para los bioensayos fueron recipientes de plástico de 300 mL, con 200 mL de medio de cultivo. Los bioensayos se iniciaron con un neonato de menos de 24 h, sin aireación. Se usó como medio de ensayo agua reposada con dos gotas de alimento. Se emplearon cinco concentraciones y un total de 10 neonatos por concentración. Los neonatos fueron colocados individualmente en cada uno de los envases. La duración del bioensayo de toxicidad crónica fue de 21 días (Tabla 10).

Tabla 10. Condiciones y criterios de bioensayo crónico sobre *Daphnia magna*.

Tipo de bioensayo	Semi-estático
Tiempo de exposición	21d
Temperatura	21°C
pH de la solución	7,5
Humedad	75%
Dureza de agua	170 mg CaCO ₃ L ⁻¹
Fotoperiodo	12h luz/ 12h oscuridad
OD	6 mg·L ⁻¹
Tamaño de envase	300mL
Tamaño de muestra	200mL
Edad de organismos	Neonatos <24 h
Nº de réplicas por concentración	4
Nº de concentración más control	6
Nº de organismos por concentración	10
Nº de organismos por envase	1
Régimen de alimentación	Tetramin®
Agua control y de dilución	Agua destilada
Respuesta sub-letal	Número de crías vivas, Longitud de las hembras de <i>Daphnia magna</i> a 21 días de exposición.
Respuesta letal	porcentaje de mortandad
Criterio de aceptabilidad	Sobre 80% de supervivencia de los controles a 21d

5.5. *Poecilia reticulata*

Se obtuvieron peces Guppy (*P. reticulata*) proveniente del acuario Neptuno, San Borja - Lima, Perú. Se colocaron cinco peces por recipientes de plástico de 300 mL y fueron sometidos a cinco concentraciones de Kresoxim-metil (6,32; 3,16; 1,58; 0,79 y 0,40 mg de i.a. \cdot L⁻¹) y un control negativo (Cn) con agua embotellada. Se realizó cuatro réplicas por concentración. La temperatura ambiental del ensayo fue de 21°C, con una humedad relativa de 75 % y agua con un pH de 6,8. Según el protocolo de EPA 1996. OPPTS 850.1075. Se mantuvo a total oscuridad hasta las 96 h de exposición. Al final del ensayo de toxicidad aguda se determinó la CL₅₀ en mg \cdot L⁻¹ 96 h del pez *P. reticulata* (Tabla 11).

Tabla 11. Condiciones y criterios de bioensayo sobre *Poecilia reticulata*.

Tipo de bioensayo	estático
Tiempo de exposición	96h
Temperatura	21°C
pH de la solución	6,8
Humedad	75%
Dureza de agua	170 mg CaCO ₃ L ⁻¹
Fotoperiodo	Oscuridad total
Tamaño de envase	300 mL
Tamaño de muestra	200mL
Tamaño de organismos	2 cm
N° de réplicas por concentración	4
N° de concentración más control	6
N° de organismos por concentración	20
N° de organismos por envase	5
Régimen de alimentación	ausencia
Agua control y de dilución	Agua embotellada y declorada.
Respuesta letal	Porcentaje de mortandad.
Criterio de aceptabilidad	Sobre 90% de supervivencia de los controles

5.6. Procedimiento y análisis de datos

En todos los ensayos con las diversas concentraciones se siguieron un incremento de x2.

Los ensayos nos indicaron los porcentajes de mortandad en las concentraciones de Kresoxim-metil más control, para *C. externa* a las 72 h de exposición; *P. reticulata* a las 96 h de exposición, de *D. magna* (toxicidad aguda) obtenidos a las 48 h de exposición, *A. franciscana* a las 24 y 48h exposición y la inhibición del crecimiento en *C. vulgaris* a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición.

Se calculó la CL₅₀ del Kresoxim-metil sobre los modelos biológicos usando el programa computarizado Probit versión 1.5. El modelo de regresión fue verificado usando el estadístico Chi-cuadrado. CL₅₀ sobre *C. externa* a las 72 h; *P. reticulata* a las 96 h; *C. externa* a las 72h, *D. magna* a las 48h y *A. franciscana* a las 48 h.

Se halló la toxicidad crónica de *D. magna* a los 21 días de exposición, evaluando el número de crías vivas, mortandad de los padres al momento de producción de la primera camada y longitud de las hembras de *D. magna* y en *C. auratus* a los 26 d de exposición a Kresoxim-metil se evaluaron la mortandad acumulada, N° días que inicia la eclosión, longitud y peso de peces sobrevivientes, N° de larvas deformadas y porcentaje de *C. auratus* con comportamiento anormal. Se usaron cinco concentraciones más el control, con cuatro repeticiones, en un diseño en bloque completamente aleatorio (DBCA) para todos los bioensayos, y solamente cinco concentraciones más el control, con 5 repeticiones para la toxicidad para la concentración de nitratos obtenido a 120 h de exposición En todos los casos, la eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías, previa transformación de los datos a raíz cuadrada del arcoseno. En el caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos o las repeticiones se realizó una Prueba de Significación

DVS (Diferencia Verdaderamente Significativa) de Tukey. Se empleó el paquete estadístico SPSS, versión 24,0 para Windows 8 para el cálculo de los estadísticos descriptivos e inferenciales.

5.7. Aspectos éticos

El uso de estos siete bioindicadores reducirán el número de ensayos de toxicidad en mamíferos. Además de su fácil manipulación, mantenerlos bajo condiciones ambientales controladas y generan un bajo costo (Guilhermino, 2000). Minimizando el número de los organismos empleados, repeticiones y empleando las tres Rs "reemplazamiento, reducción, y refinamiento" (Mukerjee, 1997).

VI. RESULTADOS

6.1. Artemia franciscana

La Tabla 12 nos indica los porcentajes de mortandad de *D. magna* obtenidos por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del Kresoxim-metil empleada a 24h y 48 h de exposición.

Tabla 12. Efecto del kresoxim-metil sobre la mortandad de *A. franciscana* a 24 y 48 h de exposición.

Concentración mg i.a.L ⁻¹	Mortandad %	
	24h	48h
Control	0 ^a	0 ^a
0,1625	29,72 ^{abc}	48,48 ^{bc}
0,325	29,72 ^{ab}	45,45 ^{bc}
0,65	43,24 ^{bcd}	42,42 ^b
1,25	45,94 ^{cd}	54,54 ^{bc}
2,5	54,05 ^{cd}	75,75 ^{bcd}
5	23,07 ^{bcd}	47,05 ^{bcd}
10	42,30 ^d	61,11 ^{cd}
20	38,09 ^d	89,47 ^d
NOEC(mg i.a.L ⁻¹)	0,325	<0,1625
LOEC(mg i.a.L ⁻¹)	0,65	0,1625
CL ₅₀ (mg i.a.L ⁻¹)	14,07	14,58

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortandad son estadísticamente iguales.

