

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**VALORACIÓN DEL RIESGO TOXICOLÓGICO SOBRE
LARVAS DE “ARTEMIA” DE DESINFECTANTES
UTILIZADOS EN TORRES DE REFRIGERACIÓN**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María del Carmen Bartolomé Camacho

Bajo la dirección del doctor
Sebastián Sánchez López

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2847-2



VALORACIÓN DEL RIESGO TOXICOLÓGICO SOBRE LARVAS DE *ARTEMIA* DE DESINFECTANTES UTILIZADOS EN TORRES DE REFRIGERACIÓN

M^a. Carmen Bartolomé Camacho

Madrid, Enero de 2005

TRABAJO QUE PRESENTA LA LICENCIADA DÑA. M^a CARMEN
BARTOLOMÉ CAMACHO PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR EN
VETERINARIA.

Fdo.: M^a Carmen Bartolomé Camacho
Madrid, Enero de 2005.

D. SEBASTIÁN SÁNCHEZ-FORTÚN RODRÍGUEZ, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA:

Que la memoria presentada por la Licenciada en Veterinaria Dña. M^a Carmen Bartolomé Camacho con el título: “*Valoración del Riesgo Toxicológico sobre Larvas de Artemia de Desinfectantes Utilizados en Torres de Refrigeración*” ha sido realizada bajo su dirección en las dependencias del Departamento de Toxicología y Farmacología de la UCM.

Madrid, Enero de 2005.

Fdo.: Sebastián Sánchez-Fortún Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Durante el periodo en el que he desarrollado esta Tesis Doctoral, han sido muchas las personas que de una u otra manera me han ayudado, a todas ellas quiero expresar mi más profunda y sincera gratitud, pero de una forma muy especial:

- Al Dr. Sebastián Sánchez Fortún, mi director de Tesis, porque sin él ésta nunca hubiera sido posible. Su orientación, su apoyo y optimismo han sido fundamentales para que este trabajo llegara a su fin.
- Al Dr. Agustín Sánchez López, por abrirme las puertas de la investigación, pero ante todo le doy las gracias por sus buenos consejos, críticas y su gran predisposición a solventar cualquier necesidad que apareciera en mi camino.
- A los miembros de Centro de Ciencias Medioambientales, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y muy especialmente al Dr. Eduardo de la Peña, quien me presentó al que sería mi futuro director y con quien siempre he sabido que podía contar para cualquier tipo de información; a D. Manuel Bénitez porque junto a él he conseguido sumergirme en el mundo de la Bioestadística, y sobre todo he de agradecerle su enorme paciencia hacia mi, su dedicación permanente y su saber escuchar, a D. Luis Cuadra por su inestimable colaboración y asesoramiento en las medidas de Bioacumulación.
- Y finalmente, pero no por ello menos importante a mi marido, a mis padres y a mi tía Nía por su confianza y apoyo incondicional en todas mis decisiones y porque siempre han estado junto a mi en esos buenos y malos momentos, que también los hay, por los que estos años han transcurrido; y a todos esos amigos incondicionales que no cito, pero que han estado pendientes de mi trabajo y de mi ánimo.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	8
1.1	RIESGO AMBIENTAL	9
1.1.1	Introducción	9
1.1.2	Análisis de riesgos	11
1.1.3	Manejo del riesgo	14
1.1.4	Comunicación de riesgos	14
1.2	BIOACUMULACIÓN	16
1.2.1	Introducción	16
1.2.2	Interpretación de los datos de bioconcentración	17
1.2.3	Factor de bioconcentración (BCF)	18
1.2.4	Coefficiente de partición octanol-agua (K_{ow})	21
1.2.5	Ausencia de datos y datos contradictorios	27
1.3	BIOCIDAS EN AMBIENTE DE ESTUARIO	28
1.3.1	Introducción	28
1.3.2	Riesgo toxicológico de los biocidas utilizados en la desinfección de torres de refrigeración en ambientes de estuario	30
1.4	ARTEMIA FRANCISCANA	38
1.4.1	Introducción	38
1.4.2	Artemia franciscana	39
1.5	BIOCIDAS	57
1.5.1	Introducción	57
1.5.2	Registro de biocidas	64
1.5.3	Exposición y valoración del riesgo	68
1.5.4	Desinfectantes para torres de refrigeración	69
1.5.5	La “Enfermedad de los legionarios”	74
1.5.6	Desinfectantes y riesgo ambiental	79
1.5.7	Riesgo ambiental de los productos utilizados para la desinfección de torres de refrigeración	87
2.	OBJETIVOS	113

3. MATERIAL Y MÉTODOS	115
3.1 COMPUESTOS QUÍMICOS EMPLEADOS	116
3.1.1 Biocidas ensayados	116
3.1.2 Agua marina sintética	116
3.2 OBTENCIÓN DE ARTEMIA FRANCISCANA	117
3.3 ESTUDIOS DE TOXICIDAD AGUDA: LETALIDAD	119
3.3.1 Distribución de larvas de Artemia	119
3.3.2 Exposición de larvas a los biocidas	119
3.4 ESTUDIOS DE TOXICIDAD SUBAGUDA: INHIBICIÓN DEL FOTOTACTISMO	122
3.4.1 Distribución de larvas de Artemia	122
3.4.2 Ensayos para determinación de la capacidad fototáctica	122
3.5 ESTUDIOS DE BIOACUMULACIÓN	126
3.5.1 Distribución de larvas de Artemia	126
3.5.2 Exposición de larvas de Artemia	126
3.5.3 Determinación de los niveles de acumulación	127
3.6 EXPRESIÓN DE RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	131
4. RESULTADOS	133
4.1 ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA	134
4.2 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL FOTOTACTISMO	152
4.2.1 Determinación del número de larvas de <i>Artemia</i> para los ensayos	152
4.2.2 Exposición a los diferentes biocidas ensayados	153
4.3 ENSAYOS DE BIOACUMULACIÓN	160
5. DISCUSIÓN	163
5.1 COMPARACIÓN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	164
5.1.1 Comparación entre métodos	166
5.1.2 Comparación entre estadios larvarios	167

5.1.3 Comparación entre compuestos	167
5.2 TOXICIDAD AGUDA	169
5.3 FOTOTACTISMO	174
5.4 BIOACUMULACIÓN	178
6. CONCLUSIONES	182
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	185

INTRODUCCIÓN

RIESGO AMBIENTAL

1.1.1 Introducción

En la evaluación toxicológica de un producto químico y las repercusiones de su utilización, se integran un conjunto de elementos de los que hay que destacar:

- el principio de precaución
- los requerimientos legislativos
- la sanidad ambiental

Cuando se disponen de elementos científicos fiables que demuestren que una sustancia puede tener efectos negativos sobre la salud humana o el medio ambiente, pero subsista una incertidumbre acerca de la naturaleza concreta o el alcance del posible daño, la toma de decisiones debe regirse por la cautela para evitar daños en esos dos ámbitos.

El desarrollo y aplicación del ***principio de precaución*** requiere identificar los efectos negativos provocados por el producto como paso previo a la evaluación del riesgo. El principio de precaución debe ser:

- proporcional al nivel de protección
- no discriminatorio en su aplicación
- consistente en medidas análogas a las aplicadas
- basado en el análisis de los beneficios potenciales y costes de intervención o no intervención
- sujeto a constante revisión
- distribuidor de responsabilidad lo que nos facilita la evidencia científica necesaria para una exhaustiva evaluación del riesgo

De esta manera, el término "peligroso" define la capacidad de una sustancia de producir efectos adversos en los organismos.

El término "riesgo" describe la probabilidad de que, en una situación dada, una sustancia peligrosa produzca un daño, siendo la "toxicidad" una medida del peligro inherente de la sustancia. **El riesgo**, por tanto, se puede definir como la probabilidad de que ocurra un efecto adverso a nivel individual o poblacional, por la exposición a una concentración dada o dosis de un agente peligroso y según la fórmula:

$$\text{RIESGO} = f(\text{EXPOSICIÓN}; \text{PELIGRO})$$

Para que exista un riesgo es necesario que se esté expuesto a un peligro y la magnitud del riesgo es una función de la peligrosidad de la sustancia y de la magnitud de la exposición. En consecuencia, se puede considerar que el riesgo es un concepto que involucra dos dimensiones: la posibilidad de que se genere un resultado negativo y la incertidumbre sobre la ocurrencia, duración y magnitud del resultado adverso.

Para conocer la magnitud de estos resultados adversos existe el procedimiento conocido como **"Evaluación de riesgos"**, que puede definirse como el proceso sistemático para describir y cuantificar los riesgos asociados a sustancias, procesos, acciones o eventos peligrosos (Covello 1993). Por otra parte, la NAS (Academia Nacional de Ciencias de los EEUU) define este proceso como "la caracterización de los efectos potencialmente adversos para la salud de los humanos por la exposición a los peligros ambientales".

Las metodologías empleadas en la evaluación de riesgos, son un elemento esencial para contar con criterios objetivos que permitan integrar una política ambiental nacional respecto de las sustancias químicas. Estas metodologías se basan en tres puntos:

- Análisis de riesgo
- Manejo del riesgo
- Comunicación de riesgos.

1.1.2 Análisis de riesgos

El modelo convencional para conducir evaluaciones de riesgo fue descrito por dos instituciones de los EEUU, la Academia Nacional de las Ciencias (NAS) y el Consejo Nacional de Investigación (NRC). Este modelo ha sido utilizado por la Agencia para la Protección Ambiental (EPA), con la finalidad de evaluar los riesgos de cáncer y otros problemas de salud que son resultado de la exposición a tóxicos medioambientales. El modelo consiste en cuatro fases:

- 1) *Identificación del peligro*: Se trata de la identificación de la capacidad inherente de un producto químico para causar uno o más efectos adversos, sin reparar en la probabilidad o severidad de tales efectos. Incluye la recolección y evaluación de datos sobre el tipo de daños a la salud o enfermedades que pueden producir una sustancia tóxica, y acerca de las condiciones de exposición en que se manifiesta el daño o la enfermedad. Involucra la caracterización del comportamiento de una sustancia tóxica específica dentro del cuerpo y sus interacciones con órganos, célula o partes de ellas. La información necesaria para conducir esta etapa se obtiene a partir de: Estudios realizados en animales de laboratorio, investigaciones epidemiológicas en poblaciones humanas e informes de casos humanos expuestos.
- 2) *Caracterización del peligro*: evaluación de la relación dosis-respuesta para varias de las formas de toxicidad que muestra una determinada sustancia. Para realizar esta estimación se utilizan distintos modelos dosis-respuesta los cuales se han desarrollado preferentemente para sustancias con efectos carcinogénicos pero también para las que producen daño sistémico de otra índole. A pesar de que se han desarrollado estudios epidemiológicos, hay pocos datos cuantitativos confiables sobre exposición; en la mayoría de los casos las relaciones dosis-respuesta deben ser estimadas a partir de estudios conducidos en animales de laboratorio, lo cual conlleva tres problemas importantes: Los animales usualmente suelen estar expuestos a dosis elevadas, y los efectos a dosis bajas deben predecirse con base en

algunos supuestos teóricos acerca de la forma de las relaciones dosis-respuesta. Los animales y los humanos a menudo difieren en susceptibilidad, al menos las diferencias de talla y metabolismo. La población humana es muy heterogénea, de tal suerte que algunos individuos pueden ser más susceptibles que otros.

Convencionalmente, los toxicólogos asumen dos supuestos generales acerca de las relaciones dosis-respuesta a dosis bajas. Para efectos que involucran alteraciones del material genético, existen razones teóricas para creer que los efectos ocurren a dosis muy bajas, por lo que existe una relación lineal entre la dosis y la respuesta. Para los otros efectos biológicos no carcinogénicos, usualmente se asume que hay un nivel umbral, lo cual significa que puede existir una determinada dosis a la cual no se observa ningún efecto, debido a la intervención de los mecanismos de homeostasis.

3) *Evaluación de la exposición*: Esta etapa incluye la estimación de la cantidad de personas expuestas a determinado agente ambiental, así como la magnitud y duración de la exposición. Se ha considerado que bajo determinadas circunstancias es relativamente sencillo medir la exposición humana a partir de las mediciones de los agentes ambientales peligrosos o utilizando monitores personales. En la mayoría de los casos es necesario conocer con detalle los factores que controlan la exposición, entre otros:

- Los factores que controlan la producción del agente en cuestión y su ingreso en el ambiente.
- La localización y cantidad del agente que fue emitido o descargado.
- Los factores que controlan el destino ambiental del contaminante, incluyendo su transporte, persistencia y degradación.
- Los factores que determinan el contacto de los humanos con el agente en cuestión, considerando el tamaño y la distribución de las poblaciones humanas vulnerables
- Los mecanismos de incorporación de la sustancia en los humanos.

La EPA define como exposición "el contacto con un agente químico o físico". Esto implica que cuando realizamos una evaluación de la exposición humana a contaminantes ambientales, deberemos transformar las concentraciones ambientales en estimaciones cuantitativas de la cantidad del contaminante que pasa a través de cualquiera de las vías de acceso al interior del cuerpo de individuos dentro de una población específica. La cantidad de la sustancia química que atraviesa diariamente estas barreras proporciona la base para evaluar el detrimento en la salud de la población. Este proceso de estimar exposición a partir de datos limitados y de extrapolarlos a las poblaciones grandes y diversas requiere supuestos, inferencias y simplificaciones. Una pregunta aún no del todo contestada es si estas estimaciones de exposición reflejan las exposiciones reales. Existen muchas incertidumbres y algunas cuantificaciones desafiantes. Una evaluación de exposición puede ser muy valiosa si proporciona una visión comprensiva de todas las rutas de exposición y si identifica las principales fuentes de incertidumbre y los impactos que tendrían en el proceso para la toma de decisiones. Se han propuesto modelos de exposición que toman diferentes rutas y su vínculo con la exposición humana es a través de la ingesta y las concentraciones en aire, agua, y suelo del o los contaminantes de interés. Esta aproximación al uso de modelos convierte las concentraciones ambientales en exposición humana usando factores de rutas de exposición ("Pathway exposure factors" o PEFs); estos son expresiones numéricas que incorporan información de fisiología y conducta humana junto con modelos de compartimento ambiental en los cuales las unidades de concentración son transformadas a mediciones de la exposición diaria para rutas específicas de inhalación, ingestión o contacto dérmico.

4) *Caracterización del riesgo*: Es la estimación semicuantitativa de la probabilidad de que pueda ocurrir un efecto adverso, y la intensidad y duración en una población dada bajo unas condiciones de exposición definidas. En esta etapa se analiza y discute la información obtenida y se prepara su presentación en forma útil y comprensible. Para ello, no sólo se deben considerar las estimaciones de riesgo asumidas para un escenario de exposición dado, si no que deben especificar las limitaciones que conllevan las suposiciones

asumidas, y las incertidumbres cuantitativas y cualitativas identificadas a lo largo de todo el proceso.

1.1.3 Manejo del riesgo

Una vez caracterizado el riesgo se debe diseñar y poner en práctica una variedad de medidas que lo prevengan o disminuyan. Tales medidas incluyen:

- Unificación de los criterios de clasificación, envasado y etiquetado de las sustancias y preparados químicos.
- El establecimiento de límites máximos permisibles y de normas de manejo, restricciones o prohibiciones.
- Distribución de información y capacitación a los trabajadores que tienen relación con la sustancia tóxica.
- Instrumentos económicos que alienten las buenas prácticas de operación y desalienten aquellas que aumentan el factor de riesgo.
- Códigos de conducta voluntarios que promuevan las buenas prácticas del manejo.
- Convenios binacionales o multinacionales.
- Coordinación y concertación intersectorial en el diseño de programas de prevención.
- Disminución de riesgos ambientales.

1.1.4 Comunicación de riesgos

Se trata de un proceso de interacción e intercambio de información (datos, opiniones y sensaciones) entre individuos, grupos o instituciones en lo relativo a amenazas para la salud, la seguridad o el ambiente, con el propósito de que la comunidad conozca los riesgos a los que está expuesta y participe en su mitigación. Idealmente este proceso es intencional y permanente y sus principales metas son: incrementar el entendimiento y el nivel de conocimientos, aumentar la credibilidad y confianza, y resolver conflictos .

Para alcanzar estas metas es recomendable tener presente los siguientes conceptos:

- El mensaje: el principal reto es dar una información sin demasiados detalles técnicos y datos, que sea corto y claro, tomando muy en cuenta qué es imprescindible para evitar las confusiones y los malos entendidos; la fuente debe ser de alta credibilidad y lo más natural posible, ayudando a aclarar el problema y no a minimizarlo y también es importante repetir los mensajes clave.
- El mensajero: es de vital importancia seleccionar el adecuado para alcanzar la meta de comunicación de riesgos; debe presentar carisma, dedicación, compromiso, honestidad, apertura, competencia y experiencia.
- El medio: existe una amplia gama de posibilidades para presentar la información, desde hojas de datos a sesiones públicas o reuniones de información.

1.2 BIOACUMULACION

1.2.1 Introducción

Bioacumulación es una de las propiedades intrínsecas importantes de las sustancias químicas que determinan el riesgo medioambiental potencial. La bioacumulación de una sustancia en un organismo no es un riesgo en sí mismo, pero la bioconcentración y bioacumulación producirán una carga corporal que puede o no llevar a un tóxico para provocar sus efectos. En el sistema de clasificación de riesgo integrado y armonizado para la salud humana medioambiental de sustancias químicas, el término *potencial para el bioacumulación* adquiere gran importancia.

Sin embargo, cabe la distinción entre los términos bioconcentración y bioacumulación. Así, **bioconcentración** se define como el resultado neto de captación, transformación y eliminación de una sustancia en un organismo debido a la exposición producida, y se considera que la **bioacumulación** incluye todas las rutas de exposición, es decir, aire, agua, sedimento/suelo y alimentos). Por otra parte, la **biomagnificación** se define como la acumulación y traslado de sustancias vía cadena alimenticia, produciendo un aumento de concentraciones tisulares en los organismos, a niveles superiores de la cadena trófica. Para la mayoría de las sustancias químicas captadas en los ecosistemas, se cree que la vía acuática es la ruta predominante, y solamente en los casos de sustancias muy hidrófobas la ruta alimenticia predomina sobre las demás. Dejando aparte este último punto, los criterios de armonización para obtener el **factor de bioconcentración** (BCF) han asumido el coeficiente de distribución octanol/agua como medida del potencial de bioacumulación.

La clasificación de una sustancia química está principalmente basada en sus propiedades intrínsecas. Sin embargo, el grado de bioconcentración también depende de otros factores como el grado de biodisponibilidad, la fisiología de los organismos utilizados en las experiencias, el mantenimiento de concentración en exposición constante, la duración de la exposición, el metabolismo corporal del organismo designado y el fenómeno de excreción. La

interpretación del potencial de bioconcentración, llevado a un contexto de clasificación química, requiere una evaluación de las propiedades intrínsecas de la sustancia, así como de las condiciones experimentales por las que el BCF ha sido determinado.

Los datos de las propiedades intrínsecas de bioconcentración de una sustancia pueden estar disponibles bien por la existencia de experiencias normalizadas, o bien pueden estimarse de la propia estructura de la molécula. La interpretación de tales datos de bioconcentración para la clasificación requiere a menudo una evaluación detallada de los datos obtenidos mediante ensayos. En el orden a facilitar esta evaluación, la metodología disponible y los factores que influyen en el potencial de bioconcentración son las herramientas disponibles para su obtención.

1.2.2 Interpretación de los Datos de Bioconcentración

La clasificación de riesgo medioambiental de una sustancia química está normalmente basada en los datos existentes acerca de sus propiedades medioambientales, y sólo se hacen necesarios datos adicionales de ensayos cuando se hace necesario de cara a conseguir una mejor clasificación. A menudo un amplio rango de datos de ensayos se encuentra disponible en la literatura y por tanto sólo resulta necesario establecer una correcta interpretación de éstos para encuadrar a la sustancia química dentro de un contexto de clasificación del riesgo.

La bioconcentración de una sustancia orgánica puede ser obtenida mediante ensayos experimentales, en los que el factor de bioconcentración (BCF) es moderado, estableciendo una relación entre la concentración de la sustancia en el organismo y en el medio acuático. Así, podrá ser estimado el rango de captación constante (k_1) y el rango de eliminación constante (k_2) (OCDE 305, 1996). En general, el potencial de una sustancia orgánica para acumularse en los organismos viene determinada por su lipofilia, cuya medida ampliamente aceptada es el coeficiente de distribución octanol-agua (K_{ow}) para sustancias no iónicas y lipofílicas, mientras que para sustancias que sufren

procesos metabólicos o de biotransformación, la medida hará referencia a una relación con el BCF. Es por ello por lo que la K_{ow} es utilizada a menudo para estimaciones de bioconcentración mediante relación empírica entre esta y la BCF, estando disponibles las metodologías de estimación para la mayoría de las sustancias orgánicas, proporcionando los datos obtenidos de forma experimental, las estimaciones por determinación experimental de la K_{ow} , así como la estimación de dicho valor por cuantificación de la relación estructura-actividad (QSARs).

1.2.3 Factor de Bioconcentración (BCF)

El BCF es definido como la proporción entre la concentración de una sustancia presente en la biota y la concentración de dicha sustancia en el medio circundante, bajo características estacionarias. Aunque dicho parámetro puede obtenerse experimentalmente bajo condiciones sostenidas, en base a concentraciones moderadas presentes, también puede calcularse como la proporción entre la captación primaria y la constante del rango de eliminación, metodología que no requeriría de la existencia de equilibrio como condición para su obtención. Así, se han estandarizado diferentes experiencias para la determinación experimental del parámetro de bioconcentración en peces por parte de la OCDE (OCDE 305, 1996). Pese a ello, siguen siendo preferibles los datos experimentales, obtenidos directamente del tóxico, para la obtención de BCF y una posterior clasificación de las sustancias.

Se entiende como datos sobre las propias sustancias aquellos obtenidos bajo criterios de validez metodológica, y que por tanto cumplen con los criterios exigidos para la realización de dichas pruebas. Así, cobra importancia el mantenimiento de concentración y exposiciones constantes, la vigilancia de la concentración de oxígeno y de las variaciones de temperatura, etc. Con todo ello, la metodología experimental utilizada será considerada como válida si cumple con las consideraciones de buenas prácticas de laboratorio (GLPs) específicas para ella, permitiendo así la posterior comprobación de cumplimiento de los criterios de validez. En suma, es imprescindible utilizar una

metodología analítica apropiada para la cuantificación de la sustancia y sus metabolitos tóxicos, tanto en el medio acuático como en los tejidos orgánicos.

Es bastante común que, cuando el BCF es valorado sin tener presentes los distintos factores de calidad metodológicos, se obtengan valores falsos y extremadamente bajos, por ejemplo cuando después de la aplicación de concentraciones relativamente bajas de la sustancia a estudiar, los periodos de exposición han sido tan bajos que no ha sido posible alcanzar las condiciones mínimas de equilibrio. Por consiguiente, este parámetro debe ser evaluado cuidadosamente antes de proceder al estudio (OCDE 306, 1996). Sin embargo, sí pueden aplicarse criterios de extrapolación cuando no existen valores determinados para alguna especie piscícola, y así se han aplicado dichos criterios extrapolando valores obtenidos en moluscos para su aplicación en peces. Sin embargo, la experiencia indica ciertas contradicciones cuando se aplicó desde valores obtenidos para microalgas.

Para sustancias lipofílicas, por ejemplo con K_{ow} superior a 6, el valor BCF tiende a disminuir conforme el grado de K_{ow} crece. La explicación conceptual de esta no linealidad en cuanto a los resultados puede ser explicada en términos cinéticos, por una reducción de la absorción a través de membrana o por una reducción de la solubilidad de la sustancia, produciéndose así fenómenos de biodisponibilidad y captación bajos. Junto a éstos, también intervendrán otros factores, como la aparición de artefactos experimentales que abarcan desde la falta de equilibrio, la biodisponibilidad reducida por secuestro de materia orgánica en la fase líquida, o los errores analíticos. Es por ello que los valores experimentales de BCF para sustancias lipofílicas tendrán un nivel de incertidumbre muy superior a los obtenidos para sustancias menos lipofílicas.

1.2.3.1 Relación entre el valor BCF y las especies utilizadas

Todos los valores de BCF utilizados para la clasificación de las diferentes sustancias están basados en el proceso de bioacumulación sobre estructuras corporales completas, y por tanto el tamaño de la especie utilizada

para los ensayos adquiere gran importancia, fundamentalmente por el tiempo necesario para una correcta captación del tóxico y para la obtención de un buen equilibrio. En general se entiende que cuanto mayor sea el tamaño de la especie utilizada, mayor debe ser el periodo de exposición que permita un grado cinético de captación constante y adecuado. Además, en muchas ocasiones es posible que existan valores de BCF derivados de diferentes especies acuáticas, e incluso valores específicos de diferentes órganos de dichas especies, por lo que se requiere un criterio común a la hora de normalizar dichas experiencias. Es por ello por lo que se ha establecido una relación entre la concentración lipídica en los individuos y el valor de BCF observado, y por tanto, al comparar los valores de BCF entre especies diferentes, o al relacionar dichos valores entre órganos y cuerpos completos, la expresión de resultados se realiza como valor de BCF en un volumen lipídico común. Si, por ejemplo, los datos de BCF en órganos y cuerpo completos aparecen en la literatura, el primer paso sería calcular el BCF sobre el porcentaje lipídico del volumen relativo de grasa en el organismo u órgano, seguido de la obtención del valor de BCF para un organismo acuático típico, previamente asumido un volumen lipídico predefinido y común. A este respecto, valores predefinidos del 5 % son asumidos de forma mayoritaria por los distintos autores (Pedersen y col. 1995).

1.2.3.2 Utilización de sustancias marcadas con radioactividad

La aplicación de sustancias problema marcadas con radioisótopos puede facilitar enormemente el análisis de agua y las muestras orgánicas, siempre y cuando se combine con una metodología analítica adecuada. Para ello, el marcaje se practica en la zona molecular más estable, asegurando así que el valor de BCF incluya tanto a la parte no metabolizada como a la parte correspondiente a los metabolitos. Para algunas sustancias, los metabolitos llegan a ser más tóxicos que el compuesto parental y alcanzan un potencial de bioconcentración más alto, y por tanto la valoración tanto de la propia sustancia como de sus metabolitos adquiere gran importancia para la interpretación del riesgo acuático, incluso del potencial de bioconcentración, de todos ellos.

Experiencias practicadas en peces, utilizando sustancias marcadas, han demostrado un alto grado de concentración de éstas en la vesícula de los organismos, interpretando este hecho como parte de la biotransformación de las sustancias a nivel hepáticos, y como consecuencia de la excreción de los diferentes metabolitos a la vesícula (Comotto y col., 1979; Wakabayashi y col., 1987; Goodrich y col., 1991; Toshima y col., 1992). Cuando los peces no consumían alimento, el contenido vesicular no era vaciado al intestino y por tanto los distintos metabolitos se acumulaban en esta estructura, e incluso se producía un proceso de reflujo. Por tanto, el régimen alimenticio de los individuos resulta comportarse como un factor de variabilidad en cuanto a la obtención del BCF.

1.2.4 Coeficiente de Partición Octanol-Agua (K_{ow})

Es el valor recomendado para la determinación experimental de las diferentes sustancias orgánicas, si bien cuando no existen datos experimentales del tóxico puede calcularse a partir de la cuantificación mediante la relación estructura-actividad (QSARs), siempre y cuando sea posible caracterizar correctamente al tipo de sustancia química. Para sustancias afines a ácidos y bases fuertes o sustancias tensioactivas, la estimación del valor de K_{ow} mediante QSARs debe estar basado en los valores n-octanol individuales y debe proporcionarse la solubilidad en agua. La concentración de sustancias ionizables deben tomarse en su forma no ionizable únicamente bajo los conceptos de pH debajo del pK para ácido libre, y por encima de pK para base libre.

1.2.4.1 Determinación experimental de K_{ow}

Para la determinación experimental del valor de K_{ow} se han descrito diferentes metodologías, pero la mayoría de los Organismos oficiales (EPA, ASTM, ...) describen como pautas normales la utilización de la metodología de agitación y la obtención mediante HPLC, si bien la OCDE mantiene en fase de prueba la utilización de una metodología pH-métrica.

La metodología de agitación es recomendada cuando se practican valoraciones de K_{ow} en un rango de $[(-2) - 4]$, aplicándose únicamente para sustancias parentales solubles en agua y n-octanol. Sin embargo, para sustancias que pasan muy lentamente desde elementos lipofílicos para su disolución en agua se aplica una metodología de agitación lenta, dando así resultados más fiables. Además esta metodología permite superar ciertas dificultades intrínsecas de la propia metodología, como la formación de microconjugados durante la agitación, donde agua, n-octanol y sustancia son equilibrados en un reactor específico para tal efecto. La OCDE mantiene a prueba dicha metodología, ya que ha demostrado gran precisión para la obtención de la K_{ow} hasta un rango de 8.2.

La aplicación de columnas analíticas mediante HPLC está recomendado para valoraciones de la K_{ow} entre 0 y 6. Es una metodología menos sensible a la presencia de impurezas en la sustancia parental, por lo que la EPA recomienda la aplicación de una metodología similar pero más precisa (USEPA, 1985b).

En ciertas condiciones, la determinación experimental de la K_{ow} no es posible, por ejemplo cuando se estudian sustancias muy solubles en agua, sustancia lipofílicas o surfactantes. Es por ello por lo que, en estos casos, es admitido el valor de K_{ow} obtenido de forma indirecta mediante la aplicación de QSARs.

1.2.4.2 Utilización de QSARs para la determinación de la K_{ow}

Cuando se utilizan QSARs para la determinación de la K_{ow} , el método de estimación utilizado adquiere una importancia vital para su validación. Numerosos QSARs han sido desarrollados para esta estimación, algunos de ellos disponibles bajo formato de software para PC, siendo utilizados habitualmente para la valoración del riesgo sin utilizar datos experimentales. Tres de ellos (CLOGP, LOGKOW y AUTOLOGP) están basados en la recopilación de datos obtenidos mediante contribuciones experimentales del grupo de trabajo que los han realizado, mientras que un cuarto (SPARC) está

basado en la forma algorítmica de la estructura química fundamental. El método de estimación SPARC sólo puede ser empleado de forma general para compuestos inorgánicos y organometálicos, mientras que son precisas metodologías especiales para estimar la K_{ow} en compuestos tensioactivos, quelantes y mezclas de sustancias. La EPA recomendó la utilización del método CLOGP, mientras que Pedersen y col. (1995) se decantaron por los métodos CLOGP y LOGKOW para propósitos de clasificación debido a su fiabilidad, disponibilidad comercial y conveniencia de uso. En la Tabla 1.2.4.2-1 se incluyen las pautas de recomendación de los diferentes métodos para la clasificación de las sustancias.

Tabla 1.2.4.2-1. Métodos de determinación de la K_{ow} mediante la utilización de QSARs.

MODELO	RANGO log K_{ow}	UTILIDAD
CLOGP	<0 - 9	Calcula K_{ow} de compuestos orgánicos que contengan C, H, N, O, P, S y halogenados
LOGKOW	-4 - 8	Calcula K_{ow} de compuestos orgánicos que contengan C, H, N, O, P, Si, Se, Li, Na, K, Hg y halogenados. También valido para algunos surfactantes y ciertas sustancias disociadas.
AUTOLOGP	>5	Calcula K_{ow} de compuestos orgánicos que contengan C, H, N, O, P, S y halogenados. Actualmente está en proceso de ampliar su aplicabilidad.
SPARC	>5	Modelo mecanístico basado en principios termodinámicos.

1.2.4.3 Categorías Químicas que Requieren Atención Especial para la Obtención de la K_{ow}

Ciertas propiedades físico-químicas de determinadas sustancias pueden llegar a provocar que la determinación del BCF sea difícil y complicada. Generalmente se produce este hecho cuando su proceso de bioconcentración se produce de una manera poco consistente, si bien algunas se presentan complicadas de ensayar en ecosistemas acuáticos, de acuerdo con la metodología desarrollada para ellas (USEPA, 1996).

Por esta razón, la OCDE está finalizando un documento técnico que servirá de guía para la realización de ensayos en medios acuáticos de sustancias difíciles, en el que se incluyen los estudios de bioconcentración, desarrollando los pasos necesarios para asegurar conclusiones válidas en las pruebas con estas sustancias. De todas formas, todavía existirían problemas para los ensayos con sustancias con características de pobre solubilidad, volátiles, o sujetas a degradaciones rápidas debido a procesos como fototransformaciones, hidrólisis, oxidación o degradación biótica.

Para que los compuestos orgánicos se bioconcentren, las sustancias deben ser solubles en lípidos, deben estar presentes en el agua y deben poseer la suficiente biodisponibilidad como para que se penetre en el organismo, y por tanto ciertas propiedades de estos compuestos que alteren dicha biodisponibilidad cambiarán drásticamente la bioconcentración real. Por ejemplo, sustancias rápidamente biodegradables sólo estarán presentes en el compartimento acuático en periodos cortos de tiempo, o de igual manera sustancias volátiles o que padezcan procesos de hidrólisis quedarán reducidas tanto en su concentración como en el tiempo y por tanto menos disponibles para el proceso de bioconcentración.

Un parámetro importante, que influye en los procesos de concentración en exposiciones reales es la adsorción, relacionado con el tamaño de partícula y la superficie expuesta. Hay varias sustancias que han demostrado un proceso de rápida transformación en los organismos, y sin embargo presentaban

valores de BCF más bajos de los esperados. Así, sustancias que forman complejos o agregados poseían una menor magnitud de bioconcentración, proceso que se demostró estar directamente relacionado con sus propiedades físico-químicas. Este hecho también ocurría con sustancias que poseían características hidrófobas y formaban complejos como consecuencia de la utilización de dispersantes, lo que llevó a la conclusión de que la utilización de estos dispersantes en pruebas de bioacumulación falseaba los datos obtenidos.

Todos estos hechos han llevado a la conclusión que para estos tipos de sustancias, la valoración de BCF y K_{ow} , basada en la materia parental, es un requisito previo para la determinación del potencial de bioconcentración, y que la documentación apropiada acerca de la concentración aplicada en las pruebas también será un requisito previo para la aprobación del valor de BCF obtenido.

1.2.4.4. Sustancias de baja solubilidad y complejas

Las sustancias de baja solubilidad deben tener una consideración especial, ya que con frecuencia dicha solubilidad se encuentra por debajo de los límites metodológicos y crea problemas de interpretación del potencial de bioconcentración. Por tanto, la valoración estará basada en la determinación experimental de la K_{ow} , o mediante estimaciones de QSARs para K_{ow} .

Cuando una sustancia compleja no es totalmente soluble en agua, resulta imprescindible identificar cada uno de los componentes antes de examinar las posibilidades de determinación de su potencial de bioacumulación, principalmente mediante el uso de la información disponible sobre cada uno de ellos. Así, cuando el grupo de componentes potencialmente bioacumulables constituyen una parte significativa del complejo, por ejemplo más del 20 % de total, o incluso menos cuando se trata de compuestos muy peligrosos, la sustancia compleja deberá ser considerada como bioacumulable.

1.2.4.5. Sustancias de alto peso molecular

Con carácter general se admite que ciertas dimensiones moleculares disminuyen ostensiblemente el proceso de bioconcentración. Este hecho es posible debido a la dificultad que poseerán dichas moléculas para atravesar las membranas. Debido a esta característica, se ha propuesto un valor límite de 700 para la aplicación de la técnica. Sin embargo, dicha limitación ha estado sujeta a controversia, y otros organismos proponen un límite alternativo de 1000 para hacerlo compatible con los efectos acuáticos indirectos. Además de todo ello, se deben tener en cuenta los procesos de bioconcentración de los posibles metabolitos o productos de degradación medioambiental de estas moléculas grandes.

1.2.4.6. Sustancias tensioactivas

Las sustancias tensioactivas están compuestas por una parte lipofílica, generalmente una cadena alquílica, y una parte hidrofílica o grupo polar. Están incluidas dentro de las categorías de compuestos aniónicos y catiónicos, y según las características del grupo principal, no aniónicos y anfóteros. Debido a la gran variedad de ellos, los surfactantes son, desde el punto de vista estructural, un grupo diverso de compuestos que se caracterizan por su capacidad de modificar la superficie acuática. Por tanto, el potencial de bioacumulación debe ser considerado para cada una de las subcategorías y no en su conjunto. Estas sustancias son capaces de formar emulsiones, en las que la biodisponibilidad resulta difícil de determinar, ya que las mezclas pueden producir cambios en el fragmento biodisponible, por lo que la interpretación de los valores de bioacumulación resulta problemático.

De forma general, los valores de BCF para surfactantes suelen aumentar conforme la cadena alquílica posee una longitud mayor, y es dependiente de la posición de unión de las diferentes fracciones estructurales.

El coeficiente de distribución octanol-agua no puede determinarse para surfactantes mediante la técnica de agitación, debido a la formación de

emulsiones. En definitiva, las moléculas del agente surfactante existirán casi exclusivamente en la fase acuosa en forma de iones, y tendrán que unirse para ser disueltos en octanol. Por ello, la determinación experimental de la K_{ow} no caracteriza la partición iónica de los surfactantes, y se ha demostrado como la bioconcentración de surfactantes aniónicos y no iónicos aumenta cuanto más creciente sea su carácter lipofílico. Se demostró como para ciertos surfactantes la estimación de la K_{ow} mediante LOGKOW era suficiente para representar su potencial de bioacumulación, mientras que para otros era necesario aplicar diferentes metodologías. Estos resultados permitieron establecer diferencias con respecto a la categoría y tipo específico de surfactante, y por tanto su clasificación basada en la K_{ow} debe ser tomada con cautela.

1.2.5. Ausencia de Datos y Datos Contradictorios

En aquellas situaciones en las que se poseen múltiples datos de BCF para una misma sustancia, la posibilidad de que aparezcan resultados contradictorios es muy elevada. En general, es debido a la realización de ensayos a tiempos distintos, por lo que deben ser considerados como resultados *de acercamiento* que deben ser evaluados individualmente. Esto implica la elección de aquellos que posean una mayor documentación y estén realizados con mejores criterios de calidad. Si a pesar de ello las diferencias todavía son importantes, deberá tomarse el valor superior como base para su clasificación. Cuando existen conjuntos de datos en los que se poseen 4 o más valores para la misma especie y fase de vida, puede aplicarse la media geométrica de ellos para establecer el BCF como valor representativo de esa especie.

Si por el contrario no se dispusiera de valores experimentales de BCF, o no estuvieran disponibles datos acerca de la K_{ow} , el potencial de bioacumulación en ambientes acuáticos puede ser evaluado mediante el juicio de un especialista. Las bases de esta aproximación se sustentan en la comparación de la estructura molecular de la sustancia problema con la de otras sustancias similares, en las que están disponibles datos experimentales y de la K_{ow} .

1.3 LOS BIOCIDAS EN AMBIENTES DE ESTUARIO

1.3.1 Introducción

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

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

El ambiente estuarino figura entre los más productivos en la tierra, creando cada año más materia orgánica que áreas comparables en tamaño (bosques, prados o tierras agrícolas). Dentro y fuera de los estuarios se encuentran una gran variedad de hábitats que incluyen; aguas poco profundas, pantanos de agua dulce y agua salada, playas arenosas, llanos de arena y lodo, costas rocosas, arrecifes de ostras, bosques de manglares, deltas de ríos, lechos de algas marinas y pantanos boscosos.

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

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

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

También deben ser considerados los beneficios económicos de los estuarios. Las aguas costeras de los estuarios sostienen infraestructuras públicas, que sirven de puertos y muelles para la transportación y embarques. Se han hecho algunos intentos para medir ciertos aspectos de la actividad económica que depende de los estuarios de América y otras aguas costeras, y así, los estuarios proveen hábitat para más del 75% de los peces comerciales y el 80-90% de los recursos de pesca recreacional.

En resumen, los estuarios proveen una variedad de recursos, beneficios y servicios. Algunos de ellos se pueden medir en términos económicos, pero otros no. Los estuarios son recursos naturales que no se pueden reponer, y por

tanto deben ser manejados cuidadosamente para el beneficio mutuo, de los que los disfrutan y de los que dependen de ellos. La presión que se ejerce sobre ellos, y muy especialmente la contaminación hídrica, está perturbando el balance natural de los ecosistemas estuarinos y amenazando su integridad, ya que el resultado de dicha presión tiene como resultado tanto la existencia de aguas poco potables como la aparición de brotes de algas dañinas, elevada mortandad de peces y vida silvestre, pérdida de hábitats, etc., que crean graves problemas tanto para la salud humana como para los recursos naturales (Environmental Health Center, 1998).

1.3.2 Riesgo toxicológico de los biocidas utilizados en la desinfección de torres de refrigeración en ambientes de estuario

1.3.2.1 Traspaso de los biocidas al ambiente de estuario

El agua utilizada en los sistemas de refrigeración se comporta como un elemento ideal para el crecimiento biológico de algas, hongos y bacterias, debido a que en el interior de estos sistemas se mantiene un ambiente caluroso y húmedo, muy favorable para estos organismos. Así, este caldo de cultivo favorece la formación y acumulación de limos que llegan a provocar la obstrucción de los conductos en estos sistemas de refrigeración, aumentando el coste de bombeo e inhibiendo la efectividad en la transferencia de calor.

Para evitar estas deficiencias, el uso periódico de biocidas se practica de forma rutinaria para un efectivo control del crecimiento y desarrollo de estos organismos. La vida efectiva de estos biocidas dependerá de múltiples factores, que van desde aspectos medioambientales hasta las características físico-químicas propias del biocida e incluso la concentración utilizada. El riesgo ecotoxicológico en zonas de estuario surge en aquellos lugares donde los sistemas de refrigeración descargan directamente el agua residual a estos ambientes acuáticos, produciéndose un riesgo potencial para las cantidades residuales de biocidas y sus productos de degradación-transformación que se integran en el medio.

Hay muchos formulados biocidas disponibles en el mercado para el control del crecimiento de organismos en los sistemas de refrigeración, pero en general se dividen en dos grupos basados en el mecanismo de acción contra estos organismos: biocidas oxidantes y biocidas no oxidantes. Los formulados a base de elementos oxidantes, fundamentalmente cloro y bromo, son menos selectivos que los no oxidantes, y por tanto éstos últimos se comportarán individualmente como más eficaces según se trate de un organismo u otro. Dado que este último grupo es muy heterogéneo, los riesgos toxicológicos serán incluidos en un capítulo posterior, limitando esta exposición a los efectos del cloro y bromo, así como a sus principales productos derivados de su transformación (cloroformo y bromoformo) en ambientes acuáticos de estuario.

1.3.2.2 Niveles en ambientes de estuario

Las concentraciones de cloro procedentes de las descargas de agua de las torres de refrigeración no parece que tengan un papel relevante en cuanto a los procesos toxicológicos en las aguas receptoras de dichas descargas, ya que estudios en estos ambientes de estuario ha determinado concentraciones medias anuales en el rango de <10 - >100 mg/l (Gardiner & Smith, 1990). Sin embargo, estudios relacionados con los niveles de cloroformo, realizados en Gran Bretaña por la *National Rivers Authority* y el *National Monitoring Programme Survey of the Quality of UK Coastal Waters*, demostraron que sobrepasaban ampliamente los niveles de seguridad en ciertos puntos estudiados, pero siempre relacionados con una falta de criterios de calidad a la hora de verter los productos al medio.

