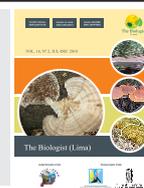


The Biologist (Lima), 2018, 16(2), jul-dic: 299-321.



The Biologist (Lima)



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

TOXICITY OF FUNGICIDE KRESOXIM - METIL ON SEVEN BIOINDICATORS OF ENVIRONMENTAL QUALITY

TOXICIDAD DEL FUNGICIDA KRESOXIM - METIL SOBRE SIETE BIOINDICADORES DE CALIDAD AMBIENTAL

Maricarmen del Rosario Valera¹; Lorena Alvariano² & José Iannacone^{1,2}

¹Universidad Ricardo Palma (URP), Facultad de Ciencias Biológicas (FCB), Laboratorio de Parasitología, Av. Alfredo Benavides 5440, Santiago de Surco, Lima, Perú.

²Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCCNM), Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA), Jr. Río Chepén 290, El Agustino, Lima, Perú.

ABSTRACT

Kresoxim-methyl is a fungicide of the strobilurin group known to affect aquatic and terrestrial environments. The objective of this work was to determine the toxicity of Kresoxim-methyl on seven bioindicators of environmental quality. Ecotoxicological bioassays were performed with the seven models using standardized protocols. Kresoxim-methyl affected the mortality of *Artemia franciscana* was 58 mg ai·L⁻¹ at 48 h of exposure. In *Carassius auratus* at 26 days, was observed that the mortality was affected at the concentration 0.067 mg ai·L⁻¹, hatching was altered at 0.134 mg ai·L⁻¹ as well as in surviving fish weights and length of surviving fish was observed effect at the highest concentration at 0.26 mg ai·L⁻¹. There was no effect on the number of deformed larvae and finally the percentage of juveniles of *C. auratus* with abnormal behavior was affected in the highest concentration 0.26 mg ai·L⁻¹. *Chlorella vulgaris* showed a growth inhibitory effect at 96 h with CL₅₀ > 0.12 x 10⁻¹ mg ai·L⁻¹. No effect of Kresoxim-methyl on the mortality of *Chrysoperla externa* and in the inhibition of nitrates in microbial communities of soil were observed. In *Daphnia magna* the CL₅₀ mortality was 1.04 mg ai·L⁻¹ at 48 h of exposure. In *Poecilia reticulata* the CL₅₀ at 96 h was 6.51 mg ai·L⁻¹. Kresoxim-methyl is more harmful to aquatic than to the terrestrial environments.

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

RESUMEN

Kresoxim-metil es un fungicida del grupo de las estrobilurinas que afecta a los ambientes acuáticos y terrestres. El objetivo de este trabajo fue determinar la toxicidad de Kresoxim-metil sobre siete bioindicadores de calidad ambiental. Se realizaron bioensayos ecotoxicológicos con siete modelos usando protocolos estandarizados. Kresoxim-metil afectó la mortandad de *Artemia franciscana*, presentando a 48h de exposición un valor de 58 mg ia·L⁻¹. En *Carassius auratus* a los 26 días de exposición se observó que la mortandad se vio afectada a la concentración de 0,067 mg ia·L⁻¹. La eclosión se vio alterada a 0,134 mg ia·L⁻¹. En el peso y longitud de los peces sobrevivientes se observó efectos a 0,26 mg ia·L⁻¹; pero no se vio efectos en el número de larvas deformadas. El porcentaje de juveniles de *C. auratus* con comportamiento anormal se vio afectado desde 0,26 mg ia·L⁻¹. En *Chlorella vulgaris* se observó un efecto inhibitor del crecimiento a las 96 h de exposición con una CL₅₀ > 0,12 x 10⁻¹ mg ia·L⁻¹. No se notó efecto de Kresoxim-metil sobre la mortandad de *Chrysoperla externa* y sobre la inhibición de nitratos en las comunidades microbianas de suelo. En *Daphnia magna*, la CL₅₀ (Concentración letal media) fue 1,04 mg ia·L⁻¹ a las 48 h de exposición. En *Poecilia reticulata*, la CL₅₀ a las 96 h de exposición fue 6,51 mg ia·L⁻¹. Kresoxim-metil fue más perjudicial en los ambientes acuáticos que en los terrestres.

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

INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son sustancias o mezclas de sustancias de origen natural o sintético, destinados a prevenir, destruir o controlar cualquier tipo de plaga que ocasione un impacto económico significativo en el rendimiento y en la calidad de las plantas. Los fungicidas son usados extensamente en la industria, la agricultura, el hogar y el jardín para la protección de las semillas de granos durante su almacenamiento, transporte y germinación; protección de los cultivos maduros y eliminación de enfermedades micóticas de la planta (Albert, 2004).

Kresoxim-metil (C₁₈H₁₉NO₄), es un fungicida sintético de amplio espectro derivado de la estrobilurina, sustancia segregada por el hongo *Strobilurus tenacellus* (Pers.). Kresoxim-metil es considerado tóxico, y diversos estudios revelan su persistencia en el agua, que requiere años para degradarse, generando así alteración de la fauna acuática, que a su vez al ser consumida por los humanos, se expone a intoxicación, convirtiéndose de esta manera en un problema de importancia ambiental y de salud pública (De Liñan, 2000; Bartlett *et al.*, 2002; Araujo *et al.*, 2012). Kresoxim-metil es un fungicida tóxico para

organismos acuáticos y puede causar efectos adversos a largo plazo en el ambiente acuático (BASF, 2009).

Ante este panorama, es necesario llevar a cabo un monitoreo y control del impacto ambiental que tienen los fungicidas sobre el ecosistema, para determinar la posible alteración de los seres vivos en su entorno. Como resultado de esta necesidad se han establecido una serie de indicadores de carácter biológico (bioindicador). Un bioindicador es un suborganismo, organismo o un conjunto de organismos que muestran la propiedad de responder a la variación de un determinado factor abiótico o biótico del ecosistema (Gallardo, 2004). Diversos estudios señalan la aplicabilidad del uso de pruebas con bioindicadores de invertebrados (Castillo, 2004), lo que reduce considerablemente el número de ensayos de toxicidad en mamíferos (ratas). Además se puede utilizar una mayor cantidad de individuos a un menor costo, con facilidad de manipulación y condiciones de laboratorio controladas (Iannacone *et al.*, 2016).