LOEC= Concentración más baja de efecto observables.

NOEC=Concentración de efectos no observables e inmediatamente debajo del LOEC.

CL₅₀ = Concentración letal media.

Kresoxim-metil tuvo efecto sobre la mortandad a las 24 y 48 h con un CL₅₀ de 14,07 mg i.a.L⁻¹ y 14,58 mg i.a.L⁻¹, respectivamente.

6.2. *Carassius auratus*

Tabla 13. Efecto de Kresoxim-metil en la mortandad acumulada, N° días que inicia la eclosión, longitud y peso de peces sobrevivientes, N° de larvas deformadas y porcentaje de *C. auratus* "Goldfish" con comportamiento anormal a exposición.

Concentración mg i.a·L ⁻¹	% Mortandad acumulada	Días en que inicia la eclosión	Longitud de peces sobrevivientes (mm)	Peso de peces sobrevivientes (g)	N° de larvas "fry" deformadas	% de juveniles con comportamiento anormal
control	0 ^a	3,6 ^a	7,2 ^a	0,20 ^a	0 ^a	0 ^a
0,016	11,42 ^a	3,5 ^a	7,0 ^a	0,18 ^a	0 ^a	2,63 ^a
0,033	8,57 ^a	3,8 ^a	7,0 ^a	0,18 ^a	0 ^a	0 ^a
0,067	14,28 ^b	4,1 ^a	7,0 ^a	0,17 ^a	0 ^a	5,26 ^{ab}
0,134	60 ^b	4,7 ^b	6,9 ^a	0,14 ^b	0 ^a	5,26 ^{ab}
0,26	89,14 ^b	4,9 ^b	6,3 ^b	0,13 ^b	2,5 ^a	7,89 ^b
NOEC (mg i.a·L ⁻¹)	0,033	0,067	0,134	0,067	0,26	0,134
LOEC (mg i.a·L ⁻¹)	0,067	0,134	0,26	0,134	>0,26	0,26

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortandad son estadísticamente iguales.

LOEC = Concentración más baja de efecto observables.

NOEC=Concentración de efectos no observables e inmediatamente debajo del LOEC.

La mortandad acumulada incluyó la mortandad embrionaria, de larvas y de juveniles. El Comportamiento anormal incluyó en conjunto el nado anormal y la hiperventilación. Además incluye a los peces (larvas y juveniles) muertos.

Se observó que a los 26 días el parámetro de mortandad se vio afectado en la concentración 0,067 mg i.a·L⁻¹ (Tabla 13).

En los días en que inicia la eclosión este factor se vio alterado en la concentración 0,134 mg i.a·L⁻¹ al igual que en los pesos de los peces sobrevivientes (Tabla 13).

En la longitud de peces sobreviviente, el efecto se observó en la concentración más alta 0,26 mg i.a·L⁻¹ (Tabla 13).

No se observó efecto en el número de larvas deformadas a las concentraciones (Tabla 13).

El porcentaje de juveniles con comportamiento anormal se vio afectado en la concentración más alta 0,26 mg i.a·L⁻¹ (Tabla 13).

6.3. *Chlorella vulgaris*

La Tabla 14 nos indica los porcentajes de inhibición del crecimiento algal de *C. vulgaris* obtenidos por acción de las cinco concentraciones en orden creciente el Kresoxim-metil empleadas a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición.

Tabla 14. Efecto del Kresoxim-metil sobre la inhibición del crecimiento algal de *C. vulgaris* a 24, 48, 72 y 96 h de exposición.

Concentración mg i.a·L ⁻¹	Inhibición %			
	24h	48h	72h	96h
0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
0,00059	30,02 ^{ab}	42,39 ^b	55,55 ^b	77,69 ^b
0,00118	47,15 ^{ab}	50,57 ^b	83,56 ^b	79,67 ^b
0,00237	62,16 ^{ab}	62,23 ^b	75,16 ^b	84,09 ^b
0,00473	47,97 ^{ab}	62,68 ^b	78,34 ^b	86,99 ^b
0,00947	70,52 ^b	72,07 ^b	87,56 ^b	89,95 ^b
NOEC(mg i.a·L ⁻¹)	0,00473	<0,00059	<0,00059	<0,00059
LOEC(mg i.a·L ⁻¹)	0,00947	0,00059	0,00059	0,00059
Cl ₅₀ (mg i.a·L ⁻¹)	0,93 x 10 ⁻²	0,34 x 10 ⁻²	0,12 x 10 ⁻¹	>0,12 x 10 ⁻¹

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los valores de inhibición de crecimiento algal son estadísticamente iguales.

LOEC= Concentración más baja de efecto observables.

NOEC=Concentración de efectos no observables e inmediatamente debajo del LOEC.

Cl₅₀= Concentración de inhibición media.

Se observó efecto de inhibición a las 24 h con Cl_{50} $0,93 \cdot 10^{-2}$ mg i.a. \cdot L $^{-1}$, a las 48 h el Cl_{50} fue $0,34 \cdot 10^{-2}$ mg i.a. \cdot L $^{-1}$ y a las 96 h el CL_{50} fue $>0,12 \times 10^{-1}$ mg i.a. \cdot L $^{-1}$.

6.4. *Chrysoperla externa*

La Tabla 15 nos indica los porcentajes de mortandad de *Chrysoperla externa* obtenidos por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del Kresoxim-metil empleada a 72 h de exposición.

Tabla 15. Efecto del Kresoxim-metil sobre la mortandad de *Chrysoperla externa* a 72 h de exposición.

Concentración mg i.a. \cdot L $^{-1}$	Mortandad % 72h
0	0 ^a
0,3175	0 ^a
0,0635	23,07 ^a
0,127	0 ^a
0,254	38,46 ^a
0,508	23,07 ^a
NOEC (mg i.a. \cdot L $^{-1}$)	0,508
LOEC (mg i.a. \cdot L $^{-1}$)	>0,508

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortandad son estadísticamente iguales.

LOEC = Concentración más baja de efecto observables.

NOEC=Concentración de efectos no observables e inmediatamente debajo del LOEC.

Ninguna de las concentraciones de Kresoxim-metil tuvo efecto significativo sobre la mortandad de *C. externa*.

6.5. Comunidades microbianas

La Tabla 16 nos indica la concentración y el porcentaje de inhibición de nitratos por efecto de las cuatro concentraciones de Kresoxim-metil empleada a 120 h de exposición a las comunidades microbianas del suelo.