1.3.2.3 Comportamiento en el ambiente de estuario

1.3.2.3.1 Cloro y bromo

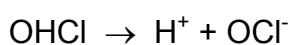
El comportamiento del cloro en agua ha sido estudiado de manera exhaustiva, y así cuando el gas clor se disuelve en agua, rápidamente se hidroliza a ácido hipocloroso, de acuerdo a la siguiente ecuación:



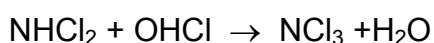
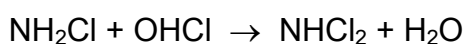
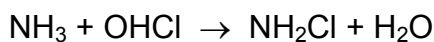
reacción que también se produce cuando se usa hipoclorito sódico como fuente de cloro:



El ácido hipocloroso es un ácido débil, por lo que sufrirá una disociación parcial de la siguiente forma:

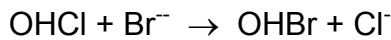


Estas reacciones son pH dependientes, considerando que en aguas con pH entre 6 y 9 el ácido hipocloroso y el ión hipoclorito estarán presentes, en una proporción para cada uno de ellos dependiente tanto del pH como de la temperatura. El ácido hipocloroso es significativamente más eficaz como biocida que el ión hipoclorito, y reacciona con amoníaco para la formación de cloraminas,

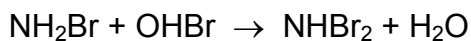
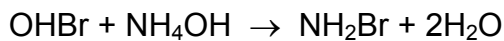
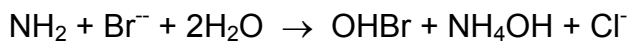


Al igual que la anterior, estas reacciones son dependientes del pH y temperatura, además del tiempo de contacto y de las concentraciones relativas de cloro y amoníaco. De forma general se puede indicar que cualquier molécula de cloro libre se convertirá en monocloramina a pH 7-8, cuando la proporción de cloro y amoníaco sea al menos equimolar (5:1). Cuando existan valores altos de cloro y amoníaco, o valores bajos de pH, los productos formados serán dicloramina y tricloramina.

El cloro también tiene la capacidad de oxidar al bromuro para formar ácido hipobromoso:



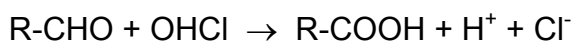
El ácido hipobromoso también es un biocida eficaz, y por tanto es efectivo que, para un valor de pH dado, la proporción de ácido hipobromoso relativa al hipobromito sea significativamente mayor que los valores correspondientes de ácido hipocloroso. Por ejemplo, en un medio con pH 8 y 20 °C, el ácido hipobromoso representa el 83 %, mientras que el ácido hipocloroso sólo está presente en proporción del 28 %. Cuando el amoníaco también está presente en el medio, es probable que cloro y bromo compartan reacciones, favoreciendo la formación rápida de monocloramina y ácido hipobromoso, con la posibilidad de aparición de nuevas reacciones,



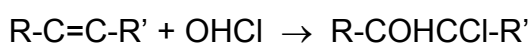
El cloro también puede reaccionar con compuestos orgánicos nitrogenados, caso de aminoácidos, para formar cloraminas orgánicas. Sin embargo, no se conocen las propiedades biocidas de estos compuestos.

En las aguas naturales, el cloro puede sufrir multitud de reacciones distintas a las ya mencionadas. Así, reaccionará con constituyentes inorgánicos como hierro, manganeso, nitritos y sulfuros. Estas reacciones pueden agruparse en varios tipos:

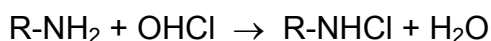
Procesos de oxidación, donde el cloro se reduce al ión cloruro



Procesos de adición a dobles enlaces no saturados



Procesos de sustitución para formar compuestos N-clorados



Procesos de formación de C-clorados:



Las reacciones de sustitución de cloro puede llevar a la formación de compuestos halogenados, caso del cloroformo y, cuando el ácido hipobromoso se encuentra presente, bromoformo. Aunque este tipo de reacciones tiene amplia significación toxicológica, ha sido estimado que únicamente un pequeño porcentaje de cloro aplicado termina en la forma de derivado halogenado. Al ser el cloro un potente oxidante, una proporción significativa de lo aplicado termina en reacciones de oxidación, llevando a la formación de productos no halogenados en forma de cloruro.

Es probable que otras características del medio acuático tengan impacto en las concentraciones de derivados orgánicos presentes en las descargas del agua procedente de las torres de refrigeración. Así, la materia orgánica es el precursor mayor de derivados halogenados, y por tanto la concentración orgánica (carbono orgánico total) puede llegar a afectar respecto a su aparición. En general se reconoce que las aguas continentales poseen una mayor carga orgánica que las aguas marinas y de estuario, y por tanto su potencial de producción de elementos halogenado es mucho mayor. De igual manera, las aguas marinas y de estuario poseen concentraciones menores de amoniaco que las aguas continentales, y por tanto la formación de cloraminas es menor. Si embargo, bajo ciertas condiciones, se puede producir cierta competencia con el bromuro para que el cloro disponible forme monocloramina. En suma, el ácido hipobromoso puede reaccionar con el amoniaco para formar bromaminas, y aunque la sucesión de reacciones es compleja, parece probable que la reacción del ácido hipocloroso o hipobromoso con amoniaco reduciría la formación de los derivados orgánicos durante la desinfección con cloro en las aguas de estuarios.

El pH del agua utilizada para el proceso de refrigeración también podría afectar a la naturaleza de los derivados formados. A pH creciente aumenta la formación de trihalometanos, probablemente debido a un proceso de hidrólisis básica de compuestos intermediarios de la reacción, mientras que por otro lado la formación de TCA es significativa a valores de pH superiores a 7, posiblemente debido a la reducción poder oxidante del ión hipoclorito comparado con el del ácido hipocloroso. A pesar de ello es posible afirmar que, mientras que las variaciones de pH afecten a las concentraciones de estos derivados, la concentración global formada permanecerá relativamente constante.

La presencia de ciertos contaminantes en los acuíferos receptores podría llevar a un aumento en los niveles de halogenados orgánicos. Por ejemplo, la presencia de fenol puede provocar la formación de clorofenoles, y es por eso por lo que se han identificado estos compuestos en vertidos procedentes de torres de refrigeración. Dadas las particularidades de cada uno de los elementos, cloroformo y trihalometanos suelen predominar en aguas continentales, mientras que el bromoformo predomina en aguas salinas de estuarios y marinas.

1.3.2.3.2 Cloroformo y bromoformo

Cloroformo y bromoformo son sustancias muy volátiles y sólo ligeramente solubles en agua. El cloroformo, al ser un elemento químico ampliamente utilizado en la industria, existen numerosos datos acerca del efecto medioambiental de este compuesto, y en parecidos términos se obtienen datos para el bromoformo. Al no absorberse en el terreno ni en los sedimentos, no han sido consideradas suficientemente las necesidades para impedir su presencia en el medio acuático. La volatilización, seguida de un proceso de oxidación, es la mayor ruta para la desaparición del cloroformo, y posiblemente también del bromoformo, del medio acuático. Además, los procesos de biodegradación también intervienen de forma importante en su desaparición, a pesar de ser un proceso lento. Sin embargo, los procesos de hidrólisis,

adsorción, fotooxidación, fotólisis y bioacumulación no parecen reducir sensiblemente su presencia en el medioambiente.

1.3.2.4 Efectos sobre ecosistemas de estuario

Basado en los datos obtenidos por Lewis y col. (1994, 1997) el efecto tóxico de estos compuestos ha sido estudiado y son conocidos los grupos de organismos de agua salada más sensibles.

La revisión de estos datos para cloro y bromo demuestran que existe más información disponible en cuanto a la toxicidad del cloro y cloraminas que para bromo y bromaminas. El estudio toxicológico comparativo entre las especies de agua salada *Menidia beryllina* y *Mysidopsis bahia*, ha demostrado que no existen grandes diferencias, aunque los compuestos clorados parecían ligeramente más tóxicos que los bromados. En cuanto a los estudios sobre cloroformo y bromoformo, indicaron que ambos se comportaban como moderadamente tóxicos en organismos acuáticos.

En cuanto a los procesos de bioacumulación, mientras que no existen datos disponibles para el bromo y las bromaminas, parece probable que el cloro y las cloraminas no tienen potencial de bioacumulación, por lo que parecería razonable extrapolar esta conclusión para los anteriores, sin perjuicio de una necesidad de datos adicionales para confirmarlo. Con respecto al cloroformo, los datos existentes son contradictorios, pero parecen encaminados hacia la conclusión de que puede existir cierto grado de bioacumulación en algunos organismos. El cloroformo es muy volátil y posee un coeficiente de distribución octanol-agua relativamente bajo ($K_{ow} = 1.97$), por lo que se deduce que el potencial de bioacumulación debe ser también relativamente bajo. Veith y col. (1980) estimaron un BCF de 18 para invertebrados y peces, mientras que Malihot (1987) obtuvo un valor de 690 para el alga verde *Selenastrum capricornutum*.

El potencial de bioacumulación de los trihalometanos parece ser bajo comparado con el de otros compuestos organoclorados, ya que se ha

demostrado que la captación y depuración de estos compuestos se producía rápidamente, con un equilibrio alcanzado a las 24 horas. Los factores de bioconcentración eran relativamente bajos (<1 – 10 veces la concentración en agua). En parecidos términos se producía el efecto sobre bromoformo, concluyendo que el grado de captación y depuración eran dependientes del individuo y de la concentración de bromoformo en el medio acuático.

1.4 ARTEMIA FRANCISCANA

1.4.1 Introducción

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

Incluidos en los crustáceos se encuentran el grupo de branquiópodos, primitivo grupo que aún se encuentra en el interior de aguas de lagos salinos, y charcas originadas por nieve derretida o por tiempo húmedo. Las branquias se localizan en los apéndices del tronco (Martin, 1992).

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

exoesqueleto es fino, flexible y no está calcificado. El sistema nervioso es el típico de los artrópodos y anélidos y no presenta tendencia a la cefalización. El desarrollo incluye un estado de nauplio, metanauplio y postnauplio para alcanzar finalmente el de larva.

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

1.4.2 *Artemia franciscana*

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

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

Figura 1.4.2.1 Imagen de un ejemplar de *Artemia salina* en su fase adulta.



1.4.2.1 Anatomía Externa

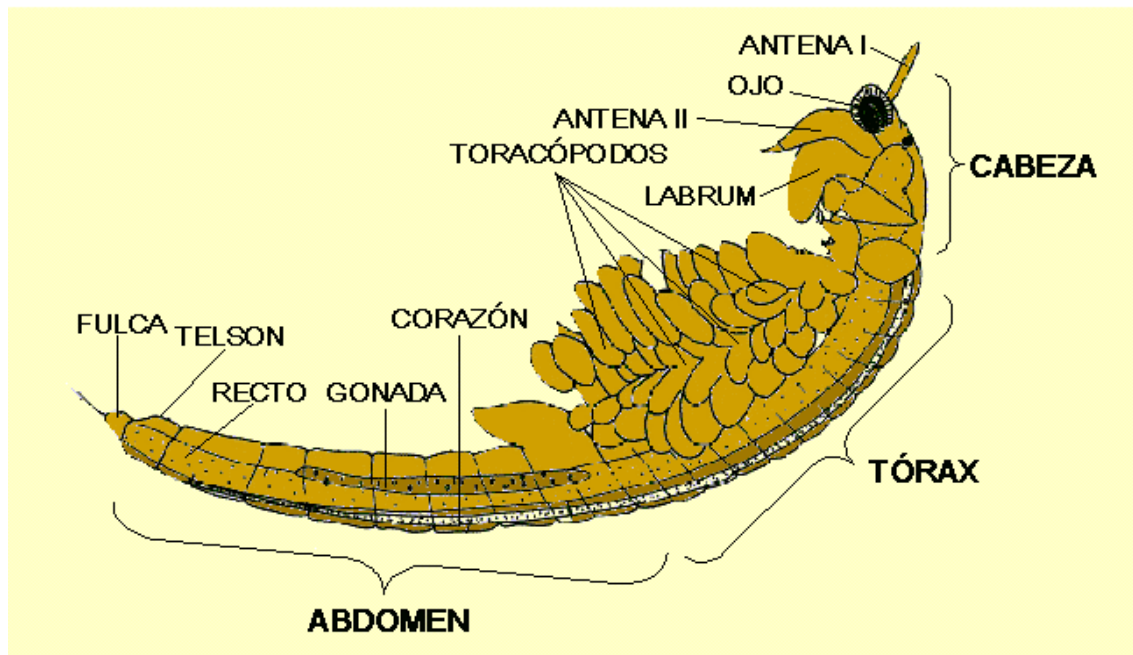
El cuerpo de los anostraca se encuentra dividido en cabeza, tórax y abdomen (Figura 1.4.2.1-1). La cabeza y los apéndices se encuentran especializados como el de los primitivos crustáceos. Los apéndices torácicos son todos semejantes y no se especializan. El abdomen carece de apéndices.

La cabeza (Figura 1.4.2.1-2) está compuesta por cinco segmentos que no se ven divididos, lleva un par de ojos compuestos y uno simple; en estado de nauplio se observa un ojo medial hacia el final anterior. Los ojos no se consideran parte de los apéndices. La primera antena presenta quimiosensores, siendo éste el apéndice del primer segmento de la cabeza y no presenta articulación. La segunda antena es mayor y presenta dimorfismo sexual, las de los machos son mayores y se modifican hacia una especie de enganche para la hembra durante la copulación. Se componen de dos articulaciones. La antena segunda de las hembras es menor y más fina que la primera y se compone de una única articulación. El *labrum* o labio superior es grande, medial, forma un pliegue ventral a la pared del cuerpo hasta la base de la segunda antena. No es par y tampoco tiene segmentos. Se extiende posteriormente y cubre la superficie ventral de la cabeza, incluyendo la boca. Dos mandíbulas se abultan en ambas caras de la cabeza y forman el tercer segmento de la cabeza. Las mandíbulas se curvan medialmente y se encuentran la una con la otra en la mitad, y es en su borde ventral donde aparecen los dientes. La boca se localiza en la mitad ventral entre las mandíbulas, siendo necesario mover el *labrum* hacia un lado para ver el final ventral de mandíbulas y boca. La primera y segunda mandíbulas son pequeñas y difíciles de observar. La primera maxila es mayor que la segunda y soporta un abultamiento dirigido anteriormente. La primera maxila se localiza inmediatamente posterior a las mandíbulas sobre la superficie ventral de la cabeza y se usa para transferir comida desde los apéndices torácicos hasta la boca, la segunda maxila es minúscula, casi un vestigio y en ella se ven los nefridioporos. El aparato excretor del adulto está compuesto de dos glándulas maxilares, o glándulas coxales, se localizan en el segmento de la segunda

maxila donde forman un acumulo de abultamientos sobre las superficies dorso-laterales. Pueden también verse canales arrollados sin los abombamientos. Las glándulas maxilares (Figura 1.4.2.1-3) se abren en la segunda mandíbula a través de los nefridioporos.

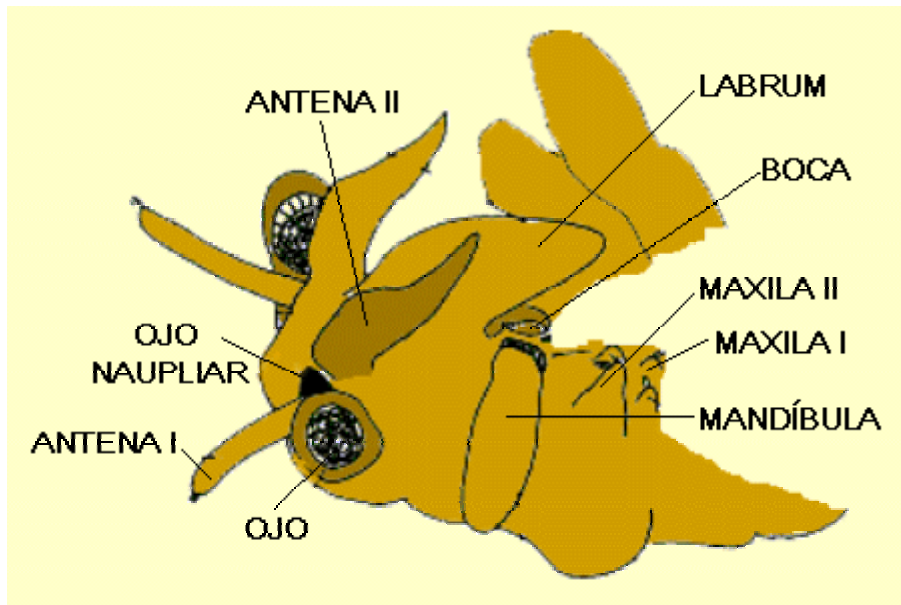
El tórax consiste en once segmentos independientes (Figura 1.4.2.1-4). No presenta caparazón y ninguno de sus segmentos se encuentran fusionados entre si; no existe cefalotórax. Cada segmento torácico lleva un par ventral de toracópodos semejantes en su forma a una hoja, se conocen como filópodos, estos son semejantes a lo largo de los once segmentos y no se observa especialización regional, su única diferencia es la talla. El exoesqueleto de los miembros es fino y flexible, para su rigidez es necesaria la presión de la sangre. Los filópodos son usados para nadar, alimentarse y respirar. Hay semejanzas entre partes de lo filópodos y los ancestrales apéndices birramos, pero la proposición de estas afinidades aún está en discusión. Los apéndices son aparentemente unirramos aunque hay partes que pueden ser consideradas birramas. cada apéndice es plano y tiene forma de hoja y nos recuerda a los apéndices primitivos birramos de los mixópodos, lo que no existe es la parte cilíndrica. A lo largo del borde dorsal se une un gran protopodio basal, algunas extensiones pequeñas se extienden hasta los bordes lateral y medial del protopodio, los procesos laterales son los exitos, los mediales los énditos. Cinco o seis enditos se extienden hacia el margen medial del protopodio y son extremadamente pequeños, los proximales y distales al ser un poco mayores pueden verse con facilidad, sobre los enditos, en dirección medial se localizan una serie de setas, y éstas son el mayor filtro del aparato digestivo, las distales, mayores que las anteriores, pueden considerarse como el endopodio de los apéndices birramos ancestrales. Hay tres largos exitos sobre el margen lateral del protopodio, los proximales y mediales no llevan setas, el medial correspondería a las branquias. El endito distal puede compararse al exopodio de los apéndices birramos, éste es el único proceso unido por articulación al protopodio y lleva una seta en forma de pluma que es usada para nadar.

Figura 1.4.2.1-1 Esquema de la anatomía de una hembra de *Artemia franciscana*.



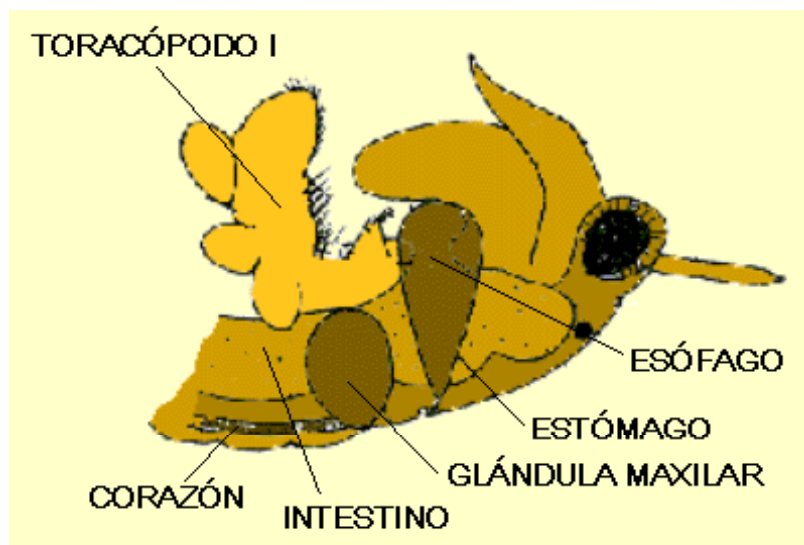
La mayoría de los anostracos se alimentan de comida en suspensión, aunque hay unos pocos que son carnívoros. Un surco longitudinal y medioventral se utiliza para la alimentación, aparece entre la gnatobase y los filópodos. La boca se ve en la cara anterior del final del surco. Los movimientos natatorios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

Figura 1.4.2.1-2 Detalle de la cabeza de una hembra de *Artemia franciscana*



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

Figura 1.4.2.1-3 Cabeza y tórax anterior de *Artemia franciscana*



El abdomen corresponde a seis segmentos, posteriores al aparato genital, es casi cilíndrico. El final corresponde al *telson* y éste lleva un par de furcas caudales en su fin. Ninguno de los segmentos abdominales llevan apéndices. El ano se localiza sobre el *telson* entre las dos furcas caudales (Bullowg, 1958).

Figura 1.4.2.1-4 Tórax posterior y abdomen de una hembra de *Artemia franciscana*



1.4.2.2 Anatomía Interna

1.4.2.2.1 Sistema digestivo

El intestino es un tubo que se extiende a lo largo del animal. La boca se localiza en la parte ventral, hacia la mitad de la cabeza, entre las superficies opuestas de las mandíbulas. El esófago en posición vertical se extiende dorsalmente desde la boca hasta el estómago donde se abre, lo que ocurre por encima de la posición de la boca. El estómago es una expansión del intestino en mitad de la cabeza. Dos grandes ampollas cecales se localizan anterolaterales a la pared del estómago. El intestino es un tubo largo que va

desde el estómago a través del tórax y parte del abdomen. El intestino medio es el lugar de secreción de enzimas y donde se produce la digestión y absorción; lo circunda el hemocele, bañado en sangre y muchos de los materiales atraviesan su fina pared. Al intestino se une un corto recto, localizado en el cuarto segmento del abdomen, es el responsable de la formación de bolitas fecales y se abre al exterior a través del ano el cual se encuentra entre las furcas caudales y está provisto de un esfínter.

1.4.2.2.2 Sistema vascular

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

1.4.2.2.3 Sistema respiratorio

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

1.4.2.2.4 Sistema osmorregulador y Excreción

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

1.4.2.2.5 Sistema reproductivo

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

1.4.2.3 Comportamiento de la Artemia

Las artemias adultas nadan constantemente usando los filópodos de los apéndices torácicos. El agua en forma de ondas atraviesa la serie de filópodos

y las partículas de comida pasan al surco alimenticio, y se crea un efectivo con el movimiento de natación de las setas. Por tanto, la locomoción y la natación son simultáneas. La artemia también se alimenta escarbando en algas de superficies duras. Los anostracos pueden originar rápidos movimientos por la flexibilidad de su abdomen a lo que ayuda la seta plumosa con función natatoria.

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

1.4.2.4 Ciclo Vital

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

Una vez puestos en agua de mar, los quistes bicóncavos se hidratan tomando forma esférica y el embrión recobra su metabolismo reversible interrumpido. Tras unas 24 horas, la membrana externa de los quistes se rompe y aparece el embrión rodeado de la membrana de eclosión. Durante las

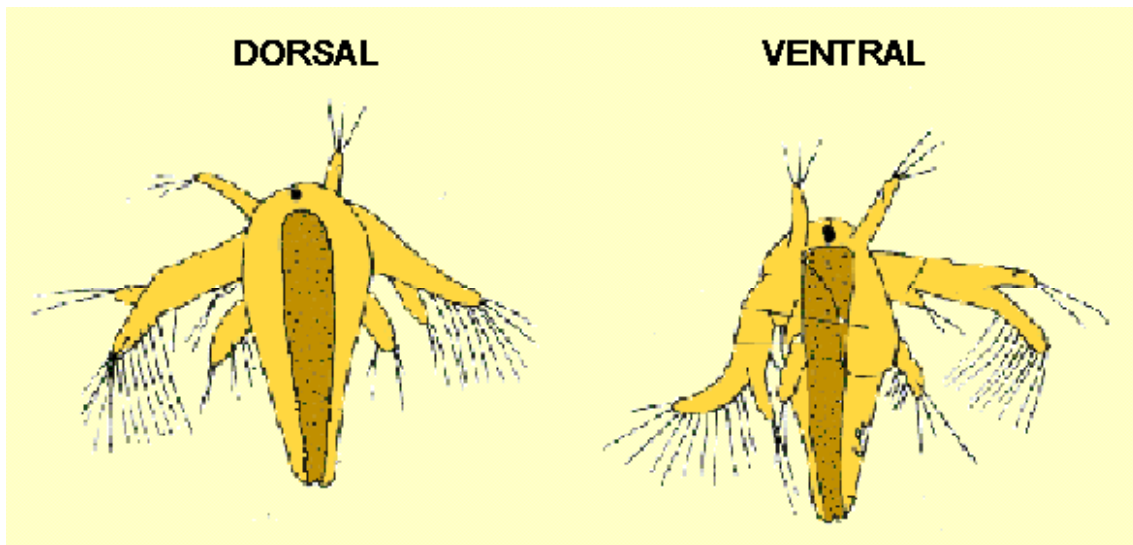
siguientes horas, el embrión abandona completamente la cáscara vacía a la cual permanece todavía unido dentro de la membrana de eclosión se completa el desarrollo del nauplio, sus apéndices comienzan a moverse y en un breve periodo de tiempo, y la membrana de eclosión se rasga emergiendo el nauplio que nada libremente

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

1.4.2.4.1 Periodo de nauplio. Larva 1

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

Figura 1.3.2.1-4 Vista dorsal y ventral de un nauplio de *Artemia franciscana*.



El cerebro puede ser visible alrededor del ojo de los mayores y a ambos lados de los ojos se levantan dos anténulas todavía sin cutícula, unirramas y relativamente pequeñas las primeras, las segundas son los mayores apéndices de los nauplios y les sirven como órganos natatorios. Las antenas son los primeros órganos de locomoción. Las antenas constan de un protopodio con dos enditos con largas setas, un endopodio con una o dos setas largas y un exopodio que presenta diez setas terminales. El tercer par de apéndices son las mandíbulas que se caracterizan por ser unirramas, también se dividen en protopodio, endopodio y exopodio, respectivamente cada uno presenta dos enditos con una cerda, dos enditos con dos cerdas y el exopodio con tres setas terminales. El *labrum* se extiende entre la segunda antena y las mandíbulas, inmediatamente anterior a la boca, es grande, fino y se alza desde él un pliegue ventral de la pared del cuerpo. La región postmandibular presenta el ano sin apertura al exterior (en estos momentos no se alimentan porque su aparato digestivo no es funcional, tanto la boca como el ano permanecen cerrados y su nutrición proviene de las reservas del saco vitelino). Se ve insegmentado y sin ningún brote de los miembros. El telson es la parte posterior del cuerpo, contiene el teloblasto a partir de donde se formarán los nuevos segmentos, los segmentos más antiguos se localizan más anteriores y los más jóvenes son los que cierran el telson.

1.4.2.4.2 *Periodo de metanauplio*

Se trata de una larva pequeña transparente con un largo tronco; como todavía nada con los apéndices de la cabeza se la sigue considerando un nauplio, aunque el metanauplio incluye varias mudas durante una serie de días que terminan cuando los miembros de la zona anterior del tórax comienzan a ser funcionales, además las reservas del vitelo se agotan y la larva debe comenzar a alimentarse.

Anatómicamente la cabeza aparece sin segmentar y está unida al largo tórax, y el final anterior está visiblemente segmentado. El intestino se extiende desde la cabeza hasta la parte posterior del telson, la boca está en la superficie ventral, bajo el *labrum* y entre las bases de las mandíbulas. El estómago es más ancho que el resto del intestino y lo vemos dorsal a la boca que se conecta a él por medio de un esófago en posición vertical. El intestino medio se extiende posteriormente desde el estómago, es relativamente corto y estrecho al principio para aparecer largo al final del estado de metanauplio. El final posterior corresponde al recto este se abre al exterior a través del ano, al final del telson. Los ojos sésiles aparecen en posición lateral, pero requerirán aún muchas mudas para alcanzar su verdadero estado final.

1.4.2.4.2.1 *Larva 2*

Difiere en unos pocos caracteres del de L1. Las setas terminales de las antenas y los exopodios de las mandíbulas toman parte en la filtración, y tan solo las antenas contribuyen a la locomoción. La parte postmandibular comienza la segmentación, dos surcos indican los bordes de las maxilulas y del segmento maxilar.

1.4.2.4.2.2 *Larva 3*

En este momento, en la punta de las antenas se desarrollan unas setas más cortas, finas y flageladas, el *labrum* se engruesa, el aparato filtrador

aparece más complejo gracias a un engranaje de estrechas sétulas. La región postmandibular se agranda y aparecen los toracómetros I y II y también los brotes de las maxílulas y las maxilas.

1.4.2.4.2.3 Larva 4

Maxílulas y maxilas se agrandan, algunas cerdas han comenzado a formarse en su punta y la región postmandibular se expande. Los toracómeros II, III y IV se diferencian.

1.4.2.4.2.4 Larva 5

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

1.4.2.4.3 Periodo de postmetanauplio

En este periodo se completa el número de somitos del tronco y comienza la transformación de las antenas hacia su forma definitiva y funcional.

1.4.2.4.3.1 Larva 6

En la punta de cada anténula se ven brotes de la cuarta y setas tipo II, una de ellas comienza a diferenciarse como un fino flagelo. Las sétulas del protopodio y las cerdas en forma de hoz se reducen esto indica el comienzo de la transformación de estas extremidades. Las mandíbulas disminuyen su talla, las maxílulas y maxilas son activas filtrando partículas de comida. Aparecen los toracómeros VII y VIII en la región postmandibular y los toracópodos I y II ya se ven articulados en su protopodio; los toracópodos III y IV se pueden identificar a nivel de protopodio y enditos mientras que los incipientes miembros de los toracómeros V Y VI carecen aún de articulación.

Se delimita un canal ventral por medio de los toracópodos y brotes de los miembros: el canal alimentario. El primer par de extremidades del tronco produce ya corrientes alimentarias, siendo el aparato filtrador el principal responsable de la recogida de la comida.

1.4.2.4.3.2 Larva 7

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

1.4.2.4.3.3 Larva 8

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

1.4.2.4.3.4 Larva 9

Ante todo se diferencia por algunos cambios morfológicos. El *labrum* lo circunda un borde trapezoidal, la punta de cada antena tiene unas setas que crecen hasta alcanzar la forma de una botella con un poro distal, los incipientes ojos compuestos son protuberantes y la omátida se diferencia, los toracópodos

VI y VII finalizan su diferenciación, el octavo y noveno par de extremidades comienzan a articularse y el toracómero XI desarrolla los brotes de sus miembros. En la región abdominal aparece el segundo segmento y tercer segmento genital.

1.4.2.4.3.5 Larva 10

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

1.4.2.4.3.6 Larva 11

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

1.4.2.4.3.7 Larva 12

Ya el borde del labio se encuentra casi completamente reabsorbido, el *labrum* forma una especie de lengua, las setas terminales de las antenas se deterioran, las mandíbulas aparecen como un resto de tejido semejante a un botón. Los toracópodos X y XI completan su llenado de setas filtradoras y el segmento abdominal VIII y telson se separan por un surco; cubiertos por los toracópodos los brotes de los penes aparecen como hinchazones globulares en la porción ventral del segmento genital, mientras que el saco ovárico se

construye por la fusión del tejido de los lóbulos ventrales de los dos segmentos genitales .

1.4.2.4.4 Periodo postlarval

Comprende cinco estadios donde se desarrollan las antenas y las estructuras genitales principalmente.

1.4.2.4.4.1 Larva 13 (Artemia juvenil)

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

1.4.2.4.4.2 Larva 14

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

1.4.2.4.4.3 Larva 15

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

1.4.2.4.4.4 Larva 16

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

1.4.2.4.4.5 Larva 17

En este estadio las diferencias con el estado adulto son muy pequeñas. Los tallos de los ojos compuestos se extienden, los exopodios de las antenas de los machos aumentan rápidamente en tamaño formando como una especie de pinzas, el muñón frontal desarrolla espinas ramificadas o no y se agranda, estas espinas pueden ser solitarias o ir en pareja. Algunos a nivel lateral sobre las extremidades pueden mostrar tejido remanente de las mandíbulas. Los genitales se expanden, los sacos ováricos forman una espina y una especie de broche en cada lado.

La muda correspondiente a este estadio finaliza el desarrollo en ambos sexos y se obtiene la organización adulta. Los adultos miden hasta 10 mm de longitud en las poblaciones bisexuales y hasta 20 mm en las poblaciones parternogenéticas. Los adultos se caracterizan por un cuerpo alargado con dos ojos compuestos pedunculados, un aparato digestivo lineal, unas anténulas sensoriales y 11 pares de toracópodos funcionales. El macho posee un par de piezas prensiles musculosas y muy características (segundo par de antenas) en la región cefálica mientras que en la parte posterior del tórax se pueden observar un par de penes. La hembra no tiene apéndices distintivos en la región cefálica, pero puede ser fácilmente reconocida por el saco ovígero localizado inmediatamente detrás del undécimo par de toracópodos.

Como ya ha sido comentado, los huevos se desarrollan en dos ovarios tubulares situados en el abdomen. Una vez maduros, los oviductos son visibles (también se denominan sacos laterales). La precópula de los adultos se inicia cuando el macho sujeta a la hembra entre el ovisaco y el último par de toracópodos, con sus antenas modificadas y curvadas. Las parejas pueden nadar durante largo tiempo a lo que se conoce como paseo nupcial, para ello mueven sus toracópodos de forma sincrónica. La cópula es un rápido acto reflejo: la parte ventral del macho se dobla hacia delante y uno de los penes es introducido en la abertura del útero fertilizando a los huevos. En el caso de las hembras preternogenéticas esto no ocurre y el desarrollo embrionario comienza tan pronto como los huevos han llegado al útero.

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

1.5 BIOCIDAS

1.5.1 Introducción

Se conoce con el nombre de biocidas una amplia gama de sustancias capaces de eliminar o controlar la proliferación de microorganismos capaces de provocar alteraciones en los seres humanos, animales y sobre el medioambiente. Existen en el mercado numerosos formulados capaces de realizar dicha función, y que abarcan desde la simple desinfección de hogares hasta especialidades de uso médico. Las distintas familias químicas de compuestos biocidas poseen perfiles de actuación variados, pero todos ellos comparten la características de ser letales a los microorganismos bajo cierta conjunción de circunstancias que hacen de ellos el ser viables para su comercialización.

Por pura definición cualquier biocida resultará eficaz, si bien dicha circunstancia será dependiente de la concentración a la que será usada y al tiempo de exposición que requiera para realizar su función. Además de ello, el éxito de un biocida dependerá de la optimización de 5 parámetros en su actuación: Coste, Potencia, Persistencia, Velocidad y Concentración, y por tanto, aspectos como el olor, corrosividad, inestabilidad química del formulado, toxicidad medioambiental, biodegradabilidad y sensibilidad de los individuos serán los factores que determinen la utilidad de un biocida en particular para una aplicación específica. Por el contrario, las características negativas pueden limitar severamente la utilidad de un biocida que bien pudiera ser un compuesto eficaz.

Así, la búsqueda de un equilibrio entre las limitaciones de un biocida y los atributos que le hacen eficaz y seguro, es el desafío constante a la hora de elegir un tipo de biocida. De esta forma, puede llegar a ser necesario el planteamiento de necesidades de tiempos limitados de actuación o, por el contrario una gran persistencia de su efecto para reducir la contaminación y el crecimiento microbiano. Pero si los factores de velocidad, persistencia y potencia son conseguidos mediante concentraciones altas de los principios

activos, entonces es probable que proporcionalmente aumenten los atributos negativos del compuesto, y si la persistencia de actividad debe ser alta, aparecerán inevitablemente los efectos medioambientales adversos y la aparición de alteraciones crónicas entre los individuos expuestos.

Hoy en día se hacen evidentes los procesos adversos de tipo toxicológico y medioambiental, prácticamente para todos los biocidas existentes en el mercado. Que estos compuestos mantengan su volumen de venta a pesar de los serios inconvenientes que plantean, hace evidente la demanda antimicrobial existente, y de hecho su crecimiento es en parte atribuible a la aparición en el mercado de nuevos productos para los que no se había considerado la necesidad de desinfección, y que ahora se hace indispensable. Sin embargo, cada vez se producen un mayor número de opiniones en contra de la utilización masiva de biocidas que podríamos considerar como tradicionales, y que ha provocado que las empresas que los comercializan se atrincheren en sus propuestas a espera que remita la presión social. De cualquier forma, se han ido produciendo ciertos cambios, y así por ejemplo, en los últimos 20 años, los derivados fenólicos tuvieron que ceder terreno ante el empuje que suponía la aparición de los formulados a partir de amonio cuaternario, fundamentalmente desde el punto de vista gubernamental y medioambiental.

Aunque hoy en día la EPA tiene registrados más de 5000 formulaciones, la lista de formulados agrupados por familias, con principios activos análogos, es bastante corta y quedan agrupados en unas pocas categorías.

1.5.1.1 Aldehidos

Representantes de esta categoría son el formaldehído y glutaraldehído, biocidas de amplio espectro capaces incluso de destruir las esporas bacterianas más resistentes. Son productos solubles en agua pero vaporizan rápidamente, provocando así un fuerte olor penetrante y desagradable. Además, el formaldehído es un potente carcinógeno, existiendo sobre él

severas restricciones, establecidas por la OSHA, en cuanto a la permisibilidad de exposición en los lugares de trabajo.

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

1.5.1.2 Alcoholes

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

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

1.5.1.3 Compuestos de Amonio Cuaternario

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

Su mecanismo de acción está basado en su capacidad para disolver las capas exteriores de muchos agentes patógenos, si bien su eficacia es limitada, por lo que han sido considerados como desinfectantes de bajo nivel. Además, su poder corrosivo sobre algunos polímeros permite el crecimiento de ciertas bacterias y una tendencia de algunas de ellas a desarrollar fenómenos de resistencia, caso del *Staphylococcus aureus* y de *Pseudomonas*.

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

1.5.1.4 Metales Pesados

Todos los metales pesados son tóxicos para la mayoría de las formas de vida, y esta característica ha sido aprovechada tradicionalmente para su uso como desinfectantes. Así, compuestos como el cinc, plata, mercurio, arsénico, cobre, boro o estaño han ido siendo incorporados de diferente manera a los formulados, cada vez con mayor grado de sofisticación. A menudo se utilizan

sales cúpricas como alguicidas, y el cobre también ha sido utilizado par limitar los niveles bacterianos en cañerías. Compuestos a partir de plata se aplican para la destrucción de bacterias y virus, y cartuchos con contenido de plata están disponibles para la medición en arroyos, piscinas y sistemas cerrados de torres de refrigeración. Las sales de boro son utilizadas para limitar la colonización de bacterias en depósitos de combustible de grandes naves y en los depósitos Diesel de vehículos como trenes.

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

1.5.1.5 Compuestos Fenólicos

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

Hoy en día, estos compuestos son de uso corriente, usándose a concentraciones de 500-1000 ppm, normalmente mediante mezclas con

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

Por el contrario, si se analizan los compuestos fenólicos más benignos, su eficacia también se reduce drásticamente, produciéndose el hecho de ser popularmente utilizados en productos para el hogar.

1.5.1.6 Peróxidos/Donantes de Oxígeno

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

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

podría suplantar al glutaraldehído si su tendencia a evaporarse rápidamente no restringe su ámbito de utilización.

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

1.5.1.7 Derivados Halogenados: Yodo, Cloro, Bromo

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

El cloro es un biocida de amplio espectro barato y eficaz, que se utiliza en disolución a 500-5000 ppm para desinfección medioambiental. El hipoclorito sódico, en contacto con el agua, pasa a la forma de ácido hipocloroso, que es la forma más activa para su actuación como biocida. El problema fundamental que surge con la utilización de este compuesto es que, siendo susceptibles todas las formas vivas a su acción oxidante, también lo son muchas superficies donde se aplica, generando fenómenos de corrosión importantes, fundamentalmente en elementos metálicos. El ácido hipocloroso trabaja en rangos muy estrechos de pH, fuera del cual deja de ser activo, se degrada por la acción de los rayos ultravioleta y reacciona con gran número de moléculas orgánicas, generando los llamados derivados de la desinfección, o DBP. Algunos de éstos son altamente carcinógenos, y por ello el uso del cloro, fundamentalmente en procesos industriales, está bajo una crítica revisión en toda Europa.

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

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

1.5.2 Registro de Biocidas

Los biocidas, o pesticidas de uso no agrícola, abarcan un amplio abanico de sustancias químicas y biológicas, que son utilizadas para la desinfección y/o saneamiento en ambientes fuera del ámbito agrícola.

En 1996, la OCDE comenzó sus trabajos en biocidas con el objetivo de ayudar a los países miembros a la formalización de un proyecto de colaboración para la valoración y registro de estos productos. Su fin consistía en conseguir una armonización de criterios y un acercamiento de posturas para la regularización global respecto a las evaluaciones de estos biocidas, lo que redundaría en una mayor protección en las áreas de salud pública y medioambiental. Sin embargo, hoy en día existe una considerable variabilidad en la manera de cómo los países miembros de la OCDE regulan estos compuestos, hecho que quedó patente en los resultados publicados en el Boletín del FMI, en cuanto al acercamiento de posturas de cara a la regulación de biocidas realizada en el periodo 1997-1998. Así, aparecen diferencias en

cuanto a la manera de catalogar a los biocidas, en el proceso regulador utilizado, en los datos requeridos para su registro y notificación, valoración del riesgo, etc. Estas diferencias limitan en exceso la oportunidad de los gobiernos para gestionar razonablemente los recursos a través de una mutua aceptación de valoraciones de biocidas, hecho que sí se produce cuando se trata de pesticidas de uso agrícola. Sin embargo, en 1998 los países miembros llegaron a un acuerdo de armonización en la regulación de biocidas, incluyéndose una serie de actividades en las siguientes áreas:

- Armonización de los requisitos requeridos, en cuanto a los datos necesarios.
- Tests de eficacia y criterio de aceptabilidad.
- Desarrollo de pautas para conocer los efectos en salud humana y medioambiente.
- Valoración de la exposición y riesgo.
- Coordinación entre los países para la valoración de biocidas.
- Reducción del riesgo.

1.5.2.1 Armonización de los requisitos requeridos

Una simple recopilación de los estudios realizados por cada país miembro de la OCDE demuestra que los requisitos necesarios para cada uno de ellos difieren sustancialmente. Por ello, el proyecto OCDE enfoca sus objetivos de cara a desarrollar, por un lado un ámbito común básico para los estudios de biocidas, común para todas las categorías, y por otro un conjunto de datos adicionales para cada una de estas categorías, que incluirían tanto datos comunes para cada una de ellas, como otros denominados como adicionales y que fueron requeridos bajo ciertas circunstancias. Con respecto a estos últimos, el trabajo ha comenzado inicialmente en áreas limitadas (protectores de madera, microbiocidas,...), aunque ya se está solicitando a los países miembros de la OCDE que desarrollen estudios de cara al desarrollo de propuestas para otros grupos de biocidas.

Siguiendo en esta línea de trabajo, el BSG (Biocides Steering Group) está evaluando el éxito en el acercamiento de posturas y decidirá los siguientes objetivos, de cara al desarrollo de propuestas de la OCDE sobre requisitos adicionales para otros grupos de biocidas.

1.5.2.2 Ensayos de eficacia y criterios de aceptabilidad

Basándose en estos criterios, los trabajos que se vienen realizando para alcanzar la mayor eficacia se incluyen en dos áreas fundamentales:

- El desarrollo de Documentos Guía de la OCDE para consolidar los test de eficacia y su valoración. La mayoría de los países requieren datos de eficacia a la industria, respecto a las aplicaciones, como fórmula de apoyo para la aprobación de los biocidas, aunque no necesariamente para todas las categorías del uso que éstos regulan. Por lo general, la metodología general de eficacia no se encuentra disponible, por lo que el desarrollo de la guía constará de tres pasos a seguir:
- Apreciación global de proyectos para valorar la eficacia, tanto con pruebas de campo como laboratoriales, evaluando su validez e identificando donde se precisan nuevas metodologías para desarrollarlas adecuadamente.
- La unión de dicha apreciación global con la guía técnica que se está desarrollando actualmente para el Reglamento de Biocidas (98/8/EEC), como base de formalización del Documento de Eficacia y Valoración.
- La formación de un reducido grupo de especialistas para continuar con estas labores, y así obtener información adicional al respecto.

De esta forma, se desarrollaron dichos métodos con la participación de la Secretaria de la OCDE, con ayuda del *Biocides Steering Group* (BSG).