Hasta la actualidad, en el Perú no se han realizado investigaciones del efecto ecotóxico de Kresoxim-metil sobre la calidad ambiental empleando bioindicadores. Por lo tanto el objetivo de esta investigación fue determinar la toxicidad del

fungicida Kresoxim-metil sobre siete bioindicadores de calidad ambiental: *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 "Artemia"; *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) "Goldfish"; *Chlorella vulgaris* Beijerinck, 1890 "Clorela"; *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) "Crisopa o león de los áfidos"; Comunidades microbianas del suelo; *Daphnia magna* Straus, 1820 "Pulga de agua", y *Poecilia reticulata* Peters, 1859 "Guppy" (Hellawell, 1986; Olazo, 1987; Núñez, 1988; Royero, 1993; Morales, 1996; Macnaughton *et al.*, 1999; Fernández, 2000; González-Pérez & Aportela-Gilling, 2001; Tyagi *et al.*, 2007; Shaw *et al.*, 2008; Nieto & García, 2010; Iannacone *et al.*, 2016).

Por este motivo se busca determinar el efecto tóxico de Kresoxim-metil en la mortandad del crustáceo *A. franciscana* a 48 h de exposición. Evaluar el efecto de Kresoxim-metil sobre la mortandad del pez *C. auratus* a 26 días de exposición. Establecer la inhibición del crecimiento por acción del Kresoxim-metil en la microalga *C. vulgaris* hasta 96 h de exposición. Identificar el efecto tóxico de la exposición del Kresoxim-metil a las 72 h de exposición sobre la mortandad en el depredador terrestre *C. externa*. Observar el efecto tóxico de Kresoxim-metil en el porcentaje de inhibición de nitratos en comunidades microbianas a las 120 h de exposición. Hallar la toxicidad aguda (mortandad) a 48 h y toxicidad crónica (N° crías vivas, mortandad de los padres y longitud de hembras) a los 21 días de exposición de Kresoxim-metil sobre *D. magna*. Finalmente conocer el efecto tóxico de Kresoxim-metil en la mortandad de *P. reticulata* a las 96 h de exposición.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de ejecución: se analizaron siete modelos bioindicadores: *A. franciscana*, *C. auratus*, *C. vulgaris*, *C. externa*, Comunidades microbianas de suelo, *D. magna* y *P. reticulata*. Los cuales fueron obtenidos en distintos establecimientos de Lima, trasladados y analizados en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Ricardo Palma, Surco,

Lima- Perú.

Kresoxim-metil: Fungicida con nombre CA: metil (α E) - α - (metoximino) -2- [(2-metilfenoxi) metil] benceneacetato y nombre IUPAC: metil (E)-metoxiimina [α -(o-toliloxi)-o-tolil] acetato. Tiene fórmula química: $C_{18}H_{19}NO_4$, peso molecular: 313,4 y está catalogado como tipo toxicológico: IV. CAS = 143390-89-0.

Bioindicadores

Artemia franciscana

Se obtuvieron huevos de *A. franciscana* de Sera-Artemia Mix, Salt Lake USA, comercializado por Zoofarma® Lima, Perú. Laboratorio-Acuario de la ciudad de Lima, Perú. Se prepararon las condiciones para la eclosión de los huevos, con el fin de obtener los individuos en estadio nauplio II. Se incorporaron los huevos en un vaso de precipitado de 500 mL con agua embotellada y se expuso a luz intensa por 1 h. Luego, se utilizó hipoclorito de sodio a una concentración de 5,25%. En proporción 100 mL por 900 mL de agua de mar, se agitó constantemente por espacio de 30 min con el fin de facilitar la eclosión de los huevos. Seguido se enjuagaron los huevos con agua de mar, fueron trasladados a un vaso de precipitado de 1000 mL conteniendo agua de mar filtrada y 7,5 g de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$), y luego se llevó a la incubadora a 21°C durante un periodo de 24 h. Pasado el tiempo de incubación se sometieron los huevos a una fuerte aireación hasta su eclosión y se mantuvieron a temperatura ambiente (21°C). Se verificó y seleccionó para los bioensayos solo los nauplios II de *A. franciscana* dentro de las 24 h de eclosión. Una vez obtenidos los nauplios II se procedió a realizar los bioensayos de toxicidad aguda por 48 h de exposición. Los individuos de *A. franciscana* fueron expuestos en recipientes de plástico de 25 mL de capacidad con 20 mL de solución, se colocó diez neonatos por unidad experimental y fueron expuestos a ocho concentraciones de Kresoxim-metil (0,1625; 0,325; 0,65; 1,25; 2,5; 5, 10, 20 mg de $ia \cdot L^{-1}$) y un control negativo con cuatro réplicas por concentración. Se utilizaron un total de 360 individuos de *A. franciscana*. Los nauplios II no se alimentaron durante el bioensayo. Se contó el número de nauplios vivos y muertos en cada una de las diluciones a las 24 h y 48 h de exposición. Se usó como criterio de mortandad la carencia de movilidad a 15 s de observación al estereoscopio (Iannacone *et al.*, 2016). Se empleó el dicromato de

potasio ($K_2Cr_2O_7$) como control positivo determinándose una CL_{50} con rango entre 8 a 15 $mg \cdot L^{-1}$ (Tabla 1).

Carassius auratus

Se emplearon individuos provenientes del acuario Neptuno, San Borja - Lima, Perú de un cultivo estable y saludable. Se cultivaron y se aclimataron en el laboratorio por dos semanas previas al bioensayo. Posteriormente se aplicaron sobre los huevos las siguientes cinco concentraciones del Kresoxim-metil en agua embotellada: 0,26; 0,134; 0,067; 0,033 y 0,016 $mg \cdot L^{-1}$. Se tomó como referencia fundamental para la realización de los bioensayos la guía 210 de la OECD (1992).