Tabla 16. Efecto del Kresoxim-metil sobre las comunidades microbianas del suelo a 120 h de exposición.

Concentración mg i.a.g ⁻¹	[c] de nitratos a 120 h en el suelo (mg ia g ⁻¹ suelo)	Porcentaje de inhibición a 120h
0	11,00 ^a	0 ^a
153	20,90 ^{ab}	11,12 ^{ab}
306	26,40 ^{ab}	17,30 ^{ab}
612	24,20 ^{ab}	14,83 ^{ab}
1244	28,05 ^b	19,15 ^b
NOEC (mg i.a.L ⁻¹)	612	612
LOEC (mg i.a.L ⁻¹)	1244	1244
Cl ₅₀ (mg i.a.L ⁻¹)	>1244	4622

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales.

LOEC = Concentración más baja de efecto observables.

NOEC=Concentración de efectos no observables e inmediatamente debajo del LOEC.

Cl₅₀= Concentración de inhibición media.

Se observó inhibición en la formación de nitratos sobre las comunidades microbianas, en la concentración evaluada de 1244 mg i.a.L⁻¹ a las 120h.

6.6. *Daphnia magna* (Toxicidad aguda)

La Tabla 17 nos indica los porcentajes de mortandad de *D. magna* obtenidos por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del kresoxim-metil empleada a 24h y 48 h de exposición.

Tabla 17. Efecto del kresoxim-metil sobre la mortandad de *D. magna* a 24 y 48 h de exposición.

Concentración mg i.a.·L ⁻¹	Mortandad %	
	24h	48h
control	0 ^a	0 ^a
0,1	13,16 ^a	8,57 ^{ab}
0,2	7,89 ^a	5,71 ^a
0,4	15,78 ^{ab}	14,28 ^{ab}
0,8	42,10 ^b	40 ^b
1,6	84,4 ^c	88,57 ^c
NOEC (mg i.a.·L ⁻¹)	0,8	0,8
LOEC (mg i.a.·L ⁻¹)	1,6	1,6
CL ₅₀ (mg i.a.·L ⁻¹)	1,09	1,04

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortandad son estadísticamente iguales.

LOEC=Concentración más baja de efecto observables.

NOEC=Concentración de efectos no observables e inmediatamente debajo del LOEC.

CL₅₀ = Concentración letal media.

Kresoxim-metil tuvo efecto sobre la mortandad a las 24 y 48 h en las concentraciones más altas. Con CL₅₀ de 1,09 y 1,04 mg i.a.·L⁻¹, respectivamente.

6.7. *Daphnia magna* (Toxicidad crónica)

La Tabla 18 nos indica efecto del Kresoxim-metil en el número de crías vivas, en la mortandad de los padres al momento de producción de la primera camada y en la longitud de las hembras de *D. magna* a 21 días de exposición (Fig. 2).

Tabla 18. Efecto del Kresoxim-metil sobre el n° de crías vivas, porcentaje de mortandad y longitud de las hembras de *Daphnia magna*.

Concentración mg i.a. \cdot L ⁻¹	N° crías vivas	% Mortandad de los padres	Longitud de hembras (mm)
control	81,1 ^a	0 ^a	4,8 ^a
0,0016	83,5 ^a	0 ^a	4,8 ^a
0,0033	45,3 ^b	80,5 ^b	4,8 ^a
0,0067	0 ^c	100 ^b	0 ^b
0,0134	0 ^c	100 ^b	0 ^b
0,026	0 ^c	100 ^b	0 ^b
NOEC (mg i.a. \cdot L ⁻¹)	0,0016	0,0016	0,0033
LOEC (mg i.a. \cdot L ⁻¹)	0,0033	0,0033	0,0067

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que el n° de crías vivas, porcentaje de mortandad y longitud de las hembras son estadísticamente iguales.

LOEC = Concentración más baja de efecto observables.

NOEC=Concentración de efectos no observables e inmediatamente debajo del LOEC.

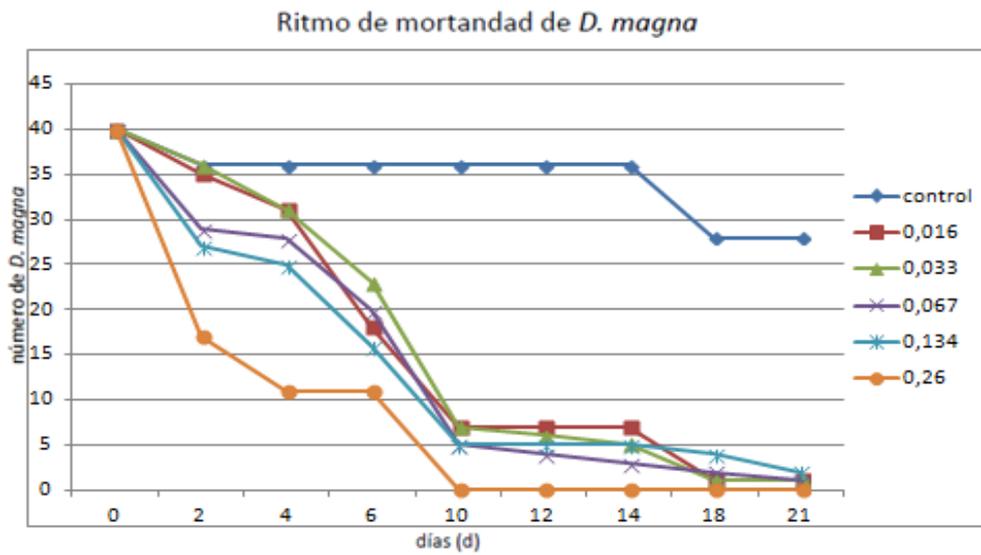


Figura 1. Ritmo de mortandad diario de *D. magna* en ensayo de toxicidad crónica a los 21 días de exposición.

El número de crías vivas se vieron afectadas a partir de la concentración 0,0033 mg i.a. \cdot L⁻¹.

El porcentaje de mortandad de padres se vio afectado a partir de la concentración 0,0033 mg i.a. \cdot L⁻¹.

La longitud de las hembras se vieron afectadas a partir de la concentración 0,0067 mg i.a. \cdot L⁻¹.

La Figura 1 señala el ritmo de mortandad de *D. magna* en ensayo de toxicidad crónica a los 21 días de exposición.

6.8. *Poecilia reticulata*

Porcentaje de mortandad

La Tabla 19 nos indica los porcentajes de mortandad del pez *P. reticulata* obtenidos por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del Kresoxim-metil empleadas a 96 h de exposición.