El desarrollo de criterios de aceptabilidad, es decir, el criterio *pass/fail* (aceptable / no aceptable) respecto a la eficacia de los productos. La

armonización del criterio de aceptabilidad se desarrolló específicamente para la eficacia del biocida, reconociendo que es probable que dicho criterio diferirá dependiendo de las categoría de uso. El criterio de aceptabilidad armonizado mantendrá una base, desarrollando un acercamiento consistente a la manera que se evalúan los datos de eficacia y, por consiguiente, cómo un producto se determina para ser aceptable para el uso. Este criterio es la base para dar significado específico a los niveles de actuación, determinado por la consiguiente etiqueta, y así poseer información respecto a su actuación o falta de actuación en su campo determinado. Para el desarrollo de una armonización en los criterios de aceptabilidad, se desarrollan tres pasos:

- La revisión del criterio existente en cada uno de los países miembros.
- El desarrollo de propuestas de armonización por parte de la OCDE y BSG.
- La discusión y adopción de acuerdos por el *Working Group on Pesticides* (WGP) de la OCDE.

1.5.2.3 Guías para el estudio del destino y efecto de biocidas, excluyendo criterios de eficacia y exposición

En un intento de priorizar dichos estudios, la industria ha realizado a partir de 1999 informes que, por lado, incluyen metodologías para comprobar que los biocidas cumplen los requisitos exigidos entre los países miembros y, por otro lado identifican las áreas donde surge una mayor problemática por las repetidas exposiciones. Según estos informes, la mayoría de las pruebas son capaces de evaluar el riesgo sobre la salud humana, el efecto medioambiental y el destino de los compuestos químicos utilizados. Sin embargo, existen dos áreas fundamentales que precisan des desarrollo de una metodología apropiada para la aprobación internacional dependiente del destino de estos biocidas: Biodegradabilidad y Lixiviación de los Materiales Tratados.

1.5.3 Exposición y Valoración del Riesgo

El grupo WPG de la OCDE está dando prioridad a los trabajos de valoración de la exposición, debido fundamentalmente a la amplia variedad de metodologías de exposición asociadas con el uso de estos componentes químicos, aunque los métodos existentes para la valoración del riesgo en humanos, o los efectos medioambientales de los biocidas no tendrían que ser diferentes a aquellos ya usados para otros tipos de compuestos químicos. Por tanto, la OCDE ha decidido que, por el momento, no se desarrollarán trabajos específicos en esta área.

1.5.3.1 Valoración de la Exposición

A este respecto, y teniendo en cuenta la amplia variedad de guías de exposición asociadas con el uso de biocidas, la OCDE ha determinado comenzar con la valoración en un área concreta y limitada, como es aquella que concierne a los compuestos químicos utilizados para preservar la madera. Para ello, se formaron dos grupos de trabajo en la primera mitad del año 2000, uno para enfocar la valoración de la exposición medioambiental (Belgirate, Italia) y otro para valorar los efectos primarios (profesional) y secundarios (post-aplicación) en la valoración de dicha exposición (Ottawa, Canadá). Tanto uno como otro, tenían como objetivos:

- Acercamiento de posturas de los países miembros acerca de la información de los datos de exposición.
- Identificación de los datos necesarios para la evaluación.
- Recomendación de los puntos clave para la realización de una guía armonizada por parte de la OCDE.
- Armonizar criterios para poder extrapolar los datos a otros tipos de biocidas.

Este primer paso representa un importante avance en la valoración del riesgo de biocidas, y la OCDE ya está programando ampliar el espectro a todo el conjunto de biocidas.

1.5.3.2 Valoración del riesgo

La Unión Europea está preparando actualmente un documento guía para la valoración del riesgo de biocidas, participando en su elaboración el BSG y WGP. La revisión de los datos acerca de biocidas por los diferentes países miembros proporcionará amplias ventajas, tanto a la industria como a los gobiernos, y en este sentido, la WPG determinó comenzar sus actividades por los pesticidas de uso agrícola. Así, el Programa de Biocidas se enmarca en tres áreas:

- Establecimiento de información compartida acerca de los datos disponibles.
- Desarrollo de una guía armonizadas, para dar formato a la remisión de datos, tanto de la industria como de los diferentes Estados.
- Desarrollo de un sistema electrónico de remisión de datos de biocidas por parte de la industria.

1.5.3.3 Reducción del riesgo

En este sentido, la OCDE intenta hincar un acercamiento consistente en solicitar a los países miembros su colaboración en cuanto a la aportación de cualquier información sobre las actividades que éstos hayan realizado de cara a reducir el riesgo en el uso de los diferentes biocidas. Dicha aportación se realiza mediante comunicaciones orales al WPG, o comunicaciones cortas escritas y enviadas a su página web.

1.5.4 Desinfectantes para Torres de Refrigeración

En la actualidad, la inclusión en registro de un producto destinado a la desinfección de torres de refrigeración se encuentra regulado por las normas generales para la inscripción de productos en el Registro General de plaguicidas de la Dirección General de Salud Pública. Para ello, son de aplicación las siguientes disposiciones:

- Real Decreto 3349/1983, de 30 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas (B.O.E. de 24 de enero de 1984).
- Real Decreto 162/1991, de 8 de febrero, por el que se modifica la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de los plaguicidas (B.O.E. de 15 de febrero de 1991).
- Orden de 24 de febrero de 1993, por la que se normalizan la inscripción y funcionamiento del Registro de Establecimientos y Servicios Plaguicidas. (B.O.E. de 4 de marzo de 1993).
- Orden de 4 de febrero de 1994, por la que se prohíbe la comercialización y utilización de plaguicidas de uso ambiental que contienen determinados ingredientes activos peligrosos. (B.O.E. de 17 de febrero de 1994).
- Orden de 8 de marzo de 1994, por la que se establece la normativa reguladora de la homologación de cursos de capacitación para realizar tratamientos con plaguicidas. (B.O.E. de 15 de marzo de 1994).
- Real Decreto 443/1994, de 11 de marzo, por el que se modifica la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de los plaguicidas (B.O.E. de 30 de marzo de 1994).

En el Registro de Plaguicidas del Ministerio de Sanidad y Consumo se encuentran consignados una serie de productos comercializados, a los que se autoriza para ser utilizados para desinfección de torres de refrigeración. En la Tabla 1.5.4-1 se resumen en su conjunto.

En relación con estos preparados, la reglamentación indica que los fabricantes deben incluir en los informes datos acerca del efecto que pueden provocar sobre *Legionella pneumophila*, dado el carácter prioritario que la legislación da a la eliminación de este organismo, causante de un proceso

patológico en muchos casos mortal, denominado como la “enfermedad de los legionarios” o legionelosis.

Tabla 1.5.4-1 Formulados inscritos en el Registro de Plaguicidas para su uso en desinfección de torres de refrigeración

Nº REGISTRO	COMPOSICION	CONSEJOS	RIESGO
98-00-01526	Borax 100%	S22-26-36/37/39-45	R36/37/38
98-00-01527	Oxido de plata 100%	S26-37/39-45	R36/37/38
98-100-01528	Silicato de aluminio 49.3% Silicato de sodio 17.5% Borato sódico 31.2% Oxido de plata 2%	S2-13-22-24/25-36/37-45	
98-00-01545	Cloruro de tributilo tetradecilo de fosfonio 49.1%	S37/39-45	R22-36/38
98-00-01546	Acido tricloroisocianurico: 99.5%	S8-22-26-37/39-41-45	R8-22-31-36/37
98-100-01547	Acido tricloroisocianúrico (Cl activo 87.1%) 90.8%	S2-8-13-22-26-36/37-41-45	R8-22-31-36/37
98-100-01548	Cloruro tributil tetradecil fosfonio 7.5% Agua csp 100%	S2-13-24/25-36/37-45	
99-100-01691	Cloruro de didecil dimetil amonio 50% Excipientes csp 100%	S2-13-26-36/37/39-45	R34
99-100-01692	Sulfato de tetrakishidroximetil fosforo 10% Agua csp 100%	S2-13-26-36/37/39-45	R41-43
99-00-01693	Sulfato de tetrakishidroximetil fosfonio (THPS) 75-77%	S24-26-36/37/39-45	R22-41-43
99-00-01704	Diclorofeno 97%	S22-26-36/37-45	R22-36
99-100-01705	Cloruro de didecil dimetil amonio 12.5% Excipientes csp 100%	S2-13-26-36/37/39-45	R34
99-100-01706	Cloruro de didecil dimetil amonio 12.5% Excipientes csp 100%	S2-13-26-36/37/39-45	R34
99-100-01707	Cloruro de didecil dimetil amonio 12.5% Excipientes csp 100%	S2-13-26-36/37/39-45	R34
99-100-01708	Cloruro de didecil dimetil amonio 12.5% Excipientes csp 100%	S2-13-26-36/37/39-45	R34
99-100-01709	Cloruro de didecil dimetil amonio 12.5% Excipientes csp 100%	S2-13-26-36/37/39-45	R34
99-100-01710	Cloruro de didecil dimetil amonio 12.5% Excipientes csp 100%	S2-13-26-36/37/39-45	R34

99-100-01711	Cloruro de didecil dimetil amonio 10.5% Disolventes y Excipientes csp. 100%	S2-13-26-36/37/39-45	R10-34
99-100-01712	Sulfato de tetrakishidroximetil fosfonio 10.5% Excipientes csp 100%	S2-13-26-36/37/39-45	R41-43
99-100-01748	Peroxido de hidrógeno 50% Nitrato de plata 0.05% Excipientes csp 100%	S2-3-13-28-36/37/39-45	R8-34
99-00-01759	Poli (oxietileno(dimetilimino) etileno (dimetilimino) etileno dicloruro) 60%	S36/37-45	R22-36/38
99-100-01767	Ioduros de amonio cuaternarios 11.3% Coadyuvantes y agua csp 100%	S2-13-36/37-45	
00-100-01880	Cloruro de didecil dimetil amonio 14% Excipientes csp 100%	S2-13-24/25-36-45	R34
00-100-01989	Sulfato de tetrakishidroximetil fosfonio 7% Inerte c.s.p. 100%	S2-13-26-36/37-45	R36-43
00-100-01998	Monopersulfato potasico sal triple 49.8% Acido sulfamico 5% Acido malico 10% Aditivos y Coadyuvantes c.s.p. 100%	S2-13-22-24/25-36/37-45	R36/37/38
00-100-02051	Peroxido de hidrogeno (50%) 99.9% Nitrato de plata 0.05% Coadyuvantes c.s.p. 100%	S2-13-28-36/37/39-45	R8-34
00-00-02074	Hipobromito sodico estabilizado (Bromo disponible 14%)	S28-36/37-45	R31-34
00-100-02075	Hipoclorito sodico 6.22% Bromuro sodico 9.66% Hidroxido sodico, Aditivos y Disolvente c.s.p. 100%	S2-13-26-28-36/37/39-45	R31-35
00-100-02082	Cloruro de benzalconio 0.5%, Alcohol isopropilico y Excipientes c.s.p. 100%	S2-13-23-24/25-45	R10-36-67
00-100-02083	Cloruro de tributil tetradecil fosfonio 96%	S36/37/39	R22-34
00-100-02084	Cloruro de tributil tetradecil fosfonio 1.72% Excipientes c.s.p. 100%	S2-13-24/25-45	
00-100-02085	Cloruro de tributil tetradecil fosfonio 6% Excipientes c.s.p. 100%	S2-13-24/25-45	R36/38

00-00-02103	Bromuro de sodio 43.67% Coadyuvantes y Disolvente c.s.p. 100%	S28-36/37-45	R36/37/38
00-100-02108	Clorometilisotiazolonas 2.6% Excipientes c.s.p. 100%	S2-13-24-37-45	R43
00-100-02138	Dibromonitropropionamida 97.6%	S22-26-36/37/39-45	R22-26-38-41-43
00-100-02139	2-2-dibromonitropropionamida 20% Disolvente c.s.p. 100%	S2-13-26-37/39-45	R20/22-38-41-43
01-100-02146	2-hidroxibifenilo 5% Alcohol y Excipientes c.s.p. 100%	S2-13-26-37-45	R11-36
01-100-02149	Diclorofeno sodico 84% Excipientes c.s.p. 100%	S2-13-26-37-45	R22-36
01-100-02150	Sulfato de tetrakishidroximetilfosfonio 14% Excipientes c.s.p. 100%	S2-13-24-26-37/39-45	R41-43
01-100-02151	Cloruro de didecildimetilamonio 50% Alcohol isopropilico y Excipientes c.s.p.	S2-13-26-36/37/39-45	R10-22-34-67
01-00-02166	5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3- ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1) 14% Aditivos e Inertes c.s.p. 100%	S26-28-36/37/39-45	R20/21/22-34-43
01-100-02167	5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3- ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1) 1.4% Inertes y Agua c.s.p. 100%	S2-13-24-37-45	R34-43
01-100-02168	5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3- ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1) 0.14% Inertes y Agua c.s.p. 100%	S2-13-24-37-45	R36/38-43
01-100-02216	Cloruro de didecil dimetil amonio 7.5% Excipientes c.s.p. 100%	S2-13-24/25-37-45	R36/38
01-100-02217	Cloruro de didecil dimetil amonio 7.5% Excipientes c.s.p. 100%	S2-13-24/25-37-45	R36/38
01-100-02218	Cloruro de didecil dimetil amonio 7.5% Excipientes c.s.p. 100%	S2-13-24/25-37-45	R36/38
01-100-02219	Cloruro de didecil dimetil amonio 7.5% Excipientes c.s.p. 100%	S2-13-26-37-45	R36/38
01-100-02220	Cloruro de didecil dimetil amonio 7.5% Excipientes c.s.p. 100%	S2-13-24/25-37-45	R36/38
01-100-02235	Bronopol 5.5% Mezcla de 2-metil-4-isotiazolin- 3-ona y de 5-cloro-2-metil-4-	S2-13-26-36/37/39-45	R22-34-43

	isotiazolin-3-ona (3:1) 2.5% Inertes y Agua c.s.p. 100%		
01-100-02247	Peroxido de hidrogeno (100%) 50% Nitrato de plata 0.065% Coadyuvantes y Agua c.s.p. 100%	S1/2-3-13-28-36/37/39-45	R8-34
01-100-02499	WSPC 10% Excipientes c.s.p. 100%	S2-13-24/25-37-45	

1.5.5 La “Enfermedad de los Legionarios”

El nombre de “Enfermedad de los Legionarios” se acuñó en 1976 después de que una enfermedad respiratoria afectó a un grupo de delegados que asistieron a una convención en Filadelfia, convocados por la Legión Americana de Pensilvania. A partir de este momento, la bacteria responsable de la enfermedad fue aislada y se la denominó como *Legionella pneumophila* (Figura 1.5.5-1). En realidad existen dos enfermedades distintas, la Enfermedad de los Legionarios y la Fiebre de Pontiac, asociadas con especies de *Legionella*, la primera que provoca una severa neumonía y la segunda que no lo hace. No está claro que el mismo agente causal pueda producir las dos enfermedades.

La bacteria responsable de la enfermedad pertenece al género *Legionella*. Hay aproximadamente 35 especies de *Legionella* conocidas para producir la enfermedad. Normalmente se encuentran en cualquier ambiente acuático, pueden sobrevivir durante varios meses en un ambiente húmedo y se pueden multiplicar en presencia de algas y materia orgánica.

Figura 1.5.5-1 Imagen microscópica de *Legionella pneumophila*.

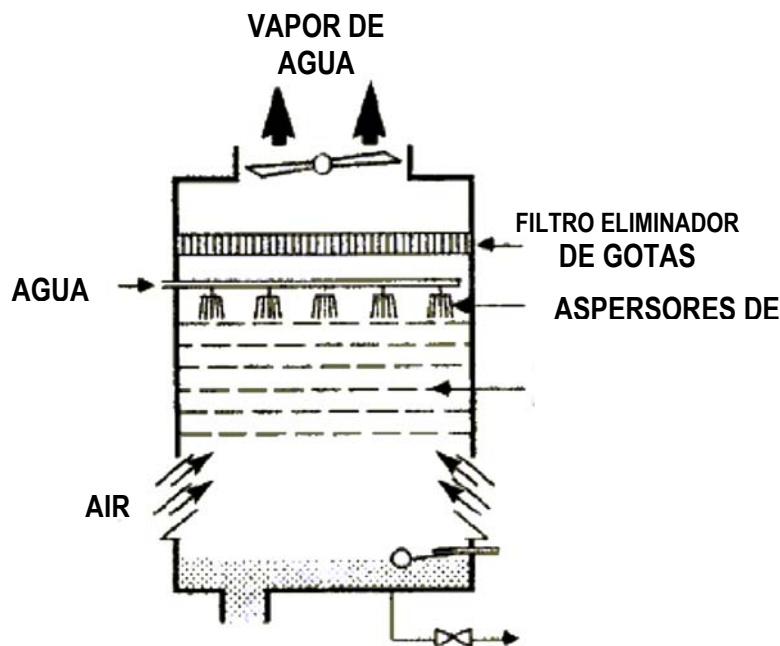


La enfermedad normalmente comienza con dolor de cabeza, dolor muscular y malestar general. Los síntomas continúan con fiebre alta (40°-40.5 °C) y temblores. Pueden aparecer náuseas, vómitos y diarrea. Al segundo o tercer día, la tos seca empieza y el dolor del pecho puede aparecer. La dificultad respiratoria es un síntoma común en los afectados. La mayoría de los pacientes desarrollan neumonía, los bronquios se llenan de fluido o pus y se reduce considerablemente la capacidad de respiración. La neumonía, como resultado de la enfermedad, es similar a la neumonía desarrollada por otras causas, por lo que los ensayos de laboratorio son necesarios para un diagnóstico seguro. Los cambios mentales, como la confusión, desorientación, alucinación y pérdida de memoria, pueden ocurrir a una magnitud desproporcionada a la gravedad de fiebre. La recuperación completa precisa varias semanas, y aproximadamente 5-15% de los casos conocidos de enfermedad han sido fatales.

La transmisión de enfermedad no es conocida completamente. La presencia normal de *Legionella* en el medioambiente (agua y tierra) no se asocia automáticamente con una erupción de la enfermedad. Parece ser que el microorganismo, para producir la enfermedad, debe alcanzar los pulmones. La inhalación de partículas pequeñas de agua contaminada (aerosoles) o de tierra parece ser la clave de transmisión. La evidencia de transmisión persona a persona no se ha encontrado. Por tanto, la atención ha sido enfocada a los sistemas de ventilación. La *Legionella* puede crecer en el agua templada

estancada que, habiendo contaminado los conductos aéreos por medio de gotitas de agua contaminada, se transportan por todo el edificio y, si estas gotas son lo suficientemente pequeñas, son inhaladas y pasan directamente al pulmón.

Figura 1.5.5-2 Esquema de una Torre de Refrigeración.

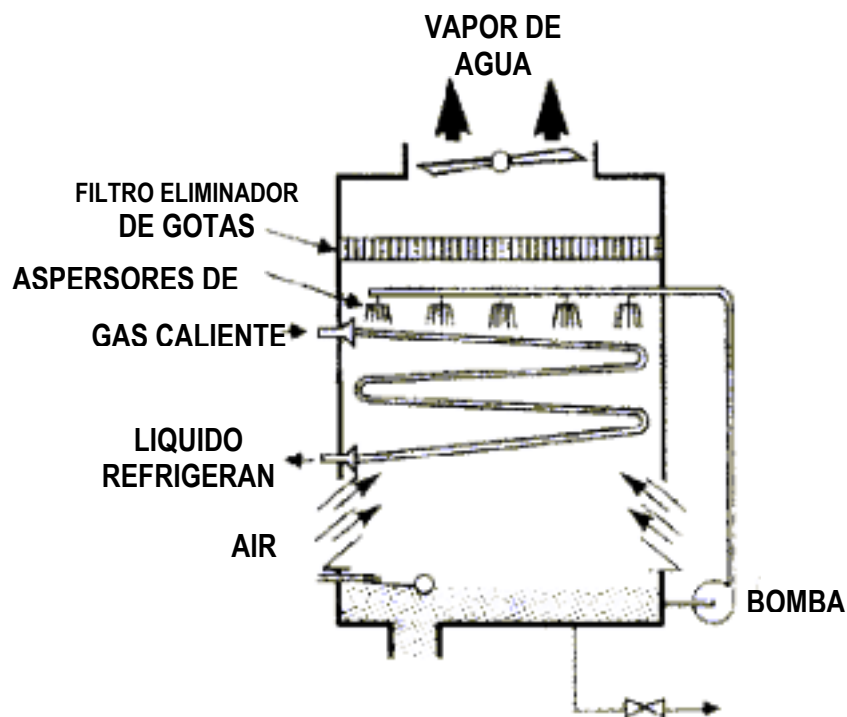


Las torres de refrigeración (Figura 1.5.5-2) son parte de los sistemas del acondicionamiento de aire, y se usan enfriar el agua y disipar el calor no deseado a la atmósfera a través de la evaporación de agua. Los flujos de agua son de naturaleza caliente en la parte superior de la torre de refrigeración, a través de las boquillas de emisión. Mientras el agua atraviesa estas boquillas, se forman las gotitas diminutas aerotransportadas, proporcionando el contacto máximo entre el agua y el aire circulante a través de la torre. Para impedir que las gotitas se unan y forman gotas más grandes, se ponen barras de salpicadura debajo de las boquillas. Cuando se producen fallos en la torre de refrigeración, parte del agua se evapora, y el consumo de energía necesario para dicha evaporación hace que el agua restante se enfríe y sea arrastrada a través de la torre. Esta evapotranspiración es reducida mediante un eliminador colocado en la parte superior de la torre. El agua fresca almacenada al fondo de la torre se bombea posteriormente en otro ciclo. La *Legionella* crece

fácilmente en el agua, sobre todo si algas y materia orgánica están presentes en el medio, se dispersa al producirse los procesos de aerosolización o evaporación y puede entrar en el sistema de aire acondicionado. Se ha encontrado en tanques del agua caliente, cabezas de ducha, grifos, manantiales, etc. No es conocido si la *Legionella* penetra en el agua de un edificio por el agua canalizada, o si lo hace por torres de refrigeración contaminadas adyacentes, aunque las dos vías pueden ser posibles.

Los condensadores de evaporación (Figura 1.5.5-3) poseen similares características de construcción y funcionamiento que las torres de refrigeración, y por tanto la problemática con respecto a la *Legionella* es prácticamente la misma.

Figura 1.5.5-3 Esquema de un Condensador de Evaporación.



La enfermedad de los legionarios afecta principalmente a personas de mediana edad, aunque se han informado casos en todos los grupos de riesgo. La enfermedad frecuentemente aparece en personas cuya resistencia a la infección es reducida, pero aparentemente se encuentran saludables. Las personas que padecen cáncer o enfermedades renales crónicas están en el

grupo de amplio riesgo. Otras enfermedades crónicas, como la diabetes o el alcoholismo, también parecen aumentar la vulnerabilidad a la enfermedad. El riesgo ocupacional es alto en trabajadores que desarrollan su labor en edificios sellados, y fundamentalmente aquellos que se encargan del mantenimiento de torres de refrigeración y sistemas de aire acondicionado. Algunas ocupaciones al aire libre también deben ser consideradas como de alto riesgo, sobre todo lo que concierne a movimiento de tierras, procesos de aerosolización de productos, etc.

La probabilidad de infección por *Legionella* puede ser reducida mediante unas buenas prácticas de ingeniería, basada en un correcto funcionamiento y mantenimiento de las torres de refrigeración y otros sistemas de manejo de agua. Deberían inspeccionarse periódicamente las torres de refrigeración y los condensadores de evaporación, y proceder a una correcta limpieza de éstos. Se deberían reemplazar las partes corroídas, especialmente los eliminadores, y quitar completamente las poblaciones de algas y la materia orgánica. Estas medidas no sólo controlarían el crecimiento de gérmenes, también mantendrían la eficacia del sistema. que opera. El agua de refrigeración debería ser tratada, de forma manual o mediante sistemas de tratamiento automático, de tal forma que quedara asegurada la calidad del agua circulante

Los desinfectantes normalmente usados en las torres de refrigeración son a base de cloro, dibromo-nitrilo-propionamida, o derivados del amoníaco (compuestos de amonio cuaternario) y aunque parecen eficaces en los ensayos de laboratorio, su valor en la práctica no ha sido completamente probado. Es importante que cualquier desinfectante usado en un sistema de agua de torre de refrigeración sea compatible con los materiales de construcción de la torre.

No deben construirse succiones del aire puro cerca de las torres de refrigeración, ya que los aerosoles contaminados pueden penetrar en el sistema de ventilación. Deben examinarse los filtros de aire, deben limpiarse y/o deben reemplazarse periódicamente y debe estudiarse el proceso de condensación. Deben posicionarse las torres de refrigeración para que el

resultado de la evaporación no penetre en la succión del aire puro. Deben limpiarse regularmente los tanques del agua caliente que podrían mantener las condiciones ideales el crecimiento de *Legionella*. Los sistemas de agua deben vaciarse regularmente para impedir el estancamiento de agua.

1.5.6 Desinfectantes y Riesgo Ambiental

Según la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de febrero de 1998 (D.O., 1998), relativa a la comercialización de biocidas, este grupo queda definido como “sustancias activas y preparados que contienen una o más sustancias activas, presentados en la forma en que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos”. En su Anexo V, se engloban bajo el epígrafe de Desinfectantes y Biocidas Generales, de los que reconoce 5 tipos:

- TIPO 1: BIOCIDAS PARA LA HIGIENE HUMANA. Los productos de este grupo son los biocidas empleados con fines de higiene humana.
- TIPO 2: DESINFECTANTES UTILIZADOS EN LOS ÁMBITOS DE LA VIDA PRIVADA Y DE LA SALUD PÚBLICA Y OTROS BIOCIDAS. Productos empleados para la desinfección del aire, superficies, materiales, equipos y muebles que no se utilicen en contacto directo con alimentos o piensos en zonas de la esfera privada, pública e industrial, incluidos los hospitales, así como los productos empleados como alguicidas. Las zonas de utilización incluyen, entre otras, las piscinas, acuarios, aguas de baño y otras; sistemas de aire acondicionado; paredes y suelos de centros sanitarios y otras instituciones; retretes químicos, aguas residuales, desechos de hospitales, tierra u otros sustratos (en las áreas de juegos).
- TIPO 3: BIOCIDAS PARA LA HIGIENE VETERINARIA. Los productos de este grupo son los biocidas empleados con fines de higiene veterinaria, incluidos los productos empleados en las zonas en que se alojan, mantienen o transportan animales.

- TIPO 4: DESINFECTANTES PARA LAS SUPERFICIES QUE ESTÁN EN CONTACTO CON ALIMENTOS Y PIENSOS. Productos empleados en la desinfección de equipos, recipientes, utensilios para consumo, superficies o tuberías relacionados con la producción, transporte, almacenamiento o consumo de alimentos, piensos o bebidas (incluida el agua potable) para seres humanos o animales.
- TIPO 5: DESINFECTANTES PARA AGUA POTABLE. Productos empleados para la desinfección del agua potable (tanto para seres humanos como para animales).

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

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

La caracterización del riesgo ambiental que supone la utilización de un determinado biocida, puede derivar, en general, de las propiedades y efectos

de cualquier sustancia activa o sustancia de posible riesgo presente en un biocida, y en particular de:

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

La valoración del posible riesgo toxicológico de un biocida se realiza mediante el estudio de la relación Concentración/Efecto, mediante la obtención de la PNEC, es decir, aquella concentración prevista bajo la cual no se espera efecto adverso ninguno. Esta concentración se calculará aplicando un factor de evaluación a los valores resultantes de los ensayos con organismos, por ejemplo, DL₅₀ (dosis letal 50), CL₅₀ (concentración letal 50), CE₅₀ (concentración eficaz 50), CI₅₀ (concentración que produce el 50 % de inhibición de un parámetro dado, por ejemplo, crecimiento), NOEL/C (nivel/concentración sin efecto observado) o LOEL/C (nivel/concentración con mínimo efecto observado).

Un hecho importante a tener en cuenta es lo que se ha denominado como Factor de Evaluación, entendiendo como tal una expresión del grado de incertidumbre en la extrapolación de los datos de un ensayo con un número limitado de especies al medio ambiente real. Por eso, en general, cuanto más amplios sean los datos y mayor la duración de los ensayos, menor será el grado de incertidumbre y la magnitud del factor de evaluación. Las especificaciones para los factores de evaluación se elaboran en las notas relativas a la orientación técnica que, a tal efecto, están basadas, en particular, en las indicaciones dadas en la Directiva 93/67/CEE de la Comisión, de 20 de julio de 1993 (D.O., 1993), por la que se fijan los principios de evaluación del riesgo, para el ser humano y el medio ambiente, de las sustancias notificadas de acuerdo con la Directiva 67/548/CEE del Consejo (D.O., 1967).

Para cada compartimento medioambiental se realizará una evaluación de la exposición para predecir la concentración que sea probable encontrar de cada sustancia activa o de posible riesgo presente en el biocida. Esta concentración se conoce como concentración ambiental prevista (PEC), la cual sólo será determinada en el caso de aquellos compartimentos medioambientales en los que se dan o son razonablemente previsibles emisiones, vertidos, eliminaciones o distribuciones, inclusive cualquier contribución pertinente de material tratado con biocidas. La PEC se calculará atendiendo a:

- Los datos de exposición medidos de forma adecuada.
- La forma de comercialización del producto.
- El tipo de biocida.
- El método y la tasa de aplicación.
- Las propiedades fisicoquímicas.
- Los productos de degradación/transformación.
- Las rutas probables de llegada a los compartimentos medioambientales y potencial de adsorción/desorción y degradación.
- La frecuencia y duración de la exposición.

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

1.5.6.1 Peligrosidad de los vertidos de aguas contaminadas

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

PROPIEDADES INFLAMABLES

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

PROPIEDADES CORROSIVAS

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

PROPIEDADES REACTANTES

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

PROPIEDADES TOXICAS

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

1.5.6.2 Descarga de biocidas mediante aguas residuales

Aquellas industrias que prevean realizar descargas de cualquier tipo de biocida al medioambiente, deben tener previsto el potencial de peligrosidad que dicho vertido suponga al medio acuático donde se vierte. Existen diferentes formas de predecir el impacto ambiental, todas ellas encaminadas a determinar si la concentración final en el medio representa un riesgo toxicológico, y por tanto si la utilización del biocida elegido resulta aceptable o no, pero una forma rápida y sencilla es la que a continuación se presenta. Bajo esta forma de cálculo, los parámetros que han de tenerse en cuenta para la predicción de la peligrosidad del vertido son los siguientes:

- Concentración emitida al medio.
- Concentración letal.
- Volumen emitido al medio.
- Índice de degradación.
- Factor de degradación.
- Concentración de descarga constante.
- Concentración en el medio receptor.
- Limitación.

La concentración emitida al medio se define como la concentración de la descarga del producto, en condiciones “7Q10”, y expresada en porcentaje. Resulta evidente que, para que este dato resulte útil, es necesario que su obtención se realice cuando el flujo del medio acuático donde va a ser emitido el producto se encuentre bajo condiciones adversas, es decir, cuando el caudal sea reducido. Es por ello por lo que se aplica el factor “7Q10”, que queda definido como la medio de flujo mínimo que soporta el curso de agua en un periodo de 7 días consecutivos, y que representa una media de repetición de

una vez cada 10 años. El cálculo de la concentración emitida al medio se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CEM} = \frac{\text{DD}}{(7\text{Q}10) \times [0.646] + \text{DD}} \times 100$$

El parámetro de concentración letal utilizado es aquel que aporta información acerca de aquel valor capaz de provocar la muerte del 50 % de los organismos seleccionados para la prueba, es decir, la Concentración Letal 50 (CL₅₀). Aún siendo un valor útil e imprescindible para los estudios de ecotoxicidad, debe tenerse en cuenta que desde el punto de vista toxicológico es considerada como una prueba *imperfecta*, ya que existe un amplio margen de efectos patológicos entre la ausencia de efecto y la letalidad. Además de todo ello, los resultados de la prueba no pueden considerarse como valores absolutos sino sólo orientativos, no tienen valor de seguridad puesto que no son reproducibles ni entre investigadores ni en repeticiones, no prejuzgan posibles efectos letales a concentraciones inferiores, y no pueden ser extrapolables a especies diferentes. Por tanto, el valor obtenido no puede considerarse como una constante biológica, sino únicamente un valor que por su característica de parámetro único, resulta extremadamente útil para la valoración del efecto agudo de un compuesto sobre determinados organismos. El tiempo de exposición es la principal variable a tener en cuenta en los ensayos, siendo éste variable desde periodos de 24 horas (ensayos con especies como *Artemia salina*), 48 horas (ensayos con *Daphnia* spp), o exposiciones de 96 horas generalmente aplicadas a ensayos con peces. El valor obtenido se expresa normalmente como miligramos/litro.

El volumen emitido representa aquel que, en su totalidad, está previsto que pase directamente al cauce receptor. Dicho valor quedará expresado en gramos de producto, por lo que resulta necesario practicar la conversión de volumen a masa.

La necesidad de conocer, por parte de la industria emisora del vertido, el tiempo que transcurrirá desde que el producto ha sido vertido hasta que se

degrada totalmente, hace imprescindible establecer un parámetro que aporte información al respecto. Es por ello por lo que se utiliza el valor de vida media, es decir, el tiempo necesario para la degradación del 50 % del producto en el medio receptor. Es este parámetro el principal para el conocimiento del índice de degradación, el cual relaciona dicha vida media con el medio mediante la siguiente fórmula:

$$ID = \frac{Ln_2}{VM} = \frac{0.69}{VM}$$

Íntimamente relacionado con el índice de degradación aparece el factor de degradación, el cual relaciona dicho parámetro con la estimación de descarga de producto, tanto en el sistema como en el punto de vertido permitido. El factor de degradación es calculado mediante la siguiente fórmula:

$$FD = \frac{DD}{VOLUMEN} + ID$$

La concentración de descarga constante queda definida como aquella concentración final resultante y dependiente del volumen de emisión del producto. Por tanto, es una relación entre los niveles de dosificación al medio por parte de la industria implicada y los valores reales de ese producto en el medio receptor. Para su cálculo resulta necesario conocer el grado de dosificación, expresado en gramos, del producto en un periodo de 24 horas, y la fórmula a aplicar para su obtención sería:

$$CDC = \frac{D}{FD \times VOLUMEN \times 3785}$$

La concentración en el medio receptor, expresada en miligramos/litro, es aquella que se produce en el cauce donde ha sido vertido el producto, bajo condiciones de escasa fluidez, es decir, cuando el caudal del medio es el

menor previsible dentro de su ciclo. Para la obtención de este dato se relacionan los parámetros ya obtenidos anteriormente acerca de la concentración en el medio receptor, expresado en gramos, y la concentración de descarga constante, mediante la fórmula:

$$\text{CMR} = \frac{\text{CDC} \times \text{CEM} (\%)}{100}$$

Se entiende como limitación aquella que ha sido establecida, y por tanto regulada, por los organismos competentes para ello. Por tanto, son límites legales establecidos para cada uno de los compuestos, y serán expresados en miligramos/litro. La limitación está directamente relacionada con la vida media de los compuestos y se expresa bajo el parámetro conocido de la Concentración Letal 50 (CL₅₀), de tal forma que cuando la vida media de un compuesto no supera los 4 días, la limitación se establece como 0.5 x CL₅₀; mientras que si la vida media del producto supera estos 4 días, o simplemente no es conocida, la limitación quedaría como 0.01 x CL₅₀.

Una vez conocidos estos datos, sólo restaría la toma de decisión dependiente del resultado de la valoración, sobre si el compuesto vertido posee la seguridad de que no representará un peligro para el medioambiente. Esta decisión se establece sobre la base de la relación entre la concentración del producto en el medio receptor y las limitaciones legales establecidas, de tal forma que si esta concentración supera los límites establecidos, el compuesto se consideraría inaceptable para su uso.

1.5.7 Riesgo Ambiental de los Productos Utilizados para Desinfección de Torres de Refrigeración

Si se tiene en cuenta la falta de información, en cuanto a las acciones ecotoxicológicas de estos productos, o cuando menos el carácter restringido de estos datos, el objetivo de este trabajo es recopilar cuando menos los efectos ecotoxicológicos de los principios activos incluidos en sus formulados,

fundamentalmente de cara al riesgo ambiental que suponen sobre medioambientes acuáticos.

1.5.7.1 Compuestos a partir de amonio cuaternario (quats)

1.5.7.1.1 Relación entre la toxicidad de los QUATs y los valores de pH y temperatura

En términos toxicológicos, cuando se hace referencia a los compuestos amónicos en el medio ambiente se plantea un equilibrio entre NH_3 (no ionizado) y NH_4^+ (ionizado), de tal forma que los test para su determinación se plantean de forma global ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$). La toxicidad de estos compuestos es atribuida fundamentalmente a la forma no ionizada, siendo la toxicidad dependiente del pH del medio, y así, cuanto más alto sea el pH, y se incremente la temperatura, mayor toxicidad plantea la presencia de NH_3 en el medio (USEPA, 1985a). Estudios de valoración de la presencia de NH_3 en medios acuáticos de agua dulce, se presentan en la Tabla 1.5.7.1.1-1. Tomando como base una temperatura de 30 °C, y variando los valores de pH, la toxicidad del amonio en salmónidos se presenta en la Tabla 1.5.7.1.1-2.

Tabla 1.5.7.1.1-1 Relación entre los niveles de NH_3 , mostrado como porcentaje de amonio total, y diferentes valores de pH y temperatura.

°C	[NH_3] (% amonio total)				
	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5	pH 8.0	pH 8.5
20	0.13	0.40	1.24	8.82	11.2
25	0.18	0.57	1.77	5.38	15.3
28	0.22	0.70	2.17	6.56	18.2
30	0.26	0.80	2.48	7.46	20.3

Tomando como referencia los valores tóxicos en peces de agua dulce a tiempos de 1 hora y 4 días, la recomendación de las principales agencias medioambientales es que los niveles establecidos no excedan más de una vez cada tres años, con el objetivo de que el ecosistema sea capaz de recuperarse del estrés causado por la contaminación con compuestos amónicos .

Tabla 1.5.7.1.1-2 Toxicidad de compuestos amónicos sobre salmónidos, dependientes del pH y tiempo de exposición.

pH	tiempo exposición	LC ₅₀ (mg/l)	
		amonio total	NH ₃
6.5	1 hora	14.3	0.036
	4 días	0.73	0.002
7.0	1 hora	11.6	0.093
	4 días	0.74	0.006
7.5	1 hora	7.3	0.181
	4 días	0.74	0.019
8.0	1 hora	3.5	0.26
	4 días	0.47	0.035
8.5	1 hora	1.3	0.26
	4 días	0.17	0.035

De los datos presentados, se puede deducir que las concentraciones de amonio total en un medio que posea un pH bajo son mejor toleradas por la fauna piscícola que cuando dicho pH aumenta, mientras que las concentraciones de NH₃ resultan más peligrosas cuanto más bajo sea el valor de pH. En segundo lugar, el establecimiento de un factor 10, es decir, asumir como valor de seguridad 1/10 de los valores establecidos, sería una medida conveniente para prevenir efectos adversos en la fauna piscícola; y así, tomando los valores presentados para salmónidos, concentraciones de 0.1 mg/l para exposiciones cortas, y 0.02 mg/l para exposiciones de 4 días, permitirían obtener dichos márgenes de seguridad.

1.5.7.1.2 Efectos ecotoxicológicos de los compuestos a partir de amonio cuaternario

1.5.7.1.2.1 Medioambiente de agua dulce

Los estudios realizados en fitoplacton, utilizando algas verdes del género *Dunaliella*, demostraron que estos compuestos eran capaces de provocar cambios de tipo bioquímico en estas algas, estableciendo para ellos una EC₅₀₍₂₄₎ entre 0.38 y 0.79 mg/l, cuando se aplicaban ensayos de tipo estático.

Estas experiencias establecieron que la concentración de seguridad, por debajo de la cual no se producían dichos cambios, era de 0.2 mg/l, la misma necesaria para evitar procesos letales (Utsunomiya y col., 1997b). Cuando se aplicó sobre *Chlorella pyrenoidosa*, pudo observarse como se reducía la población de estas algas, estableciendo una $EC_{50(96)}$ de 0.28 mg/l (Utsunomiya y col., 1997a). Lewis & Hamm (1986) realizaron estudios sobre algas de la especie *Microcystis aeruginosa*, aplicando ensayos estáticos para conocer el descenso de la población cuando se enfrentaban a estos compuestos, y obteniendo una $EC_{50(96)}$ de 0.05 mg/l, y de 0.07 mg/l cuando estas experiencias se realizaban con diatomeas de la especie *Navicula pelliculosa*. Roghair y col. (1991, 1992) realizaron trabajos de evaluación del riesgo ecotoxicológico con estos compuestos, aplicándolos sobre algas verdes de la especie *Scenedesmus pannonicus*, y llegaron a la conclusión de que, a 4 días de exposición y mediante ensayos de tipo estático para determinación de la disminución de la población de algas, la LOEC se cifraba en 1 mg/l, mientras que la NOEC se situaba entre 0.56 y 1 mg/l.

Con respecto a ensayos sobre *Daphnia magna*, en la literatura sólo ha sido posible encontrar el trabajo de Allen y col. (1995). Estos autores realizaron experiencias, tanto a nivel estático, estudiando cambios tóxicos referentes a la inhibición del proceso de alimentación de estos individuos, que determinó una $EC_{50(24)}$ de 0.38 mg/l; como del efecto letal de estos compuestos sobre los biosensores, mediante ensayos con renovación del medio, y que dio como resultado una $LC_{50(48)}$ de 0.49 mg/l.

Roghair y col. (1991) también estudiaron los efectos de los compuestos amonio cuaternarios sobre larvas acuáticas de insectos de la especie *Chironomus thummi*. En estudios de letalidad, aplicando ensayos con renovación del medio, la $LC_{50(96)}$ era de 5.6-10 mg/l. Un resumen de los datos de letalidad, aportados por estos autores, se incluye en la Tabla 1.5.7.1.2.1-1.

Tabla 1.5.7.1.2.1-1 Resultados de letalidad de compuestos de amonio cuaternario sobre *Chironomus thummi*.

DATO	EFEECTO	T(hr)	ENSAYO	[mg/l]
LC ₅₀	MORT	24	R	17
LC ₅₀	MORT	48	R	12
LC ₅₀	MORT	72	R	11
LC ₅₀	MORT	96	R	10
LC ₅₀	MORT	168	R	3.9-9.2
LC ₅₀	MORT	336	R	4-4.8
LC ₅₀	MORT	504	R	3.7-4
LC ₅₀	MORT	672	R	3.3-4
EC ₅₀	BEH	96	R	7.5
EC ₅₀	NOC	24	R	5.6-10
EC ₅₀	NOC	48	R	5.6-10
EC ₅₀	NOC	72	R	5.6-10
EC ₅₀	NOC	96	R	5.6-10
EC ₅₀	NOC	168	R	2.3-3.9
EC ₅₀	NOC	336	R	1-4
EC ₅₀	NOC	504	R	1-4
NOEC	DVP	672	R	1
NOEC	GRO	672	R	1
NOEC	MORT	24	R	10
NOEC	MORT	48	R	5.6
NOEC	MORT	72	R	5.6
NOEC	MORT	96	R	10
NOEC	MORT	168	R	3.2
NOEC	MORT	336	R	1
NOEC	MORT	504	R	1
NOEC	MORT	672	R	1

Roghair y col. (1991) también realizaron experiencias sobre moluscos de agua dulce mediante ensayos con renovación del medio, concretamente sobre la especie *Lymnaea stagnalis*. De sus experiencias se desprende que la LC₅₀₍₉₆₎ era de 18 mg/l, si bien dicha concentración disminuía hasta 1 mg/l cuando los organismos eran expuestos durante 21 días. La exposición durante 24 horas presentó una LC₅₀ superior a 56 mg/l. Del trabajo realizado también se desprende que la EC₅₀₍₉₆₎ relativa al descenso de la población, quedaba situada en 0.05-0.07 mg/l, si bien este tipo de ensayos los realizaron mediante sistemas estáticos. Ahora sí, con renovación del medio, establecieron una NOEC relativa a la alteración reproductora de los individuos, en 3.2 mg/l para tiempos de exposición de 28 días.