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

Los bioensayos se iniciaron con huevos de estado embrionario-temprano de desarrollo. La eclosión de los huevos y la supervivencia fueron evaluadas diariamente. Los embriones, larvas y los juveniles muertos se retiraron de los envases para evitar que su descomposición pueda afectar a los supervivientes. Se empleó como medio de ensayo agua embotellada en medio ADAM® (Aachener Daphnien Medium) con dos gotas de alimento (Tetramin y nauplios de *A. franciscana ad libitum*). Se emplearon las cinco concentraciones mencionadas anteriormente y un total de 40 huevos por concentración. La duración del bioensayo de toxicidad fue de 26 días. Al final del ensayo, en *C. auratus* se evaluó: la mortandad acumulada (embriones, larvas y juveniles), el N° días que inicia la eclosión de los huevos, la longitud y el peso de los sobrevivientes (juveniles), el número de larvas deformadas y el porcentaje de *C. auratus* (Cyprinidae) “Goldfish” con comportamiento anormal. El comportamiento anormal incluyó hiperventilación y nado no coordinado. Para la validez del ensayo, el éxito en la eclosión fue sobre 80%, y el éxito en la post-eclosión fue de 70% en el bioensayo (Tabla 2).

Tabla 1. Condiciones y criterios del bioensayo con *Artemia franciscana*.

Tipo de bioensayo	estático
Tiempo de exposición	24 y 48h
Temperatura	21°±2C
pH de la solución	7,5
Humedad del laboratorio	75%
Fotoperiodo	Oscuridad total
Tamaño de envase	25 mL
Tamaño de muestra	20 mL
Edad de organismos	nauplios II<24h
N° de réplicas por concentración	4
N° de concentración más control	9
N° de organismos por concentración	40
N° de organismos por envase	10
Régimen de alimentación	ausencia
Agua control y de dilución	agua de mar
Respuesta letal	porcentaje de mortandad
Criterio de aceptabilidad	Sobre 90% de supervivencia de los controles

Tabla 2. Condiciones y criterios del bioensayo con *Carassius auratus*.

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

Chlorella vulgaris

Las microalgas fueron obtenidas de un acuario de Lima, Perú. La concentración inicial de *C. vulgaris* fue de 41875 células·mL⁻¹ al inicio del bioensayo. Luego las algas fueron trasladadas a tubos de vidrio de 12 mL de capacidad para realizar el diseño experimental del bioensayo.

Se trabajó con cinco concentraciones (0,00059; 0,000118; 0,000237; 0,000473 y 0,00947 mg de ia·L⁻¹) de Kresoxim-metil y un control negativo con

tres réplicas por concentración. Este ensayo se realizó a una temperatura constante de 21°C y una humedad relativa 75% con una iluminación permanente. Se siguió como referencia el protocolo de EPA (2012c). Las lecturas fueron realizadas hasta las 96 h de exposición. Se determinó la CI₅₀ (Concentración de inhibición media) en mg·L⁻¹ del producto Kresoxim-metil empleando un ensayo de toxicidad de inhibición del crecimiento de microalgas (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones y criterios de bioensayo con *Chlorella vulgaris*.

Tipo de bioensayo	Estático
Tiempo de exposición	96 h
Temperatura	21°±2C
pH de la solución	7
Humedad	75%
Dureza de agua	175 mg CaCO ₃ L ⁻¹
Fotoperiodo	Iluminación permanente
Tamaño de envase	12mL
Tamaño de la muestra	10mL
Concentración inicial de organismos	41875 células·mL ⁻¹
N° de réplicas por concentración	3
N° de concentración más control	6
Régimen de alimentación	NR
Agua control y de dilución	Agua embotellada
Respuesta sub-letal	Inhibición del crecimiento en microalgas al 50% (CI ₅₀)
Criterio de aceptabilidad sugerida	Densidad óptima del control a 72h de iniciado el ensayo sobre 40·10 ³ células·mL ⁻¹

Chrysoperla externa

Se obtuvieron huevos de *C. externa* del Programa Nacional de Control Biológico (PNCB) del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), Ate - Vitarte, Lima. La aclimatación de los individuos consistió en mantenerlos en un ambiente con condiciones semi-controladas a una temperatura de $21^{\circ}\pm 2C$ y con una humedad relativa del laboratorio de 75 % y bajo oscuridad total. Se tomó en cuenta el protocolo de EPA (2012a). Se mantuvo en estas condiciones hasta su eclosión y

durante el bioensayo. Posteriormente los bioensayos se iniciaron colocando larvas de primer estadio por envase de plástico de 30 mL aproximadamente. Para los ensayos con *C. externa* se usaron cinco concentraciones de Kresoxim - metil (0,508; 0,254; 0,127; 0,0635 y 0,03175 mg de $ia \cdot L^{-1}$) y un control negativo. Se realizaron cuatro réplicas por concentración. Las lecturas de mortandad se realizaron a las 24 h hasta las 72 h de exposición (Tabla 4).

Tabla 4. Condiciones y criterios de bioensayo con *Chrysoperla externa*.

Tipo de bioensayo	Estático
Tiempo de exposición	72h
Temperatura	$21^{\circ}\pm 2C$
pH de la solución	7,5
Humedad	75%
Dureza de agua	175 mg $CaCO_3 L^{-1}$
Fotoperiodo	Oscuridad permanente
Tamaño de envase	30mL
Edad de organismos	larvas < 24h
N° de réplicas por concentración	4
N° de concentración más control	6
N° de organismos por concentración	40
N° de organismos por envase	10
Régimen de alimentación	NR
Agua control y de dilución	Agua embotellada
Respuesta letal	Porcentaje de mortandad
Criterio de aceptabilidad	Sobre 80% de supervivencia en controles

NR=No requerido.