Tabla 19. Efecto del kresoxim-metil sobre la mortandad de *P. reticulata* a 96 h de exposición.

mg i.a.·L ⁻¹	Mortandad % 96h
control	0 ^a
0,40	10,52 ^a
0,79	31,57 ^a
1,58	21,05 ^a
3,16	10,52 ^a
6,32	52,63 ^a
NOEC (mg i.a.·L ⁻¹)	6,32
LOEC (mg i.a.·L ⁻¹)	>6,32
CL ₅₀ (mg i.a.·L ⁻¹)	6,51

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortandad son estadísticamente iguales.

LOEC = Concentración más baja de efecto observables.

NOEC=Concentración de efectos no observables e inmediatamente debajo del LOEC.

CL₅₀ = Concentración letal media.

No se observó efecto tóxico de Kresoxim-metil sobre el porcentaje de mortandad de *P. reticulata*.

VII. DISCUSIÓN

Kresoxim-metil es un fungicida muy tóxico para organismos acuáticos y que además puede causar efectos adversos a largo plazo en el ambiente acuático. Se conoce que existe toxicidad para los peces, *Daphnia* y algas verdes *in vitro* (BASF, 2009).

7.1. *Artemia franciscana*

En la prueba de toxicidad aguda con *A. franciscana* a las 24h y 48h, se halló CL_{50} 14,07 mg i.a. \cdot L⁻¹ y 14,58 mg i.a. \cdot L⁻¹, respectivamente que demuestra ser un compuesto de similar toxicidad a Diazinon cuyo valor de CL_{50} a las 24 h es 10,57 mg \cdot mL⁻¹. Se usó el fungicida azoxistrobina (sustancia activa) y su formulación comercial, cuyo modo de acción es igual a Kresoxim-metil, sobre *A. franciscana* el CL_{50} de azoxistrobina a las 24h mortalidad es 0,46 mg \cdot L⁻¹ y Ortiva 1,252 mg \cdot L⁻¹ (Alves, 2015). En otro ensayo con *A. franciscana* se evaluó la concentración letal media (CL_{50}) de diecisiete compuestos organofosforados. Fentión cuya CL_{50} a exposición de 24h y 48h fue 0,00626 mg \cdot mL⁻¹ y 0,00011mg \cdot mL, respectivamente, presentó mayor toxicidad que los demás compuestos. El compuesto con menos toxicidad fue clorpirifos cuyo CL_{50} a las 24 y 48 h fue 0,10 y 0,022, respectivamente (Jaramillo *et al.*, 2013).

7.2. *Carassius auratus*

Muchos efectos tóxicos producidos por diversas sustancias sobre los organismos no se manifiestan de forma inmediata; pero son suficientes para modificar la biología de éstos llegando incluso a condicionar su posibilidad de sobrevivir. Estos efectos se pueden evaluar utilizando

diferentes biomarcadores (Alvarez *et al.*, 2012). Para analizar estos efectos fue necesario someter a un *P. reticulata* a mayor tiempo de exposición (26 días) con diferentes concentraciones de Kresoxim-metil.

7.3. *Chlorella vulgaris*

Al final de las evaluaciones se observó que todas las poblaciones de *C. vulgaris* expuestas a las diferentes concentraciones durante las 24, 48, 72 y 96 h, presentaron una inhibición significativa con respecto a los controles. Siendo mayor la inhibición a medida que la concentración de Kresoxim-metil era más alta. En otro trabajo similar donde usaron glifosato para calcular la inhibición sobre *C. vulgaris* se observó poblaciones algales expuestas a concentraciones de glifosato de 5 mg Gli/l que también provocaron una inhibición significativa del crecimiento algal respecto de los controles (Saenz & Marzio, 2009). Tomando en consideración los valores de los índices NOEC y LOEC utilizando como parámetro el crecimiento medio de inhibición a las 96 h, la especie *C. vulgaris* resultó más sensible frente a la acción de Kresoxim-metil con valores de 0,00947 y >0,00947 mg i.a. \cdot L⁻¹ respectivamente frente a Glisofato con NOEC y LOEC a las 96 h con valores de 2,5 y 5 mg Gli/l respectivamente (Saenz & Marzio, 2009). Lo que demuestra que kresoxim-metil es más tóxico que glisofato sobre de *C. vulgaris*. Se trabajó con una especie de la familia de Chlorellaceae, *Chlorella pyrenoidosa* Chick, 1903, de características similares a *C. vulgaris*. Se utilizó la mezcla de clortoluron (43%) con terbutrina (7%) e isoproturon (50%), estos herbicidas disminuyeron el crecimiento de algas de *C. pyrenoidosa*. Los valores de NOEC (96 h) fueron <0,002 y 0,0043 mg \cdot L⁻¹, respectivamente. (Anton & Alia, 1993). Lo que indica que el efecto de la mezcla de herbicidas es similar en toxicidad con el Kresoxim-metil.

7.4. *Chrysoperla externa*

Las diferentes concentraciones de Kresoxim-metil a 72 h de exposición no tuvieron efecto sobre *C. externa*. El NOEC y NOEC fue 0,508 mg i.a·L⁻¹ y >0,0508 mg i.a·L⁻¹, respectivamente, para el parámetro de porcentaje mortandad en *C. externa*. No se encontró literatura del uso de Kresoxim-metil sobre *C. externa*. En un trabajo similar se utilizó el insecticida lufenuron y abamectina sobre *C. externa*. Se demostró que lufenuron fue nocivo para este depredador, ya que indujo una alta mortandad en las larvas de neonatos de los huevos tratados, en recién nacidos, así como en larvas de primer, segundo y en tercer estadio, donde se produjo una alta mortandad de pupas, no permitiendo llegar a adultos, mientras que la viabilidad del huevo de *C. externa* no fue afectada por la abamectina en ninguno de sus estadios y se desarrollaron adultos. Los resultados mostraron que la abamectina es inocua y que el lufenuron es tóxico para los huevos y larvas de *C. externa* (Bueno & Freitas, 2004). En otro bioensayo se utilizó el huevo, larva y adulto de *Chrysoperla rufilabris* Burmeister, 1839 al que se le aplicó fungicidas (trifenilestaño, benomil y dodina), acaricidas (dicofol y hexakis) e insecticidas (dimetoato, demetón, malatión, fosadona, endosulfán, azinfos-metilo, lindano y etión) donde se observó que los fungicidas y acaricidas causaron <50% de mortandad para *C. rufilabris* mientras que los insecticidas usados fueron menos tóxicos (Mizell & Schiffhauer, 1990).