Experiencias realizadas con peces de la especie *Ictalurus punctatus*, con respecto al factor letal de estos compuestos, pusieron en evidencia una $LC_{50(48)}$ de 1.12 mg/l, pasando a 1.28 mg/l si las experiencias, de tipo estático, se realizaban a 24 horas (Willford, 1966). Este mismo autor estudió el efecto letal sobre *Lepomis macrochirus*, obteniendo concentraciones de 1.68 y 2.1 mg/l para la LC_{50} a 48 y 24 horas, respectivamente. Sin embargo, estos datos no son coincidentes con los obtenidos por Cope (1965), ya que este autor obtuvo concentraciones de 0.31, 0.51 y 0.55 mg/l, correspondientes a la LC_{50} a 96, 48 y 24 horas, respectivamente.

Bills y col. (1993), estudiando la sensibilidad de determinados peces a productos químicos usados en acuicultura, estudiaron el efecto de estas sustancias sobre la especie *Morone saxatilis*. De sus trabajos se desprende que la $LC_{50(96)}$ variaba desde 0.5 hasta 1.9 mg/l. Con respecto a otros datos sobre letalidad, concentraciones de 1.4-2.7 mg/l correspondían a $LC_{50(24)}$, y aproximadamente 0.5-1.5 mg/l a la correspondiente a 72 horas de exposición. También realizaron experiencias a tiempos muy cortos de exposición, obteniendo una LC_{50} de 6-16.4 mg/l cuando los individuos se exponían durante menos de 1 hora.

Estudios realizados con *Oncorhynchus mykiss* demostraron la alta toxicidad de estos compuestos sobre estos peces. Willford (1966) determinaron una CL_{50} de 3.24 mg/l para exposiciones de tipo estático de 24 horas, y 2.57 mg/l para exposiciones de 48 horas. Por su parte, Johnson & Finley (1980) establecieron una $CL_{50(96)}$ de 1.2 mg/l. La exposición durante 3 días sobre *Oncorhynchus kisutch* estableció una NOEC de 10 ppm, siendo la LOEC de 17.8 ppm, y por tanto la concentración máxima permisible se encontraría entre 10 y 17.8 ppm (Holland y col., 1960). Otros datos ecotoxicológicos, referentes a peces de agua dulce, se resumen en la Tabla 1.5.7.1.2.1-2.

Tabla 1.5.7.1.2.1-2 Efectos ecotoxicológicos de compuestos amonio cuaternarios sobre peces de agua dulce.

ESPECIE	DATO	EFEECTO	T(hr)	ENSAYO	[mg/l]	REFERENCIA
<i>Oncorhynchus mykiss</i>		FDB	0.48	S	25	Rodgers y col. (1951)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>		MORT	0.96		20	Rucker & Whipple (1951)
<i>Oncorhynchus nerka</i>		MORT	0.96		20	Rucker & Whipple (1951)
<i>Oncorhynchus nerka</i>		MORT	2.88	P	2-2.5	Rucker (1948)
<i>Oryzias latipes</i> (huevos)		HIS	1344	R	0.32-5.6	Wester & Roghair (1992)
<i>Rasbora heteromorpha</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	2.45	Tooby y col. (1975)
<i>Rasbora heteromorpha</i>	LC ₅₀	MORT	48	S	1.1	Tooby y co. (1975)
<i>Rasbora heteromorpha</i>	LC ₅₀	MORT	96	S	0.62	Tooby y co. (1975)
<i>Salmo trutta</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	2.95	Willford (1966)
<i>Salmo trutta</i>	LC ₅₀	MORT	48	S	2.05	Willford (1966)
<i>Salvenius fontinalis</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	2.7-4.13	Willford (1966)
<i>Salvenius fontinalis</i>	LC ₅₀	MORT	48	S	1.95-3.4	Willford (1966)

1.5.7.1.2.2 Medioambiente de agua marina

Ensayos a distintas concentraciones de salinidad, sobre algas verdes del género *Dunaliella*, demostraron que bastaban concentraciones de 0.71-0.79 mg/l para provocar cambios bioquímicos, fundamentalmente en lo referente al proceso fotosintético, al 50 % de la población expuesta (Utsunomiya y col. (1997b).

También se han realizado ensayos con organismos dinoflagelados de la especie *Gymnodinium brevis*. Kutt & Martín (1974) establecieron que concentraciones de 12.5 mg/l, en periodos de exposición estática de 48 horas, provocaban la mortalidad al 27 % de la población, y que concentraciones de

66.67 mg/l hacía decrecer significativamente la población de estos dinoflagelados.

Sobre moluscos marinos, concretamente sobre *Mercenaria mercenaria*, Davis & Hidu (1969) realizaron ensayos tanto de letalidad como de las alteraciones que la exposición a estos compuestos, provocaba sobre los biosensores. De esta forma, quedó establecida una LC₅₀ a 12 días de exposición mediante ensayos con renovación del medio, de 0.14 mg/l. Los estudios mediante ensayos estáticos a 48 horas puso en evidencia que la LC₅₀ para alteraciones del desarrollo se cifraba en 0.19 mg/l. Con respecto al parámetro de crecimiento, estos mismos ensayos a 12 días de exposición demostraron que la concentración mínima, por debajo de la cual no aparecían estos efectos, era de 0.1 mg/l.

1.5.7.1.3 Riesgo ecotoxicológico del Cloruro de benzalconio

1.5.7.1.3.1 Medioambiente de agua dulce

La exposición de cloruro de benzalconio sobre ecosistemas de agua continentales ha puesto en evidencia que este compuesto resulta altamente tóxico para lá mayoría de las especies estudiadas. Así, experiencias realizadas por Canton y col. (1983) mediante la exposición de este compuesto frente a *Daphnia magna* establecieron la CL₅₀₍₄₈₎ en 39-160 µg/l, cuando las experiencias se realizaban mediante ensayos estáticos, si bien se podían observar alteraciones del comportamiento en el 50 % de la población cuando eran expuestas a concentraciones de 18 µg/l, en este mismo tipo de ensayo y en el mismo tiempo. Los ensayos de letalidad a 24 horas sobre esta misma especie establecieron la CL₅₀₍₂₄₎ entre 180 y 230 µg/l. Mayor resistencia a este compuesto demostraron poseer camarones de la especie *Macrobrachium rosenbergii*, sobre los que quedó establecida una CL₅₀₍₂₄₎ de 2 mg/l (Liao & Guo, 1990).

El riesgo sobre especies piscícolas de agua dulce ha quedado establecido mediante estudios realizados por diferentes autores. De nuevo Canton y col. (1983) se propusieron determinar el efecto del cloruro de benzalconio, pero esta vez sobre peces de la especie *Poecilia reticulata*, y mediante ensayos con renovación de medio, y de los resultados obtenidos se obtiene la conclusión de que no aparecen variaciones significativas dependientes del tiempo de exposición, ya que estos autores establecieron la $CL_{50(96)}$ en 1.3-3.4 mg/l, siendo de 2.4-5.4 mg/l, 1.6-4.5 mg/l y 1.4-4.2 mg/l para exposiciones de 24, 48 y 72 horas, respectivamente. Estos mismos autores también realizaron estudios sobre peces de la especie *Oryzias latipes* con resultados similares, y así, la exposición a cloruro de benzalconio sobre estos individuos, mediante ensayos de renovación, establecieron una $CL_{50(96)}$ de 2.4-6.1 mg/l, y de nuevo quedó demostrado la ausencia del factor tiempo de exposición, ya que no se producían variaciones significativas en cuanto al efecto letal con exposiciones de 24 (4-7 mg/l), 48 (2.9-6.9 mg/l) o 72 (2.5-4 mg/l) horas. Sin embargo, los individuos de estas especie presentaban graves problemas de comportamiento frente a la exposición al compuesto, siendo suficientes concentraciones de 0.75 mg/l, en ensayos con renovación, para afectar al 50 % de la población expuesta.

1.5.7.1.3.2 Medioambiente de agua marina

En ecosistemas marinos, la acción del cloruro de benzalconio sigue prácticamente los mismos parámetros ecotoxicológicos que los establecidos para aguas continentales, si bien aparece un cierto grado de mayor resistencia por parte de crustáceos marinos a este tipo de contaminación.

1.5.7.2 Compuestos Donantes de Cloro

1.5.7.2.1 Acido tricloroisocianúrico

Los isocianuros clorados han sido registrados para su uso como desinfectantes, alguicidas, fungicidas y fungiestáticos, bactericidas y bacterioestáticos, etc. En un primer momento, su aplicación se centraba en la

desinfección y acción alguicida sobre piscinas y sistemas de refrigeración. En USA fueron registrados por primera vez en 1958, y en 1980 la EPA solicitó información adicional acerca de las alteraciones renales que provocaba la exposición a estos compuestos.

Su inclusión dentro de la categoría I, en cuanto a sus efectos tóxicos agudos, se debe a la capacidad que posee de provocar toxicidad por vía dérmica y una muy importante irritación ocular a bajas concentraciones. A nivel subcrónico, provoca efectos en el tracto urinario de ratas y ratones. Los estudios de cronicidad indican que no es carcinógeno, teratógeno ni mutagénico. Es un compuesto que se absorbe y distribuye rápidamente, y finalmente se excreta prácticamente sin metabolizar.

Al no esperarse exposiciones a través de la dieta, no han quedado establecidas restricciones ni tolerancias. Sin embargo, la FDA regula su uso para superficies que estén en contacto con alimentos. Algunas exposiciones ocupacionales y residenciales a estos compuestos pueden producirse dependiendo de su uso, fundamentalmente en piscinas y torres de refrigeración. Por ello, los bañistas y las personas expuestas no deberían ponerse en contacto con las superficies tratadas que aún contengan concentraciones superiores a 3 ppm (USEPA, 1992).

El ácido tricloroisocianúrico (TCIC) es un compuesto que está descrito como irritante primario, y constituye un principio activo de formulaciones utilizadas como desinfectantes. Presenta una DL_{50} en rata, cuando es administrado por vía oral, de 406 mg/kg p.v., aunque está establecido una dosis mayor, en torno a 750 mg/kg p.v. para mamíferos. La DL_{LO} , cuando la aplicación es por vía oral, se establece en 1900 mg/kg p.v. para conejo, entrando estos animales durante el desarrollo de las pruebas en coma, y en 3570 mg/kg p.v. para humanos, padeciendo una sintomatología de tipo gastrointestinal, con ulceraciones gástricas.

Los estudios de toxicidad por inhalación, utilizando ratas como animales de experimentación, dieron como resultado que la LC es superior a 2 gr/m³/1 hora.

En los ensayos de irritación dérmica y ocular (Standard Draize Test) en conejo, el TCIC a concentraciones de 500 mg presenta una reacción moderada cuando es aplicado en piel, y severa cuando se administra en el ojo. La DL_{LO}, por administración dérmica en conejo, se establece en 5010 mg/kg p.v., y durante el desarrollo del ensayo los animales padecieron somnolencia y pérdida de apetito.

1.5.7.2.2.1 Efectos ecotoxicológicos del Acido triclorsiocianúrico

El TCIC es un compuesto hidrofílico que comúnmente se encuentra como contaminante de aguas, tanto subterráneas como superficiales. El grado de peligrosidad medioambiental del TCIC depende de los niveles de utilización. Un uso moderado de TCIC, aplicado de forma directa en agua, puede llegar a suponer una concentración de 2.7 µg/l, siendo claramente una concentración susceptible de provocar alteraciones en la vegetación acuática y en invertebrados acuáticos.

Aunque el TCIC presenta una baja toxicidad tanto en aves como en mamíferos o abejas, estudios en medio acuático lo catalogan con una toxicidad entre moderada y alta para la fauna existente en este medio. Así, las especies acuáticas más sensibles, como son los copépodos marinos, presentan una LC₅₀₍₉₆₎ de 94 µg/l., aunque a concentraciones inferiores pueden provocar alteraciones que desequilibrarían el medio, y a modo de ejemplo se puede indicar que concentraciones en el medio acuático de 20 µg/l reducen significativamente la eclosión en huevos de mosca enana (*Chironomus tentans*).

De este compuesto cabe esperar efecto tóxico sobre la vegetación tanto acuática como terrestre, incluido el grupo de algas. Concentraciones de 1-5 µg/l, en un corto espacio de tiempo (varios días) provocan una inhibición

reversible de la fotosíntesis de plantas acuáticas, si bien la concentración debe aumentar hasta 10 µg/l para causar daños más extensos en la población vegetal acuática. Exposiciones a corto plazo de 100 µg/l de TCIC sobre algas provocan una drástica reducción en la producción de oxígeno de éstas, si bien a menores concentraciones la población de algas sufren un estímulo encaminado a aumentar la actividad de fotosíntesis. En la Tabla 1.5.7.2.1-1 se resumen los datos de toxicidad en diferentes especies, fruto de la exposición con TCIC.

Tabla 1.5.7.2.1-1 Resultados de los estudios de toxicidad con TCIC.

TEST	ESPECIE	LC ₅₀ (mg/l)
Toxicidad Aguda (96 h)	<i>Salmo gairdneri</i>	4.5-24
Toxicidad Aguda (96 h)	<i>Lepomis macrochirus</i>	8-42
Toxicidad Aguda (48 h)	<i>Daphnia magna</i>	6.9
Toxicidad Aguda (48 h)	<i>Chironomus tentans</i>	0.72
Toxicidad Aguda (96 h)	<i>Mysidopsis bahia</i>	1
Toxicidad Aguda (96 h)	<i>Acartia tonsa</i>	0.094

Los estudios sobre realizados con formulados que contengan TCIC (Foster, 1981; OPP, 1995), revelan el riesgo ambiental que supone la exposición al producto. Experiencias realizadas mediante la exposición a *Corbicula mailensis*, molusco de agua dulce de origen asiático, revelan una LC₅₀₍₂₄₎ de 0.6 mg/l. Ensayos de tipo estático con *Lepomis macrochirus* presentaron una LC₅₀₍₉₆₎ entre 0.46 y 1.72 ppm, mientras que cuando el ensayo era de flujo, la LC₅₀₍₉₆₎ pasaba a ser de 0.28 ppm.

Estudios realizados en patos de 14 días de edad (*Anas platyrhynchos*), incorporando el producto al alimento durante distintos periodos de tiempo, dieron como resultado una variabilidad de efecto (OPP, 1995). Así, exposiciones a 14 días presentaron una DL₅₀ entre 1916 y >10000 mg/kg p.v., dependiendo del formulado. A 8 días de exposición, la DL₅₀ aumentaba (5620 - >10000 mg/kg p.v.).

1.5.7.3 Otros compuestos derivados halogenados

1.5.7.3.1 Bromuro sódico

El bromuro sódico es un compuesto que se disuelve muy bien en agua, y los iones bromuro aparecen de forma natural en prácticamente todos los organismos, no poseyendo efectos adversos a bajos niveles. Se debería llegar a concentraciones muy altas para provocar un cuadro agudo, que cursa con náuseas y vómitos. De igual manera. Su toxicidad dérmica es muy baja y no se comporta como irritante de la piel. Tampoco se han podido observar efectos tras exposiciones crónicas al producto.

El uso de estos compuestos en forma de solución sanitaria sobre superficies de contacto con alimentos hace que sea considerado como producto de uso aditivo alimentario indirecto, y por ello esta faceta ha sido regulada por la FDA. No se espera la existencia de residuos alimentarios, por lo que tampoco han sido establecidas tolerancias en cuanto a límites de residuos. Tampoco se espera que puedan producirse exposiciones ocupacionales o residenciales.

Las revisiones acerca del efecto medioambiental de los bromuros indican que, manteniendo su uso de interior, no existe riesgo de aparición de efectos adversos. Sin embargo, en 1984 fue requerida por la EPA la realización de pruebas, fundamentalmente de bromuro potásico, para determinar sus efectos ecológicos de cara a caracterizar la toxicidad en aves y peces. Estos estudios indicaron que era un compuesto prácticamente atóxico.

1.5.7.3.1.1 Medioambiente de agua dulce

Pocos datos existen en la literatura acerca del efecto tóxico sobre organismos del bromuro sódico. De hecho, sólo ha sido posible encontrar dos trabajos que haya abordado el tema. El primero se refiere a los estudios realizados por Ewell y col. (1986), en los que practican evaluaciones simultáneas de los efectos agudos sobre diferentes especies.

Interiormente a estos trabajos, Terhaar y col. (1972) estudiaron la toxicidad del bromuro sódico en peces de la especie *Pimephales promelas*, difiriendo en lo fundamental con respecto a la misma especie estudiada por los anteriores autores. Efectivamente, Terhaar y col. (1972) establecían la $CL_{50(96)}$ en 672 mg/l, muy por encima de los 30 mg/l obtenidos por Ewell y col. (1986). También dejaban establecida la CL_{50} en ensayos a 3.75 horas en 6715 mg/l, y la misma concentración aparecía como aquella que no provocaba letalidad tras 24 h de exposición.

1.5.7.3.1.2 Medioambiente de agua marina

No ha sido posible localizar ningún trabajo que indique la existencia de pruebas toxicológicas con individuos biosensores de estuario o marinos, a los que se hubiera expuesto a bromuro sódico.

1.5.7.4 Donantes de formaldehído

1.5.7.4.1 Sulfato de tetrakis(hidroximetil) fosfonio

Estudios realizados en ratas y ratones por exposición durante 14 días, a concentraciones entre 18.8 y 300 mg/kg p.v. por vía oral, dieron como resultado una alta mortalidad de los animales a las dosis más altas, presentando éstos procesos paráliticos límbicos en las extremidades posteriores.

Estudios desarrollados a tiempos de 13 semanas, en rango de dosis de 1.5-60 mg/kg para ratas, y 1.5-135 mg/kg p.v. para ratones, presentaron igualmente alta mortalidad a las dosis altas, precedida de un cuadro de degeneración vascular de hepatocitos o necrosis hepatocelular. La parálisis límbica también estaba presente, y aparecía un cuadro de degeneración axonal. El cuadro nervioso se centraba principalmente en el nervio ciático, en la raíz dorsal de los nervios espinales caudales y en tractos del cordón espinal, particularmente en la columna dorsal del cordón lumbar.

Estudios a 2 años en rata, a dosis de 3.75-7.5 mg/kg p.v., demostraron una disminución en la supervivencia a 102 semanas para las dosis bajas, y 67 semanas para las dosis altas.

El verdadero riesgo ambiental, que supone el uso de este compuesto, reside en la capacidad de producir fosfamina (fosfuro de hidrógeno) y formaldehído cuando se pone en contacto con el medio acuático (MRI, 1978).

1.5.7.4.1.1 Riesgo ecotoxicológico derivado de la contaminación por fosfamina

La fosfamina ha sido clasificada, desde el punto de vista de toxicidad aguda, en la categoría II para efectos dérmicos en mamíferos, siendo menor su efecto por vía oral o inhalatoria (categoría IV), y no provoca sensibilización dérmica. Los estudios subcrónicos determinan que a altas dosis provoca alteraciones estadísticamente significativas en riñones y vejiga urinaria, y una disminución del peso corporal. Con respecto a su poder mutagénico, en algunos test *in vitro* provoca aberraciones cromosómicas, mientras que en otros no aparece ningún efecto mutagénico. Basado en la forma en que se aplican estos productos, los trabajadores pueden quedar expuestos a fosfamina, fundamentalmente mediante exposición dérmica, por lo que se hace necesario tomar las medidas adecuadas de protección.

La fosfamina no es muy persistente bajo condiciones aerobias o anaerobias, y parece ser que se degrada con rapidez. Su disipación es dependiente de la rapidez con que sea degradado por las bacterias del ambiente, y sin embargo, aunque en estudios de campo se ha visto que es altamente soluble en agua, bajo condiciones laborales la fosfamina es estable bajo el proceso de hidrólisis.

La exposición de fosfamina a plantas acuáticas puede ocurrir como resultado de su aplicación en forma de spray, pero no se esperan excesivos efectos adversos sobre ellas si se cumplen las condiciones de utilización. El riesgo sobre plantas terrestres no ha sido suficientemente estudiado.

La exposición a organismos acuáticos también puede derivar de su utilización en forma de spray. Sin embargo, los efectos de toxicidad aguda sobre peces e invertebrados de agua dulce no son esperados con un normal uso de los productos. La fosfamina es prácticamente atóxica para peces, y no parece que se produzca en ellos un efecto de bioacumulación. Sin embargo, en los estudios aparece un porcentaje del 9 % de individuos muertos (USEPA, 1995a).

Han sido varios los estudios ecotoxicológicos en los que se ha evaluado el efecto de la fosfamina sobre biosensores acuáticos. Así, Cope (1965) estableció que eran necesarios 100 mg/l para provocar la muerte de individuos de la especie *Oncorhynchus mykiss*, si bien Johnson y Finley (1980) determinaron que eran necesarias concentraciones superiores a 100 mg/l, en ensayos estáticos, para lograr establecer una $LC_{50(96)}$ en la misma especie. Stock y Cope (1969) realizaron estudios de ecotoxicidad con estos compuestos, utilizando como elemento biosensor a la especie *Poecilia reticulata*, exponiendo a estos peces mediante un ensayo de renovación diaria durante 231 días, y estableciendo una LC_{100} de 10 mg/l, si bien aparecían efectos sobre la reproducción de los individuos a concentraciones de 1 mg/l. Si el tiempo de exposición se disminuía a 159 días, los efectos sobre la reproducción aparecían a concentraciones de 25 mg/l. Los estudios sobre *Pimephales promelas*, realizados por Geiger y col. (1986), establecieron una $LC_{50(96)}$ para ensayos dinámicos de 53.7 mg/l, siendo 3.9 mg/l la concentración necesaria para que comience la aparición de letalidad en estos organismos.

1.5.7.4.1.2 Riesgo ecotoxicológico derivado de la contaminación por formaldehído

1.5.7.4.1.2.1 Medioambiente de agua dulce

Con respecto al formaldehído, estudios estáticos realizados con *Daphnia magna* determinaron una $LC_{50(24)}$ de 52 mg/l (Bringmann & Khun, 1977), si bien sólo es necesaria una concentración de 33 mg/l para que comiencen a aparecer desordenes en los organismos (Bringmann & Khun, 1982).

Lagerspetz y col. (1993) estudiaron el efecto del formaldehído sobre la actividad fisiológica de *Daphnia magna*, llegando a la conclusión de que son necesarias concentraciones de 5 mg/l, en ensayo estático, para establecer una $CE_{50(24)}$, y 1.4 mg/l para una $CE_{50(48)}$. Estudios de Janssen y Persoone (1993) determinaron que la $EC_{50(24)}$ respecto a la aparición de efectos tóxicos sobre *Daphnia magna* se establece en 57 mg/l, pasando a 29 mg/l si se establece la $CE_{50(48)}$. Otros datos exotoxicológicos del efecto del formaldehído, sobre crustáceos de agua dulce, quedan resumidos en la Tabla 1.5.7.6.1.2.1-1.

Tabla 1.5.7.4.1.2.1-1 Acciones ecotoxicológicas del formaldehído sobre crustáceos de aguas continentales.

ESPECIE	DATO	EFECTO	T(hr)	ENSAYO	[mg/l]	REFERENCIA
<i>Cypridopsis</i> spp	EC_{50}	ITX	0.96	S	3.6	Bills y col. (1977)
<i>Cypridopsis</i> spp	EC_{50}	ITX	2.88	S	2.56	Bills y col. (1977)
<i>Cypridopsis</i> spp	EC_{50}	ITX	6	S	0.48	Bills y col. (1977)
<i>Cypridopsis</i> spp	EC_{50}	ITX	24	S	0.46	Bills y col. (1977)
<i>Cypridopsis</i> spp	EC_{50}	ITX	96	S	0.42	Bills y col. (1977)
<i>Notonecta</i> spp	EC_{50}	ITX	24	S	1800	Bills y col. (1977)
<i>Notonecta</i> spp	EC_{50}	ITX	96	S	334	Bills y col. (1977)
<i>Palaemonetes kadiakensis</i>	EC_{50}	ITX	2.88	S	860	Bills y col. (1977)
<i>Palaemonetes kadiakensis</i>	EC_{50}	ITX	6	S	760	Bills y col. (1977)
<i>Palaemonetes kadiakensis</i>	EC_{50}	ITX	24	S	442	Bills y col. (1977)
<i>Palaemonetes kadiakensis</i>	EC_{50}	ITX	96	S	186	Bills y col. (1977)
<i>Streptocephalus seali</i>	LC_{100}	MORT	24-48	S	15-25	Moss (1978)

La contaminación de formaldehído en agua dulce es capaz de provocar alteraciones toxicológicas en el fitoplacton. Así, la exposición sobre algas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii*) produce alteraciones a nivel bioquímico, alterando su capacidad fotosintética, de tal forma que ha quedado establecido una EC_{05} de 3.7 mg/l cuando la población de estas algas era expuesta a un tiempo de 2 horas (Brack & Frank, 1998). Sobre *Anacystis aeruginosa* (alga azul) el efecto letal se desarrolla a concentraciones de 0.39 mg/l y, si esta misma concentración se mantuviera en el medio durante 8 días, se produciría

una drástica disminución de su población (Bringmann & Kuhn, 1978). Sobre alga verde (*Scenedesmus quadricauda*) también se ha demostrado un efecto sobre su fisiologismo, quedando determinada una $EC_{50(24)}$ de 14.7 mg/l para lograr dicho efecto (Tisler & Zagorc-Koncan, 1997), si bien concentraciones de 2.5 mg/l comienzan a provocar el efecto letal en estos organismos (Bringmann & Kuhn, 1978). Exposiciones de 0.3 mg/l de formaldehído durante 96 horas, sobre estas algas verdes, reducen su población ((Bringmann & Kuhn, 1979).

Los individuos del género *Corbicula* (almejas de agua dulce) también se ven afectados por la contaminación con formaldehído. Bills y col. (1977) observaron signos de intoxicación en estos organismos, llegando a establecer una $EC_{50(96)}$ de 50.4 mg/l en experimentos estáticos con las almejas, bajando la toxicidad hasta 320 mg/l al establecer la $EC_{50(24)}$. Estudios realizados dos años después (Chandler & Marking, 1979), con *Corbicula manilensis* (almeja asiática de agua dulce), dieron como resultado una $LC_{50(96)}$ de 126 mg/l cuando se practicaba el ensayo estático, y 95 mg/l cuando el ensayo era de flujo continuo. La exposición estática a 24 horas presentó una LC_{50} de 800 mg/l. Ensayos de determinación del efecto tóxico, realizados con individuos del género *Helioma*, pusieron de manifiesto que la mitad de la población (EC_{50}) desarrollaba el efecto toxicológico a concentraciones de 1410, 536, 312, 284 y 37.2 mg/l a tiempos de 0.96, 2.88, 6, 24 y 96 horas respectivamente (Bills y col., 1977).

Los estudios sobre *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris), exponiéndolos a formulados conteniendo formaldehído y mediante ensayos a 48 horas con renovación del medio, determinaron que la concentración necesaria para que comience a ser letal para trucha arco iris era de 20-30 mg/l, siendo la $LC_{100(48)}$ de 64 mg/l (Lysak & Marcinek, 1972). Los ensayos estáticos con esta misma especie, aplicando el producto activo, dieron como resultado una muy alta toxicidad del formaldehído, siendo la $LC_{50(96)}$ de 0.121 mg/l, reduciéndose el riesgo hasta una $LC_{50(24)}$ de 0.22 mg/l, y más de 0.4mg/l para determinar la $LC_{50(0.25)}$ (Howe y col., 1995). Los ensayos de flujo dinámico establecieron una $LC_{50(96)}$ de 0.129 mg/l, 0.149 mg/l si se exponían a 72 horas, y 0.223 mg/l si la exposición era de 20 minutos (Van Heerden y col., 1995). Wedemeyer (1971), realizando estudios acerca del estrés producido sobre

estos individuos, estableció que concentraciones de 200 mg/l de formaldehído, durante periodos de 6 horas, provocaban en ellos alteraciones de tipo bioquímico y fisiológico. También ha sido comprobado como el formaldehído puede acumularse en los individuos expuestos, y así, Sills y Allen (1979) establecieron que a concentraciones de 0.11 mg/l, durante periodos de exposición cercanos a 1 hora, aparecían dichos residuos en las truchas. Otro aspecto es aquel que nos indica como la contaminación con formaldehído retrasa el crecimiento de las truchas, necesitando únicamente concentraciones de 0.167 mg/l, durante 1 hora, para que dicha alteración se produzca (Smith y col., 1987).

La exposición a concentraciones crecientes de formaldehído, sobre pez gato (*Ictalurus punctatus*), demostraron una alta sensibilidad por parte de estos individuos a este contaminante. Howe y col. (1995), utilizando para el ensayo sustancia activa, establecieron una $LC_{50(96)}$ de aproximadamente 0.047 mg/l; dato que contrasta ostensiblemente con el obtenido por Bills y col. (1977), ya que la utilización de formulados disminuye drásticamente la toxicidad hasta llegar a $LC_{50(96)}$ entre 19 y 25 mg/l. Estos últimos, establecieron que únicamente eran necesarias concentraciones de 224-312 mg/l para provocar la muerte del 50% de la población de pez gato en aproximadamente 1 hora de exposición a formaldehído.

La exposición a formaldehído sobre *Lepomis macrochirus*, presentó una $LC_{50(96)}$ entre 40 y 69.2 mg/l. Exposiciones cortas, de aproximadamente 3 horas, establecen una LC_{50} de 700-900 mg/l, mientras que la $LC_{50(24)}$ queda establecida entre 90 y 185 mg/l (Bills y col. 1977). En individuos de la especie *Lepomis cyanellus* se ha observado alteración de la conducta cuando han sido sometidos a ensayos estáticos, a tiempos de 5-15 minutos, y con concentraciones de 30 mg/l (Summerfelt & Lewis, 1967).

Usando como organismo biosensor al *Cyprinus carpio* (carpa), estudios a muy corto plazo determinaron una LC_{50} de 641 mg/l cuando estos organismos eran expuestos a formaldehído durante 15 minutos, y de 464 mg/l cuando el tiempo aumentaba a 30 minutos (Rosicky y col., 1986). Estos

mismos autores establecieron en 236 y 254 mg/l la LC₅₀ para 2 y 3 horas de exposición, respectivamente. Sin embargo, Kouril y col. (1985) apreciaron una mayor sensibilidad en exposiciones a 30 minutos, llegando a determinar estos autores una LC₅₀ de 0.72 mg/l. Ensayos de tipo estático con estos organismos han revelado la aparición de alteraciones fisiológicas a concentraciones de 200 mg/l en tiempos de exposición de aproximadamente 1 hora (Yamamoto, 1991), o de 280 mg/l en tiempos de exposición de 2 horas (Aunaas y col., 1991). Estos cambios fisiológicos se traducían fundamentalmente en alteraciones de la respiración de los peces.

El pez mosquito (*Gambusia affinis*) es otro de los biosensores utilizados en ecotoxicología acuática. Su utilización para los estudios con formaldehído ha determinado una LC₅₀₍₉₆₎ de 56.6-163.7 mg/l en ensayos estáticos (McCorkle y col., 1979).

La exposición de formaldehído a individuos de la especie *Morone saxatilis* provocó un cuadro de letalidad alto, estableciendo la LC₅₀₍₉₆₎ en 15 mg/l cuando se practicaban ensayos estáticos (Hughes, 1973). Estos datos prácticamente concuerdan con los obtenidos por Wellborn (1969), que estableció LC₅₀₍₉₆₎ en 18 mg/l, pero sin embargo se encuentran lejos de los obtenidos por Bills y col. (1993) que la establecieron entre 56 y 75 mg/l. Un resumen de la secuencia de toxicidad, aportada por los distintos autores, se incluye en la Tabla 1.5.7.4.1.2.1 -2. Otros datos exotoxicológicos del efecto del formaldehído, sobre peces de agua dulce, quedan resumidos en la Tabla 1.5.7.4.1.2.1 -3.

Tabla 1.5.7.4.1.2.1-2 Acciones ecotoxicológicas del formaldehído sobre el pez de agua dulce de la especie *Morone saxatilis*.

ESPECIE	DATO	EFEECTO	T(hr)	ENSAYO	[mg/l]	REFERENCIA
<i>Morone saxatilis</i>	LC ₅₀	MORT	0.96	S	>10000	Bills y col. (1993)
<i>Morone saxatilis</i>	LC ₅₀	MORT	2.88	S	1410	Bills y col. (1993)
<i>Morone saxatilis</i>	LC ₅₀	MORT	6	S	410-940	Bills y col. (1993)
<i>Morone saxatilis</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	82-211	Bills y col. (1993)
<i>Morone saxatilis</i>	LC ₅₀	MORT	48	S	15-35	Hughes (1973)
<i>Morone saxatilis</i>	LC ₅₀	MORT	48	S	32	Wellborn (1969)
<i>Morone saxatilis</i>	LC ₅₀	MORT	96	S	56-75	Bills y col. (1993)
<i>Morone saxatilis</i>	LC ₅₀	MORT	96	S	4.96-15.48	Reardon & Harrell (1990)
<i>Morone saxatilis</i>	LC ₅₀	MORT	96	S	18	Wellborn (1969)
<i>Morone saxatilis</i>	LC ₅₀	MORT	48	S	15	Hughes (1973)

Tabla 1.5.7.4.1.2.1 -3 Acciones tóxicas del formaldehído sobre especies de peces de agua dulce.

ESPECIE	DATO	EFEECTO	T(hr)	ENSAYO	[mg/l]	REFERENCIA
<i>Ameiurus melas</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	69.2	Bills y col. (1977)
<i>Ameiurus melas</i>	LC ₅₀	MORT	96	S	24.8	Bills y col. (1977)
<i>Anguilla anguilla</i>		PHY	264	P	30-100	Imada & Muroga (1979)
<i>Anguilla anguilla</i>		PHY	24		30-100	Imada & Muroga (1979)
<i>Anguilla japonica</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	440	Yokoyama y col. (1988)
<i>Anguilla japonica</i>	LC ₅₀	MORT	48	S	400	Yokoyama y col. (1988)
<i>Anguilla rostrata</i>	LC ₅₀	MORT	96	S	83.96	Hinton & Eversole (1978)
<i>Anguilla rostrata</i>	LC ₅₀	MORT	96	S	224.49	Hinton & Eversole (1979)
<i>Anguilla rostrata</i>	LC ₅₀	MORT	96	S	329.65	Hinton & Eversole (1980)
<i>Barbus gonionotus</i>		ACC	24		25-50	Subasinghe & Yusoff (1993)
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	LC ₅₀	MORT	0.24	S	755	Rosicky y col. (1986)
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	LC ₅₀	MORT	0.48	S	448	Rosicky y col. (1986)
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	LC ₅₀	MORT	0.48	S	1.11	Kouril y col. (1985)
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	LC ₅₀	MORT	0.96	S	284	Rosicky y col. (1986)
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	LC ₅₀	MORT	1.92	S	256	Rosicky y col. (1986)
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	LC ₅₀	MORT	2.88	S	160	Rosicky y col. (1986)
<i>Danio rerio</i>	LC ₅₀	MORT	96	S	41	Wellens (1982)
<i>Micropterus salmoides</i>	LC ₅₀	MORT	6	S	412	Bills y col. (1977)
<i>Micropterus salmoides</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	88.8	Bills y col. (1977)
<i>Micropterus salmoides</i>	LC ₅₀	MORT	96	S	54.4	Bills y col. (1977)
<i>Oryzias</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	44-98	Tsuji y col. (1986)

<i>latipes</i> (huevos)						
<i>Oryzias</i>	LC ₅₀	MORT	48	S	44-87	Tsuji y col. (1986)
<i>latipes</i> (huevos)						
<i>Oryzias</i>		GRO	672	F	48	Johnson y col. (1993)
<i>latipes</i> (huevos)						
<i>Oryzias</i>		HIS	672	F	48	Johnson y col. (1993)
<i>latipes</i> (huevos)						
<i>Pimephales</i>	LC ₅₀	MORT	96	S	24.1	Geiger y col. (1990)
<i>promelas</i>						
<i>Salmo salar</i>	LC ₅₀	MORT	2.88	S	564	Bills y col. (1977)
<i>Salmo salar</i>	LC ₅₀	MORT	6	S	336	Bills y col. (1977)
<i>Salmo salar</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	156	Bills y col. (1977)
<i>Salmo salar</i>	LC ₅₀	MORT	96	S	69.2	Bills y col. (1977)
<i>Salmo trutta</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	325	Willford (1966)
<i>Salmo trutta</i>	LC ₅₀	MORT	48	S	185	Willford (1966)
<i>Salvelinus</i>	LC ₅₀	MORT	6	S	241	Bills y col. (1977)
<i>fontinalis</i>						
<i>Salvelinus</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	220	Willford (1966)
<i>fontinalis</i>						
<i>Salvelinus</i>	LC ₅₀	MORT	48	S	167	Willford (1966)
<i>fontinalis</i>						
<i>Salvelinus</i>	LC ₅₀	MORT	96	S	40	Willford (1966)
<i>fontinalis</i>						
<i>Silurus</i>	LC ₅₀	MORT	0.48	S	1.13	Dvorak y col. (1985)
<i>glanis</i>						
<i>Tanichthys</i>	LC ₅₀	MORT	48	S	2.1-2.4	Kitamura (1990)
<i>albonubes</i>						
<i>Tilapia</i>	LC ₅₀	MORT	96	S	148-179	Durez (1989)
<i>nilotica</i>						
<i>Tilapia</i>		HIS	72	S	25-50	Durez (1989)
<i>nilotica</i>						

1.5.7.4.1.2.2 Medioambiente de agua marina

También ha sido descrito el efecto ambiental que supone la exposición de formaldehído en medios acuáticos marinos. Estudios de tipo enzimático sobre estos organismos pusieron en evidencia que son necesarias concentraciones aproximadas de 1.7-1.9 mg/l, mediante una exposición única de pocos minutos, para ejercer sobre estos organismos procesos de inhibición enzimática, debiendo ser aumentada dicha concentración hasta 2.09 mg/l para

obtener el mismo efecto tras exposiciones de 24 horas (Espiritu, 1995). Otros datos exotoxicológicos del efecto del formaldehído, sobre crustáceos de agua salada, quedan resumidos en la Tabla 1.5.7.4.1.2.2 -1.

Tabla 1.5.7.4.1.2.2-1 Acciones tóxicas del formaldehído sobre especies de crustáceos de agua marina.

ESPECIE	DATO	EFECTO	T(hr)	ENSAYO	[mg/l]	REFERENCIA
<i>Crangon crangon</i>	LC ₅₀	MORT	48	S	330-1000	Portmann (1972)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	423	Liao y col. (1989)
<i>Metapenaeus ensis</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	633	Liao y col. (1989)
<i>Penaeus duorarum</i>	LC ₅₀	MORT	96	S	235-270	Johnson (1974)
<i>Penaeus duorarum</i>		MORT	4.8	S	150-250	Johnson (1974)
<i>Penaeus duorarum</i>		MORT	48	S	150-500	Johnson (1974)
<i>Penaeus duorarum</i>		MORT	96	S	125-500	Johnson (1974)
<i>Penaeus japonicus</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	136	Liao y col. (1989)
<i>Penaeus monodon</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	168	Liao y col. (1989)
<i>Penaeus penicillatus</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	275	Liao y col. (1989)
<i>Penaeus semisulcatus</i>	LC ₅₀	MORT	24	S	184	Liao y col. (1989)
<i>Penaeus stylirostris</i>	LC ₁₀₀	MORT	24	S	27	Castille & Lawrence (1986)
<i>Penaeus stylirostris</i>	LC ₀	MORT	24	S	2.7	Castille & Lawrence (1986)
<i>Penaeus stylirostris</i>		DES	24	S	2.7	Castille & Lawrence (1986)
<i>Penaeus stylirostris</i>		COMP	16.8	S	25	Bell y col. (1987)
<i>Forma serrata</i>		DES	96		5-25	Hamasaki & Hatai (1993)
<i>Forma serrata</i>		CREC	96		5-25	Hamasaki & Hatai (1993)
<i>Forma serrata</i>		MORT	96		5-25	Hamasaki & Hatai (1993)

Burridge y col (1995), en estudios con organismos marinos, ya estudiaron la acción ecotoxicológica del formaldehído sobre alga marrón (*Phyllospora comosa*), estableciendo la NOEC entre 0.1 y 1 mg/l en experimentos de formaldehído a 96 horas, siendo la LOEC cercana a 10 mg/l. Sin embargo, la mortalidad de estos organismos no aparece hasta formaldehído es de 100 mg/l, a formaldehído de 24 horas, o 10 mg/l si la formaldehído se alarga hasta 14-21 días.

El grupo de las diatomeas también se ve afectado por la contaminación con formaldehído. La especie *Chaetoceros gracilis* sufre una fuerte reducción en su población cuando se expone a concentraciones de 0.1-5 mg/l, así como alteraciones del crecimiento y de tipo bioquímico (Suzuki & Tokuda, 1998). Iguales resultados obtuvieron Suzuki y Tokuda (1998) cuando expusieron a diatomeas marinas del género *Nitzschia*.

Las exposiciones a formaldehído sobre moluscos, aplicando ensayos con renovación del medio, demostraron que este compuesto es capaz de reducir el tiempo de supervivencia (LT) del *Mytilus edulis* (Frost y col., 1993). La LT_{50} , tras la exposición durante 5 días, era de 10 mg/l, llegando a convertirse en 1 mg/l si la concentración se incrementaba por encima de los 18 días. Lin y col. (1986) realizaron ensayos estáticos, exponiendo a individuos de la especie *Mytilus edulis* a concentraciones crecientes de formaldehído, y determinaron que eran necesarias concentraciones de 0.00018 % para provocar la muerte de todos los individuos en pocos minutos. Otros estudios, los cuales ya no buscaban el efecto letal, sino más bien alteraciones del fisiologismo de los moluscos, demostraron que son necesarias concentraciones 1-30 mg/l, durante formaldehído de 4 días en ensayos con renovación continua del medio, para que se produjeran dichas alteraciones (Aunaas y col., 1991).

La contaminación marina por formaldehído también afecta a distintos géneros de peces marinos. Estudios realizados en salmónidos como el *Chanos chanos* determinaron una $LC_{50(96)}$ de 232 mg/l, subiendo a 241, 260 y 322 mg/l para 72, 48 y 24 horas, respectivamente (Cruz & Pitogo, 1989). Estos mismos autores demostraron la existencia de cambios histológicos cuando los

individuos eran expuestos a concentraciones de 50-500 mg/l durante periodos de 96 horas.

La exposición de peces marinos de la especie *Trachinotus carolinus* ha demostrado el carácter tóxico del formaldehído a estos individuos, quedando determinada la $LC_{50(96)}$ entre 69.1-74.9 mg/l (Birdsong, 1971). En el mismo estudio también se establecían las concentraciones letales medias para 24 y 48 horas, que correspondían a 78-84 y 73.7-78 mg/l, respectivamente. Otros datos exotoxicológicos del efecto del formaldehído, sobre peces de agua salada y equinodermos, quedan resumidos en la Tabla 1.5.7.4.1.2.2-2.

Tabla 1.5.7.6.1.2.2-2 Acciones tóxicas del formaldehído sobre especies de peces de agua marina.

ESPECIE	DATO	EFEECTO	T(hr)	ENSAYO	[mg/l]	REFERENCIA
<i>Sciaenops ocellatus</i>	NOEC	MORT	0.072	S	2% sat.	Douillet y col. (1994)
<i>Sciaenops ocellatus</i>		MORT	0.072	S	2% sat.	Douillet y col. (1994)
<i>Anthocidaris crassispina</i>		DVP	12	S	0.37	Kobayashi (1971)
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	LETH	MORT	0.024	S	0.0072%	Lin y col. (1986)
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	LETH	MORT	0.192	S	0.0018%	Lin y col. (1986)
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	LETH	MORT	0.48	S	0.00036%	Lin y col. (1986)

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

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

- Determinar el riesgo toxicológico de tipo agudo que se pueda derivar de la presencia de los biocidas seleccionados en ambientes acuáticos de agua salina, mediante la exposición de éstos frente a larvas de *Artemia* como organismos presentes en ambientes de estuario y aguas salubres.
- Establecer el grado de sensibilidad de diferentes estadios larvarios de estos crustáceos frente a la presencia de estos biocidas en el medio, específicamente en aquellos estadios comprendidos en las primeras 72 horas de vida.
- Estudiar los posibles efectos sobre el comportamiento de las larvas de *Artemia*, cuando éstas son expuestas a concentraciones subletales de los biocidas seleccionados, aprovechando la capacidad fototáctica que presentan. En base a ello, determinar si concentraciones subletales de los biocidas seleccionados son capaces que reducir o incluso inhibir la facultad fototáctica que estas larvas presentan.
- Analizar los resultados obtenidos en los ensayos de letalidad y fototactismo para seleccionar el método estadístico que resulte óptimo para el estudio de dichos resultados.
- Valorar la capacidad de bioconcentración que poseen los biocidas seleccionados, de cara a la obtención del correspondiente Factor de Bioconcentración, como parámetro de riesgo en estos organismos biosensores.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Compuestos Químicos Empleados

3.1.1 Biocidas Ensayados

Tanto el ácido tricloroisocianúrico (TCIC) como el cloruro de benzalconio (CB) y el bromuro sódico (BrNa) fueron obtenidos de Sigma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Switzeland), mientras que el cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosfonio (THPC) fue obtenido de Fluka (Fluka Chemie GmbH, Switzeland).