Comunidades microbianas

Se obtuvo una muestra de suelo y se trabajó una serie de cinco réplicas por concentración y un control, a cinco días de exposición, se cubrió con parafilm® las unidades de ensayo. Las condiciones del ensayo fueron a oscuridad total, temperatura de incubación constante de $21^{\circ}C$, pH: 6, suelo artificial: 34 g de arena lavada, 10 g aserrín y 5 g musgo (el cual proporciona la materia orgánica o las comunidades microbianas del suelo), 1 g carbonato de calcio y 6 g agua embotellada conteniendo alfalfa filtrada, según lo indicado en el

ítem 3. iii e ítem 4. ii del protocolo de la EPA (2012b) y del protocolo de OECD (2000). Se agregó 80 mL de KCl a 1N a cada unidad de muestra y por un lapso de una h en movimiento frecuente. Seguidamente se filtró y añadió un sachet del kit Hanna® de medición de nitratos por el método colorimétrico, en unidades de $mg \cdot L^{-1}$ y posterior transformación a $ug \cdot g^{-1}$ de suelo. Se evaluaron cuatro concentraciones (0,153; 0,306; 0,612; 1,244 mg de $ia \cdot g^{-1}$ de suelo) con Kresoxim-metil y un control negativo (Tabla 5).

Daphnia magna

Toxicidad aguda: Se obtuvieron neonatos de *D. magna* de menos de 24 h de nacidos, provenientes en el acuario Neptuno, San Borja - Lima, Perú. En el laboratorio, las pulgas de agua fueron puestas en recipientes de plástico de 30 mL conteniendo diez neonatos por unidad experimental y fueron expuestos a cinco concentraciones de Kresoxim-metil (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 mg de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y un control negativo con cuatro réplicas por concentración. Las condiciones a las que se mantuvo el ensayo fueron de temperatura a 21°C , con humedad relativa de 75% y el agua presentó un pH de 7. Todo esto bajo oscuridad. La duración del bioensayo de toxicidad aguda fue de 48 h. Se siguió el protocolo estandarizado para invertebrados (EPA, 2016a). La lectura se realizó a las 24h y 48 h de exposición (Tabla 6).

Toxicidad crónica: Se empleó a *D. magna* provenientes del acuario Neptuno, San Borja - Lima, Perú. Se buscó un cultivo estable y saludable por más de un año. En el laboratorio se cultivó en un medio denominado ADAM®, y se aclimató en el laboratorio por dos semanas previas al bioensayo. Se aplicaron las siguientes cinco concentraciones

del Kresoxim-metil en agua destilada (0,026; 0,0134; 0,0067; 0,0033 y 0,0016 mg de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). La temperatura ambiental de los ensayos fue de 21°C . Bajo 12 h luz/12 h oscuridad, calidad de luz de fluorescente, blanco-frío. El agua presentó un pH de 7,5; OD: $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y una dureza de $170\text{ mg CaCO}_3\text{ L}^{-1}$. Se tomó como referencia fundamental para la realización de los bioensayos la guía 211 OECD (2008). La alimentación de las hembras-neonatas fueron a base de Tetramin® disuelto (1/10) a una dosis de alimento de 2 gotas de preparado alimenticio diario. La frecuencia de recambio del medio fueron tres veces por semana (condiciones semi-estáticas). Los recipientes de mantenimiento del cultivo fueron de 5 L de capacidad. La unidad de muestra para los bioensayos fueron recipientes de plástico de 300 mL, con 200 mL de medio de cultivo. Los bioensayos se iniciaron con un neonato de menos de 24 h de nacido, sin aireación. Se usó como medio de ensayo agua reposada con dos gotas de alimento. Se emplearon cinco concentraciones y un total de 10 neonatos por concentración. Los neonatos fueron colocados individualmente en cada uno de los envases. La duración del bioensayo de toxicidad crónica fue de 21 días (Tabla 7).

Tabla 5. Condiciones y criterios de bioensayo con comunidades microbianas.

Tipo de bioensayo	Estático
Tiempo de exposición	120 h
Temperatura	21°C
pH de la solución	6
Humedad	75%
Dureza de agua	$170\text{ mg CaCO}_3\text{ L}^{-1}$
Fotoperiodo	Oscuridad total
Tamaño de envase	250mL
Tamaño de la muestra	150 g de suelo
Edad de organismos	NR
Nº de réplicas por concentración	5
Nº de concentración más control	5
Agua control y de dilución	Agua embotellada
Respuesta sub-letal	Nitrificación microbiana en base al NOEC y LOEC
Criterio de aceptabilidad sugerida	Incremento en la nitrificación en el control en comparación con el inicial

NR=No requerido.

LOEC=Concentración más baja de efecto observables.

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

Tabla 6. Condiciones y criterios de bioensayo agudo sobre *Daphnia magna*.

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

NR=No requerido.

Tabla 7. Condiciones y criterios de bioensayo crónico sobre *Daphnia magna*.

Tipo de bioensayo	Semi-estático
Tiempo de exposición	21d
Temperatura	21°C
pH de la solución	7,5
Humedad	75%
Dureza de agua	170 mg CaCO ₃ L ⁻¹
Fotoperiodo	12h luz/ 12h oscuridad
OD	6 mg·L ⁻¹
Tamaño de envase	300mL
Tamaño de muestra	200mL
Edad de organismos	Neonatos <24 h
N° de réplicas por concentración	4
N° de concentración más control	6
N° de organismos por concentración	10
N° de organismos por envase	1
Régimen de alimentación	Tetramin®
Agua control y de dilución	Agua destilada
Respuesta sub-letal	Número de crías vivas, Longitud de las hembras de <i>Daphnia magna</i> a 21 días de exposición.
Respuesta letal	porcentaje de mortandad
Criterio de aceptabilidad	Sobre 80% de supervivencia de los controles a 21d

Poecilia reticulata

Se obtuvieron peces Guppy (*P. reticulata*) proveniente del acuario Neptuno, San Borja - Lima, Perú. Se colocaron cinco peces por recipientes de plástico de 300 mL y fueron sometidos a cinco concentraciones de Kresoxim-metil (6,32; 3,16; 1,58; 0,79 y 0,40 mg de i.a.·L⁻¹) y un control negativo (Cn) con agua embotellada. Se

realizó cuatro réplicas por concentración. La temperatura ambiental del ensayo fue de 21°C, con una humedad relativa de 75 % y agua con un pH de 6,8. Según el protocolo EPA (2016b). Se mantuvo a total oscuridad hasta las 96 h de exposición. Al final del ensayo de toxicidad aguda se determinó la CL₅₀ en mg·L⁻¹ 96 h del pez *P. reticulata* (Tabla 8).