7.5. Comunidades microbianas

No se observó inhibición en la formación de nitratos sobre las comunidades microbianas, en ninguna de las cuatro concentraciones evaluadas a las 120h. La concentración más alta usada fue 1244 mg. i.a·g⁻¹. En otro ensayo con tres fungicidas (Captan, Thiram y Verdasan), estos estuvieron asociados a una disminución en la nitrificación a los 28 días. Las tasas más bajas de aplicación de los tres fungicidas dieron

como resultado la mayor cantidad de nitrificación, así se obtuvo la inhibición de la nitrificación a los $0,01 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de Verdasan, a $0,1 \text{ mg}\cdot\text{g}$ de Tiram y $0,25 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de Captan en suelo. Wainwright & Pugh (1973) indican que Kresoxim-metil es menos tóxico que los tres fungicidas mencionados. Por otro lado, mientras que en otro bioensayo se utilizaron siete insecticidas (lindano, fenitrotión, fonofos, malatión, forato, terbufos y carbofurano) y seis fungicidas (mancozeb, maneb, thiram, benomyl, captan y terrazole.) sobre la desnitrificación de nitratos en suelos. A partir de la concentración $50 \text{ ug}\cdot\text{g}^{-1}$ se obtuvo un efecto significativo en el caso de todos los insecticidas, al igual que en dos fungicidas tiram y captan que actuaron a partir de la concentración $50 \text{ ug}\cdot\text{g}^{-1}$ mientras que el resto a esa elevada concentración no presentaron ningún efecto de desnitrificación. Yeomans & Bremner (1985) demuestran que los insecticidas tiene mayor efecto sobre la inhibición de nitratos en las comunidades microbianas que los fungicidas, especialmente Kresoxim-metil.

7.6. *Daphnia magna*

Kresoxim-metil está considerado como un plaguicida de bajo riesgo, sin embargo estudios recientes han reconocido los impactos potenciales de los fungicidas en la reproducción de *Daphnia* (Warming *et al.*, 2009).

En la prueba de toxicidad aguda para *D. magna* se observó una mortandad alta en la mayor concentración con un porcentaje de 88,57%. A las 24 h el $\text{CL}_{50} = 1,09 \text{ mg i.a}\cdot\text{L}^{-1}$ y para 48h el $\text{CL}_{50} = 1,04 \text{ mg i.a}\cdot\text{L}^{-1}$. Mientras que en otros fungicidas del grupo estrobilurinas, piraclostrobina y epoxiconazole al que pertenece Kresoxim-metil los valor de $\text{CL}_{50} = 0,016 \text{ mg i.a}\cdot\text{L}$ y $\text{CL}_{50} = 8,69 \text{ mg i.a}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente (Capeagro, 2016). Por otro lado se trabajó con 3 clones de *D. magna* y se demostró una variación clonal significativa en la sensibilidad de *D. magna* hacia la azoxistrobina. Un clon tenía una concentración letal media de 48 h $\text{CL}_{50} =$

0,277 mg·L⁻¹. Sin embargo, los dos clones restantes eran mucho más sensibles y tenían CL₅₀ = 0,071 mg·L⁻¹ / y 0,098 mg·L⁻¹, respectivamente (Warming, 2009). Estas diferencias podrían ser el resultado de diversas condiciones experimentales o de cultivo, como factor genético, medio, y también la pureza del compuesto probado.

Las pruebas crónicas se utilizan para evaluar las respuestas a largo plazo de los contaminantes, la toxicidad crónica de éstos puede afectar negativamente la supervivencia, el crecimiento de las poblaciones de organismos, y eventualmente causar daño a los ecosistemas (Sancho *et al.*, 2016). Se realizó una prueba crónica de 21 días de *D. magna* donde se observó como afectó negativamente la mortandad de los padres, el número de crías vivas y la longitud de las hembras. Estos resultados coinciden con Cui (2017) que realizó una prueba crónica de 21 días, donde observó que las estrobilurinas pueden afectar significativamente la reproducción, el desarrollo, el crecimiento y causar una disminución significativa en el número de crías.

El NOEC con respecto a la mortandad para tebuconazole a los 21 días fue 0,41 mg·L⁻¹, mientras que en este ensayo fue de 0,0016 mg i.a.·L⁻¹. Esto demuestra que Kresomin metil es más tóxico que tebuconazole (Sancho *et al.*, 2016).

Los resultados indican que Kresoxim-metil es tóxico para *D. magna* y sus bajas concentraciones son suficientes para causar daño a *D. magna* en concentraciones ambientalmente relevantes (Cui, 2017).

7.7. *Poecilia reticulata*

En peces el valor establecido de la CL₅₀ es 1mg·L⁻¹ (Anasac, 2016) mientras que en los resultados de *P. reticulata* el valor a las 96h de CL₅₀ fue de 6,51 mg i.a.·L⁻¹. En un estudio similar donde se utilizó Strobilurina (grupo químico al que pertenece Kresoxim-metil) + triazol, el valor a las

96 h de CL₅₀ fue 9,9 mg·L⁻¹ en pez *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) "bagre" (Kreutz, 2008), mientras que en otro ensayo se evaluaron dos formulaciones comerciales (A,B) y solución de glifosato puro (C) frente a *P. reticulata* a las 96h. Kresoxim-metil no tuvo efecto sobre *P. reticulata* en ninguna de sus concentraciones. Se utilizaron formulaciones comerciales A, B, C y demostraron ser tóxicas aún a bajas concentraciones, siendo la formulación B hasta cuatro veces más tóxica que la A, provocando un 100% de mortandad aún a valores de 0,025 ml·L⁻¹ de formulación comercial, equivalente a 12 mg·L⁻¹ de sal de glifosato. Se determinó también que, aún a concentraciones altas (hasta 400 mg·L⁻¹), el glifosato puro no presentó estos efectos (Alvarez *et al.*, 2012). Se utilizó el pez *Poecilia latipinna* (Lesueur, 1821) que pertenece a la misma familia que *P. reticulata*. Se evaluó la toxicidad aguda a las 96 h del metomilo donde se halló el valor de la CL₅₀ 2,08 mg i.a·L⁻¹ (Napan *et al.*, 2010).

7.8. Análisis Global

El bioindicador más sensible ante el fungicida Kresoxim-metil fue *C. vulgaris*. Los resultados de estos ensayos brindan información de la ecotoxicidad del fungicida Kresoxim-metil sobre la calidad ambiental utilizando siete bioindicadores. En el presente proyecto se deduce que Kresoxim-metil es más perjudicial en los ambientes acuáticos que en los terrestres, estos resultados coinciden con estudios que afirman la toxicidad del fungicida sobre ambientes acuáticos que altera la fauna acuática que a su vez es consumida por humanos, exponiéndose a intoxicación. Señalan a kresoxim-metil como probable carcinógeno para los humanos.