Todos los biocidas ensayados fueron disueltos en agua bidestilada y desionizada (Milli-Q), excepto el TCIC que fue disuelto en acetona (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Switzeland).

3.1.2 Agua Marina Sintética

La preparación de agua marina se practicó a partir de sal marina obtenida de Sera (Sera Meersalz, Sera, Germany), especialmente preparada mediante suplementación de calcio y oligoelementos para un mejor cultivo de algas e invertebrados de agua salada. Este preparado se presenta libre de nitratos, fosfatos y salicatos, y lleva adicionados quelatos especiales que contribuyen a la detoxicación de metales pesados como el cobre.

Para la preparación de agua marina reconstituida, se disolvió dicha sal marina en agua bidestilada y desionizada (Milli-Q) hasta alcanzar una concentración del 35 ‰ y una densidad de 1.022-1.024 gr/l. El agua marina así reconstituida era posteriormente aireada y removida mediante bomba sumergible durante 24 horas, para conseguir las condiciones apropiadas de oxígeno y dióxido de carbono. Finalmente, el agua marina reconstituida era filtrada mediante filtros de celulosa de 30 µm (Millipore).

3.2 Obtención de *Artemia franciscana*

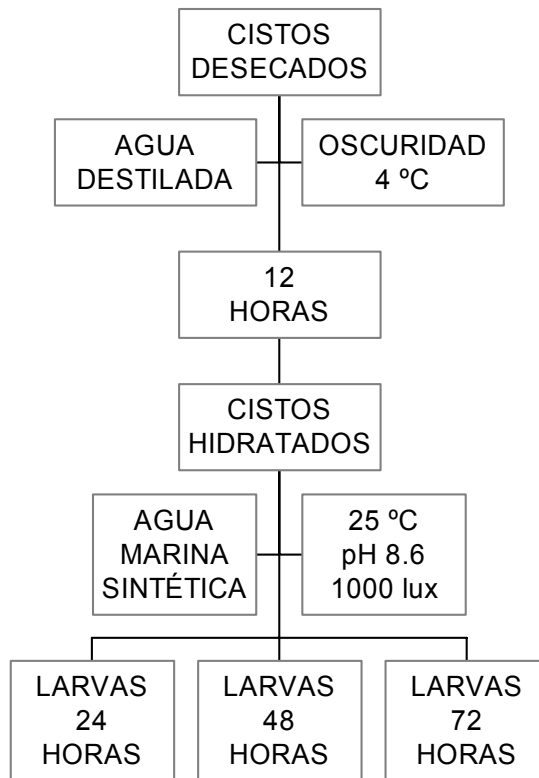
La obtención de larvas de *Artemia franciscana* se practicó a partir de huevos desecados obtenidos de Argent (Argent Chemical Laboratories, Washington, USA) y utilizando la línea *ARGENTEMIA Grade II Silver Label*, línea procedente del *North Arm Great Salt Lake* (USA) y que garantiza un mínimo de 260.000 huevos/gr., de los cuales más de un 92 % eclosionarán en un intervalo para el tiempo de inducción de mínimo (T_0) 9 horas y máximo (T_{90}) 16 horas, obteniendo así poblaciones homogéneas de nauplios, de las que al menos un 80 % tenían un tamaño de 500-525 μm . La técnica aplicada está basada en la metodología propuesta por Persoone y col. (1989), si bien con la aplicación de diferentes modificaciones planteadas con posterioridad a la metodología original (Barahona y col., 1994; Sánchez-Fortún y col., 1995). Un esquema para la obtención de larvas de *Artemia*, a partir de cistos deshidratados, se presenta en la Figura 3.2-1.

Los huevos desecados eran hidratados en placas de Petri mediante inmersión en agua destilada a una temperatura de 4 °C, manteniéndolos así durante un periodo de 12 horas en ambiente de oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, aquellos huevos que flotaban eran desechados, y el resto eran transferidos a una probeta de decantación que contenía agua marina reconstituida a 25 °C y pH de 8.6, y al que se aplicaba una fuente de luz de aproximadamente 1000 Lux. A dicho medio, conteniendo los huevos hidratados, se le mantenía con burbujeo continuo, con el fin de facilitar su eclosión.

Bajo estas condiciones, al cabo de 16-18 horas comenzaba la eclosión de los huevos, y transcurridas 20 horas desde que los huevos eran incubados en el medio salino reconstituido se obtenía una amplia población de nauplios libres. Dichos nauplios eran transferidos a placas de Petri con medio salino reconstituido, a 25 °C y aireación. Bajo estas condiciones, los nauplios eran mantenidos hasta que alcanzaban las 24 horas de vida, los cuales eran utilizados para la realización de pruebas de toxicidad con larvas de esta edad. Una parte de los nauplios obtenidos, eran reservados en placas de Petri hasta

alcanzar las 48 y 72 horas de edad, y con ellas se practicaban los correspondientes ensayos de toxicidad a estas edades.

Figura 3.2-1. Esquema de la obtención de larvas de *Artemia* a partir de cistos deshidratados.



3.3 Estudios de Toxicidad Aguda: Letalidad

3.3.1 Distribución de larvas de *Artemia*

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

Para ello, un conjunto de larvas procedentes del total de larvas obtenidas eran separadas del resto y se transferían a una nueva placa de Petri, teniendo cuidado de traspasar el menor volumen de medio salino posible. Seguidamente, y por medio de una pipeta Pasteur, un conjunto de 10 larvas se introducía en cada uno de los pocillos, realizando una confirmación posterior a su traslado, bajo lupa binocular, para asegurarnos de que cada pocillo poseía el número exacto de larvas.

Para la realización de las posteriores exposiciones a los diferentes biocidas ensayados, la columna 1 de la placa multipocillos quedaría reservada para los estudios control (sin exposición al compuesto), y en los estudios con TCIC, la columna 2 se reservaría para los estudios control del solvente utilizado, siendo en este caso acetona.

3.3.2 Exposición de las larvas a los biocidas

3.3.2.1 Exposiciones previas

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

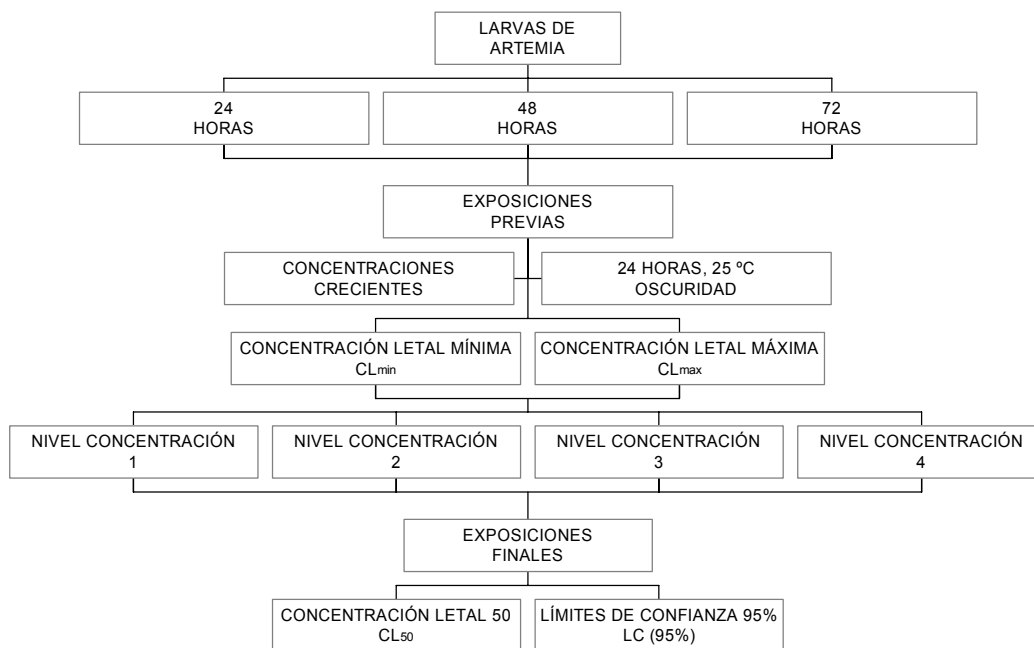
Para su obtención, se realizaron ensayos sobre placas multipocillo, a concentraciones crecientes de cada uno de los biocidas ensayados. Así, con posterioridad a la exposición, las placas multipocillo eran incubadas a 25 °C en

una cámara de cultivo, en ambiente de oscuridad y durante un periodo de 24 horas. Pasado este tiempo, se realizaba la lectura de la placa bajo lupa binocular, contabilizando el número de larvas vivas y muertas en cada uno de los pocillos. En este sentido, y con el fin de establecer parámetros similares para todos los estudios, se consideraba que una larva estaba muerta cuando no exhibía ningún tipo de movimiento, ni interno ni externo, durante un periodo de observación de 10 segundos.

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

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

Figura 3.3.2.1-1 Esquema de la realización de los ensayos de letalidad con larvas de *Artemia* de 24, 48 y 72 horas de vida.



3.3.2.2 Exposiciones finales

Una vez establecidas las correspondientes CL_{min} y CL_{max} , se practicaron las exposiciones a los diferentes biocidas y a los tres estadios larvarios, aplicando un total de 5 concentraciones dentro del rango establecido, que corresponderían a las columnas 2, 3, 4, 5 y 6 de la placa multipocillos, y reservando a la columna 1 como control, para el estudio de letalidad sobre BrNa, THPC y CB, y un total de 4 concentraciones correspondientes a las columnas 3, 4, 5 y 6 de la placa multipocillo, con la columna 1 como control y la 2 para control de acetona, para los estudios de letalidad sobre TCIC.

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

3.4 Estudios de Toxicidad Subaguda: Inhibición del Fototactismo

3.4.1 Distribución de larvas de *Artemia*

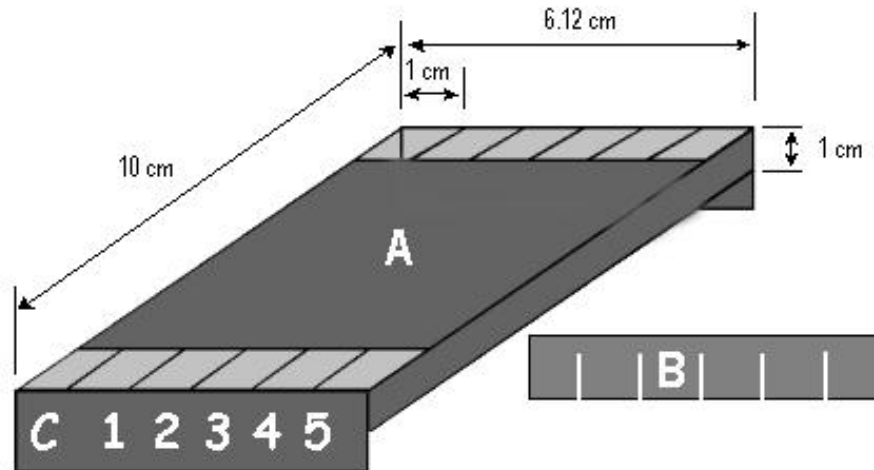
Para la realización de los estudios de inhibición del fototactismo, se utilizaron únicamente larvas de *Artemia* de 24 horas de edad, las cuales eran expuestas a concentraciones subletales de los diferentes biocidas ensayados, correspondientes a 1/10, 1/25, 1/50 y 1/100 de la CL₅₀ obtenida en los anteriores ensayos de letalidad.

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

3.4.2 Ensayos para determinación de la capacidad fototáctica

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

Figura 3.4.2-1. Esquema del diseño de la cámara oscura (A) y el elemento de cierre (B) aplicado una vez finalizado el experimento, empleados para la realización de los ensayos de inhibición del fototactismo en larvas de *Artemia* expuestas previamente a los distintos biocidas.

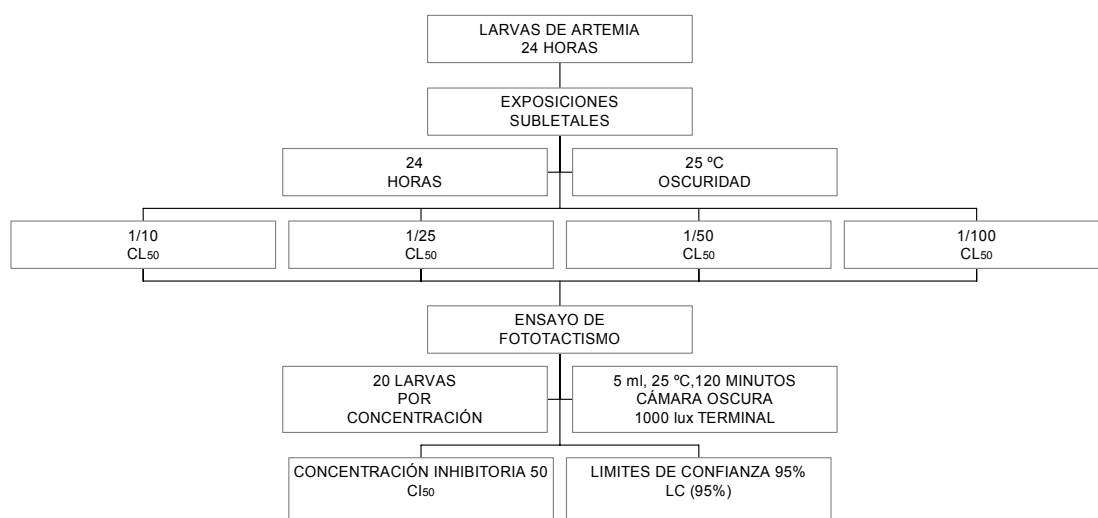


Estas cámaras oscuras lo constituían unos receptáculos, construidos con material plástico duro e inerte, que fueron pintados exteriormente con pintura plástica de color negro, de tal forma que asegurara una completa oscuridad en su interior. Fueron construidas con unas dimensiones internas de 10 cm de longitud, 6,12 cm de anchura y 6 cm de altura. El interior de las cámaras estaba compartimentado en 6 receptáculos estancos de 10 cm de longitud, 1 cm de anchura y 1 cm de altura. Tanto en el extremo proximal como en el terminal poseían 6 ventanas superiores, una en cada extremo por cada receptáculo.

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

determinado biocida provocara una alteración con respecto a su capacidad fototáctica, el número de individuos capaces de aproximarse a la fuente de luz disminuiría en una relación concentración-dependiente.

Figura 3.4.2-2. Esquema de realización de los ensayos de fototactismo con larvas de *Artemia* de 24 horas de vida.



Para corroborar la hipótesis de trabajo, se realizaron experiencias previas con larvas de *Artemia* de 24 horas de edad que no habían sido expuestas a ninguno de los biocidas. Así, se incluyeron en cada uno de los receptáculos, a los cuales se había añadido un volumen de 5 ml de agua marina reconstituida convenientemente aireada, un total de 20 larvas por receptáculo. Seguidamente, las ventanas proximales eran tapadas con cinta aislante de color negro, con el fin de completar el ambiente de oscuridad en aquella parte de la cámara. Inmediatamente, se aplicaba sobre las ventanas terminales una fuente de aproximadamente 1000 Lux, en un ambiente controlado a 25 °C, y se practicaron observaciones periódicas con el fin de determinar el tiempo que tardaban las larvas en recorrer la longitud de 10 cm que componía cada uno de los receptáculos de la cámara oscura.

Una vez comprobada la capacidad de las larvas de *Artemia* de practicar este recorrido en busca de la fuente de luz, y de quedar establecido el tiempo necesario por las larvas para realizar ese recorrido de 10 cm, que quedó

establecido en 120 minutos, se realizaron los ensayos con cada uno de los biocidas empleados en este estudio.

Para ello, las larvas de *Artemia* previamente tratadas a concentraciones de 1/10, 1/25, 1/50 y 1/100 de la CL_{50} , tal y como ha quedado explicado anteriormente, fueron introducidas en cada uno de los receptáculos, reservando el receptáculo 1 para los ensayos control y, en su caso, el receptáculo 2 para control de solvente. Siguiendo la metodología anteriormente citada, la fuente de luz se mantuvo durante un tiempo de 120 minutos, transcurridos los cuales la fracción de receptáculo correspondiente a la ventana terminal era aislada del resto de dicho receptáculo mediante un sistema de esclusa de diseño propio. De esta forma, la cámara era trasladada hasta una lupa binocular, donde el número de larvas que había conseguido llegar hasta la ventana terminal eran contabilizados. Al igual que ocurría en los ensayos de letalidad, quedaban invalidados todos aquellos ensayos en los que los individuos incluidos en los receptáculos control no hubieran conseguido alcanzar la ventana terminal en un porcentaje igual o superior al 90 %. En total se practicaron 8 réplicas para cada uno de los ensayos correspondientes a cada uno de los biocidas.

3.5 Estudios de Bioacumulación

3.5.1 Distribución de larvas de Artemia

Para realizar los estudios de bioacumulación de los distintos biocidas empleados, se practicaron cultivos de *Artemia* de tal forma que nos permitieran obtener poblaciones de aproximadamente 5000 individuos por cada uno de los ensayos realizados.

A este respecto indicar que no se han practicado los correspondientes ensayos de bioacumulación con CB, ya que sus propiedades surfactantes hacen inviable dicha actuación.

Una vez eclosionados los huevos, siguiendo la técnica de cultivo ya descrita, los nauplios obtenidos eran transferidos a dos frascos de vidrio, uno para la obtención de valores control y otro para la realización de los ensayos, especialmente acondicionados para mantener una temperatura constante de 25 °C y aireación permanente por burbujeo, que contenían un volumen de 1 litro de agua marina reconstituida.

Durante todo el tiempo de duración de los ensayos, las larvas de *Artemia* fueron alimentadas con *Alimento para Artemia Salina* (Brine Shrimp Food, N.T. Laboratories Ltd., U.K), cuyo análisis de composición determina 23.4 % de carbohidratos, 0.5 % de proteínas, 0.2 % de grasas y 22.8 % de cenizas, y suplementado con un total de 16 vitaminas y cofactores que incluyen vitamina A, B₁, B₆, B₁₂, C, E y K₃. igualmente, durante todo el proceso se establecieron mediciones periódicas de los niveles de nitritos y del pH.

3.5.2 Exposición de las larvas de Artemia

Una vez que los nauplios se encontraban en los dos frascos de vidrio, y habiendo comprobado la densidad de individuos existente en cada uno de ellos, se procedía inmediatamente al comienzo de los ensayos. Éstos fueron planteados como Ensayos con Renovación de Medio cada 24 horas. La

exposición se realizó añadiendo a 1 litro de agua marina reconstituida una concentración del biocida ensayado suficiente para conseguir una concentración final en el medio de 1/10 de la CL₅₀. A tal efecto, las larvas de *Artemia* fueron expuestas a las siguientes concentraciones:

- BrNa: 200 mg/l
- TCIC: 0.006 mg/l
- THPC: 0.0008 mg/l

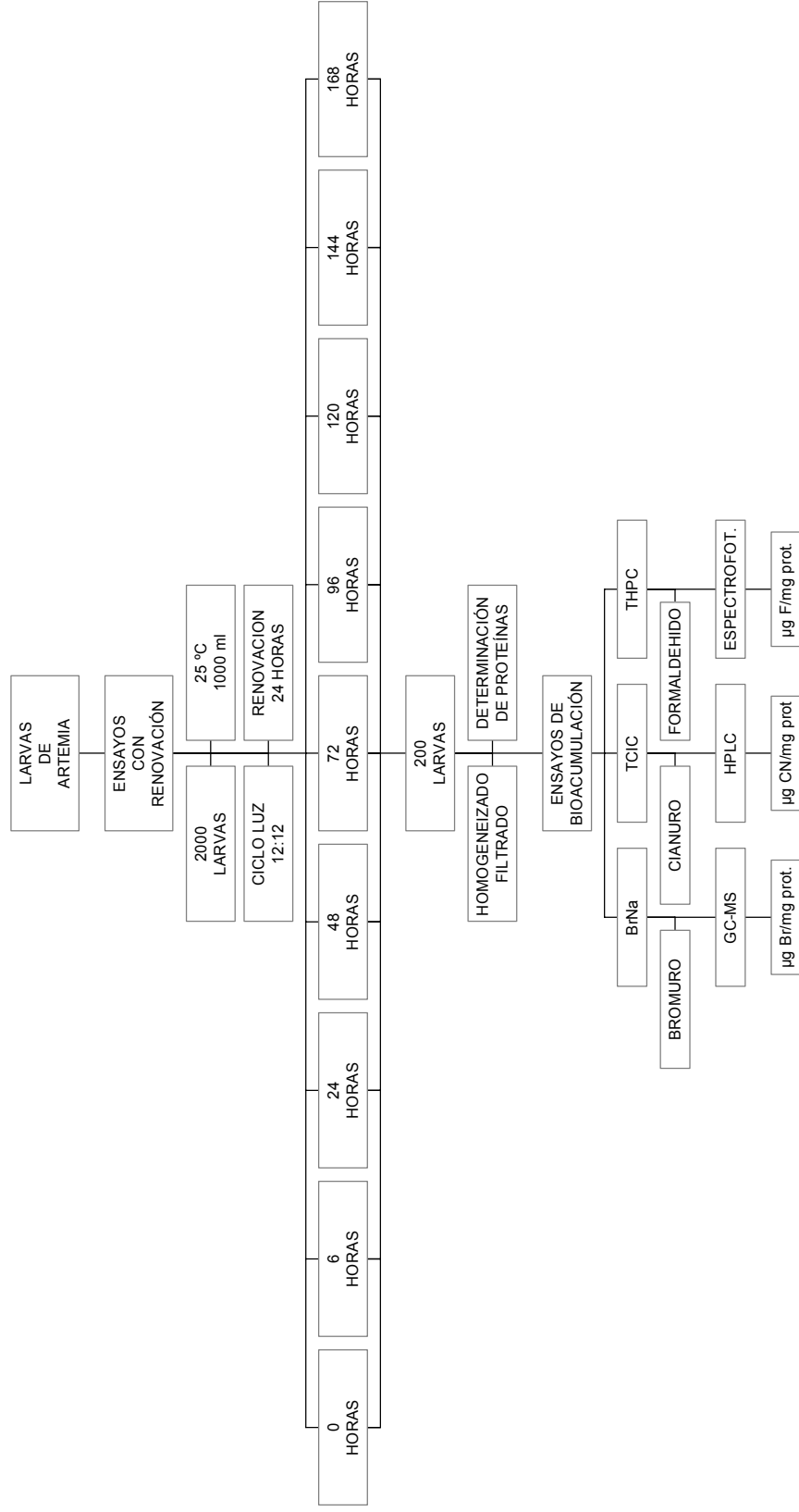
De esta forma, se practicaron renovaciones cada 24 horas en los frascos problema, siguiendo la misma pauta en los frascos control, pero sin la presencia del biocida en el medio.

Bajo estas condiciones, un total de 200 larvas por frasco fueron obtenidas a tiempos de 0, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas posteriores al inicio de la exposición. Tanto de controles como de los diferentes ensayos, se practicó un total de 4 réplicas.

3.5.3 Determinación de los Niveles de Acumulación

A cada grupo de 200 larvas de *Artemia* obtenidas a los diferentes tiempos de exposición se les sometió a reducción mecánica mediante homogenizador, y posteriormente las muestras obtenidas fueron convenientemente filtradas. Una pequeña parte de la muestra fue utilizada para la realización de una determinación de proteínas, mientras que el resto fue reservado para la posterior determinación de los niveles existentes en cada uno de los ensayos.

Figura 3.5. Esquema de la realización de los ensayos de bioacumulación, por exposiciones a bromuro sódico (BrNa), ácido tricloroisocianúrico (TCIC) y cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosfonio (THPC), sobre larvas de *Artemia*, mediante ensayos de renovación de medio cada 24 horas.



3.5.3.1 Determinación de proteínas

Posterior a la reducción mecánica y filtrado de las muestras, se practicó en todas ellas una determinación de proteínas mediante el método de Bradford (1976).

Anterior a las determinaciones de nuestras muestras, se obtuvo una curva de calibración mediante el empleo de concentraciones conocidas de suero bovino fetal, con el fin de relacionar los resultados obtenidos con las posteriores mediciones que fueran obtenidas en nuestros ensayos.

Para la realización de la técnica, se tomaban 50 µl de cada muestra, se les añadía 750 µl de agua bidestilada y desionizada (Milli-Q) y posteriormente 200 µl de *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories GMBH, Germany). Paralelamente se realizaba un ensayo blanco, sustituyendo los 50 µl de muestra por el mismo volumen de agua bidestilada y desionizada (Milli-Q). Las muestras se dejaban reposar durante 15 minutos, y transcurrido ese tiempo se practicaba una lectura en un espectrofotómetro Bausch & Lomb Spectronic 20, a una longitud de onda de 595 nm.

3.5.3.2 Determinación de los niveles de acumulación de Bromuro en larvas de *Artemia*

Tanto las muestras control, como aquellas procedentes de la exposición sobre larvas de *Artemia* a 1/10 de la CL₅₀, correspondiente a 200 mg/l de BrNa, fueron analizadas por cromatografía iónica con autosupresión, mediante un Dionex DX 120, cromatógrafo iónico con equipo de supresión química de eluyente, provisto de un sistema de identificación mediante conductividad electrolítica. La calibración se practicó mediante inyección de un estándar de iones que contenía bromuro. Las condiciones de trabajo quedan reflejadas en la Tabla 3..5.3.2-1.

Tabla 3.5.3.2-1. Condiciones de trabajo para la determinación de bromuro, mediante cromatografía iónica con autosupresión.

Instrumental	Condiciones
Columna:	AS-14 (4x250 mm) columna analítica
Supresor:	ASRS II supresor iónico autoregenerativo
Eluyentes:	5 mM Na ₂ CO ₃ carbonato sódico 1.5 mM NaHCO ₃ bicarbonato sódico
Flujo:	Eluyentes: 1 ml/min
Célula de detección:	DS4 estabilizador de detección
Volumen de inyección:	25 µl

3.5.3.3 Determinación de los niveles de acumulación de Cianuro en larvas de *Artemia*

Las muestras control y las procedentes de la exposición sobre larvas de *Artemia* a 1/10 de la CL₅₀ se analizaron por medio de HPLC (UV). La calibración del aparato se practicó mediante la inyección de soluciones estándar de ácido cianúrico en fase móvil. Las condiciones de trabajo quedan resumizadas en la Tabla 3.5.3.3-1.

Tabla 3.5.3.2-1. Condiciones de trabajo para la determinación de ácido cianúrico, mediante HPLC(UV).

Instrumental	Condiciones
Extracción:	3 ml 0.005 M Na ₂ HPO ₄ , 5.95 (v:v) metanol:agua (pH 7.0), 10 min ultrasonidos
Volumen de inyección:	15 µl
Fase móvil:	0.005 M Na ₂ HPO ₄ , 5.95 (v:v) metanol:agua (pH 7.0),
Columna:	µ-Bondapak C ₁₈ , 10 µm de partícula; Cartucho Radial PAK, 11cm x 8 mm ID
Detector:	UV, 225 nm

3.5.3.4 Determinación de los niveles de acumulación de Formaldehído en larvas de Artemia

Las muestras control y las procedentes de la exposición sobre larvas de Artemia a 1/10 de la CL_{50} , fueron analizadas por colorimetría a través de un espectrofotómetro ultravioleta visible *Perkin -Elmer lambda 1A* con cubetas de cuarzo de 1cm de grosor de camino óptico. El formaldehído es analizado usando MBTH (3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone hydrochloride) como solución acuosa para su absorción, originando la formación de una azina que será oxidada en medio ácido dando un catión azul, el cual será medido por colorimetría a 628 nm.

3.6 Expresión de Resultados y Tratamientos Estadísticos

Los valores, tanto de letalidad como de inhibición del fototactismo, fueron obtenidos mediante la aplicación de un modelo estadístico de ajuste de Regresión no Lineal de Crecimiento Exponencial, usando el algoritmo SIMPLEX mediante la utilización del paquete de software informático Statistica v. 5.1 (StatSoft, USA).

Anteriormente a la aplicación de este modelo estadístico, tanto los datos obtenidos mediante ensayos de letalidad como los de fototactismo, fueron analizados mediante modelo estadístico Probit, aplicando el paquete informático SPSS v. 11.5 (SPSS Inc., USA)

La elección del modelo estadístico utilizado se realizó mediante el paquete de software CurveExpert v. 1.38 (Microsoft Co., USA). La aplicación del modelo de Regresión no Lineal de Crecimiento Exponencial, elegido de esta forma, reduce significativamente el alto grado de incertidumbre proporcionado por los resultados obtenidos mediante el análisis Probit.

El análisis comparativo de los resultados y los test de hipótesis se han realizado mediante la aplicación de un modelo no paramétrico de Wilcoxon para muestras pareadas, utilizando el mismo paquete informático Statistica v.

5.1 (StatSoft, USA). Las diferencias se consideraron significativas con un nivel de probabilidad de $P < 0.05$.

El tratamiento de los datos obtenidos en los ensayos de bioacumulación se realizó mediante curvas concentración tiempo dependiente, mediante el paquete informático GraphPad Prism v 4.0 (GraphPad Software Inc., USA).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Ensayos de Toxicidad Aguda

Los resultados obtenidos tras la exposición de larvas de *Artemia*, a los tiempos de desarrollo larvario correspondientes a 24-, 48- y 72 horas de vida, se presentan sumariados en la Tabla 4.1-1. Los valores presentados fueron obtenidos a partir de un modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial, después del estudio comparativo entre éste y el modelo estadístico Probit, por haber obtenido un mejor ajuste de curva, tal y como queda reflejado en las Figuras 4.1-1, 4.1-2, 4.1-3 y 4.1-4.

Tabla 4.1-1 Valores de Concentración Letal 50 (CL₅₀), con sus correspondientes Límites de Confianza al 95 % (LC 95 %), obtenidos para cada uno de los compuestos biocidas ensayados, sobre larvas de *Artemia* de 24-, 48- y 72 horas de vida.

COMPUESTO	n	CL ₅₀ (LC 95 %)		
		24 h	48 h	72 h
Cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosfonio	12	7,82 µg/l (3,93-15,57)	6,78 µg/l (3,61-12,35)	0,019 µg/l ^{ab} (0,008-0,045)
Cloruro de benzalconio	12	32,67 µg/l (20,76-51,41)	9,14 µg/l ^a (4,10-13,00)	0,0007 µg/l ^{ab} (0,0002-0,002)
Ácido tricloroisocianúrico	12	61,28 µg/l (45,14-83,18)	0,70 µg/l ^a (0,49-1,00)	0,002 µg/l ^{ab} (0,0007-0,004)
Bromuro sódico	12	>2000 mg/l	531,06 mg/l ^a (447,38-630,39)	42,42 mg/l ^{ab} (30,98-58,09)

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

Figura 4.1-1a.- Comparación entre las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo estadístico Probit (a) y el modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial (b), en los resultados obtenidos con cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosfonio sobre larvas de *Artemia* de 24 horas de edad.

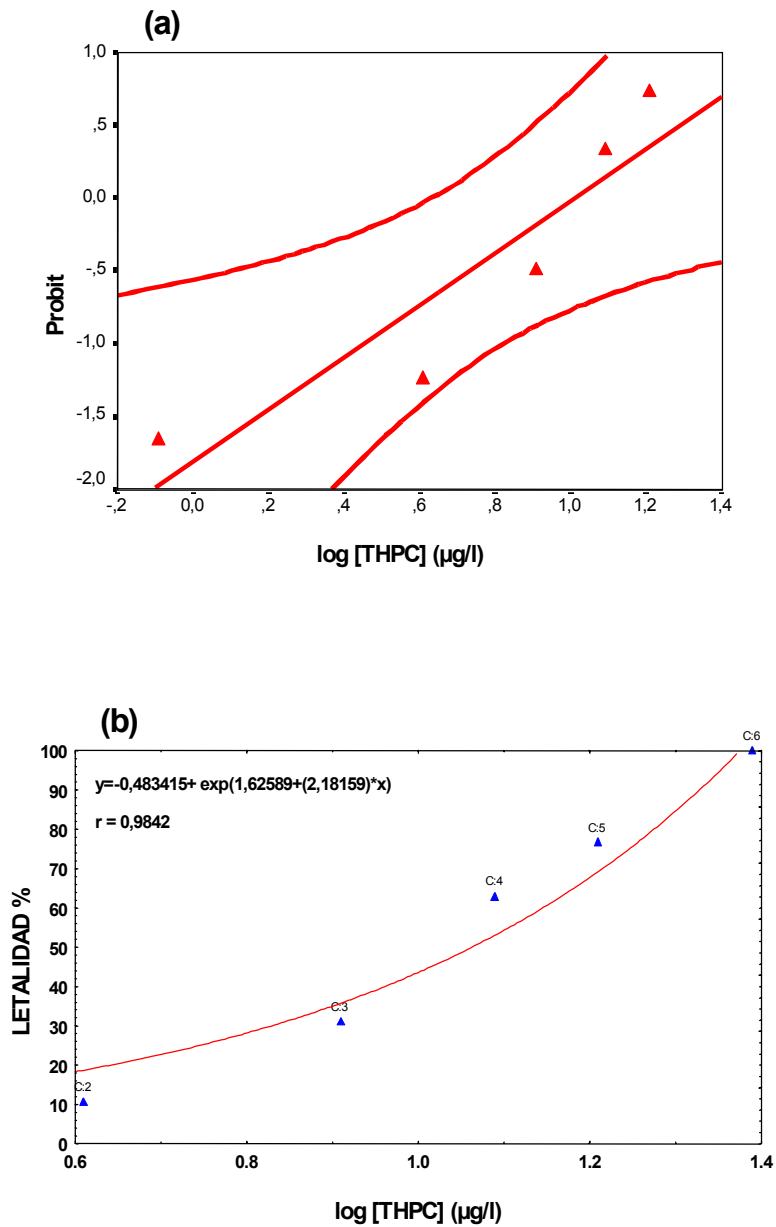


Figura 4.1-1b.- Comparación entre las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo estadístico Probit (a) y el modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial (b), en los resultados obtenidos con cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosfonio sobre larvas de *Artemia* de 48 horas de edad.

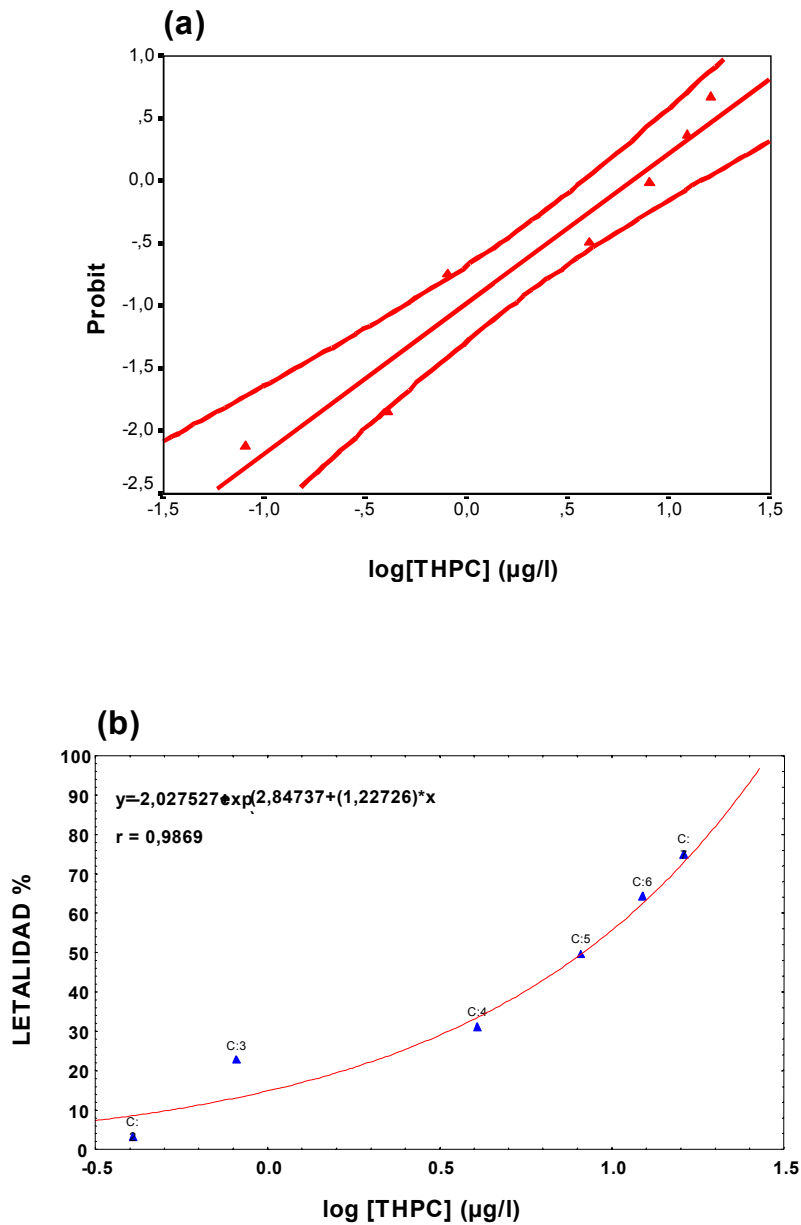


Figura 4.1-1c.- Comparación entre las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo estadístico Probit (a) y el modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial (b), en los resultados obtenidos con cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosfonio sobre larvas de *Artemia* de 72 horas de edad.

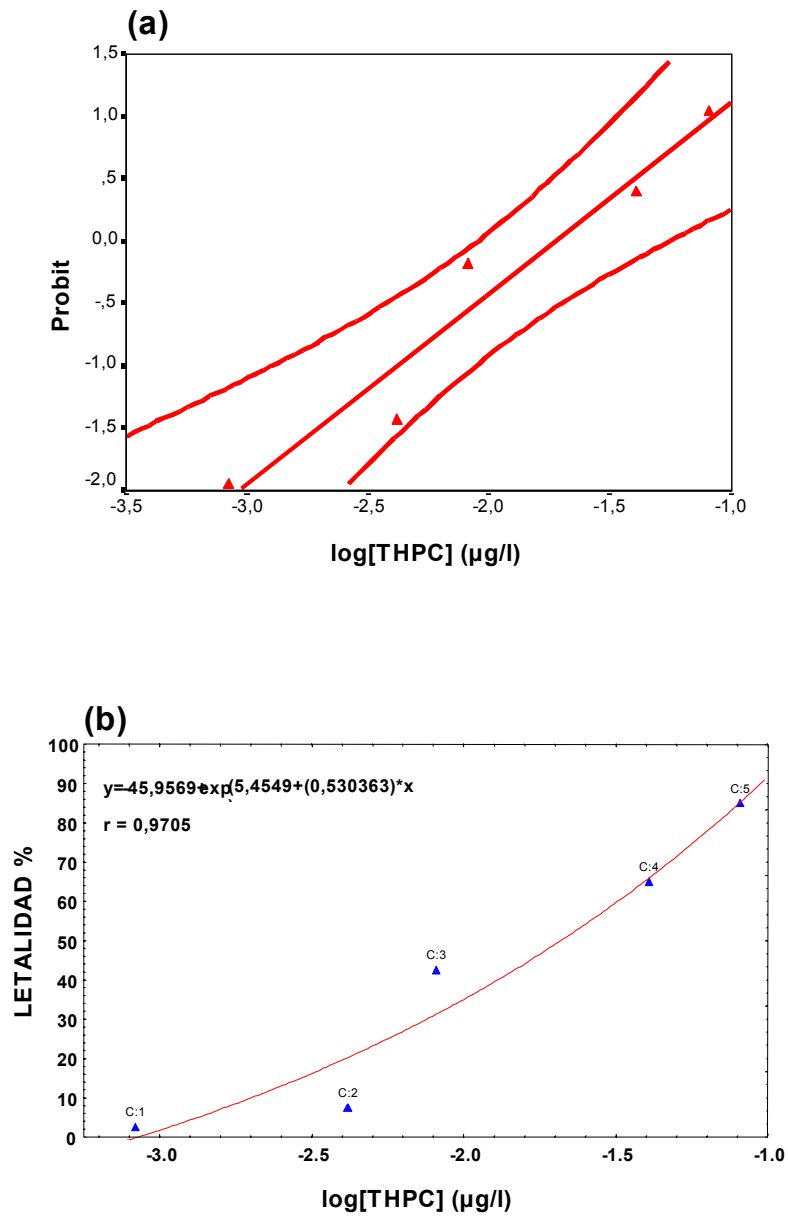


Figura 4.1-2a.- Comparación entre las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo estadístico Probit (a) y el modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial (b), en los resultados obtenidos con cloruro benzalconio sobre larvas de *Artemia* de 24 horas de edad.

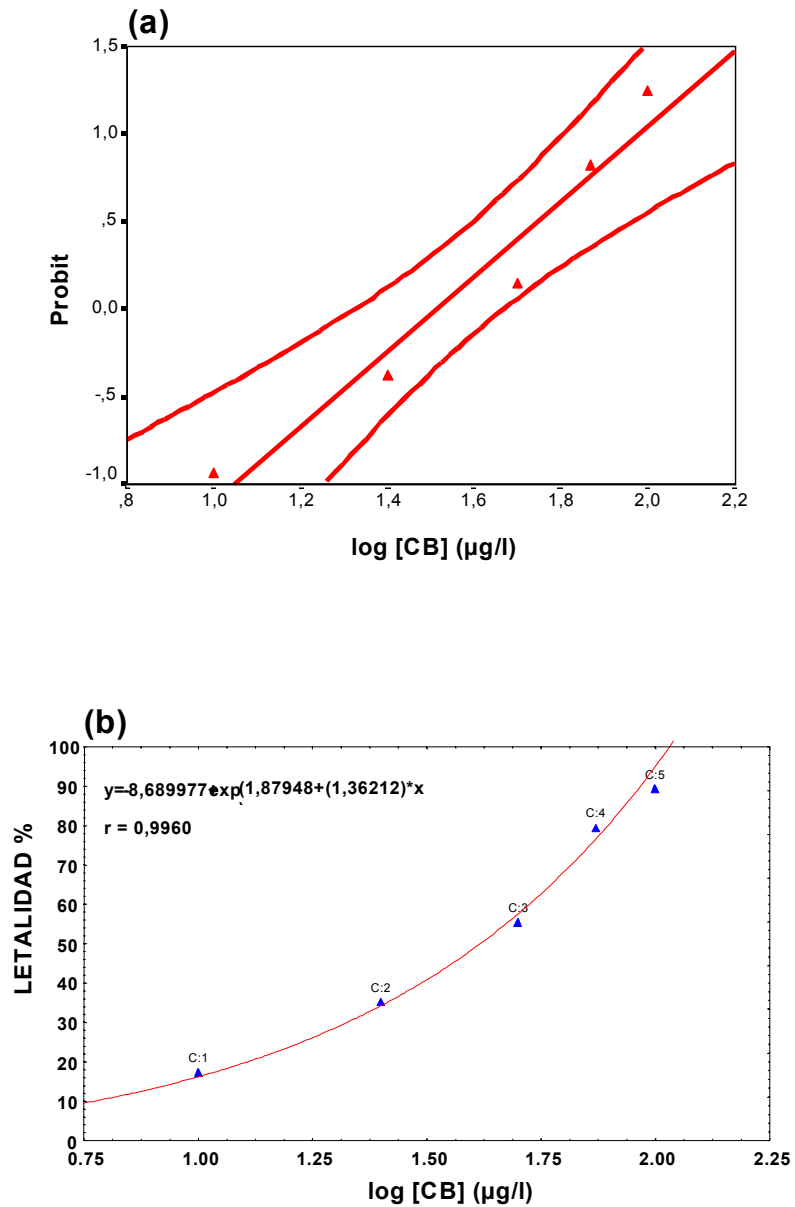


Figura 4.1-2b.- Comparación entre las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo estadístico Probit (a) y el modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial (b), en los resultados obtenidos con cloruro benzalconio sobre larvas de *Artemia* de 48 horas de edad.