Tabla 8. Condiciones y criterios de bioensayo sobre *Poecilia reticulata*.

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

Procedimiento y análisis de datos

En todos los ensayos con las diversas concentraciones de Kresoxim-metil se siguió un incremento de x2. Los ensayos nos muestran los porcentajes de mortandad en las concentraciones de Kresoxim-metil más control, para *C. externa* a las 72 h de exposición, para *P. reticulata* a las 96 h de exposición, para *D. magna* (toxicidad aguda) obtenidos a las 48 h de exposición, *A. franciscana* a las 24 h y 48 h exposición, y la inhibición del crecimiento en *C. vulgaris* a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición.

Se calculó la CL(I)₅₀ del Kresoxim-metil sobre los modelos biológicos usando el programa computarizado Probit versión 1.5. El modelo de regresión fue verificado usando el estadístico Chi-

cuadrado. CL₅₀ sobre *C. externa* a las 72 h; *P. reticulata* a las 96 h; *D. magna* a las 48 h y *A. franciscana* a las 48 h.

Se halló la toxicidad crónica de *D. magna* a los 21 días de exposición, evaluando el número de crías vivas, mortandad de los padres al momento de producción de la primera camada y longitud de las hembras de *D. magna* y en *C. auratus* a los 26 d de exposición a Kresoxim-metil se evaluaron la mortandad acumulada, N° días que inicia la eclosión, longitud y peso de peces sobrevivientes, N° de larvas deformadas y porcentaje de *C. auratus* con comportamiento anormal. Se usaron mayormente cinco a ocho concentraciones más el control, con tres a cuatro repeticiones, en un diseño en bloque completamente aleatorio (DBCA) para

todos los bioensayos, y solamente cinco concentraciones más el control, con 5 repeticiones para la toxicidad para la concentración de nitratos obtenido a 120 h de exposición. En todos los casos, la eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías, previa transformación de los datos a raíz cuadrada del arcoseno. En el caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos o las repeticiones se realizó una Prueba de Significación DVS (Diferencia Verdaderamente Significativa) de Tukey. Se empleó el paquete estadístico SPSS, versión 24,0 para Windows 8 para el cálculo de los estadísticos descriptivos e inferenciales.

Aspectos éticos: El uso de estos siete bioindicadores reduce el número de ensayos de

toxicidad en mamíferos. Además de su fácil manipulación, mantenerlos bajo condiciones ambientales controladas y generar un bajo costo (Guilhermino *et al.*, 2000). Se minimizaron el número de los organismos empleados y las repeticiones empleando el principio de las tres Rs "reemplazamiento, reducción, y refinamiento" (Mukerjee, 1997).

RESULTADOS

Artemia franciscana

La Tabla 9 nos indica los porcentajes de mortandad, valores de NOEC y LOEC, CL_{50} de *D. magna* obtenidos por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del Kreso xim-metil empleada a 24h y 48 h de exposición.

Tabla 9. Efecto del kresoxim-metil sobre la mortandad de *Artemia franciscana* a 24 y 48 h de exposición.

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

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

LOEC= Concentración más baja de efecto observables.

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

CL₅₀ = Concentración letal media. xim-metil empleada a 24h y 48 h de exposición.

Carassius auratus

Se observó que a los 26 días el parámetro de mortandad se vio afectado en la concentración 0,067 mg i.a·L⁻¹ (Tabla 10). En los días en que inicia la eclosión este factor se vio alterado en la concentración 0,134 mg i.a·L⁻¹ al igual que en los pesos de los peces sobrevivientes (Tabla 10). En la longitud de peces sobreviviente, el efecto se observó en la concentración más alta 0,26 mg i.a·L⁻¹ (Tabla 10). No se observó efecto en el número de larvas deformadas a ninguna de las

concentraciones (Tabla 10). El porcentaje de juveniles con comportamiento anormal se vio afectado en la concentración más alta 0,26 mg i.a·L⁻¹ (Tabla 10).

Chlorella vulgaris

La Tabla 11 nos indica los porcentajes de inhibición del crecimiento algal de *C. vulgaris* obtenidos por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del Kresoxim-metil empleadas a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición.

Tabla 10. Efecto de Kresoxim-metil en la mortandad acumulada, N° días que inicia la eclosión, longitud y peso de peces sobrevivientes, N° de larvas deformadas y porcentaje de *Carassius auratus* "Goldfish" con comportamiento anormal a exposición.

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

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

LOEC = Concentración más baja de efecto observables.

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

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

Tabla 11. Efecto del Kresoxim-metil sobre la inhibición del crecimiento algal de *Chlorella vulgaris* a 24, 48, 72 y 96 h de exposición.

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

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

LOEC= Concentración más baja de efecto observables.

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

CI₅₀= Concentración de inhibición media.

Se observó efecto de inhibición de las 24 h hasta las 96 h empleando el CL₅₀ (Tabla 11).

mortandad de *C. externa* obtenidos por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del Kresoxim-metil empleada a 72 h de exposición.

Chrysoperla externa

La Tabla 12 nos indica los porcentajes de

Tabla 12. Efecto del Kresoxim-metil sobre la mortandad de *Chrysoperla externa* a 72 h de exposición.

Concentración mg i.a·L ⁻¹	Mortandad % 72h
0	0 ^a
0,3175	0 ^a
0,0635	23,07 ^a
0,127	0 ^a
0,254	38,46 ^a
0,508	23,07 ^a
NOEC (mg ia·L ⁻¹)	0,508
LOEC (mg ia·L ⁻¹)	>0,508

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

LOEC = Concentración más baja de efecto observables.

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

Ninguna de las concentraciones de Kresoxim-metil tuvo efecto significativo sobre la mortandad de *C. externa* (Tabla 12).