Kresoxim-metil se encuentra vigente mediante la Resolución Directoral 0064-2014- MINAGRI-SENASA-DIAIA. Con el número registro 794-98-AG-SENASA. Los resultados obtenidos de este fungicida registrado debe ser reevaluado de acuerdo al surgimiento de nueva información técnico-

científica, sobre la eficacia, toxicidad o ecotoxicidad, que pueda implicar en algunos casos restricciones en su registro o en otros hasta su prohibición.

Por otro lado el uso de bioindicadores fue favorable ya que reduce considerablemente el número de ensayos de toxicidad en mamíferos y además se puede utilizar mayor cantidad de individuos a un menor costo.

VIII.CONCLUSIONES

Se observó que el Kresoxim-metil:

- Tuvo efecto sobre la mortandad de *A. franciscana* a las 24 y 48 h.
- Tuvo efecto a los 26 días sobre *C. auratus* en parámetros de: mortandad, días en que inicia la eclosión y longitud de peces sobrevivientes.
- Se vio inhibición del Kresoxim-metil, sobre *C. vulgaris*.
- No se observó efecto sobre la mortandad *C. externa*.
- Se observó inhibición en la formación de nitratos de las comunidades microbianas.
- Tuvo efecto sobre la mortandad de *D. magna* en las concentraciones más altas.
- Tuvo efecto sobre *D. magna* a los 21 días en los parámetros de: crías vivas, mortandad de padres y longitud de hembras.
- No se observó efecto sobre la mortandad de *P. reticulata*
- Es más perjudicial en los ambientes acuáticos que en los terrestres.

IX. RECOMENDACIONES

- Para comunidades microbianas es recomendable extender el ensayo a mayor cantidad de horas y también días. Además de emplear mayor concentración de Kresoxim-metil.
- En ensayos con *C. externa* sería necesario trabajar con todos los estadios del insecto y utilizar concentraciones elevadas de Kresoxim metil.
- Exponer a *P. reticulata* a mayor concentración de Kresoxim-metil y más horas de exposición.
- Realizar los bioensayos previamente descritos y aplicarlos en el campo.
- Ensayar en otros modelos biológicos como *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972 "trucha".

REFERENCIAS CITADAS

- Abril, A. (2003). ¿Son los microorganismos edáficos buenos indicadores de impacto productivo en los ecosistemas? *Ecología Australia*, 13:195-204.
- Albert, L. A. (2004). *Toxicología ambiental*. México: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, 21: 359-382.
- Allen, G.R. (1991). *Field guide to the freshwater fishes of New Guinea*. Publication, no. 9. 268 p. Christensen Research Institute, Madang, Papua New Guinea.
- Álvarez, M., Gimenez, I.T., Saitua, H., Enriz, R.D., & Giannini, F.A. (2012). Toxicidad en peces de herbicidas formulados con glifosato. *Acta toxicologica Argentina*, 20: 5-13.
- Alves - Respostas, C. (2015). *Dos organismos marinhos à azoxistrobina e à sua formulação comercial Ortiva®*. Coimbra : [s.n.], Dissertação de Mestrado em Ecologia.
- Anasac (2016) <http://www.anasac.cl/agropecuario/wp-content/uploads/HDS-KREXIM-50-SC.pdf>
- Anton, F.A., Ariz, M., & Alia, M. (1993). Ecotoxic effects of four herbicides (glyphosate, alachlor, chlortoluron and isoproturon) on the algae *Chlorella pyrenoidosa* chick. *Science of the total environment*, 134: 845-851.
- Araujo, L., Sánchez, G., Cubillán, D., Mercado, J., Troconis, M., & Prieto, A. (2012). Determinación de kresoxim-metil y trifloxystrobin en muestras de agua mediante microextracción con gota suspendida y cromatografía de gases-espectrometría de masa. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3: 97-106.

- Arencibia-Carballo, G., Tizol-Correa, R.A. & Rodríguez, R.O. (2010). Toxicidad de nauplios de *Artemia franciscana* a dos piretroides de uso comercial. Revista cubana de investigaciones pesqueras, 27: 47-53.
- Authman, M., Zaki, M., Khallaf, E. & Abbas, H. (2015). Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. Journal of Aquaculture Research & Development, 6: 1-13.
- Bajguz, A. (2011). Suppression of *Chlorella vulgaris* growth by cadmium, lead, and copper stress and its restoration by endogenous brassinolide. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 60: 406-416.
- Baltanás, R. (2009). Empleo de bioindicadores en estudios de evaluación de la calidad ambiental. Departamento de Zoología.
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., & Parr-Dobrzanski, B. (2002). The strobilurin fungicides. Pest management science, 58: 649-662.
- Bartual, J., & Berenguer, M. (1981). Pesticidas: clasificación y riesgos principales. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo, NTP 143.
- Baser, S., Erkoc, F., Selvi, M., & Kocak, O. (2003). Investigation of acute toxicity of permethrin on guppies *Poecilia reticulata* Chemosphere, 51: 469–474.
- BASF (2009). Kresoxim metil. <http://www.cdms.net/ldat/mp2QN010.pdf>.
- BASF(2017) http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y

[_nutricionales/view trademark?book id=1&composition tree id=29&trademark id=1077.](#)

- Brady, N., & Weil, R. (1996). Soils and chemical pollution. The Nature and Properties of Soils: Prentiss Hall Intnal. Capitulo18.
- Bretaud, S., Toutant, J., & Saglio, P. (2000). Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47: 117-124.
- Bueno, A.F., & Freitas, S. (2004). Effect of the insecticides abamectin and lufenuron on eggs and larvae of *Chrysoperla externa* under laboratory conditions. *BioControl*, 49: 277-283.
- Capeagro (2016) Hoja de seguridad fungicida epoxtrobin (Pyraclostrobin 13.3% + Epoxiconazole 5%).
<https://static1.squarespace.com/static/5754b4074c2f85bf961d54d2/t/57f6c2622994ca3f6430e654/1475789410723/EPOXTROBIN+HOJA+DE+SEGURIDAD.pdf>
- Capeagro (2017)
<https://static1.squarespace.com/static/5754b4074c2f85bf961d54d2/t/57f69b35e4fcb593852b90a0/1475779382861/KREMEX+500+WG++FICHA+TECNICA.pdf>
- Capó, M. (2002). Principios de Ecotoxicología: Diagnóstico, tratamiento y Gestión del Medio Ambiente. España, Tebar (Ed.).
- Carvalho, G. A., Carvalho, C. F., Souza, B., & Ulhoa, J. L. R. (2002). Selectividade de insecticidas a *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). *Neotropical Entomology*, 31: 615-621.