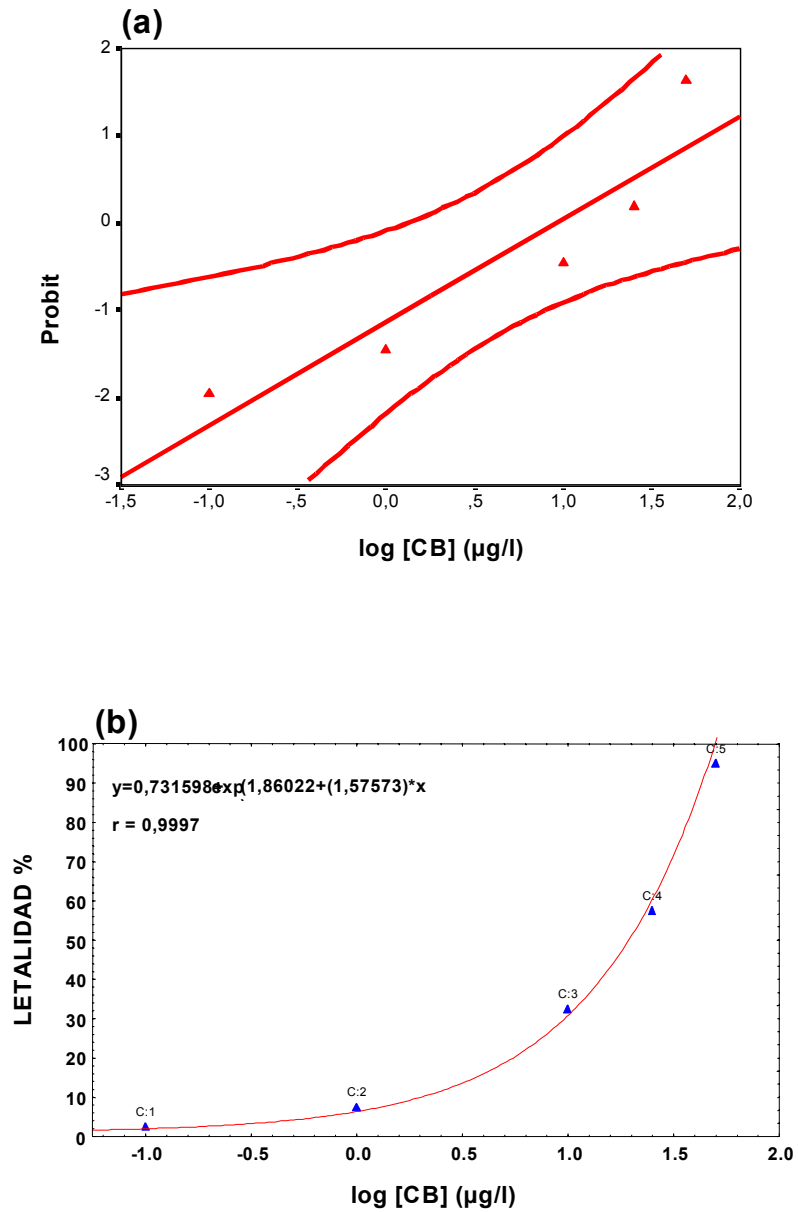


Figura 4.1-2c.- Comparación entre las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo estadístico Probit (a) y el modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial (b), en los resultados obtenidos con cloruro benzalconio sobre larvas de *Artemia* de 72 horas de edad.

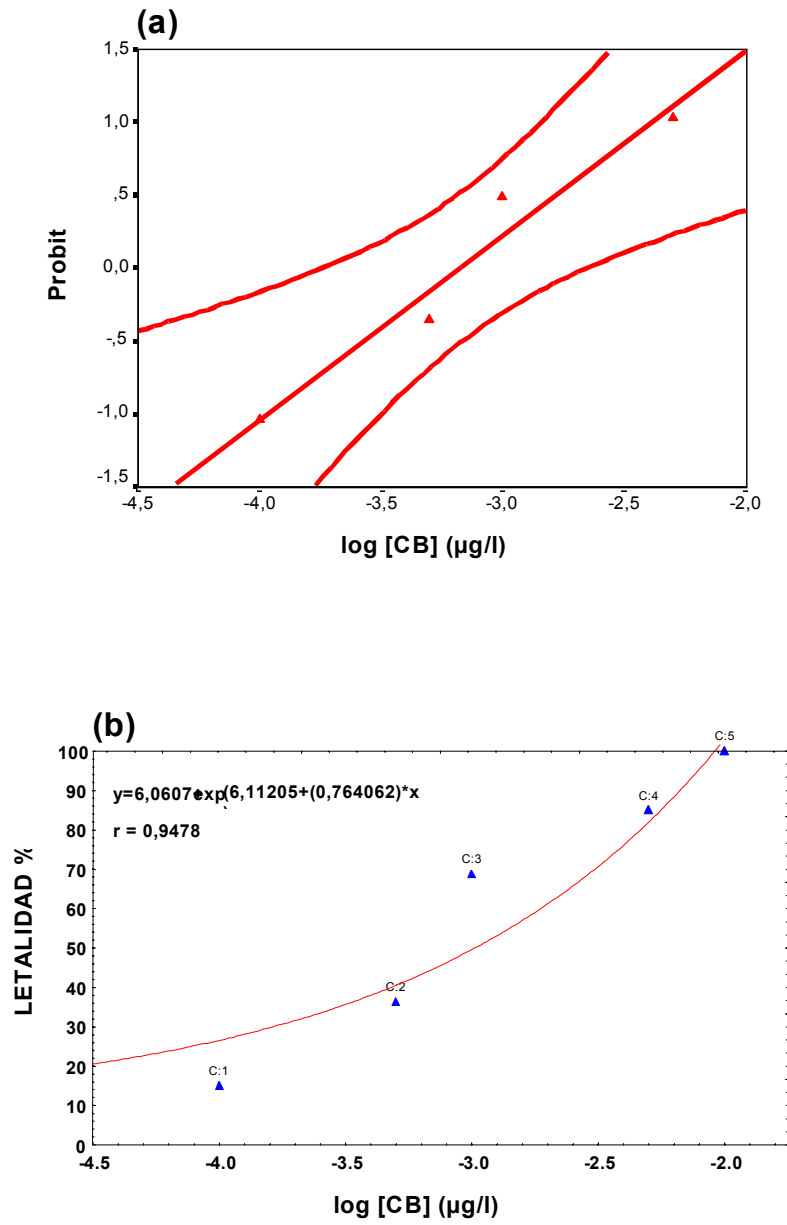


Figura 4.1-3a.- Comparación entre las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo estadístico Probit (a) y el modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial (b), en los resultados obtenidos con ácido triclorosiocianúrico sobre larvas de *Artemia* de 24 horas de edad.

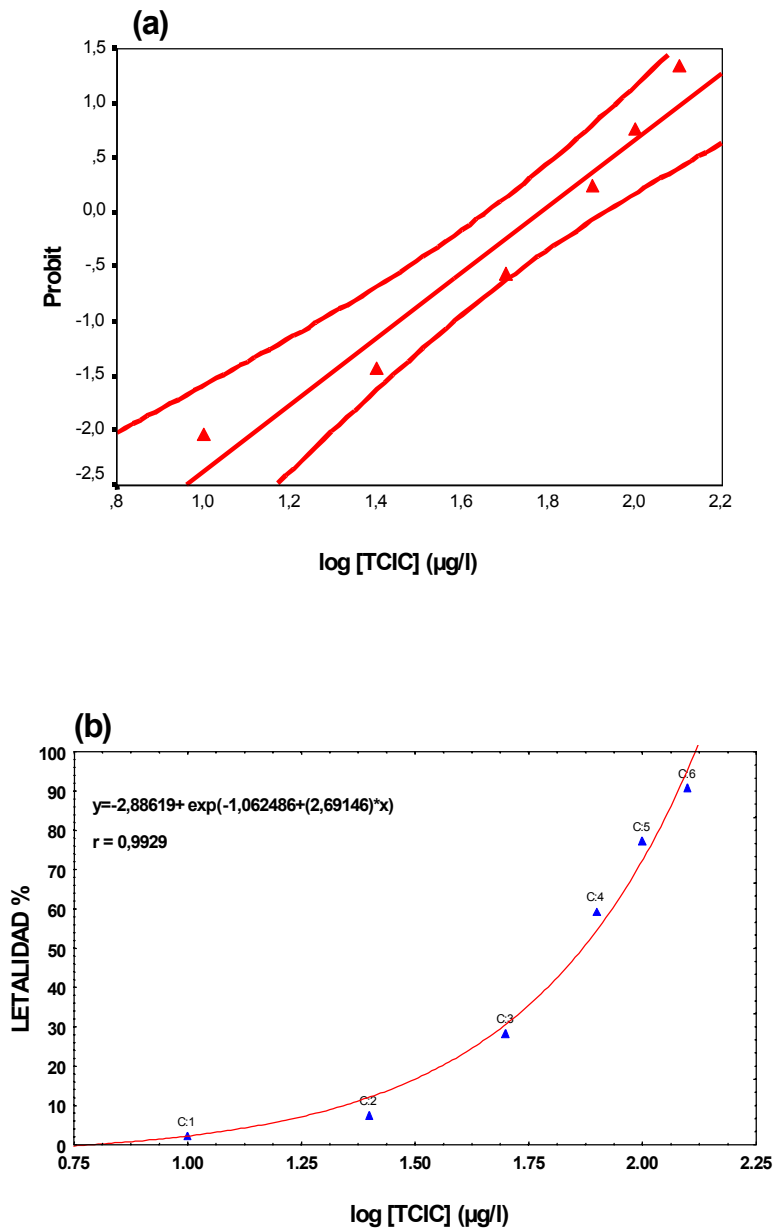


Figura 4.1-3b.- Comparación entre las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo estadístico Probit (a) y el modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial (b), en los resultados obtenidos con ácido triclorosiocianúrico sobre larvas de *Artemia* de 48 horas de edad.

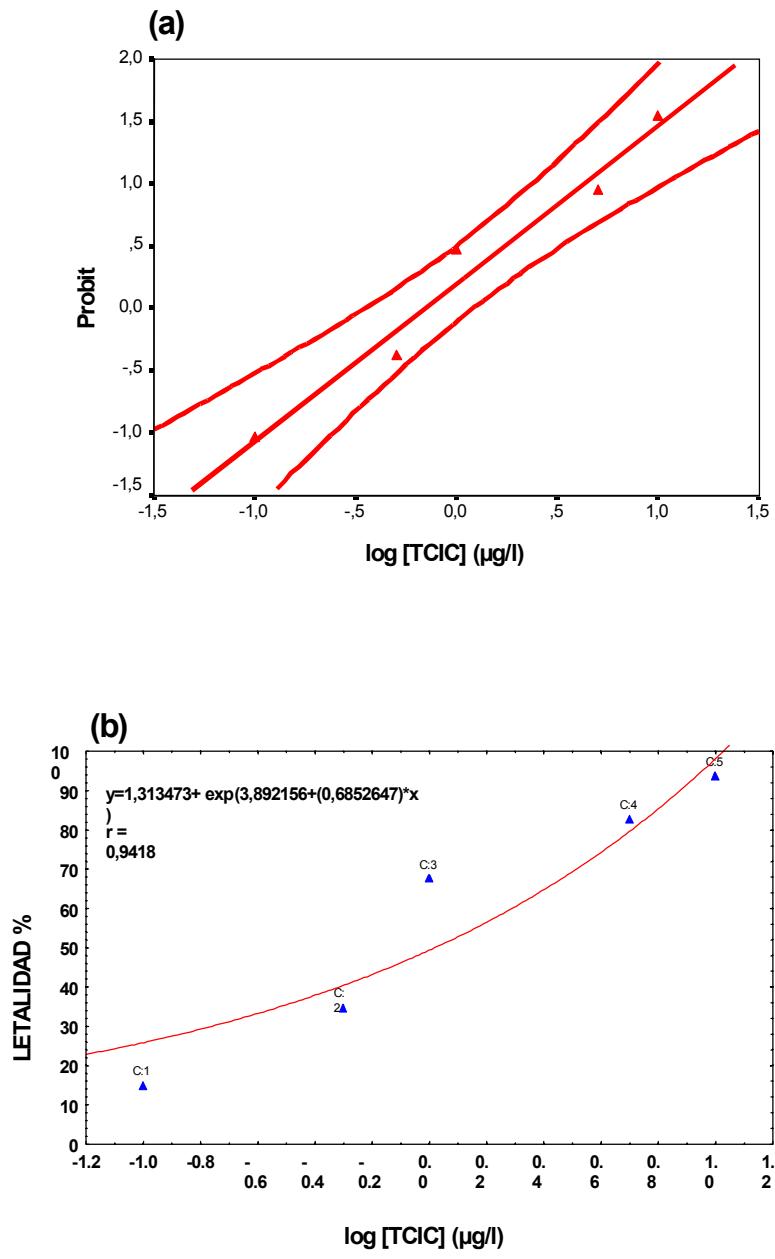


Figura 4.1-3c.- Comparación entre las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo estadístico Probit (a) y el modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial (b), en los resultados obtenidos con ácido triclorosiocianúrico sobre larvas de *Artemia* de 72 horas de edad.

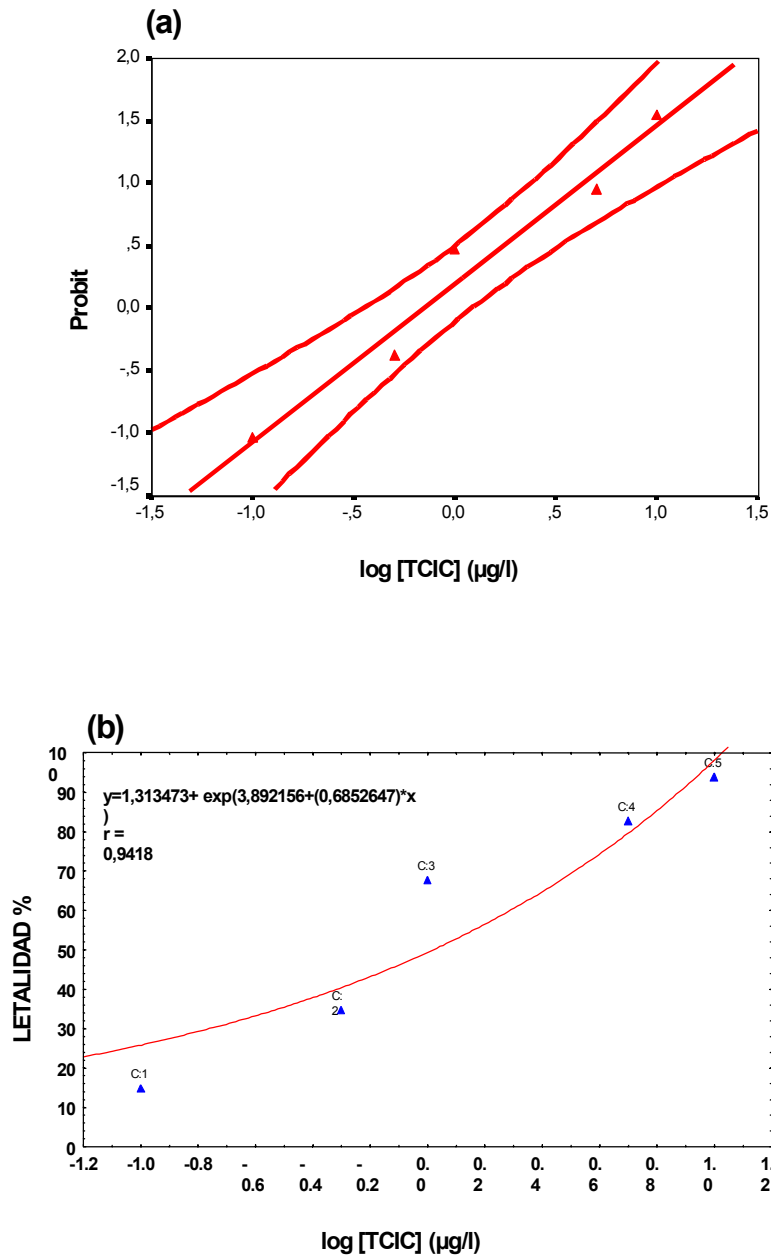


Figura 4.1-4a.- Comparación entre las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo estadístico Probit (a) y el modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial (b), en los resultados obtenidos con bromuro sódico sobre larvas de *Artemia* de 48 horas de edad.

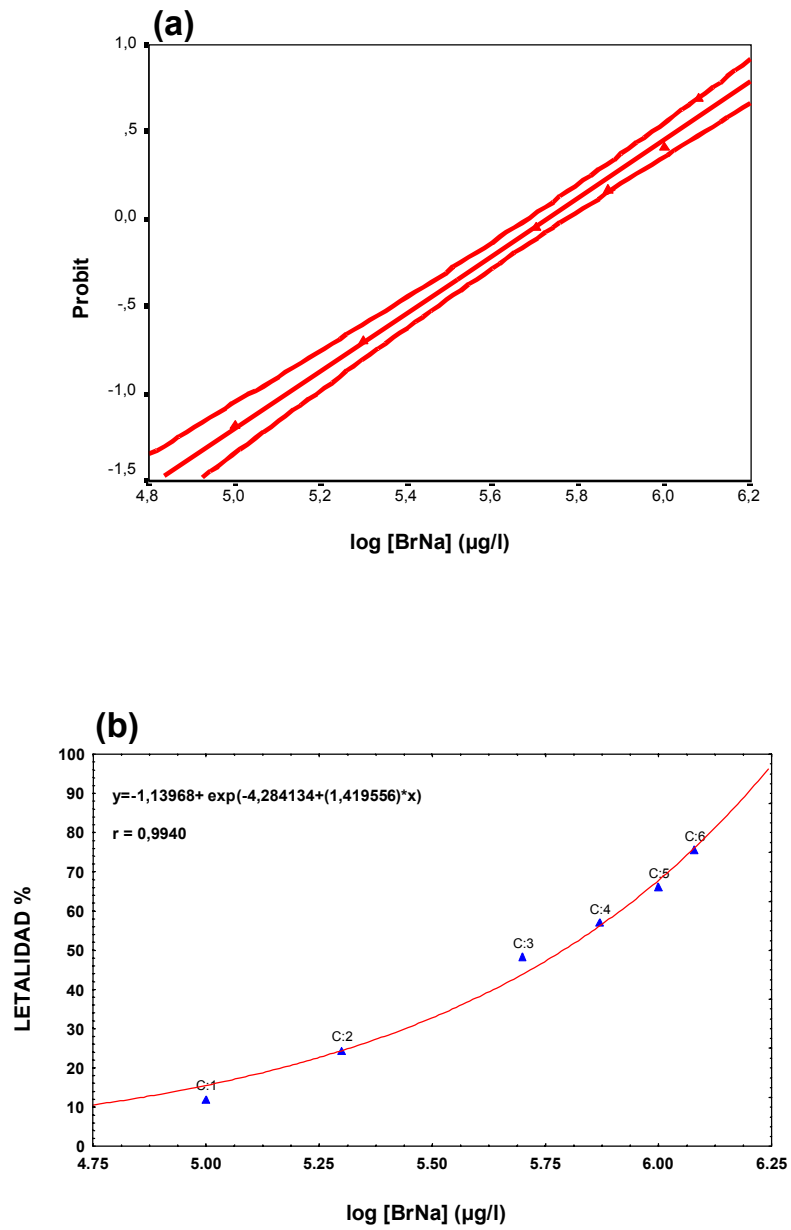
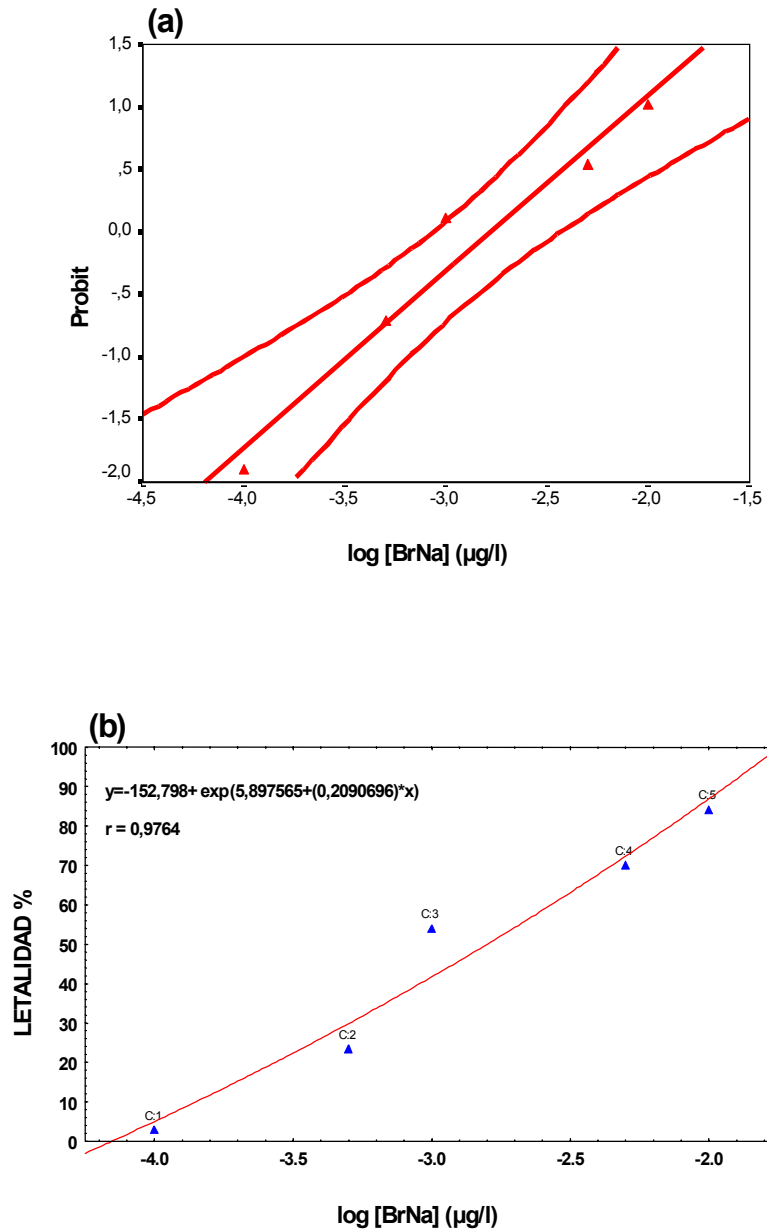


Figura 4.1-4b.- Comparación entre las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo estadístico Probit (a) y el modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial (b), en los resultados obtenidos con bromuro sódico sobre larvas de *Artemia* de 72 horas de edad.



El estudio de letalidad en cada uno de los compuestos activos ensayados revela que, tanto el TCIC (Figura 4.1-5) como el THPC (Figura 4.1-6) y el CB (Figura 4.1-7), se comportan como elementos extremadamente tóxicos para las larvas de *Artemia*, mientras que las exposiciones a diferentes concentraciones de BrNa (Figura 4.1-8) indican que este compuesto es mucho menos tóxico que los anteriores.

Los resultados obtenidos frente a la exposición sobre larvas de *Artemia* de 24 horas de vida indican que el THPC resultó ser el compuesto más tóxico, con un valor para la CL_{50} de 7.82 $\mu\text{g/l}$, seguido del CB (32.67 $\mu\text{g/l}$) y del TCIC (61.28 $\mu\text{g/l}$), mientras que exposiciones hasta 2000 mg/l de BrNa no provocaron efecto letal sobre las larvas.

Sin embargo, los resultados obtenidos con la exposición sobre larvas de *Artemia* de 48 horas de vida evidencian un cambio en cuanto al efecto letal de los compuestos ensayados. Así, mientras que no aparecen diferencias estadísticamente significativas entre la $CL_{50(24)}$ y la $CL_{50(48)}$ correspondientes al THPC, tanto para el CB como para el TCIC aparecen importantes diferencias entre ambos valores, que implican cambios en el orden de efecto letal, de tal forma que en este estadio larvario es el TCIC el elemento más tóxico, con una CL_{50} de 0.70 $\mu\text{g/l}$, seguido del THPC (6.78 $\mu\text{g/l}$), CB (9.14 $\mu\text{g/l}$) y finalmente el BrNa, que sobre este estadio de desarrollo larvario ha sido establecida la CL_{50} en 531.06 mg/l.

El mayor efecto letal provocado por el TCIC se continúa en los ensayos con larvas de *Artemia* de 72 horas de vida. A este estadio larvario se produce un similar efecto tóxico provocado tanto por este compuesto (0.0002 $\mu\text{g/l}$) como para el CB (0.0007 $\mu\text{g/l}$), mientras que el THPC presenta una CL_{50} de 0.019 $\mu\text{g/l}$. El BrNa se comporta como altamente tóxico cuando es aplicado sobre larvas de 72 horas de vida, y aunque los valores siguen siendo muy superiores con respecto al resto de compuestos ensayados, la CL_{50} obtenida de 42.42 mg/l entra dentro del rango de toxicidad que permite realizar dicha afirmación.

El estudio comparativo de la sensibilidad de los tres estadios larvarios utilizados aporta la evidencia del aumento de sensibilidad conforme se aumentó el grado de desarrollo larvario (Figuras 4.1-9, 4.1-10 y 4.1-11). Este hecho pudo ser observado en todos los compuestos ensayados menos en el THPC. Así, en el TCIC, CB y BrNa se producen diferencias estadísticamente significativas para los valores obtenidos entre larvas de *Artemia* de 24 y 48 horas de vida, y entre los correspondientes a los estudios con larvas de *Artemia* de 48 y 72 horas de vida. Sin embargo, en el caso del THPC no aparecen dichas diferencias entre larvas de *Artemia* de 24 y 48 horas de vida, pero si se producen entre éstas y las larvas de 72 horas de vida.

Figura 4.1-5 Representación de la curva concentración-respuesta en superficie tras la exposición a ácido tricloroisocianúrico de larvas de *Artemia* de 24-, 48- y 72 horas de vida.

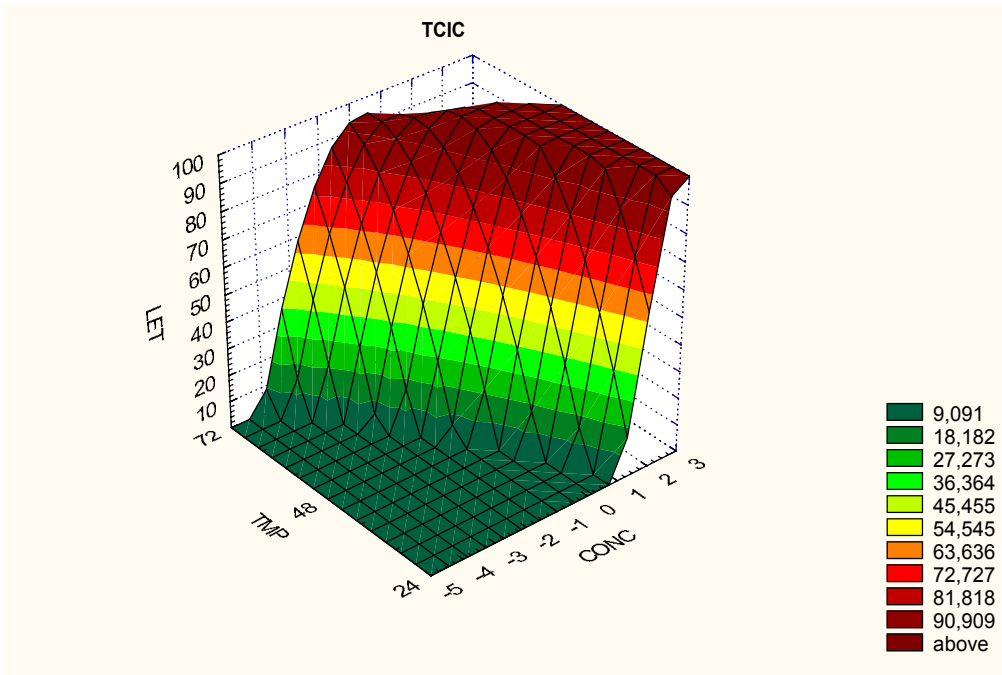


Figura 4.1-6 Representación de la curva concentración-respuesta en superficie tras la exposición a cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosfonio de larvas de *Artemia* de 24-, 48- y 72 horas de vida.

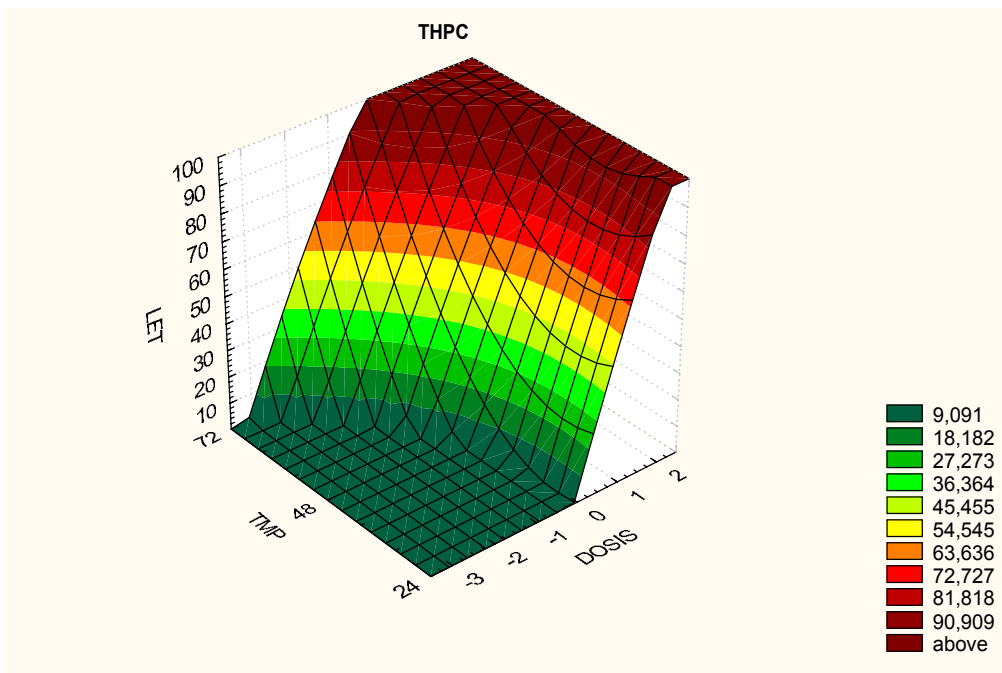


Figura 4.1-7 Representación de la curva concentración-respuesta en superficie tras la exposición a cloruro de benzalconio de larvas de *Artemia* de 24-, 48- y 72 horas de vida.

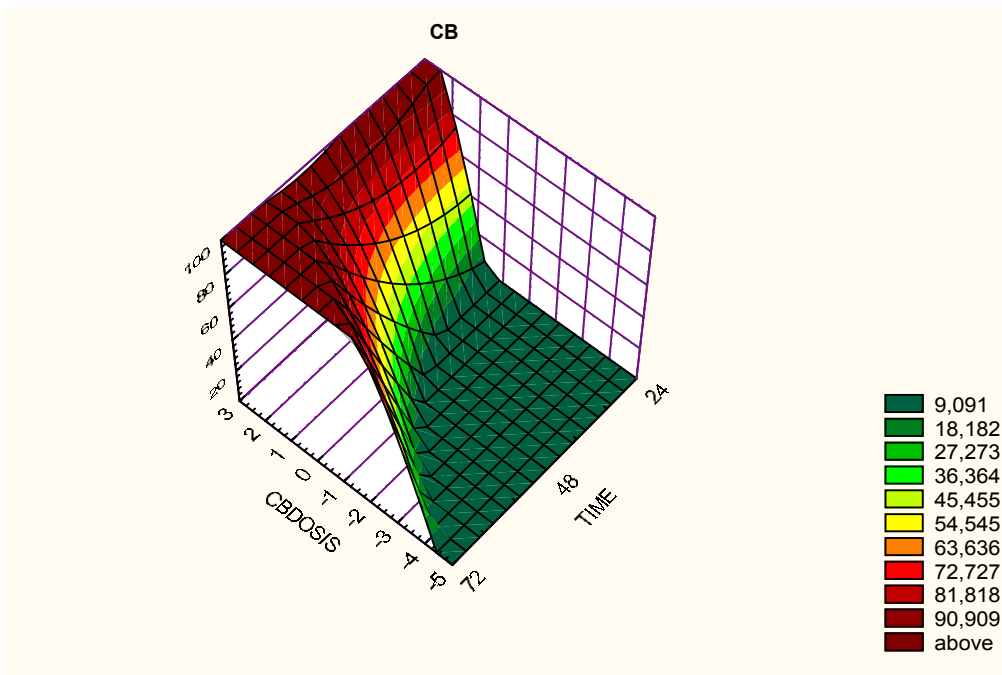


Figura 4.1-8 Representación de la curva concentración-respuesta en superficie tras la exposición a bromuro sódico de larvas de *Artemia* de 24-, 48- y 72 horas de vida.

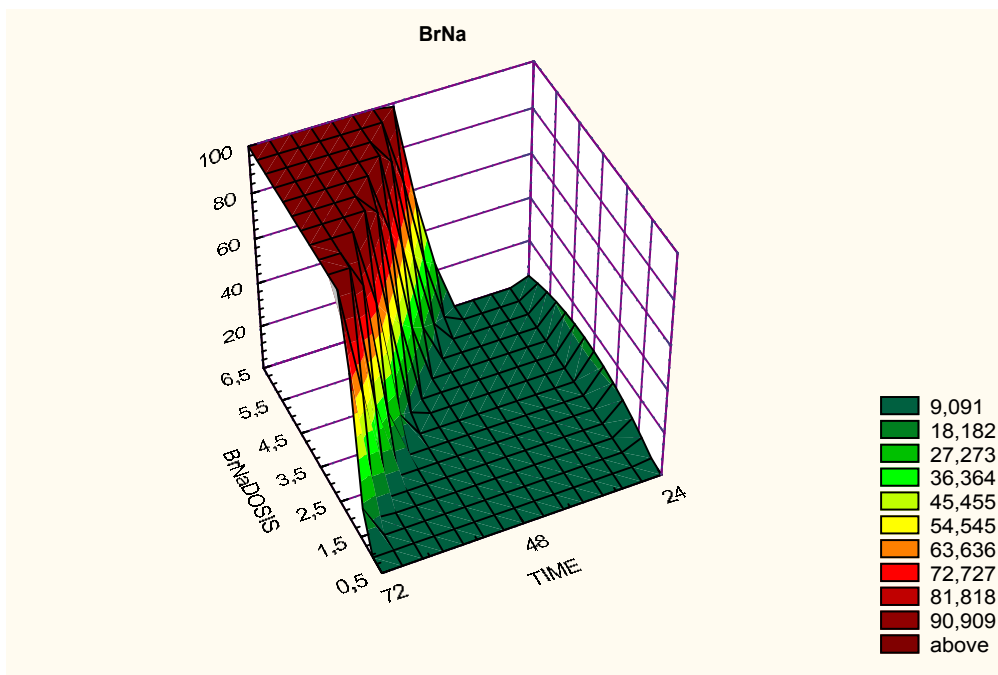


Figura 4.1-9 Comparación de las curvas para los distintos biocidas en los resultados obtenidos sobre larvas de *Artemia* de 24 horas de vida.

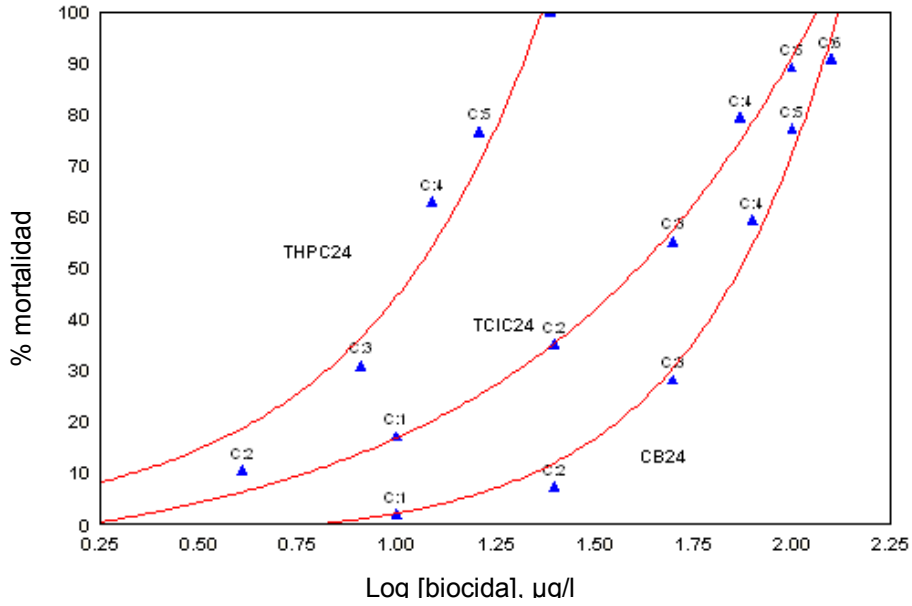


Figura 4.1-10 Comparación de las curvas para los distintos biocidas en los resultados obtenidos sobre larvas de *Artemia* de 48 horas de vida.

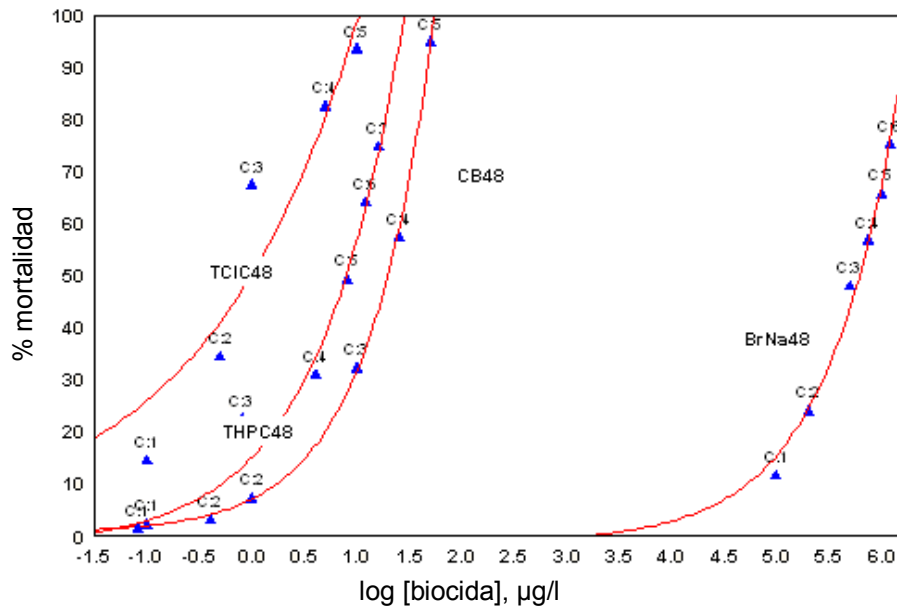
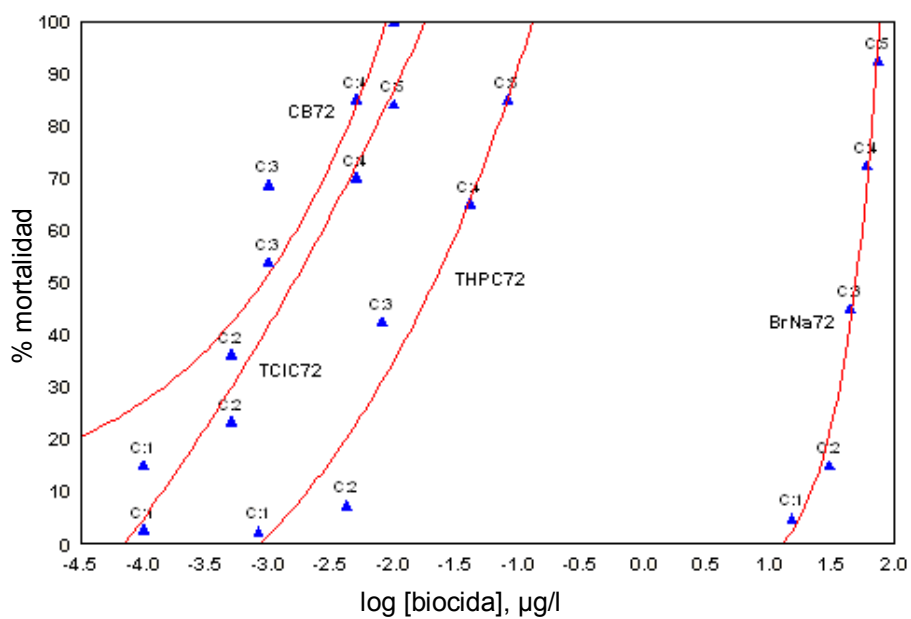


Figura 4.1-11 Comparación de las curvas para los distintos biocidas en los resultados obtenidos sobre larvas de *Artemia* de 72 horas de vida.



4.2 Ensayos de Inhibición del Fototactismo

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

El establecimiento del mínimo número de larvas de *Artemia* que son necesarias para la realización de los ensayos para determinar el efecto inhibitor sobre el fototactismo de estos organismos, y su relación con el tiempo necesario para conseguir la total migración horizontal de larvas no tratadas, son presentados en la Tabla 4.2.1-1.

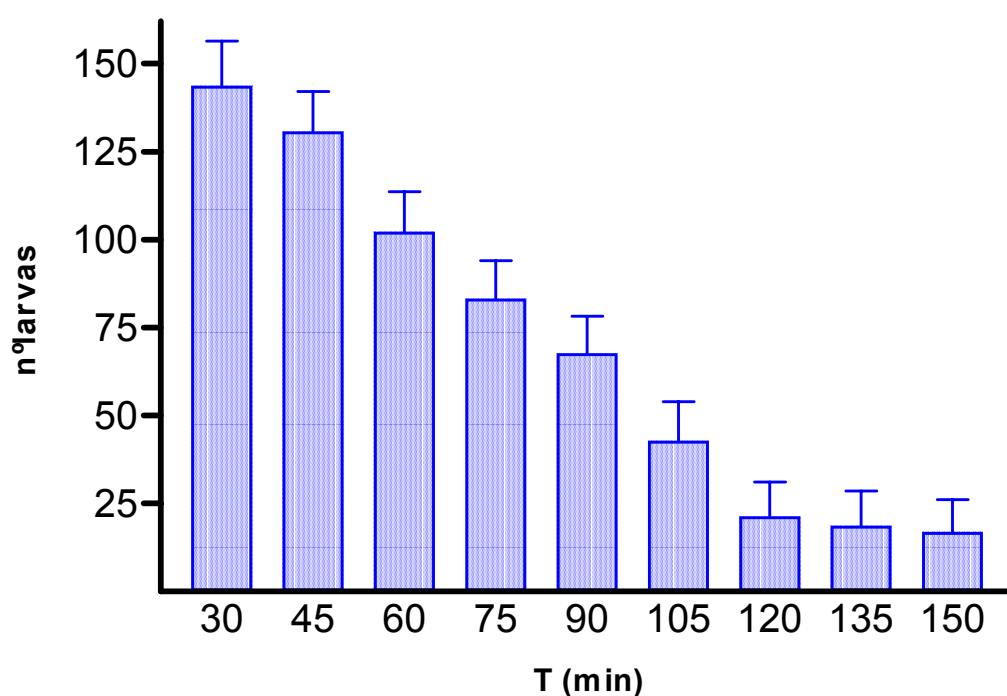
Tabla 4.2.1.-1. Relación entre el número de larvas de *Artemia* no tratadas y el tiempo (T), expresado en minutos, que han necesitado para practicar la migración total por el interior de la cámara oscura (10 cm. longitud). Los resultados son expresados como la media (\pm s.e.m.) de seis experiencias (n=6).