Comunidades microbianas

La Tabla 13 nos indica la concentración y el porcentaje de inhibición de nitratos por efecto de las cuatro concentraciones de Kresoxim-metil empleada a 120 h de exposición en las comunidades microbianas del suelo.

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

Daphnia magna (Toxicidad aguda)

La Tabla 14 nos indica los porcentajes de mortandad de *D. magna* obtenidos por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del kresoxim-metil empleada a 24h y 48 h de exposición.

Tabla 13. Efecto del Kresoxim-metil sobre las comunidades microbianas del suelo a 120 h de exposición.

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

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

LOEC = Concentración más baja de efecto observables.

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

CI₅₀= Concentración de inhibición media.

Tabla 14. Efecto del kresoxim-metil sobre la mortandad de *Daphnia magna* a 24 y 48 h de exposición.

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

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

LOEC=Concentración más baja de efecto observables.

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

CL₅₀ = Concentración letal media.

Daphnia magna (Toxicidad crónica)

La Tabla 15 nos indica efecto del Kresoxim-metil en el número de crías vivas, en la mortandad de los

padres al momento de producción de la primera camada y en la longitud de las hembras de *D. magna* a 21 días de exposición.

Tabla 15. Efecto del Kresoxim-metil sobre el n° de crías vivas, porcentaje de mortandad y longitud de las hembras de *Daphnia magna* a 21 días de exposición.

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

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

LOEC = Concentración más baja de efecto observables.

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

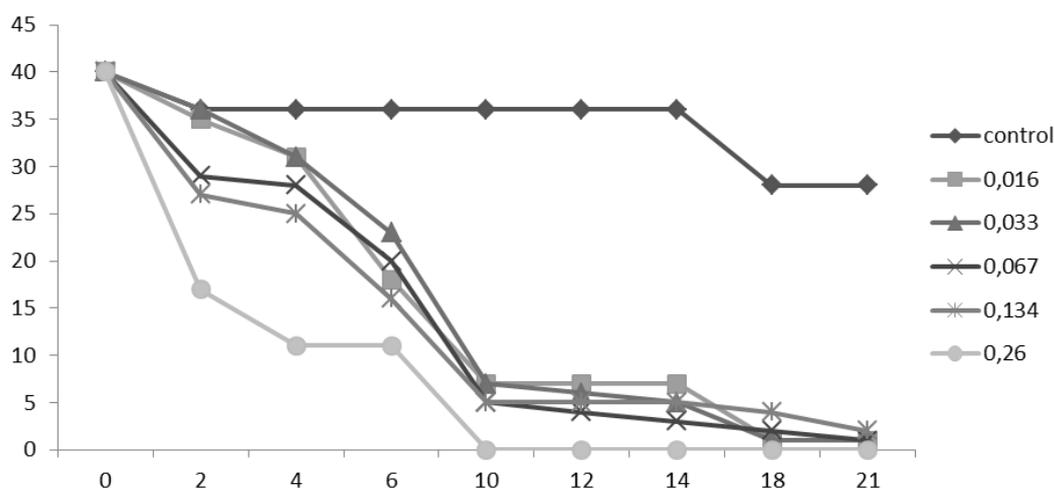


Figura 1. Ritmo de mortandad diario de *Daphnia magna* en ensayo de toxicidad crónica a los 21 días de exposición.

El número de crías vivas se vieron afectadas a partir de la concentración 0,0033 mg i.a. \cdot L⁻¹. El porcentaje de mortandad de padres se vio afectado a partir de la concentración 0,0033 mg i.a. \cdot L⁻¹. La longitud de las hembras se vieron afectadas a partir de la concentración 0,0067 mg i.a. \cdot L⁻¹. La Figura 1 señala el ritmo de mortandad de *D. magna* en ensayo de toxicidad crónica a los 21 días de exposición.

Poecilia reticulata

La Tabla 16 nos indica los porcentajes de mortandad del pez *P. reticulata* obtenidos por acción de las cinco concentraciones en orden creciente del Kresoxim-metil a 96 h de exposición.

Tabla 16. Efecto del kresoxim-metil sobre la mortandad de *Poecilia reticulata* a 96 h de exposición.

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

Letras minúsculas iguales en una misma columna indican que los porcentajes de mortandad son estadísticamente iguales.
 LOEC = Concentración más baja de efecto observables.
 NOEC=Concentración de efectos no observables e inmediatamente debajo del LOEC.
 CL₅₀ = Concentración letal media.

No se observó efecto tóxico de Kresoxim-metil sobre el porcentaje de mortandad de *P. reticulata* (Tabla 16).

DISCUSIÓN

Artemia franciscana:

En la prueba de toxicidad aguda con *A. franciscana* a las 24h y 48h, se halló valores de CL_{50} de 14,07 mg i.a. $\cdot L^{-1}$ y de 14,58 mg i.a. $\cdot L^{-1}$, respectivamente. El compuesto ensayado presentó una menor toxicidad en comparación al Diazinon, con un valor de CL_{50} a las 24 h de 10,57 mg $\cdot mL^{-1}$. El fungicida azoxistrobina (sustancia activa) y su formulación comercial, cuyo modo de acción es similar a kresoxim-metil, han sido evaluados sobre *A. franciscana* presentando un valor de CL_{50} de azoxistrobina a las 24h de 0,46 mg $\cdot L^{-1}$ y el producto comercial con 1,25 mg $\cdot L^{-1}$ (Alves-Respostas, 2015). En otro ensayo con *A. franciscana* se evaluó la concentración letal media (CL_{50}) de diecisiete compuestos organofosforados. Fentión cuya CL_{50} a exposición de 24h y 48h fue 0,00626 mg $\cdot mL^{-1}$ y 0,00011mg $\cdot mL^{-1}$, respectivamente, presentó una mayor toxicidad que los demás compuestos. El compuesto con menos toxicidad fue el clorpirifos cuyo CL_{50} a las 24 y 48 h fue 0,10 y 0,022, respectivamente (Jaramillo *et al.*, 2013).

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

de ensayos ecotoxicológicos de corta duración sobre *A. franciscana*.