- Castillo, G. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas, Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Mexico. Ed. Mexico: IMT.
- Cui, F., Chai, T., Liu, X., & Wang, C. (2017). Toxicity of three strobilurins (kresoxim-methyl, pyraclostrobin and trifloxystrobin) on *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry. 36: 182-189.
- De Liñan, C. (2000). Vademécum de productos fitosanitarios y nutricionales, 16 ed., Madrid, Ed. Agrotécnicas.
- Elías-Fernández, G., Navarrete-Salgado, N.A., Fernández-Guzmán, J.L., & Contreras-Rivero, G. (2006). Crecimiento, abundancia y biomasa de *Poecilia reticulata* en el lago urbano del parque Tezozomoc de la Ciudad de México. Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente, 12: 155-159.
- FAO (2009). La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050 http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf
- FAO (2015). Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas. <http://www.fao.org/3/a-i3604s.pdf>.
- Fernández, F. (2000). Pesticides effects on *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). XXI International Congress of Entomology, Foz de Iguaçu, Brazil, pp. 20-26.
- Fiskejo, G. (1993). A 2-3 days plant test for toxicity assessment of various chemicals by measuring the mean root growth of a series of onions (*Allium cepa* L.). Environmental toxicology and Water Quality, 8: 461-470.

- Gallardo, J. (2004). Propiedades de los suelos forestales de montaña. Recursos Rurais. Serie cursos, 1: 39-43.
- Godoy, M.S., Carvalho, G.A., Moraes, J.C., Cosme, L.V., Goussain, M. M., Carvalho, C. F., & Morais, A. A. (2004), Seletividade de seis inseticidas utilizados en citros a pupas e adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). Neotropical Entomology, 33: 359-364.
- González, L., & Lozano, L. (2004). Bioindicadores como herramienta de evaluación de la calidad ambiental en la parte alta de la microcuenca Las Delicias. Umbral Científico, 5: 73-82.
- Granados, Y., Díaz, M., & Ronco, A. (2004). Bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna* en: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Castillo, G. (Ed.). México IMTA, Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Primera edición, pp. 52-63.
- Guilhermino, L., Diamantino, T., Silva, M., & Soares, A. (2000). Acute Toxicity Test with *Daphnia magna*: An Alternative to Mammals in the Prescreening of Chemical Toxicity? Ecotoxicology and Environmental Safety, 46: 357-362.
- Hellawell, J.M. (1986). Biological Indicators of Freshwater Pollution and environment Managment. Elsevier, New York.
- <https://static1.squarespace.com/static/5754b4074c2f85bf961d54d2/t/57f69b35e4fcb593852b90a0/1475779382861/KREMEX+500+WG++FICHA+TECNICA.pdf>
- Iannacone, J., & Alvariño, L. (1998). Ecotoxicidad aguda del zinc sobre el "guppy" *Poecilia reticulata*. Wiñay Yachay, 2: 67-74.

- Iannacone, J., & Gutierrez, A. (1999). Ecotoxicity of agrochemicals lindane and chlorpyrifos on the nematode *Panagrellus*, the microalgae *Chlorella* and the *Allium* test. *Agricultura Técnica (Chile)*, 59: 85-95.
- Iannacone, J., & Lamas, G. (2002). Efecto de dos extractos botánicos y de un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*, 65: 92-101.
- Iannacone, J., Alvaríño, L., Riestra, V., Ymaña, B., Argota, G., Fimia, R., & Castañeda, L. (2016). Toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre larvas del camarón salino *Artemia franciscana* (Crustacea: Artemiidae). *Revista de toxicología*, 33: 31-38.
- Iannacone, J., Onofre, R., & Huanqui, O. (2007). Efectos ecotoxicológicos del cartap sobre *Poecilia reticulata* “guppy” (poeciliidae) Y *Paracheiroidoninnesi* “neon tetra” (characidae) *Gayana*, 71: 170-177.
- Jaramillo, C., Beatriz, E., Martelo, I., & Duarte, E. (2013). toxicidad aguda de pesticidas organofosforados y análisis de la relación cuantitativa de estructura actividad (qsar). *Bioteecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 11: 76-84.
- Jonsson, C. M., Paraiba, L. C., & Mendoza, M. T. (2001) Bioconcentration of the insecticide pyridaphenthion by the green algae *Chlorella saccharophila*. *Chemosphere*, 43: 321–325.
- Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Silva, T.O., Anziliero, D., Martins, D., Lorenson, M., & Silva, L.B.D. (2008). Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. *Ciência Rural*, 38: 1050-1055.

- Li, T., Zhou, Q., Zhang, N., & Luo, Y. (2008). Toxic effects of chlorpromazine on *Carassius auratus* and its oxidative stress. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 43: 638-643.
- Lizarazo, M. (2005). Grupos funcionales de microorganismos del suelo: ciclos del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre. *Suelos Ecuatoriales*, 35: 59-65.
- López Geta, J., & Martínez-Navarrete, P. (1992). Las aguas subterráneas y los plaguicidas. Instituto Geológico y Minero de España. 149 pp.
- López, L. (2009). Determinación de la concentración letal media (50-48) del cloro en el efluente de una industria tipo mediante bioensayos de toxicidad acuática utilizando *Daphnia pulex*. Tesis de grado para optar al título de ingeniera ambiental y sanitaria. Universidad de la Salle programa de ingeniería ambiental y sanitaria. Bogotá D.C.
- Ma J, Lin F, Zhang R, Yu W & Lu N. (2004). Differential sensitivity of two green algae, *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris* to 14 pesticides adjuvants. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 58:61-67.
- MacNaughton S., Stephen J., Venosa A., Davis G., Chang Y., & White D. (1999). Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3566-3574.
- Malachowski, M.J. (1995). Health effects of toxic substances. government Institute Inc. Rockville, Maryland, U.S.A. Segunda edición.

- Martí, M.A.C. (2003). La ecotoxicología, una ciencia de hoy. *Medicina Balear*, 18: 101-104.
- Martínez, F. (2008). Ensayo de toxicidad aguda con cladóceros de la familia Daphnidae. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). pp 99-115.
- McGrath, M.T. (2004). What are Fungicides. The Plant Health Instructor
- Meffe, G., & Snelson, F. (1989). An ecological overview of poeciliid fishes. *Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae)*, pp 13-31.
- Mizell, R.F., & Schiffhauer, D.E. (1990). Effects of pesticides on pecan aphid predators *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae), *Hippodamia convergens*, *Cycloneda sanguinea* (L.), *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae), and *Aphelinus perpallidus* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Journal of economic Entomology*, 83: 1806-1812.
- Morales, Z.M. (1996). *Aquaguía*. Revista especializada en acuariofilia y otras mascotas. Naucalpan, México.
- Moreno, R. (2012). Desarrollo de Métodos Inmunoquímicos para el Análisis de los Fungicidas Estrobilurínicos Kresoxim-methyl y Trifloxystrobin. Tesis para optar al grado de Doctora en Química. Universidad de Valencia. Toxicidad aguda.
- Mukerjee, M. (1997). Trends in Animal Research. *Scientific American*, pp. 86- 93.