T (min)	Nº larvas	n
30,0	143,68 \pm 12.75	6
45,0	130,69 \pm 11.36	6
60,0	102,22 \pm 11.44	6
75,0	83,21 \pm 10.78	6
90,0	67,66 \pm 10.58	6
105,0	42,89 \pm 10.99	6
120,0	21,43 \pm 9.67	6
135,0	18,75 \pm 9.85	6
150,0	16,89 \pm 9.30	6

Los resultados obtenidos revelan una dependencia en cuanto al número de organismos empleados y el fenómeno fototáctico, de tal forma que cuanto mayor sea el número de individuos empleados, menor es el tiempo de progresión en la cámara oscura. De esta forma, y bajo un criterio de utilización del menor número de individuos por ensayo, los resultados obtenidos con larvas de *Artemia* de 24 horas de vida, sin previa exposición a ningún contaminante, indican como parámetros idóneos de estudio en la cámara

oscura diseñada un número de 20 larvas por ensayo y un tiempo de ensayo de 120 minutos, ya que no existen variaciones estadísticamente significativas en cuanto al tiempo de ensayo cuando se aplicaba un número de larvas inferior al propuesto (Figura 4.2-1).

Figura 4.2-1 Representación gráfica de la relación entre el número de larvas de *Artemia* de 24 horas de vida y el tiempo necesario para que éstas consigan la migración total en la cámara oscura. Las barras del gráfico representan la media de 6 ensayos (n=6), cada una con su correspondiente error estándar de la media (s.e.m.)



4.2.2 Exposiciones a los diferentes biocidas ensayados

Los resultados obtenidos tras la exposición de larvas de *Artemia*, a tiempo de desarrollo larvario correspondiente a 24 horas de vida, se presentan resumidos en la Tabla 4.2.2-1. Los valores presentados fueron obtenidos a partir de un modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial, después del estudio comparativo entre éste y el modelo estadístico Probit, por haber obtenido un mejor ajuste de curva, tal y como queda reflejado en las Figuras 4.2.2-1, 4.2.2-2, 4.2.2-3 y 4.2.2-4.

Tabla 4.2.2-1 Valores de Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀), con sus correspondientes Límites de Confianza al 95 % (LC 95 %), obtenidos para cada uno de los compuestos biocidas ensayados, sobre larvas de *Artemia* de 24 horas de vida.

COMPUESTO	n	CI ₅₀ (LC 95 %)
Cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosfonio	12	0,25 µg/l (0,17-0,39)
Cloruro de benzalconio	12	0,60 µg/l (0,24-1,49)
Ácido tricloroisocianúrico	12	1,69 µg/l (1,21-2,35)
Bromuro sódico	12	50,45 mg/l (40,92-62,19)

Los valores de inhibición del fototactismo obtenidos sobre larvas de *Artemia* de 24 horas de vida ponen de manifiesto que los cuatro compuestos utilizados en los ensayos son capaces de disminuir la capacidad fototáctica de las larvas a concentraciones subletales, muy por debajo de los valores correspondientes a sus respectivas CL₅₀ (Figura 4.2.2-5)

Figura 4.2.2-1 Comparación entre las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo estadístico Probit (a) y el modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial (b), en los resultados de fototoxicidad obtenidos con cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosfonio sobre larvas de *Artemia* de 24 horas de edad.

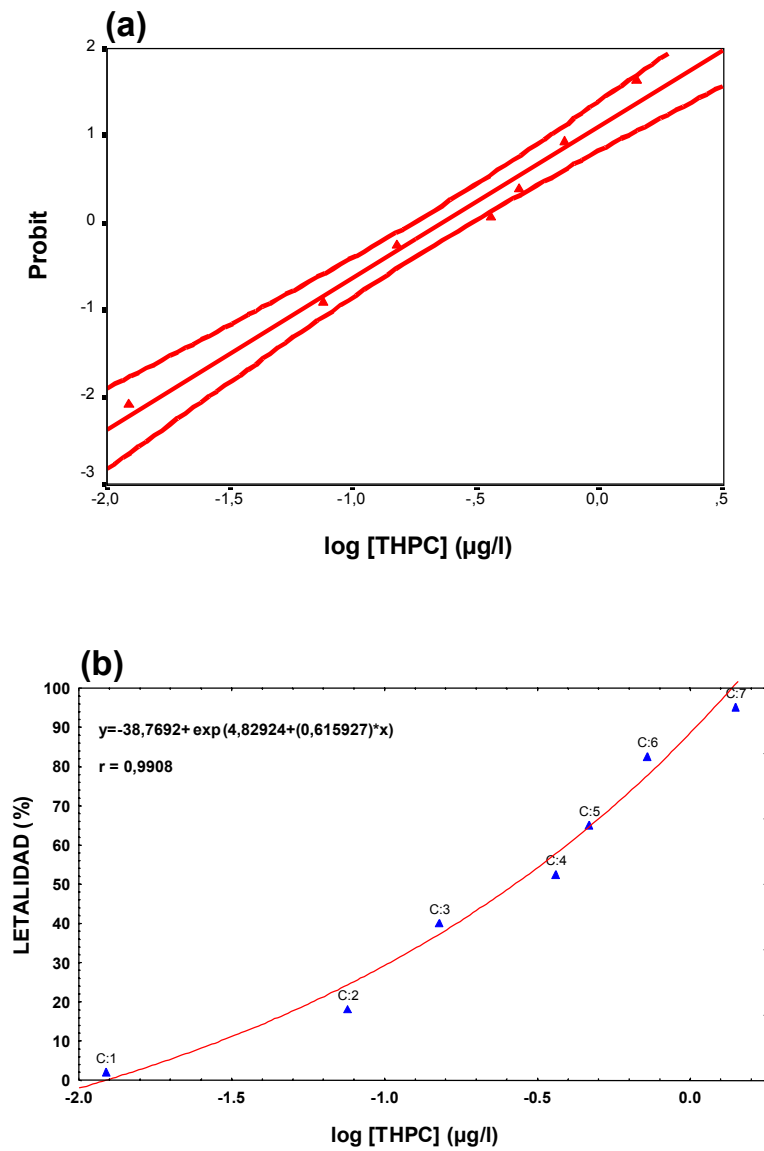


Figura 4.2.2-2 Comparación entre las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo estadístico Probit (a) y el modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial (b), en los resultados de fototoxicidad obtenidos con cloruro de benzalconio sobre larvas de *Artemia* de 24 horas de edad.

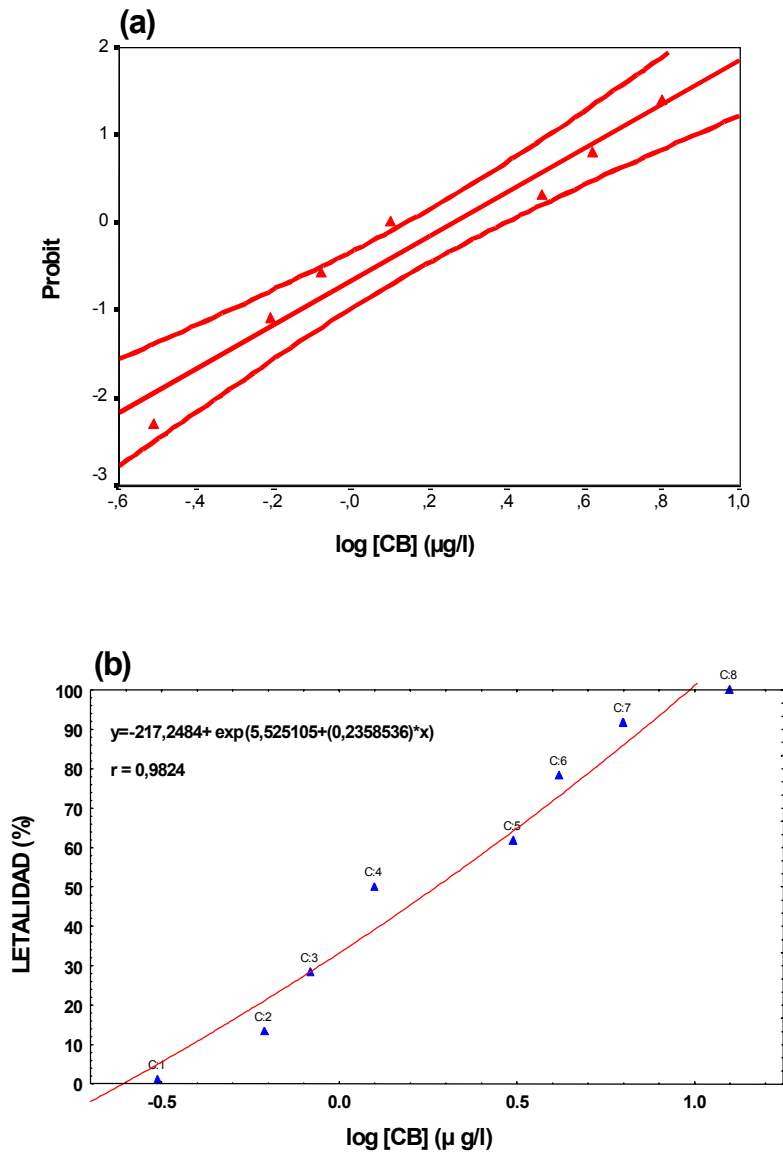


Figura 4.2.2-3 Comparación entre las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo estadístico Probit (a) y el modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial (b), en los resultados de fototoxicidad obtenidos con ácido tricloroisocianúrico sobre larvas de *Artemia* de 24 horas de edad.

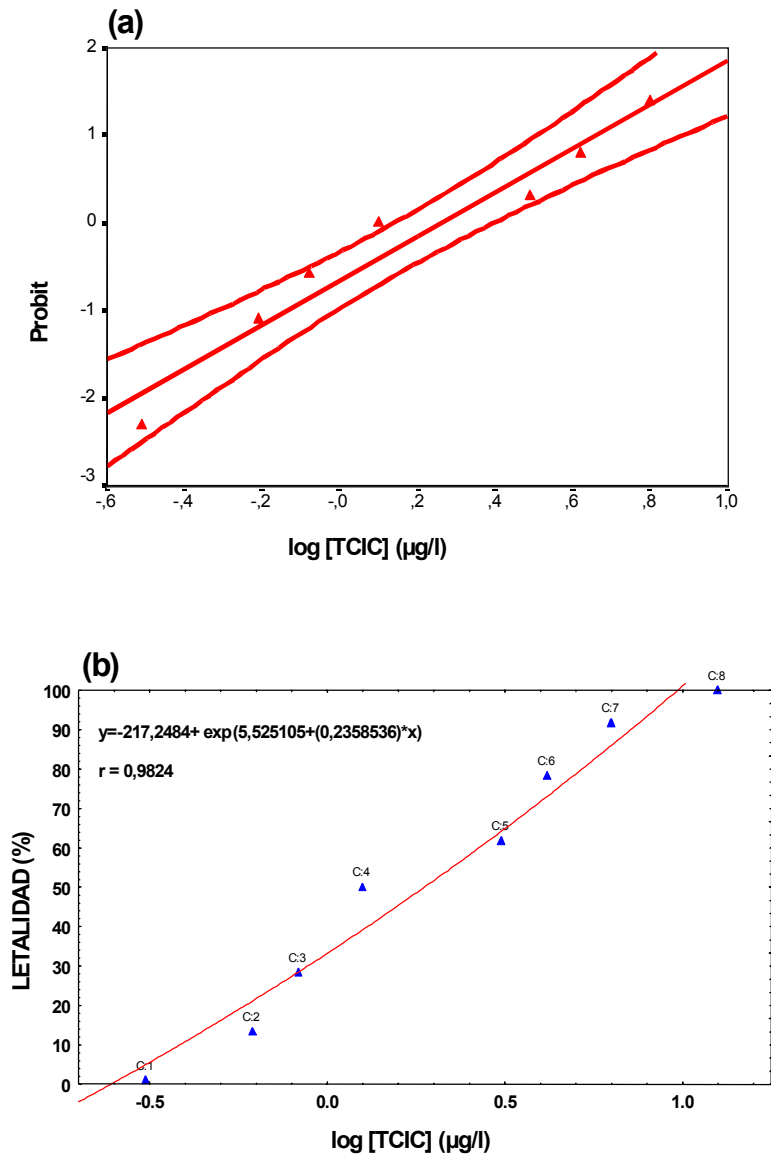


Figura 4.2.2-4 Comparación entre las curvas obtenidas mediante la aplicación del modelo estadístico Probit (a) y el modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial (b), en los resultados de fototoxicidad obtenidos con bromuro sódico sobre larvas de *Artemia* de 24 horas de edad.

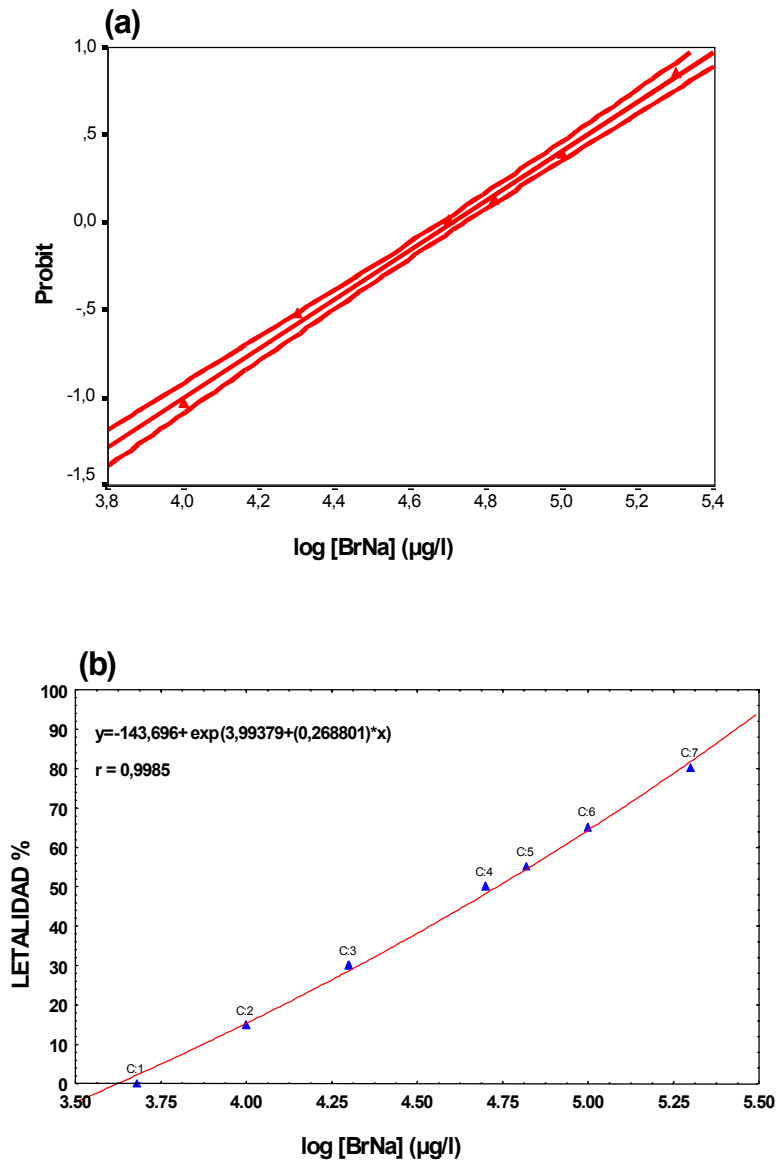
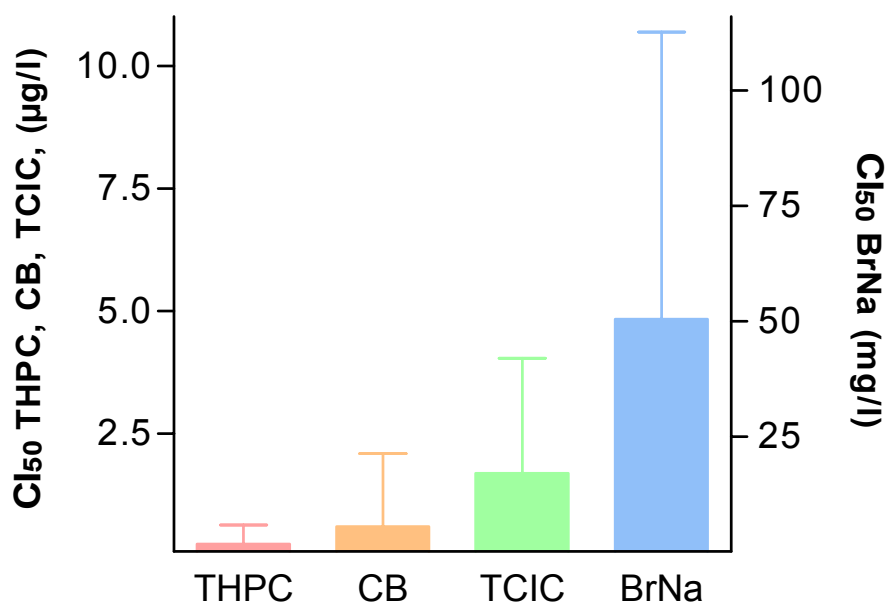


Figura 4.2.2-5 Representación gráfica de los valores de la Concentración Inhibitoria 50 (Cl_{50}), obtenidos para cada uno de los compuestos biocidas ensayados, sobre larvas de *Artemia franciscana* de 24 horas de vida.



El THPC ha demostrado ser el compuesto potencialmente más tóxico, respecto a su capacidad de inhibición de fototactismo, sobre las larvas de *Artemia* de 24 horas de vida, quedando establecida la Cl_{50} en 0.25 µg/l, lo que supone una concentración 31.28 veces inferior a la establecida para su correspondiente CL_{50} . Sin embargo, desde un punto de vista relativo, los resultados obtenidos mediante exposiciones con CB sobre larvas de *Artemia* de 24 horas de edad presentan a este compuesto con mayor capacidad de inhibición de la capacidad fototáctica, ya que el valor obtenido para la Cl_{50} , correspondiente a 0.60 µg/l es 54.45 veces menor al establecido como CL_{50} . Los valores de Cl_{50} obtenidos para el TCIC (1.69 µg/l) y BrNa (50.45 mg/l), aunque inferiores a los obtenidos para los dos compuestos anteriores, resultan similares, en cuanto a su capacidad relativa de provocar el efecto fototático, a los obtenidos para el THPC, llegando a ser 36.26 y 39.64 veces inferiores, respectivamente, a los establecidos para sus correspondientes CL_{50} .

4.3 Ensayos de Bioacumulación

Los resultados obtenidos tras la exposición de larvas de *Artemia*, mediante ensayos de renovación cada 24 horas, y con exposición continua hasta 168 horas, quedan sumariados en la Tabla 4.3-1 y su correspondiente representación gráfica en la Figura 4.3-1.

Los resultados indican que prácticamente no existe un proceso de bioacumulación estadísticamente significativo, cuando las larvas de *Artemia* eran expuestas a una concentración de 1/10 de la CL₅₀ de TCIC, durante un periodo de exposición de 168 horas y mediante ensayo de renovación cada 24 horas.

Tabla 4.3-1 Concentración de los distintos compuestos, o sus correspondientes transformaciones en el medio acuático, detectados a nivel tisular en larvas de *Artemia* a diferentes tiempos después de exposiciones de 168 horas. Los valores reseñados corresponden a la media (\pm s.e.m.) de 4 experimentos, expresados como μg de compuesto por mg de proteína.

T (hr)	n	THPC <i>μg formaldeido/mg/prot</i>	TCIC <i>μg CN/mg prot</i>	BrNa <i>μg bromuro/mg prot</i>
0	4	0,000	0,000	0,000
6	4	0,000	0,000	0,470 \pm 0,120
24	4	0,003 \pm 0,002	0,000	0,950 \pm 0,230
48	4	0,010 \pm 0,004	0,000	3,840 \pm 0,440
72	4	0,023 \pm 0,002	0,000	10,360 \pm 2,100
96	4	0,031 \pm 0,002	0,010 \pm 0,010	27,440 \pm 4,650
120	4	0,045 \pm 0,003	0,000	45,320 \pm 6,660
144	4	0,054 \pm 0,003	0,010 \pm 0,010	47,070 \pm 9,890
168	4	0,075 \pm 0,003	0,010 \pm 0,010	46,210 \pm 10,760

THPC: cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosfonio

TCIC: ácido tricloroisocianúrico

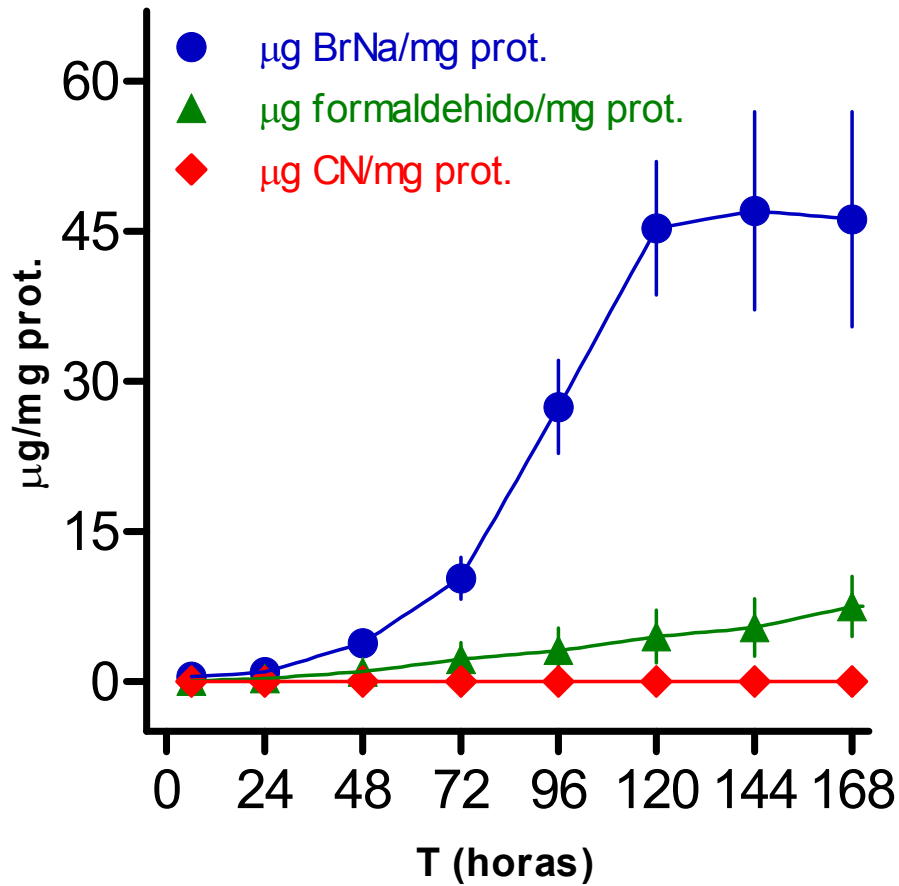
BrNa: bromuro sódico

Cuando las larvas de *Artemia* fueron expuestas a THPC, una moderada acumulación de formaldehído ha podido ser detectada en los homogeneizados practicados con dichas larvas. Así, aparece un aumento de la concentración de formaldehído, tiempo-dependiente, alcanzando un valor máximo de 0.075 ± 0.003 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína en las larvas sobre las que se practicó la exposición hasta 168 horas.

Los ensayos practicados mediante la exposición a BrNa indican que este compuesto se acumula en las larvas de *Artemia*, aumentando la concentración conforme aumenta el tiempo de exposición. Sin embargo, en este caso se produce un incremento significativo de los niveles de bromuro hasta las 120 horas de exposición continua, pasadas las cuales la concentración de bromuro no aumenta significativamente, apareciendo una estabilización en cuanto a la concentración detectada. Así, se han obtenido concentraciones máximas de bromuro de 47.07 ± 9.89 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína a las 144 horas de exposición.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que, aunque la capacidad de bioacumulación de estos biocidas resulta reducida o nula, existen diferencias entre los cuatro compuestos analizados sobre larvas de *Artemia*, estableciéndose el siguiente rango de acumulación: BrNa > THPC > TCIC.

Figura 4.3.1 Representación gráfica de la concentración de los distintos compuestos, o sus correspondientes transformaciones en el medio acuático, detectados a nivel tisular en larvas de *Artemia franciscana* a diferentes tiempos después de exposiciones de 168 horas. Los valores reseñados corresponden a la media y son expresados como $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína.



DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 Comparación de análisis estadístico

El tratamiento de los datos obtenidos fue planteado originalmente mediante un modelo estadístico de Probit, cuya base tiene su origen en el modelo desarrollado por Bliss (1934). Este tratamiento se enmarca dentro de un proceso de respuesta binaria, donde la variable dependiente sólo toma valores con 0 ó 1, quedando los valores de la variable dependiente ajustados a probabilidades (Cox, 1970).

Esta metodología de tratamiento de datos puede mejorar las metodologías de estimación basadas en modelos de regresión lineal (ajuste lineal), ya que puede corregir alguno de sus inconvenientes, como serían:

- La recta de regresión ajustada no se encuentra acotada, por lo que podrían aparecer probabilidades superiores a 1, así como probabilidades inferiores a 0.
- En la práctica, en los modelos de ajuste lineal conforme aumenta cualquiera de las variables explicativas, la probabilidad de que $y = 1$ ó $y = 0$ no aumenta o disminuye de forma proporcional.
- Al ser modelos que presentan heterocedasticidad, los errores de cálculo producidos no se reparten proporcionalmente a la hora de realizar dichos cálculos.

El análisis de Probit utiliza como método de estimación el Método de Máxima Verosimilitud, basado en la maximización de la función de verosimilitud en la muestra, lo que nos ha permitido obtener una aproximación de la confiabilidad mediante los valores más probables de los parámetros de distribución para un conjunto de datos.

Así, la utilización del Método Probit ha permitido medir la relación entre la intensidad de un estímulo y la proporción de casos que presentan una cierta respuesta a dicho estímulo, hecho importante en situaciones en las que se dispone de una respuesta dicotómica que se piensa puede estar influenciada o

causada por los niveles de alguna o algunas variables independientes. De esta forma, resulta particularmente adecuada para el tratamiento de datos experimentales, permitiendo estimar la intensidad necesaria para que un estímulo llegue a inducir una determinada proporción de respuestas, como la dosis efectiva para la mediana, valor central de las variables ordenadas en magnitud (Finney, 1971).

El método del Probit se desarrolló antes de que se hubieran establecido algoritmos de cálculo que permitieran soslayar los errores cometidos para el análisis de datos en los que una variable es binomial, y por ello se pueden producir efectos de heterocedasticidad, es decir, los errores no se ajustan a una distribución normal en el momento del cálculo. A la hora de realizar la aproximación de la curva de regresión el punto teórico y el observado presentan una diferencia. A esas diferencias es a lo que Wold (1939) denominó *pérdida* (suma de los cuadrados de la desviación alrededor de los valores predichos).

El alto grado de incertidumbre proporcionado por los resultados obtenidos mediante el análisis Probit, nos ha llevado a buscar un método alternativo que redujera esta incertidumbre y nos permitiera trabajar exclusivamente con los datos que definen el campo de existencia realmente observado de la variable explicativa. Así, el modelo de Regresión no Lineal de Crecimiento Exponencial resultó ser el más adecuado para estas experiencias.

Para este modelo, se aplican métodos de Ajuste por Mínimos Cuadrados para minimizar la función de pérdida, y sería el desarrollo de algoritmos iterativos el que permitió el uso de este tipo de análisis de regresión no lineal. En nuestro caso es más evidente en tanto que la variable discontinua original puede considerarse transformada por el conteo y la posterior transformación a una base porcentual (Jakoby y col., 1972; Brent, 1973).

Aunque para este tipo de análisis resulta usual aplicar los procedimientos *Quasi-Newton*, propuestos por Gill y Murria (1972) como métodos estandarizados para el análisis de regresiones no lineales, en el

presente trabajo hemos optado por aplicar el procedimiento de ajuste de regresión no lineal de Crecimiento Exponencial, aplicando el algoritmo *Simplex* propuesto por Bates y Watts (1988), ya que permitía minimizar el efecto de heterocedasticidad que con el anterior podía apreciarse. El Método Simplex, establecido por Nelder y Mead (1965) hace que el algoritmo no sea realmente una estimación de derivadas de la pérdida de función, y de hecho, en cada iteración la función es evaluada en $(m+1)$ puntos dentro de un parámetro espacial bidimensional.

El tratamiento de los datos de los ensayos, tanto de letalidad como de inhibición del fototactismo, se han efectuado sobre datos transformados logarítmicamente, utilizando los modelos estadísticos Probit que usa como método de estimación el de Máxima Verosimilitud, y un modelo de ajuste de Regresión no lineal de Crecimiento Exponencial usando el algoritmo Simplex. El análisis comparativo de los resultados y los tests de hipótesis se han realizado mediante la aplicación de un *tests no paramétrico de Wilcoxon* para muestras pareadas.

5.1.1 Comparación entre métodos

Realizado el tratamiento estadístico por los dos métodos considerados (Probit-Crecimiento Exponencial), se ha procedido a la comparación de los mismos con el fin de poner en evidencia la posible existencia de diferencias significativas entre ambos. Para ello, se ha utilizado un test Wilcoxon de muestras pareadas, usando como datos de entrada los valores de estímulo respuesta correspondientes a los cuantiles comprendidos entre 10 y 90.

Los métodos clásicos de comparación de las curvas de respuesta suelen utilizar, como datos de partida, el valor medio de la distribución y el error típico de la misma. Este criterio parece insuficiente y es por lo que se ha optado por un análisis comparativo que incluyera no sólo este valor sino todos aquellos que determinan la distribución de la respuesta estudiada.

Para la comparación Probit-Crecimiento Exponencial, se ha trabajado con hipótesis nula, observando que existe una $P \geq 0.05$, lo cual implica un valor alto de probabilidad y por ello puede ser afirmado que existe igualdad de resultados entre uno y otro método. Por tanto, del estudio de las figuras anteriores se desprende la no existencia de diferencias significativas entre los resultados de ambos análisis. No obstante, los elevados valores de los coeficientes de regresión del análisis efectuado con el modelo de Crecimiento Exponencial hacen aconsejable su utilización.

5.1.2 Comparación entre estadios larvarios

La comparación entre los valores observados, tanto para los distintos estadios larvarios, como para los distintos compuestos referidos a estos estadios, se ha realizado mediante la aplicación de un test no paramétrico de Wilcoxon para muestras pareadas. Se ha considerado a este método como más oportuno porque permite establecer diferencias del valor de centralización refiriéndose no a un solo punto, sino a una población de valores que representan la función de respuesta. En este caso, la población viene dada por los valores de los cuantiles teóricos comprendidos entre 10 y 90. Los resultados obtenidos, correspondientes a THPC, CB, TCIC y BrNa, demuestran la existencia de diferencias significativas entre estadios larvarios. Resultó ser más adecuado la utilización del método de Regresión no Lineal debido a que el método Probit aportaba unos intervalos de confianza demasiado grandes.

El criterio seguido para el análisis de respuestas obtenidas es el mismo que el utilizado para el estudio comparativo de los dos métodos considerados, y por tanto debe considerarse nuevamente la hipótesis nula, donde se observa una $P \leq 0.05$, lo cual indica un bajo valor de probabilidad y por tanto existe una diferencia significativa de los resultados.

5.1.3 Comparación entre compuestos

Para el estudio de las posibles diferencias significativas que pudieran existir entre los distintos compuestos estudiados, y para cada uno de los

estadios larvarios, se ha utilizado como en los anteriores casos un test de Wilcoxon. También en este caso se han mantenido los distintos criterios para la evaluación.

Del análisis comparativo se desprende que en todos los casos aparecen diferencias significativas. No obstante, estos resultados deben ser contemplados con cierta precaución, puesto que a pesar de la evidencia estadística de esta diferencias, su interpretación desde el punto de vista toxicológico se debe llevar a cabo sobre una base de los posibles riesgos inherentes a la utilización de cada uno de los productos ensayados.

5.2 Toxicidad Aguda

Uno de los mayores inconvenientes a la hora de practicar los tratamientos con biocidas es su impacto ecológico potencial cuando estos compuestos son vertidos al medio acuático. En muchos de ellos, el efecto agudo sobre distintas especies acuáticas puede ser el resultado de descargas al medio de altas concentraciones de biocida. Entre los diferentes problemas que plantea la aplicación o vertido de los biocidas al medio acuático, el riesgo que supone estas descargas sobre organismos *no diana* debe ser especialmente considerado.

Según a la clasificación de toxicidad aguda propuesta por la OCDE, para la determinación del riesgo medioambiental de los distintos contaminantes, se incluyen en la Clase I todos aquellos compuestos que presentan una CL_{50} inferior a 1 mg/l, Clase II cuando la CL_{50} obtenida se encuadra entre 1 y 10 mg/l, y Clase III cuando el valor de este parámetro se incluyen en el rango entre 10 y 100 mg/l.

Atendiendo a esta clasificación, los resultados de toxicidad aguda obtenidos para larvas de *Artemia* con los biocidas estudiados establecen la existencia de variaciones de sensibilidad entre los tres estadios larvarios estudiados. Así, las larvas de *Artemia* de 72 horas de edad han resultado ser las más sensibles a la exposición de los cuatro biocidas ensayados, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre éstas y las larvas de 24 y 48 horas de edad. Las diferencias estadísticamente se repiten cuando son comparadas las correspondientes CL_{50} de larvas de 24 y 48 horas de edad, salvo en el estudio comparativo entre dichos estadios larvarios cuando fueron expuestos a THPC, en los que se obtenían valores sin significación estadística.

Es bien conocido como los distintos estadios de *Artemia* son sensibles a distintos contaminantes (Sorgeloos et al., 1978; Sleet and Brendel, 1985), y aunque el estadio larvario correspondiente a las 72 horas de vida parece ser en general el más sensible (Barahona et al., 1994; Sánchez-Fortún et al., 1995; Sánchez-Fortún et al., 1997), en algunas experiencias para el estudio de

toxicidad aguda con estos organismos se ha podido observar como el máximo de sensibilidad correspondía al estadio larvario de 48 horas de edad (Sánchez-Fortún et al., 1996). Es precisamente en este punto cuando el ciclo vital de los nauplios se encuentra en los estadios larvarios I y II, exhibiendo una gran sensibilidad a la presencia de contaminantes en el medio (Lewis, 1995). En el presente estudio ha quedado demostrado como la fase larvaria de 72 horas se presentaba como idónea para los estudios de toxicidad con CB, TCIC y BrNa, mientras que en las exposiciones con THPC el estadio larvario correspondiente a 48 horas de edad se presenta como más adecuado para el estudio.

Con todo ello, los resultados indican que, tanto el THPC como el CB y el TCIC pueden ser clasificados como de Clase I en los tres estadios larvarios estudiados. Los ensayos de toxicidad con BrNa aportan la evidencia de su falta de efecto letal frente a larvas de *Atemia* de 24 horas de edad hasta la concentración máxima estudiada de 2000 mg/l, presentando una toxicidad aguda muy baja (531.06 mg/l) y fuera de los valores de clasificación cuando se exponían larvas de 48 horas de edad y, sin embargo quedaba encuadrado dentro del grupo de Clase III por el valor de CL_{50} (42.42 mg/l) obtenido frente a larvas de 72 horas de edad.

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

Así, la relación entre las distintas categorías químicas y los peces quedaría establecido como formas larvarias > formas juveniles > formas adultas (Hutchinson et al., 1998).

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

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

En el caso del THPC, y practicando estudios comparativos en base al principal metabolito fruto de su transformación en medio acuático, formaldehído, los resultados obtenidos difieren sustancialmente de los obtenidos por Espiritu y col. (1995), ya que el valor de CL₅₀ de 1.99-2.52 mg/l para *Artemia salina* resulta muy superior al de 7.82 µg/l presentado en este estudio. En general, los valores de CL₅₀ existentes en la literatura para distintos organismos de agua marina resultan ser mucho mayores que los obtenidos por nosotros, quedando incluidos dentro del rango de mg/l, tanto en crustáceos (Portmann, 1972; Johnson, 1974), moluscos (Aunaas y col., 1991) o peces (Birdsong, 1971). Únicamente la exposición frente a hidras de la especie *Hydra attenuata* daba como resultado una inhibición del crecimiento a concentraciones de 3 µg/l (Kudla, 1984). Estos datos indican que las larvas de *Artemia* presentan una gran sensibilidad a la presencia de este contaminante en medios de agua salina.

Las larvas de *Artemia* también se presentan como organismos de alta sensibilidad cuando son expuestas a CB. Los valores de CL₅₀ obtenidos en el

presente estudio resultan ser mucho más bajos que los obtenidos por otros autores en diferentes organismos de agua marina. Así, el valor de 32.67 µg/l obtenido para la CL₅₀ tras exposiciones de 24 horas es muy inferior al obtenido por Liao y Guo (1990) cuando éstos exponían camarones del género *Penaeus* frente a CB mediante ensayos de tipo estático, obteniendo valores de 3.3, 3.1, 1.6 y 1.5 mg/l como CL₅₀ en *Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon*, *Penaeus penicillatus* y *Penaeus semisulcatus*, respectivamente. Igualmente, estos autores estudiaron el valor de CL₅₀ correspondiente al crustáceo de la especie *Metapenaeus ensis*, pudiendo comprobar como el valor de 3 mg/l obtenido resulta muy superior al presentado para las larvas de *Artemia*. De igual manera, estudios realizados en peces marinos de la especie *Alburnus alburnus* fijan la correspondiente CL₅₀ en 5.5-6.5 mg/l, mediante exposiciones de 96 horas a CB, valor muy superior al obtenido para las larvas de *Artemia*. Por tanto, y al igual que ocurría con el compuesto anterior, las larvas de *Artemia* presentan un grado de sensibilidad a este compuesto muy superior al referido en la literatura para otros organismos de agua salina.

El TCIC es un compuesto hidrofílico que comúnmente se encuentra como contaminante de aguas. Sobre él se han propuesto niveles para la protección de fauna acuática de 11 µg/l, si bien en determinados países como U.S.A., se ha establecido su nivel máximo de contaminación en 3 µg/l. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio indican que las larvas de *Artemia* de 48 y 72 horas de vida presentan un valor de CL₅₀ por debajo de estos valores máximos permitidos, lo cual hace que éstos se presenten como claramente insuficientes a la hora de preservar la fauna acuática. No ha sido posible encontrar referencias bibliográficas acerca del efecto tóxico del TCIC sobre organismos acuáticos marinos, pero tomando como base los datos establecidos en el Programa de la Oficina de Pesticidas (OPP) de la *Environmental Protection Agency* (1995), referidas a organismos acuáticos de agua dulce, las larvas de *Artemia* presentan una mayor sensibilidad a este compuesto que las referidas por este Organismo. Así, se indica que estudios con *Daphnia magna* provocaron efectos tóxicos con una CE₅₀ de aproximadamente 0.18 mg/l cuando los ensayos eran practicados mediante renovación de flujo y a tiempos de exposición de 48 horas. Cuando se exponía

trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, mediante ensayos de renovación de flujo y tiempos de exposición de 96 horas, al TCIC se establecía una CL₅₀ de 0.37 mg/l. Igualmente, los trabajos de Foster (1981) establecieron una CL₅₀ de 0.6 mg/l en exposiciones de 24 horas sobre el molusco *Corbicula mailensis*.

Es conocido como el efecto medioambiental de los bromuros es prácticamente inexistente, y que bajo las condiciones de uso habituales no existe riesgo de aparición de efectos adversos en los organismos acuáticos. Sin embargo, en 1984 la *Environmental Protection Agency* solicitó que se realizaran una serie de pruebas para determinar los efectos ecológicos, de cara a la caracterización de la toxicidad en aves y peces. Los resultados de estas pruebas indicaron que eran compuestos prácticamente atóxicos, aunque exhibían cierto grado de toxicidad sobre trucha arcoiris y *Daphnia magna* (USEPA, 1991a). Los resultados obtenidos en el presente estudio están acordes a los remitidos a la EPA, en cuanto al bajo grado de toxicidad que presenta el BrNa frente a larvas de *Artemia*.

5.3 Fototactismo

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

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

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

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

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo ponen en evidencia la posibilidad de estudio de los efectos negativos sobre la capacidad fototáctica de larvas de *Artemia* de 24 horas de vida, cuando éstas han sido expuestas a concentraciones subletales de distintos contaminantes, mediante exposiciones de tipo agudo y bajo condiciones de ensayo estático.

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

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

acentuando si cabe aún más el problema de establecer correctamente la distancia a recorrer por las larvas en un determinado tiempo.

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

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

Entre estos criterios, el referente al número de larvas óptimo para cada uno de los ensayos en relación al tiempo necesario para que dichas larvas finalizaran el recorrido completo del interior de la cámara, resultó ser primordial en estos ensayos. Como puede apreciarse en la figura (5.3.-1), los experimentos practicados para establecer ambos parámetros, en base a reducir el número de larvas, pusieron de manifiesto una significativa reducción de estas tiempo-dependiente, hasta llegar a 120 minutos, por encima del cual no aparecían diferencias significativas respecto al número de larvas necesarias.

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

estos organismos. Los datos relativos a la CI_{50} obtenidos en los diferentes ensayos muestran una similitud en cuanto a la capacidad de inhibición entre el THPC, TCIC y BrNa, quedando establecida la concentración capaz de inhibir el 50 % de dicha capacidad en 1/32, 1/36 y 1/39 de la CI_{50} , respectivamente, mientras que el valor de 1/54 de la CI_{50} obtenido para exposiciones con CB muestran una mayor sensibilidad de las larvas de *Artemia* a la presencia de este compuesto en el medio.

Estos resultados contrastan con los pocos datos existentes en la literatura, acerca del efecto inhibitor del fototactismo por exposiciones a contaminantes acuáticos. Estudios realizados por Withman (1981), mediante ensayos de fototactismo con *Daphnia magna*, pusieron en evidencia la necesidad de concentraciones mucho más elevadas de los contaminantes ensayados, para provocar la inhibición fototáctica en el 50 % de la población, y así, eran necesarias concentraciones alrededor de 1/3 de la CL_{50} para obtener el valor de CI_{50} en exposiciones frente a naftaleno. Resultados similares fueron obtenidos anteriormente por Southwork y col. (1978) utilizando igualmente en los ensayos *Daphnia magna*. Una comparación entre estos resultados y los obtenidos en el presente estudio parece establecer un mayor rango de sensibilidad de las larvas de *Artemia* de 24 horas de vida que aquella ofrecida por *Daphnia magna*, si bien al no existir datos respecto a los biocidas ensayados, no puede descartarse que el mayor o menor efecto inhibitor del fototactismo esté relacionado tanto con la especie como con el tipo de contaminante ensayado.

5.4 Bioacumulación

Los resultados obtenidos, mediante el estudio del efecto de bioacumulación, indican diferencias significativas entre los distintos compuestos ensayados (Figura 5.4-1). Según los criterios para la determinación de sustancias peligrosas propuestos por la Unión Europea, un compuesto resulta ser de bajo riesgo en cuanto a su potencial de bioacumulación cuando el Factor de Bioconcentración (BCF) no supera el valor de 100 o bien, cuando no se dispone de este valor, el coeficiente de partición n-octanol/agua ($\log K_{ow}$) es inferior a 3.0.

Según estos parámetros establecidos, los resultados obtenidos mediante la exposición de TCIC demuestran que no ofrece un riesgo de bioacumulación en larvas de *Artemia*. Aplicando la relación entre la concentración obtenida tras su análisis en los tejidos de las larvas, y la concentración existente en el medio, el valor obtenido de 1.67 se encuentra muy por debajo del límite de riesgo. Aunque la búsqueda de resultados acerca del riesgo de bioacumulación de este compuesto ha resultado infructuosa, no apareciendo ningún dato al respecto en la literatura, una estimación de dicho riesgo puede ser practicada mediante modelos de estimación. Así, las propiedades químicas del compuesto permiten estimar un $\log K_{ow}$ de 0.94, por aplicación de los valores correspondientes a los factores de descripción de fragmentos (Tabla 5.4-1).