Carassius auratus:

Vásquez *et al.* (2005) utilizaron como bioindicadores a los peces juveniles de *C. auratus* y evaluaron efectos tóxicos frente al tratamiento con sulfato de cobre. Li *et al.* (2008) examinaron los efectos ecotoxicológicos de la clorpromazina (CPZ) en peces Goldfish (*C. auratus*). Authman *et al.* (2015) presentaron una breve reseña de los efectos tóxicos de metales pesados en los peces. Muchos efectos tóxicos producidos por diversas sustancias sobre los organismos no se manifiestan de forma inmediata; pero son suficientes para modificar la biología de éstos llegando incluso a condicionar su posibilidad de sobrevivir. Estos efectos se evalúan utilizando diferentes biomarcadores (Álvarez *et al.*, 2012). Para analizar estos efectos fue necesario someter a *C. auratus* a un mayor tiempo de exposición (26 días) con diferentes concentraciones de Kresoxim-metil.

Chlorella vulgaris:

Las algas son capaces de bioconcentrarse y metabolizar los contaminantes acuáticos como insecticidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Jonsson *et al.*, 2001), debido al hecho de que *C. vulgaris* es un alga aceptada como bioindicadora de la contaminación del medio ambiente (Torres *et al.*, 2008).

Riva *et al.* (1998) utilizaron dos especies algales unicelulares: *C. vulgaris* y *Scenedesmus* Chodat 1926 como sistemas bioindicadores, que se expusieron a cinco formulaciones comerciales de plaguicidas organofosforados: Clorpirifos, Metilparatión, Azinfós metil, Metamidofos y Diazinón. Para la determinación de sus efectos se aplicó el método de inhibición del crecimiento algal, Iannacone & Gutiérrez (1999) midieron la toxicidad de los plaguicidas (lindano y clorpirifos) sobre tres bioindicadores, midiendo la tasa de fotosíntesis de *C. vulgaris*. Mientras que Antón *et al.* (1993) estudiaron los efectos tóxicos de varios herbicidas en una especie de la familia Chlorophyceae, *Chlorella pyrenoidosa* Chick, 1903. Todos los herbicidas (glifosato, clortolurón con terbutrilo, isoproturón y alaclor) fueron productos comerciales y técnicos. Saenz & Di Marzio (2009) evaluaron la toxicidad del herbicida glifosato puro y comercial (Roundup®) en cuatro

algas verdes de agua dulce entre ellas *C. vulgaris*. Los efectos tóxicos del glifosato se evaluaron a corto plazo (tasas fotosintéticas, determinadas como producción de oxígeno) y a largo plazo (crecimiento de las poblaciones, determinado como el número de células). También *C. vulgaris* sirve para medir el estrés por metales pesados como cadmio, plomo y cobre (Bajguz, 2011).

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

***Chrysoperla externa*:**

Las diferentes concentraciones de Kresoxim-metil a 72 h de exposición no tuvieron efecto sobre *C. externa*. El NOEC y NOEC fue 0,508 mg i.aL⁻¹ y >0,0508 mg i.aL⁻¹, respectivamente, para el parámetro de porcentaje de mortandad en *C. externa*. Esta especie es un eficiente depredador en

el manejo ecológico e integrado de plagas. Sus larvas y adultos son considerados depredadores muy voraces, oófagos y larvífagos, alimentándose de una amplia diversidad de presas, tales como pulgones, moscas blancas, huevos y larvas de *Lepidópteros*, entre otros. *Chrysoperla externa* tiene amplia distribución en la costa y sierra del Perú con presencia de adultos a través de todo el año, fácil crianza en cautiverio, potencial para adaptarse a varios ambientes de cultivos (Schumuck, 1997; Iannacone & Lamas, 2002; Carvalho *et al.*, 2002; Godoy *et al.*, 2004) y aparente resistencia a numerosos plaguicidas. Núñez (1988) y Bueno & Freitas (2004) estudiaron los efectos secundarios de los dos insecticidas / acaricidas, abamectina y lufenurón sobre los huevos y larvas de *C. externa* en el laboratorio.

No se encontró literatura del uso de Kresoxim-metil sobre *C. externa*. En un trabajo similar se utilizaron los insecticidas lufenuron y abamectina sobre *C. externa*. Se demostró que lufenuron fue nocivo para este depredador, debido a que indujo una alta mortandad en las larvas neonatas de los huevos tratados; así como en larvas de primer, segundo y en tercer estadio. También se produjo una alta mortandad de pupas que no llegaron al estado de adulto, mientras que la viabilidad del huevo de *C. externa* no fue afectada por la abamectina en ninguno de sus estadios, y se desarrollaron a adultos. Los resultados mostraron que la abamectina es inocua y que el lufenuron es tóxico para los huevos y larvas de *C. externa* (Bueno & Freitas, 2004). En otro bioensayo se utilizaron los huevos, larvas y adultos de *Chrysoperla rufilabris* Burmeister, 1839 al que se le aplicó fungicidas (trifenilestaño, benomil y dodina), acaricidas (dicofol y hexakis) e insecticidas (dimetoato, demeton, malatión, fosadona, endosulfán, azinfos-metilo, lindano y etión). Se observó que los fungicidas y acaricidas causaron <50% de mortandad para *C. rufilabris*; mientras que los insecticidas usados fueron menos tóxicos (Mizell & Schiffhauer, 1990).