- Napan K., Llanos C., & Paredes C. (2010). Latipinna, p. toxicidad aguda de metomilo en *Poecilia latipinna* (Lesueur 1821) (Poeciliidae). *The Biologist* (Lima), 8: 21-28.
- Nieto, P., & García, D. (2010). Bacterias diazotroficas y solubilizadoras de fósforo aisladas de las especies forestales altoandinas colombianas *Weinmannia tomentosa* y *Escallonia myrtilloides*. *Rev. Intropica*. 5: 63 – 76.
- Norma Mexicana, NMX-AA-087-SCFI (2010). Análisis de agua-evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, Straus (Crustacea - Cladocera) - Método de prueba (Cancela a la NMX-AA-087-SCFI -1995) - Secretaría de Economía.
- Núñez, E.Z. (1988a). Chrysopidae (Neuroptera) del Perú y sus especies más comunes. *Revista Peruana de Entomología*, 31 : 69-75.
- Olazo, E.V.G. (1987). Lo neuropteros asociados con los cultivos cítricos de la provincia de Tucuman y descripción de una nueva especie de *Nomerobius* (Hemerobiidae) CIRPON, *Revista Investigación*, 5: 37-54.
- Peña, C.E., Cartes, D.E., & Ayala-Fierro, F. (2001). Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental - Toxicología Ambiental. The University of Arizona. 1-203.
- Pérez, Y., & Gilling, P. (2001). Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. *Anuario Toxicología*, 1:104-8.
- Persoone, G., Baudo, R., Cotman, M., Blaise, C., Thompson, K., Moreira-Santos, M., Vollat, B., Törökne, A., & Han, T. (2009). Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test – Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with

organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems 393: 1-29.

- Quantics Biostatistics. NOEC-LOEC (2017) <https://www.quantics.co.uk/blog/ecotoxicology-noec-and-loec/>
- Ramírez, J.A., & Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Archivos Prev Riesgos Laborales, 4:67-75.
- Riva Juan, M., López Ribas, D., & Fabián Mumbrú, L. (1998). Toxicidad de plaguicidas organofosforados en microalgas acuáticas.. Boletín Intexter (UPC), 113: 25-29.
- Romero, D., Martínez-López, E., Hernández-García, A., & García-Fernández, A.J. (2006). Valoración de las alteraciones provocadas por diferentes agentes tóxicos sobre *Daphnia magna* a través de un ensayo "on line". Revista de Toxicología, 23: 113-117.
- Royero, R. (1993) Peces ornamentales de Venezuela. Editorial Arte, S.A. 105 pp.
- Sáenz, M.E., & Marzio, W.D. (2009). Ecotoxicidad del herbicida Glifosato sobre cuatro algas clorófitas dulceacuícolas. Limnetica, 28: 149-158.
- SafeWork. (2011). Seguridad y Salud en la Agricultura. Oficina Internacional del trabajo. Ginebra.
- Samoiloff, M. (1990). The nematode toxicity assay using *Panagrellus redivivus*. Biology Assessment, 5: 309-318.
- Sancho, E., Villarreal, M.J., & Ferrando M.D. (2016). Assessment of chronic effects of tebuconazole on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna* after different exposure times. Ecotoxicology and Environmental Safety, 124:10-17.

- Sarikaya, R., Selvi, M., Koçak, O., & Erkoç, F. (2007). Investigation of acute toxicity of fenitrothion on guppies *Poecilia reticulata*. *Journal of Applied Toxicology*, 27: 318-321.
- Schumuck, R. (1997). Effects of Euparen® M on honey bees and selected beneficial arthropods-Information about the use of the pesticide during blossom and in IPM cultures. *Pflanzen-Nachrichten Bayer*, 50: 233-246.
- Shaw, J., Pfrender, M., Eads, B., Klaper, R., Callaghan, A., Sibly, R., Colson, I., Jansen, B., Gilbert, D., & Colbourne, J. (2008). *Daphnia* as an emerging model for toxicological genomics. *Advances in Experimental Biology*, 2: 1872-2423.
- Sorgeloos, P., Leger, P.H., & Taeckaer, W. (1991). State of the art in larviculture the fish and selffish. En: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., & Ollevier, F. (Eds.) *Larvi 9 1. Fish and Crustacean Larviculture symposium*, European Acuaculture society Special Publication 15. Gante, Bélgica.
- Truhaut, R. (1975). Ecotoxicology. A new branch of toxicology: A general survey of its aims methods and prospects. En: McIntyre, A.D., & C.F. Mills (eds.)- *Ecological Toxicology Research* : 3-23.
- Tyagi, V., Chopra, A., Durgapal, N., & Kumar, A. (2007). Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of Toxicity and Treatment efficacy of Municipal Sewage Treatment Plant. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 11: 61-67.
- Vanhaecke, P., Tackaert, W. & Sorgeloos, P. (1987). The biogeography of *Artemia*: an updated review. p. 129-155. En: *Artemia* research and its applications, 1: 129-155.
- Vargas, A., & Perea, Y. (2011). Determinación de la concentración letal media CL₅₀₋₄₈, de bario e hidróxido de sodio, mediante

bioensayos de toxicidad en un ecosistema, sobre *Daphnia magna*. Tesis de grado para optar el título de ingenieros ambientales y sanitarios Universidad de la Salle Facultad de Ingeniería Programa de Ingeniería Ambiental y Sanitaria Bogotá D.C.

- Vargas, L. (2009). Determinación de la concentración de inhibición media (Ce50) de cromo para la semilla *Lactuca sativa* mediante ensayos de toxicidad. Tesis de grado para optar el título de Ingeniera Ambiental y Sanitaria. Universidad de la Salle, Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Bogotá D.C.
- Vázquez, T., Maldonado, C., Marañón, S., & Espina, S. (2005). Estrés producido por concentraciones terapéuticas de sulfato de cobre en *Carassius auratus* (Pisces, Cyprinidae). *Hidrobiológica*, 15: 35-42.
- Wainwright, M., & Pugh, G.J.F. (1973). The effect of three fungicides on nitrification and ammonification in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 5: 577-584.
- Warming, T.P., Mulderij, G., & Christoffersen, K.S. (2009). Clonal variation in physiological responses of *Daphnia magna* to the strobilurin fungicide azoxystrobin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28: 374–380.
- Yeomans, J.C., & Bremner, J.M. (1985). Denitrification in soil: effects of insecticides and fungicides. *Soil Biology and Biochemistry*, 17: 453-456