Tabla 5.4-1 Obtención del coeficiente de partición octanol-agua, expresada como logaritmo ($\log K_{ow}$), aplicando el proceso de estimación mediante el análisis de los diferentes fragmentos del ácido tricloroisocianúrico.

TIPO	Nº	DESCRIPCIÓN FRAGMENTO	COEF.	VALOR	
fragmento	3	-N<	Unión alifática	-1.8323	-5.4969
fragmento	3	-NC(=O)N-	Urea	1.0453	3.1359
fragmento	3	-Cl	Unión a nitrógeno	0.0001	0.0003
factor	3	-CO-NCO-N-CO-	Corrección de estructura	1.0254	3.0762
constante		Constante de la ecuación			0.2290
			$\log K_{ow}$	0.9445	

Asumiendo este valor de 0.94, el BCF estimado para el TCIC sería de 3.162, mediante la aplicación de la fórmula:

$$\log \text{BCF} = 0.76 \times \log K_{ow} - 0.23$$

La comparación entre el valor de 1.67, obtenido mediante ensayo laboratorial con larvas de *Artemia*, y el valor estimado de 3.162 indica que ambos son similares, y por tanto no cabe esperar un mayor riesgo de acumulación de TCIC cuando las larvas de *Artemia* son expuestas.

Igualmente, la exposición de larvas de *Artemia* a BrNa no provoca un grave riesgo de acumulación de dicho compuesto en ellas, si se tiene en cuenta el valor de BCF obtenido de 0.23, pese a que los valores de acumulación obtenidos en los ensayos indican un aumento de concentración tiempo-dependiente en los tejidos de las larvas, hasta llegar a concentraciones de 47.07 µg/mg proteína (Figura 5.4-1). A pesar de ello, los resultados obtenidos parecen indicar que el BrNa se acumula en mayor cantidad en larvas de *Artemia* que en otros organismos acuáticos, y así estudios realizados con trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, mediante la exposición a BrNa durante un periodo de 14 días, establecieron una acumulación de 10.29 µg/mg en los tejidos de estos peces. La estimación del coeficiente de partición n-octanol/agua para el BrNa, utilizando la misma sistemática propuesta para el compuesto anterior, aporta un valor de log K_{ow} de 0.63 (Tabla 5.4-2)

Tabla 5.4-2 Obtención del coeficiente de partición octanol-agua, expresada como logaritmo (log K_{ow}), aplicando el proceso de estimación mediante el análisis de los diferentes fragmentos del bromuro sódico.

TIPO	Nº	DESCRIPCIÓN FRAGMENTO	COEFICIENTE	VALOR
fragmento	1	-Br Unión alifática	0.3997	0.3997
factor	1	Na	0.0000	0.0000
constante		Constante de la ecuación		0.2290
			log K_{ow}	0.6287

En base al valor de $\log K_{ow}$ estimado, y aplicando la fórmula de determinación de $\log BCF$, el valor de BCF estimado sería de 3.162, que aunque superior al obtenido en los ensayos de laboratorio con larvas de *Artemia*, confirma la hipótesis de que el BrNa no resulta ser un riesgo ecotoxicológico de cara a su acumulación en los tejidos de los organismos acuáticos.

Sin embargo, los resultados obtenidos mediante la exposición de larvas de *Artemia* a THPC presenta a este compuesto como peligroso respecto a su poder de bioacumulación en estos organismos, ya que el valor de BCF de 93.75 (Figura 5.4-1) obtenido en los ensayos resulta similar al valor límite de 100 establecido como mínimo para ser considerado riesgo de acumulación en los tejidos de los organismos. Al igual que ocurría con los compuestos estudiados anteriormente, no ha sido posible encontrar datos de bioacumulación de este compuesto en la literatura que nos permitieran compararlos con los obtenidos. Por ello, y al igual que en los anteriores, se hace necesario comparar el valor obtenido con aquel que sea resultado de un proceso de estimación. Tomando como fuente de estimación las características químicas del compuesto, un valor de $\log K_{ow}$ de -9.77 ha sido obtenido (Tabla 5.4-3).

Tabla 5.4-3 Obtención del coeficiente de partición octanol-agua, expresada como logaritmo ($\log K_{ow}$), aplicando el proceso de estimación mediante el análisis de los diferentes fragmentos del cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosfonio.

TIPO	Nº	DESCRIPCIÓN FRAGMENTO	COEF.	VALOR
fragmento	4	-CH ₂	0.4911	1.9644
fragmento	4	-OH	-1.4086	-5.6344
fragmento	1	-Cl	0.3102	0.3102
fragmento	1	>P<	-7.5000*	-7.5000
factor	1	Corrección multialcohol	0.4064	0.4064
factor	1	Corrección fósforo	0.4500*	0.4500
constante		Constante de la ecuación		0.2290
			$\log K_{ow}$	-9.7744

*: coeficiente estimado

La aplicación de este valor de $\log K_{ow}$ sobre la fórmula para determinar el $\log BCF$ aporta como resultado un valor de BCF de prácticamente cero, lo que permitiría deducir que este compuesto no resultaría peligroso de cara al efecto de bioacumulación.

Por tanto, los resultados obtenidos con larvas de *Artemia* difieren sustancialmente con los obtenidos mediante estimación. Estas diferencias hubieran podido ser atribuidas a la utilización en los experimentos del análisis de formaldehído, principal compuesto que aparece fruto de la transformación del THPC en el medio acuático, como medio de determinación del poder de acumulación del THPC en los organismos. Sin embargo, estudios previos presentaban un BCF para el formaldehído de 0.19, basado en el establecimiento de una $\log K_{ow}$ de 0.65 (Veith y col., 1980; Hansch and Leo, 1981), habiendo sido establecido anteriormente la ausencia de bioconcentración de formaldehído en peces y crustáceos de agua dulce (Still and Allen, 1979; Hose and Lightner, 1980). Estos resultados previos hacen sospechar que, o bien las larvas de *Artemia* poseen una sensibilidad especial para este compuesto, o bien las condiciones salinas del medio favorecen la concentración de este elemento en los organismos. A falta de más datos que determinaran si las larvas de *Artemia* pudieran tener mayor sensibilidad, la hipótesis de variaciones entre los medios acuáticos de agua dulce y marino podría ser razonable teniendo en cuenta estudios realizados por Zhou y Mopper (1997), en los que el coeficiente de partición parece verse afectado cuando se practicaban ensayos en medio marino. Siendo esto así, el valor de BCF sufriría importantes variaciones al ser modificado la $\log K_{ow}$.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio han permitido establecer las siguientes conclusiones:

1.- El análisis comparativo entre los métodos estadísticos Probit y Crecimiento Exponencial reveló la conveniencia de utilización de éste último en los ensayos de toxicidad, ya que aunque los resultados no presentaron diferencias estadísticamente significativas, el mejor ajuste de los datos a la distribución de respuesta obtenida mediante el método de Crecimiento Exponencial hace aconsejable su utilización.

2.- Tanto el cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosofonio como el ácido tricloroisocianúrico y el cloruro de benzalconio se comportan como extremadamente tóxicos sobre larvas de *Artemia* de 24-, 48- y 72 horas de edad, cuando son evaluados mediante ensayos de toxicidad aguda.

3.- El bromuro sódico ha resultado ser un compuesto atóxico, cuando se practicaron los ensayos de toxicidad aguda frente a larvas de *Artemia* de 24 horas de edad. Sin embargo, a estadios larvarios de *Artemia* de 48 y 72 horas de vida, estos mismos ensayos de toxicidad revelaron que el bromuro sódico se comporta como elemento muy tóxico.

4.- El estudio comparativo, acerca de los efectos tóxicos de tipo agudo producidos sobre los distintos estadios larvarios, frente a los cuatro compuestos biocidas ensayados, revela que existe un incremento de sensibilidad de las larvas de *Artemia* conforme aumenta su tiempo de vida, siendo más sensibles las larvas de 72 horas de edad que las de 48 horas, y éstas a su vez más sensibles que las de 24 horas de vida. Sin embargo, no aparecen diferencias estadísticamente significativas entre larvas de 24 y 48 horas de edad cuando son expuestas a cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosofonio.

5.- Los cuatro compuestos biocidas ensayados tienen la facultad de inhibir la capacidad fototáctica de las larvas de *Artemia* de 24 horas de edad, cuando éstas son expuestas a concentraciones subletales de cada uno de los compuestos ensayados. Dicho efecto ha sido obtenido a concentraciones entre 1/30 y 1/60 de la CL₅₀, dependiendo del compuesto biocida ensayado.

6.- Los valores de acumulación sobre larvas de *Artemia*, bien sea de compuesto parental o de los principales metabolitos, tanto de cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosfonio como de ácido tricloroisocianúrico o bromuro sódico, revelan que ninguno de los tres compuestos supone un riesgo ambiental en cuanto al fenómeno de bioacumulación. Sin embargo, es necesario tener en cuenta el valor de FBC = 93.75 obtenido para exposiciones frente a cloruro de tetrakis (hidroximetil) fosfonio, ya que se encuentra muy próximo al valor límite de 100 considerado como mínimo potencialmente peligroso.

REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, N.L. (2001). UV radiation evokes negative phototaxis and coverty behaviour in the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Marine Ecol. Prog. Series*, 213:87-95.
- Aiken, R.B. and Hailman, J.P. (1978). Positive phototaxis of the brine shrimp *Artemia salina* to monochromatic light. *Canad. J. Zool.*, 56:708-711.
- Allen, Y.; Calow, P. & Baird, D.J. (1995). A mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14:1625-1630.
- Amiard, J.C. (1976b). Experimental study on the acute toxicity of cobalt antimony, strontium and silver salts in some crustacea and their larvae and some teleostei. *Rev. Int. Oceanogr. Med.*, 43:79-95.
- Anderson, D.T. (1967). Larval development and segment formation in the branchiopod crustaceans *Limnadia stanleyana* King (Conchostraca) and *Artemia salina* (L.) (Anostraca). *Aust. J. Zool.* 15:47-91.
- Aunaas, T.; Einarson, S.; Southon, T.E. & Zachariassen, K.E. (1991). The effects of organic and inorganic pollutants on intracellular phosphate compounds in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Comp. Biochem Physiol.*, 100C:89-93.
- Barahona, M.V.; Sanz, F. & Sánchez-Fortún, S. (1994). Acute toxicity of different solvents in *Artemia salina*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 52: 766-771
- Bates, D.M. & Watts, D.G. (1988) *Nonlinear regression analysis and its applications*. New York: Wiley
- Beattie, J.H. ; Pascoe, D. (1978). Cadmium uptake by rainbow trout, *Salmo gairdneri* eggs and alevins. *J Fish Biol* 13:631-637.
- Bell, T.A.; Arume, C.S. & Lightner, D.V. (1987). Efficacy of formalin in reducing the levels of *Peritrichous ciliates* on cultured marine shrimp. *J. Fish Dis.*, 10:45-51.
- Bills, T.D.; Marking, L.L. & Chandler, J.H. (1977). Formalin: Its toxicity to nontarget aquatic organisms, persistence, and counteraction. *Invest.*

- Fish Control n° 73. Fish Wildl. Serv., Bur. Sport Fish Wildl., USDI, Wasington, DC, pp7.
- Bills, T.D.; Marking, L.L. & Howe, G.E. (1993). Sensitivity of juvenile striped bass to chemicals used in aquaculture. Resour. Publ. 192, Fish Wildl. Serv., USDI, Wasington, DC:11.
 - Birdsong, C.I. (1971). Toxicity of certain chemicals to juvenile pompano. Prog. Fish-Cult., 33:76-80..
 - Bjornber, T.K. and Wilbur, K.M. (1968). Copepod phototaxis and vertical migration influenced by xanthone dyes. Biol. Bull., 134:398-403.
 - Bliss, C.I. (1934). The method of Probits. Science, 79:38-39.
 - Brack, W. & Frank, H. (1998). Chlorophyll a fluorescence: A tool for the investigation of toxic effects in the photosynthetic apparatus. Ecotoxicol. Environ. Saf., 40:34-41.
 - Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding. Anal. Biochem., 72:248–254.
 - Brent, F. (1973). Algorithms for mimization without derivates. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, N.Y.
 - Briggmann, G. & Kuhn, R. (1977). The effects of water pollutants on *Daphnia magna*. Z Wasser-Abwasser-Forsch, 10:161-166.
 - Briggmann, G & Kuhn, R. (1978). Threshold values of substances harmful to water for blue algae (*Microcystis aeruginosa*) and green algae (*Scenedesmus quadricauda*) in tests measuring. Vom. Wasser, 50:45-60.
 - Briggmann, G & Kuhn, R. (1979) .The toxic effects of waste water on aquatic bacteria, algae, and small crustaceans. Gesund Ing., 80:115-120.
 - Briggmann G, & Kuhn, R. (1982). Results of toxic action of water pollutants on *Daphnia magna* Straus tested by an improved standardized procedure. Z.Wasser-Abwasser-Forsch, 15:1-6.
 - Browne, R.A. (1993). Sex and the single brine shrimp. Natural History, 102:34-39.
 - Bullough, W.S. (1958). Practical Invertebrate Anatomy 2^a ed. MacMillan, London. 483 pp.

- Burridge, T.R.; Lavery, T. & Lam, P.K.S. (1995). Effects of tributyltin and formaldehyde on the germination and growth of *Phyllospora comosa* (Labillardiere) C. Agardh, (Phaeocophyta: Fucales). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 55:525-532.
- Canton, J.H. & Slooff, W. (1982). Substitutes for phosphate containing washing products: Their toxicity and biodegradability in the aquatic environment. Chemosphere, 11:891-907.
- Canton, J.H. & Mathijssen-Spiekman E.A.M. (1983). Comparative short-term research with water-organisms to determine the acute toxicity of a number of biocides. Rep. n° 668115-001, Natl. Inst. Public Health Environ. Hyg.: 6 p.
- Castille, F.L. & Lawrence, A.L. (1986). The toxicity of erythromycin, minocycline, malachite green and formalin to nauplii of the srrimp *Penaeus stylirostris*. J. World Aquacult. Soc., 17:13-18.
- Chandler, J.H.J. & Marking, L.L. (1979). Toxicity of fishery chemicals to the asiatic clam, *Corbicula manilensis*. Prog. Fish-cult., 4:148-151.
- Comotto, R.M.; Kimerle, R.A. and Swisher R.D. (1979). Bioconcentration and metabolism of linear alkylbenzenesulfonate by daphnids and fathead minnows, p. 232-250. In L.L. Marking and R.A. Kimerle (eds.), *Aquatic Toxicology*, ASTM, 1979, Vol. ASTM STP 667.
- Cope, O.B. (1965). Sport fishery investigations. In: Effects of Pesticides on Fish and Wildlife, US DI Fish and Eildl. Circ, 226:51-63.
- Covello, V. (1993). Risk Communication. Trust and Credibility Journal of Occupational Medicine, 35 : 18-19.
- Cox, D.R. (1970). The analysis ob binary data. Halsted Press, New York.
- Cruz, E.R. & Pitogo, C.L. (1989). tolerance level and histopathological response of milkfish (*Chanos chanos*) fingerlings to formalin. Aquaculture, 78:135-145.
- Davis, H.C. & Hidu, H. (1969). Effects of pesticides on embryonic development of clams and oysters and on survival and growth of the larvae. Fish Bull., 67:393-404.
- D.O. (1967). Directiva del Consejo de 27 de junio de 1967 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y

- administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas. DO P 196 de 16/08/1967. pp. 1-98.
- D.O. (1993) Directiva 93/67/CEE de la Comisión de 20 de julio de 1993 por la que se fijan los principios de evaluación del riesgo, para el ser humano y el medio ambiente, de las sustancias notificadas de acuerdo con la Directiva 67/548/CEE del Consejo. DO L 227 de 08/09/1993. pp 9-18.
 - D.O. (1998) Directiva de la Comisión 98/8/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de febrero de 1998, relativa a la comercialización de biocidas. DO L 123 de 24/04/1998. p.1.
 - Douillet, P.A. & Holt, G.J. (1994). Surface disinfection of red drum (*Sciaenops ocellatus* Linnaeus) eggs leading to bacteria-free larvae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 179:253-266.
 - Durez, L.A. (1989). Toxicity and lesions in the gills of *Tilapia nilotica* fry and fingerlings exposed to formalin, furanace, potassium permanganate and malachite green. Diss. Abstr. Int. B. Sci. Eng., 49:3628.
 - Dvorak, M.J.; Kouril, J. & Prikryl, I. (1985). The tolerance of early wells fry to preventive baths in NaCl and formalin solutions. Pr. Vyzk. Ustav. Ryb. Hydrobiol. Vodnany, 14:36-42.
 - Eggersdorfer, B. and Häder, D.P. (1991). Phototaxis, gravitaxis and vertical migration in the marine dinoflagellate *Prorocentrum micans*. FEMS Microbiol. Ecol., 85:319-326.
 - Environmental Health Center (1998). Coastal Challenges: A Guide to Coastal and Marine Issues. National Safety Council, Washington, 173 pp.
 - Espiritu, E.Q; Janssen, C.R. & Persoone, G. (1995). Cyst-based toxicity tests. VII. Evaluation of the 1-h enzymatic inhibition test (fluotox) with *Artemia* nauplii. Environ. Toxicol. Water Qual., 10:25-34.
 - Evens, T.J.; Kirkpatrick, G.J.; Millie D.F.; Chapman D.J. and Schofield, O.M.E. (2001). Photophysiological responses of the toxic red-tide dinoflagellate *Gymnodinium breve* (Dinophyceae) under natural sunlight. J. Plankton Res., 23:1177-1310.

- Ewell, W.S.; Gorsuch, J.W.; Kringle, R.O.; Roboillard, K.A. & Spiegel, R.C. (1986). Simultaneous evaluation of the acute effects of chemicals on seven aquatic species. *Environ. Toxicol. Chem.*, 5:831-840.
- Finney, D.J. (1971). *Probits analysis*. Cambridge University Press, U.K.
- Foster, R.B. (1981). Use of Asiatic clam larvae in aquatic hazard evaluations. In: J.M. Bates and C.I. Weber (Eds) *Ecological assessments of effluent impacts on communities of indigenous aquatic organisms*. ASTM STP 730, Philadelphia, 281-288.
- Frost, T.K.; Gronlie, L; Koksvik, G; Tessem, P.M. & Aunaas, T. (1993). Factors affecting toxicity of formaldehyde in *Mytilus edulis*. In: *Environmental and Biological Factors Affecting Toxicity of Formaldehyde*, Chapter Vb. Rep.
- Gardiner, J. & Smith, I.H.M. (1990). Proposed environmental quality standards for sodium chloride and sulphate in fresh water. Report for the National Rivers Authority. WRc Report Number NR 2525.
- Geiger, D.L; Poirier, S.H.; Brooke, L.T. & Call, D.J. (1986). Acute toxicities of organic chemicals to fathead minnows (*Pimephales promelas*), vol 3. Center of Lake Superior Environmental Studies, University of Wisconsin, Superior, WI:238.
- Geiger, D.L; Brooke, L.T. & Call, D.J. (1990). Acute toxicities of organic chemicals to fathead minnows (*Pimephales promelas*), vol 5. Center for Lake Superior Environmental Studies, University of Wisconsin, Superior, WI:332.
- Gill, P.E. & Murray, W. (1972). Quasi-Newton methods for unconstrained optimization. *Journal of the Institute of Mathematics and its Applications*, 9, 91-108
- Goodrich, M.S.; Melancon, M.J.; Davis, R.A. & Lech, J.J. (1991). The toxicity, bioaccumulation, metabolism and elimination of dioctyl sodium sulfosuccinate DSS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Water Res.*, 25, 119-124.
- Green, D.W.J.; Williams, K.A. and Pascoe, D. (1986). The acute and chronic toxicity of cadmium to different life history stages of the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (L). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 15:465-471.

- Green, J. (1981). Crustaceans. In: Dales RP (ed) Practical Invertebrate Zoology. MacMillan, London. pp 261-302.
- Hamasaki, K & Hatai, K. (1993). prevention of fungal infection in the eggs and larvae of the swimming crab *Portunus trituberculatus* and the mud crab *Scylla serrata* by bath treatment. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish / Nippon Suisan Gakkaishi, 59:1067-1072.
- Hansch, C. and Leo, A.J.(1981). MEDCHEN project.Claremont,CA,Pomona College(Issue No.19)
- Hinton, M.J. & Eversole, A.G. (1978). Toxicity of ten commonly used chemicals to American eels. Proc. Annu. Conf. Southeast Assoc. Fish Wildl. Agencies, 32:599-604.
- Hinton, M.J. & Eversole, A.G. (1979). Toxicity of ten chemicals commonly used in aquaculture to the black eel stage of the American eel. Proc. World Matricul. Soc., 10:554-560.
- Hinton, M.J. & Eversole, A.G. (1980). Toxicity and tolerance studies with yellow-phase eels: Five chemicals. Prog. Fish-Cult., 42:201-203.
- Holcombe, G.W.; Phipps, G.L. & Fiandt J.T. (1983). Toxicity of selected priority pollutants to various aquatid organisms. Ecotoxicol. Environ. Saf., 7:400-409.
- Holland, GA; Lasater, JE; Neumann E.D. & Eldridge W.E. (1960). Toxic effects of organic and inorganic pollutants on young salmon and trout. Res. Bull n° 5, State of Wasington Dept Fish, Seattle, WA:263.
- Hose, J.E. and Lightner, D.V.(1980). Absence of formaldehyde residues in penaeid shirmp exposed to formalin.Aquaculture,21:197-202
- Howe, GE.; Marking, LL.; Bills, T.D. & Schreier, T.M. (1995). Efficacy and yoxicity of formalin solutions containing paraformaldehyde for fish and eggs treatments. Prog. Fish-Cult., 57:147-152.
- Hughes, J.S (1973). Acute toxicity of thirty chemicals to striped bass (*Morone saxatilis*) La. Dep. Wildl. Fish 318-343-2417:15p.
- Hutchinson, TH.; Solbe J.; Kloepper-Sams P.J. (1998). Analysis of the ECETOC aquatic toxicity (EAT) database.III- Comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. *Chemosphere*, 36:129-142.

- Imada, R. & Muroga, K. (1979). *Pseudodactylogyrus microrchis* (monogenea) on the gills of cultured eels-III. Experimental control by trichlorfon. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish / Nippon Suisan Gakkaishi, 45:25-29.
- aquatic biota. 1. Methodology and Experiments with *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem., 12:711-717.
- Jacoby, S.L.S.; Kowalik, J.S. and Pizzo, J.T. (1972). Iterative methods for non linear potimization problems. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, N.Y.
- Janssen, CR. & Persoone, G. (1993) Rapid toxicity screening tests for aquatic biota. 1. Methodology and experiment with *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem., 12:711-717.
- Johnson, S.K. (1974). Toxicity of several management chemicals to penaeid shrimp. Tex. Agric. Ext. Serv. Fieh Dis. Diagn. Lab. Report, 12.
- Johnson, W.W. & Finley, M.T. (1980). Hanbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. Resour Publ. 137, Fish Wildl. Serv, USDI, Wasington, DC:98.
- Johnson, R.; Tietge, J.; Stokes, G. & Lothenbach, D. (1993). The medaka carcinogenesis model. In: Technical report 9306, Compendium of the FY 1998 & FY 1989 Research Reviews for the Research Methods Branch, US Army Biomedical Research & Development Lab., Ft Detrick, Frederick, MD:147-172.
- Kamykowski, D.; Milligan, E.J.; Reed, R.E. and Liu, W.(1999). Geotaxis/Phototaxis and biochemical patterns in *Heterocapsa (=Cachonina) illdefina* (Dinophyceae) during diel vertical migrations freshwater fishes. Acta Hydrochim. Hydrobiol., 16:541-545.
- Kevan, S.H. & Dixon, D.G. (1996). Effects of age and coion (K^+ and Na^+) on the toxicity of thiocyanate to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during pulse or continuous exposure. Ecotoxicol Environ Safety 35:288-193. freshwater fishes. Acta Hydrochim. Hydrobiol., 16:541-545.
- Kitamura, H. (1990). Relation between the toxicity of some toxicants to the aquatic animals (*Tanichthys albonubes* and *Neocaridina denticulate*) and the hardness of the test. Bull. Fac. Fish Nagasaki Univ / Chodai Sui Kempo, 67:13-19.

- Kobayashi, N. (1971). Fertilized sea urchin eggs as an indicatory material for marine pollution bioassay, preliminary experiments. *Mar. Biol. Lab.*, 18:379-406.
- Kouril, J.; Dvorak, M. & Prikryl, I. (1985). Sensitivity of the early fry of common carp and grass carp to NaCl and formalin in preventive baths. *Aquat. Sci. Fish Abstr.*, 15:23842-1Q15.
- Kudla, A.J. (1984). Hydra reaggregation: A rapid assay to predict teratogenic hazard induced by environmental toxicity. *J. Wash Acad. Sci.*, 74:102-107
- Kusk, K.O. (1996). Bioavailability and effect of pirimicarb on *Daphnia magna* in a laboratory freshwater/sediment system. *Arch Environ Contam Toxicol* 31:252-255.
- Kutt, E.C. & Martin, D.F. (1974). Effect of selected surfactants on the growth characteristics of *Gymnodinium breve*. *Mar. Biol.*, 28:253-259.
- Lagerspetz, K.Y.H; Tiiska, A. & Senius, K.E.O. (1993). Low sensitivity of ciliary activity in the gills of *Anodonta cygnea* to some ecotoxicals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105:393-395.
- Lass, S.; Boersma, M.; Wiltshire, K.H.; Spaak, P. and Boriss, H. (2001). Does trimethylamine induce life-history reactions in *Daphnia*? *Hydrobiologia*, 442:199-206.
- Latz, M.I. & Forward, R.B.Jr. (1977). Effect of salinity upon phototaxis and geotaxis in a larval crustacean. *Biol. Bull.*, 153:163-179.
- Lewis, G.E. (1995). Testing the toxicity of extracts of Southern African plants using brine shrimp (*Artemia salina*). *S. Afr. J. Sci.*, 91:382.
- Lewis, M.A. & Hamm, B.G. (1986). Environmental modification of the photosynthetic response of lake plankton to surfactants and significance to a laboratory-field comparison. *Water Res.*, 20:599-609.
- Lewis, S.; Cartwright, N.G.; Jerman, E.; Tynan P; Sims, I.R. & Wellstein, N. (1994). Proposed environmental quality standards for chlorine in fresh and marine waters. Report for the National Rivers Authority, R&D Note 332.
- Lewis, S.; Mole N.; Mascarenhas, R. & James, H. (1997). Proposed Environmental Quality Standards for Bromine in Fresh and Marine Waters. Report for the Environment Agency. R&D Technical Report p74

- Liao, I.C.; Guo, J.J.; Wang, H.M. & Day, C.L. (1989). Studies on the tolerance of postlarvae of *Penaeus monodon*, *P. Japonicus*, *P. Semisulcatus*, *P. Penicillatos*, *Metapenaeus* and *Macrobrachium*. COA Fish Ser. No 15:23-27.
- Liao, I.C. & Guo J.J. (1990). Studies on the tolerance of postlarvae of *Penaeus monodon*, *P. japonicus*, *P. semisulcatus*, *P. penicillatus*, *Metapenaeus ensis* and *Macrobrachium*. Coa (Counc. Agric.) Fish. Ser., 24:95-99.
- Lin, T.; Dong, B.; Liu, Z.; Dun, W.; Sun, H. & Kong, A. (1986). Biological effects of formaldehyde-polluted water. Acta Sci. Circumstant/Hanjing Kexue Xuebao, 6:107-113.
- Lysiak, N.S.; Hamp, A.A. and Butler, N.M. (2002). Phototactic behaviour of marine and freshwater copepods as influenced by habitat and light quality. Eos. Trans. AGU, 83:OS146. Ocean Sciences Suppl. Abstract OS22A-166.
- Lysak, A. & Marcinek, J. (1972). Multiple toxic effect of simultaneous action of some chemical substances on fish. Tocz. Nauk. Roln. Ser. H. Rybactwo., 94:53-63.
- Lysiak, N.S.; Hamp, A.A. & Butler, N.M. (2002). Phototactic behaviour of marine and freshwater copepods as influenced by habitat and light quality. Eos. Trans. AGU, 83:OS146. Ocean Sciences Suppl. Abstract OS22A-166.
- Macek, K.J. & Sleight, B.H. (1977). Utility of toxicity tests with embryos and fry of fish in evaluating hazards associated with the chronic toxicity of substances to fishes. In: Mayer, FL and Hamelink JL (eds) Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. ASTM STP, Philadelphia.
- McCahon, C.P. & Pascoe, D. (1988). Cadmium toxicity to the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) during the molt cycle. *Freshwater Biol.*, 19:197-203.
- McCorkle, F.M.; Chambers JE & Yarbrough JD (1979). Tolerance of low oxygen stress in insecticide-resistant and susceptible populations of mosquitofish (*Gambusia affinis*) Life Sci., 25:1513-1518.
- McKim, J.M. (1977). Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long term toxicity. J Fish Res Board Can 34:1148-1154

- McKim, J.M. (1985). Early life stage toxicity tests. In: Rand, G.M. and Petrocelli, S.R. (Eds.) Fundamentals of aquatic toxicology, First edition. Hemisphere Publishing Corporation, New York.
- MacPhee, C. & Ruelle, R. (1969). Lethal effects of 1888 chemicals upon four species of fish from Western North America. Univ. Idaho Forest, Wildl. Range Exp. Station Bull. N° 3, Moscow, ID, 112p.
- Mailhot, H. (1987). Prediction of algal bioaccumulation and uptake of nine organic compounds by ten physicochemical properties. Environ. Sci. Technol., 21, 1009-1013.
- Marangoni, R.; Martini, B.; Puntoni, S. and Colombetti, G. (1995). Effect of UV-irradiation on motility and on phototactic response of *Fabrea salina*. In: Bauer H., Nolan C. (Eds), The effects of environmental UV-B radiation on health and ecosystems, EUR 15607, European Commission Press, Bruxelles, pp. 357-360.
- Moss, J.L. (1978). Toxicity of selected chemicals to the fairy shrimp, *Streptocephalus seali*, under laboratory and field conditions. Prog. Fish-Cult., 40:158-160.
- MRI (Midwest Research Institute) (1978). MRI report for tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium sulfate. Kansas City, MO.
- Nelder, J.A. & Mead, R. (1965). A Simplex method for function minimization. Computer Journal, 7, 308-313.
- OCDE (1996). Guidelines for the Testing of Chemicals / Section 3: Degradation and Accumulation. Test No. 305: Bioconcentration: Flow-through Fish Test. Paris.
- OCDE (1996). Guidelines for the Testing of Chemicals / Section 3: Degradation and Accumulation. Test No. 306: Biodegradability in Seawater. Paris.
- Office of Pesticide Programs (OPP) (1995). Environmental Effects Database (EEDB) Environmental Fate and Effects Division, US EPA, Washington, DC.
- Pardi, L. & Papi, F. (1961). Kinetic and tactic responses. In: TH Waterman, The Physiology of Crustacea II. Academic Press, New York. pp 365-399.

- Pedersen, F.; Tyle, H.; Nimiela, J.R.; Guttman, B.; Lander, L. & Wedebrand, A. (1995). Environmental Hazard Classification-data and interpretation guide (2nd edition). Tema Nord 1995:581. Nordic Council of Ministers, Copenhagen.
- Persaud, A.D.; Arts, M.T. & Yan, N.D. (2003). Photoresponses of late instar *Chaoborus punctipennis* larvae to UVR. *Aquatic Ecol.*, 37:257-265
- Persoone, G. & Sorgeloos, P. (1980). General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia*: In Persoone.G, Sorgeloos.P, O.Roels & Jaspers (eds), *The Brine Shrimp Artemia*. Vol.3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa Press, wetteren, Belgium:3-24
- Persoone, G.; Van de Vell, A.; Van Steertegem, M. & Nayer, B. (1989). Predictive value for laboratory tests with aquatic invertebrates: Influence of experimental conditions. *Aquatic Toxicol* 14:149-166.
- Portmann, J.E. (1972). Results of acute toxicity tests with marine organisms, using a standard method. In: M Ruivo (Ed.), *Marine Pollution and Sea Life*, FAO, Rome, Italy; Fishing News (Books) Ltd., London, England:212-217.
- Reardon, I.S. & Harrell, R., (1990). Acute toxicity of formalin and cooper sulfate to striped bass fingerlings held in varying salinities. *Aquaculture*, 87:255-270.
- Rodgers, E.O.; Hazen, B.H.; Friddle, S.B.& Snieski, S.F. (1951). The toxicity of pyridylmercuric acetate technical (PMA) to rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Prog. Fish-Cult.*, 13:71-73.
- Roghair, C.J.; Buijze, A. & Schoon, H.N.P. (1991). Maximum permissible level of the cationic surfactants DTDMAC for aquatic ecosystems. Rep. N° 719102007, Natl. Inst. Public Health Environ. Protection, Bilthoven, Netherland s:71.
- Roghair, C.J.; Buijze, A. & Schoon, H.N.P. (1992). Ecotoxicological risk evaluation of the cationic fabric softener DTDMAC. I. Ecotoxicological effects. *Chemosphere*, 24:599-609.
- Rosicky, P.; Kouril, J. & Vykusova, B. (1986). Sensitivity of carp and grass-carp early fry to short-termed formaldehyde baths. *Bul. Vyzk. Ryb. Hidrobiol. Vodnany*, 3:25-30.

- Rothsey, S. & Rohde, K. (2002). The responses of larval copepods and monogeneans to light, gravity and magnetic fields. *Acta Parasitol.*, 47:167-172.
- Rucker, R.R. (1948). New compounds for the control of bacterial gill disease. *Prog. Fish-Cult.*, 10:19-22.
- Rucker, R.R. & Whipple, W.J. (1951). Effect of bactericides on steelhead trout fry. *Prog. Fish-Cult.*, 13:43-44.
- Sánchez-Fortún, S.; Sanz, F. & Barahona, M.V. (1995). Acute toxicities of selected insecticides to the aquatic arthropod *Artemia salina*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 54: 76-82.
- Sánchez-Fortún, S. & Barahona M.V. (1996). Comparative Sensivity of Three age Classes of *Artemia salina* Larvae to Several Phenolic Compounds *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56:271-278.
- Sánchez-Fortún, S.; Sanz, F.; Santa María, A.; Ros, J.M.; De Vicente, M.V.; Encinas, M.T.; Vinagre, E. & Barahona, M.V. (1997). Acute Sensivity of Three Age Classes of *Artemia salina* Larvae to Seven Chlorinated Solvents. *Bull. Environ. Cotam. Toxicol.*, 59: 445-451.
- Shazili, N.A.; Pascoe, D. (1986). Variable sensitivity of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and alevins to heavy metals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 36:468-474.
- Sills, J.B. & Allen, J.L. (1979). Residues of formaldehyde undetected in fish exposed to formalin. *Prog. Fish.Cult.*, 41:67-68.
- Sleet, R.B. & Brendel, K. (1985). Homogeneous populations of *Artemia nauplii* and their potential use for in vitro testing in developmental toxicology. *Teratog Carcinog Mutagen* (1985), 5:41-54.
- Smith, S.D.; Gould, R.W.; Zaugg, W.S.; Harrell, L.W. & Mahnken, C.V.W. (1987) Safe prerelease disease treatment with formalin for fall chinook salmon smolts. *Prog. Fish-Cult.*, 49:96-99.
- Sorgeloos, P.; Remiche-Van Der Wielen, G.; Persoon, G. (1978). The use of *Artemia nauplii* for toxicity tests _ acritical análisis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2, 249-255
- Southworth, G.R.; Beauchamp, J.J. & Schmieder, P.K. (1978). Bioacumulation Potential of Polycyclic Aromatic Hidrocarbons in *Daphnia pulex*.

- Stearns, D.E. & Sharp, A.A. (1994). Sublethal effects of cupris ion activity on the phototaxis of three calonoid copepods. *Hydrobiologia*, 292/293:505-511.
- Stills, J.B. & Allen, J.L. (1979). Residues of formaldehyde undetected in fish exposed to formalin. *Progress fish Cult.*, 41:67-68
- Stuijzand, S.C.; Poort, L.; Greve, G.D., Vandergeest, H.G. & Kraak, M.H.S. (2000). Variables determining the impact of diazinon on aquatic insects: taxon, developmental stage, and exposure time. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19:582-587.
- *Water Res.* 12:973-977.
- Stock, J.N., Cope, O.B. (1969). Some effects of tepa, an insect chemosterilant, on the guppy, *Poecilia reticulata*.: *Transactions of the American Fisheries Society* 98:280-287.
- Subasinghe, R.P. & Yusoff, F.M. (1993). Retention of formaldehyde in the tissues of two tropical fish species following exposure to therapeutic levels. *Aquacult. Fish Manage*, 24:693-697.
- Summerfelt, R.C. & Lewis, W.M. (1967). Repulsion of green sunfish by certain chemicals. *J. Water Pollut. Control Fed*, 39:3030-2038.
- Suzuki, M. & Tokuda, M. (1998). Concentration of formaldehyde affecting growth of marine diatoms. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult/Yoshoku Kenkyusho Kenkyu Hokoku*, 27:43-45.
- Terhaar, C.J.; Ewell WS; Dziuba SP & Fassett DW (1972). Toxicity of photographic processing chemicals to fish. *Photogr. Sci. Eng.*, 16:370-377.
- Tisler, T. & Zagorc-Koncan, J. (1997). Comparative assessment of toxicity of phenol, formaldehyde, and industrial wastewater to aquatic organisms. *Water Air Soil Pollut.*, 97:315-322.
- Tooby, T.E. & Hursey. P.A. & Alabaster, J.S. (1975). The acute toxicity of 102 pesticides and miscellaneous substances to fish. *Chem. Ind. (Lond)*, 21:523-526
- Toshima, S., T. Moriya and K. Yoshimura. (1992). Effects of polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate on the acute toxicity of linear alkylbenzensulfonate (C₁₂-LAS) to fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 24, 26-36.

- Tsuji, S.; Tonogai, Y.; Ito, Y. & Kanoh, S. (1986). The influence of rearing temperatures on the toxicity of various environmental pollutants for killifish (*Oryzias latipes*) J. Hyg. Chem. / Eisei Kagaku, 32:46-53.
- USEPA (1985a). Ambient Water Quality Criteria for Ammonia. EPA 440/5-85-001.
- USEPA (1985b). Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms, eds. W.H. Peltier and C.I. Weber. EPA/600/4-85/013. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- USEPA (1991a). R.E.D. Facts. Potassium Bromide. Prevention, Pesticides and Toxics Substances, EPA-738-F-91-105:4 p.
- USEPA (1991b). R.E.D. Facts. Sodium and Calcium Hypochlorite Salts. Prevention, Pesticides and Toxics Substances, EPA-738-F-91-108:5 p.
- USEPA (1992). R.E.D. Facts. Chlorinated Isocyanurates. Prevention, Pesticides and Toxics Substances, EPA-738-F-92-010:5 p.
- USEPA (1993a). R.E.D. Facts. Silver. Prevention, Pesticides and Toxics Substances, EPA-738-F-93-005:6 p.
- USEPA (1993b). R.E.D. Facts. Boric Acid. Prevention, Pesticides and Toxics Substances, EPA-738-F-93-006:8 p.
- USEPA (1993c). R.E.D. Facts. Peroxy Compounds. Prevention, Pesticides and Toxics Substances, EPA-738-F-93-026:4 p.
- USEPA (1994). R.E.D. Facts. 2,2-dibromo-3-nitrilo-propionamide (DBNPA). Prevention, Pesticides and Toxics Substances, EPA-738-F-94-023:6 p.
- USEPA (1995a). R.E.D. Facts. Fosfamine Ammonium. Prevention, Pesticides and Toxics Substances, EPA-738-F-95-005:7 p.
- USEPA (1995b). R.E.D. Facts. Aliphatic Alcohols. Prevention, Pesticides and Toxics Substances, EPA-738-F-95-012:5 p.
- USEPA (1995c). R.E.D. Facts. Bronopol. Prevention, Pesticides and Toxics Substances, EPA-738-F-95-029:6 p.
- Utsunomiya, A.; Watanuki, T.; Matsushita, K. & Tomita, I. (1997a). Toxic effects of linear alkylbenzene sulfonate, quaternary alkylammonium chloride on *Dunaliella* sp as measured by ¹H-NMR analysis of glycerol. Chemosphere, 35:1215-1226.

- Utsunomiya, A.; Watanuki, T.; Matsushita, K. & Tomita, I. (1997b). Toxic effects of linear alkylbenzene sulfonate, quaternary alkylammonium chloride and their complexes on *Dunaliella* sp and *Chlorella pyrenoidosa*. Environ. Toxicol. Chem., 16:1247-1254.
- Van Gool, E. (1997). Light-induced swimming of *Daphnia*: can laboratory experiments predict diel vertical migration? Hydrobiologia, 360:161-167.
- Van Heerden, E.; Van Vuren, J.H.J. & Steyn, G.J. (1995) LC₅₀ determination for malachite green and formulation on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. Water S. A., 21:87-94.
- Veith, G.D.; Macek, K.J.; Petrocelli, S.R. & Carroll, J. (1980). An evaluation of using partition coefficients and water solubility to estimate bioconcentration factors for organic chemicals in fish. In: Eaton, J.G., Parrish, P.R.; Hendricks, A.C.; eds. Aquatic toxicology. Philadelphia, PA, American Society for Testing and Materials, pp.116-129 (ASTM Special Technical publication 707)
- Wakabayashi, M.; Kikuchi, M.; Sato, A. & Yoshida, T. (1987). Bioconcentration of alcohol ethoxylates in carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 13, 148-163.
- Wedemeyer, G. (1971). The stress of formalin treatments in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) J. Fish Res. Board Can., 28:1899-1904.
- Wellborn, T.L., Jr. (1969). The toxicity of nine therapeutic and herbicidal compounds to striped bass. The Progressive Fish-Culturist 31:27-32.
- Wellens, H. (1982). Comparison of the sensitivity of *Brachydanio rerio* and *Leuciscus idus* by testing the fish toxicity of chemicals and wastewaters. Z. Wasser-Abwasser-Forsch, 15:49-52.
- Wester, P.W. & Roghair, C.J. (1992). Teratogenic effect in the gas gland of fish induced by the fabric softener ditallow dimethyl ammonium chloride. Dis. Aquat. Org., 12:207-213.
- Willford, W.A. (1966). Toxicity of 22 therapeutic compounds to six fishes. Invest. Fish Control No 18, Resourc. Publ. N° 35, Fish Wildl. Serv., Bur. Sport Fish Wildl., USDI, Washington, DC:10.

- Williams, K.A., Green, D.W.J.; Pascoe, D. & Gower, D.E. (1986). The acute toxicity of cadmium to different larval stages of *Chironomus riparius* (diptera: chironomidae) and its ecological significance for pollution regulation. *Oecologia* 70:362-366.
- Withman, L. (1981). The phototactic behavior of *Daphnia magna* as an indicator of chronic toxicity. M.S., Okla. State Univ., Stillwater.
- Withman, L.J. and Miller, R.J. (1982). The phototactic behaviour of *Daphnia*
- Wold, H. (1966). Non linear stimulation by interative least squares procedures. F. David, editor. *Researchs Papers in Statistics* Wiley, New York., 411-444
- Yamamoto, K.I. (1991). Effects of formalin on gas exchange in the gills of carp *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 98:463-465.
- Yokoyama, T.; Saka, H.; Fujita, S. & Nishhiluchi, Y. (1988). Senssitivity of japonese eel, *Anguilla japonica*, to 68 kinds of agricultural chemicals. *Bull. Agric. Chem. Insp. Stn.*, 28:26-33.
- Zhou, X., & Mopper, K. (1997). Photochemical production of low-molecular-weight carbonyl compounds in seawater and surface microlayer and their air sea exchange. *Mar. Chem.*, 56:201-203.