Comunidades microbianas:

Según Lizarazo (2005), el papel de los microorganismos en la nutrición y disponibilidad de nutrientes en el suelo ha sido ampliamente estudiada, especialmente orientada a aquellos microorganismos que hacen mutualismo con

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

No se observó inhibición en la formación de nitratos sobre las comunidades microbianas, en ninguna de las cuatro concentraciones evaluadas a las 120h. La concentración más alta usada fue 1244 mg ia.g⁻¹. En otro ensayo con tres fungicidas (Captan, Thiram y Verdasan), estos estuvieron asociados a una disminución en la nitrificación a los 28 días. Las tasas más bajas de aplicación de los tres fungicidas dieron como resultado una mayor cantidad de nitrificación, así se obtuvo la inhibición de la nitrificación a los 0,01 mg.g⁻¹ de Verdasan, a 0,1 mg.g de Tiram y 0,25 mg.g⁻¹ de Captan en suelo. Wainwright & Pugh (1973) indican que Kresoxim-metil es menos tóxico que los tres fungicidas mencionados. En otro bioensayo se utilizaron siete insecticidas (lindano, fenitrotión, fonofos, malatión, forato, terbufos y carbofurano) y seis fungicidas (mancozeb, maneb, thiram, benomyl, captan y terrazole.) sobre la nitrificación en el suelo. A partir de la concentración 50 ug.g⁻¹ se obtuvo un efecto significativo en el caso de todos los insecticidas, al igual que en dos fungicidas tiram y captan que actuaron a partir de la concentración 50 ug.g⁻¹. El resto a esa elevada concentración no presentaron ningún efecto de desnitrificación. Yeomans & Bremner (1985) demuestran que los insecticidas tiene un mayor efecto sobre la inhibición de nitratos en las comunidades microbianas que los fungicidas, especialmente Kresoxim-metil.

***Daphnia magna*:**

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

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

Warming *et al.* (2009) evaluaron los efectos agudos y crónicos del fungicida azoxistrobina de estrobilurina en tres clones de *D. magna* procedentes de diferentes lagos daneses. Martínez (2008) realizó un ensayo de toxicidad agua con cladóceros de la familia Daphnidae, analizando inmovilización o mortandad, con diferentes sustancias. Persoone *et al.* (2009) indicaron que uno de los bioensayos utilizados para la detección de toxicidad de los productos químicos y para el monitoreo de toxicidad de los efluentes y aguas contaminadas es el ensayo de toxicidad aguda con crustáceos dáfnidos, y en particular la realizada con *D. magna*. La NM (2010) estableció un método para la medición de la toxicidad aguda, utilizando al organismo dulceacuícola *D. magna*. Se basa en la medición de la toxicidad aguda, mediante la definición de la concentración efectiva media (CE₅₀), donde la respuesta que se evalúa es la ausencia de movilidad o muerte, bajo condiciones de exposición controlada de *D. magna* durante 48 h de exposición. Cui *et al.* (2017) investigó la toxicidad acuática de 3 fungicidas comunes de estrobilurina (kresoxim-metil, piraclostrobina y trifloxistrobina) en *D. magna*. Sancho *et al.* (2016) utilizaron pruebas crónicas para evaluar respuestas a largo plazo de contaminantes en *D. magna*.

Kresoxim metil está considerado como un plaguicida de bajo riesgo; sin embargo estudios recientes han reconocido los impactos potenciales de los fungicidas en la reproducción de *Daphnia* (Warming *et al.*, 2009). En la prueba de toxicidad aguda para *D. magna* se observó una mortandad alta en la mayor concentración con un porcentaje de 88,57%. A las 24 h el CL₅₀ = 1,09 mg i.a.·L⁻¹ y para 48h el CL₅₀ = 1,04 mg i.a.·L⁻¹. Mientras que en otros fungicidas del grupo estrobilurinas, piraclostrobina y epoxiconazole al que pertenece

Kresoxim-metil, presentaron respectivamente valores de $CL_{50} = 0,01 \text{ mg i.a.Ly}$ y de $CL_{50} = 8,69 \text{ mg i.a.L}^{-1}$ (Capeagro, 2016). Por otro lado se trabajó con 3 clones de *D. magna* y se demostró una variación clonal significativa en la sensibilidad de *D. magna* hacia la azoxistrobina. Un clon tenía una concentración letal media de 48 h ($CL_{50} = 0,27 \text{ mg.L}^{-1}$). Sin embargo, los dos clones restantes eran mucho más sensibles y tenían $CL_{50} = 0,07 \text{ mg.L}^{-1}$ y $0,09 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente (Warming *et al.*, 2009). Estas diferencias podrían ser el resultado de diversas condiciones experimentales o de cultivo, como el factor genético, medio, y también la pureza del compuesto ensayado.

Las pruebas crónicas se utilizan para evaluar las respuestas a largo plazo de los contaminantes, la toxicidad crónica de éstos puede afectar negativamente la supervivencia, el crecimiento de las poblaciones de organismos, y eventualmente causar daño a los ecosistemas (Sancho *et al.*, 2016). Se realizó una prueba crónica de 21 días de *D. magna* donde se observó como afectó negativamente la mortandad de los padres, el número de crías vivas y la longitud de las hembras. Estos resultados coinciden con Cui *et al.* (2017) que realizó una prueba crónica de 21 días, donde observó que las estrobilurinas pueden afectar significativamente la reproducción, el desarrollo, el crecimiento y causar una disminución significativa en el número de crías de *D. magna*. El NOEC con respecto a la mortandad para tebuconazole a los 21 días fue $0,41 \text{ mg.L}^{-1}$, mientras que en este ensayo para Kresoxim-metil fue de $0,0016 \text{ mg ia.L}^{-1}$. Esto demuestra que Kresoxim-metil es más tóxico que el tebuconazole (Sancho *et al.*, 2016). Los resultados indican que Kresoxim-metil es tóxico para *D. magna* y bajas concentraciones son suficientes para causar daño a *D. magna* en concentraciones ambientalmente relevantes (Cui *et al.*, 2017).

Poecilia reticulata:

Se encuentra en diversos hábitats, que van desde el agua muy turbia en estanques, canales y zanjas en las elevaciones más bajas prístinas arroyos de montaña a gran altitud. Se alimentan de zooplancton, pequeños insectos y detritus. Uno de los peces de acuario más populares con muchas variedades estandarizadas. Utilizado en la investigación genética (Allen, 1991; Parma de Croux *et al.*, 2002).

El guppy, es muy tolerante lo que le confiere grandes posibilidades de dispersión para colonizar diversos ambientes. Tolera bajas concentraciones de oxígeno disuelto, acepta un pH de 5,5 a 8,5; y una temperatura de 20 a 30 °C (Meffe & Snelson, 1989). Actualmente, se utiliza a *P. reticulata* como biomonitor en la restauración medio ambiental de un ecosistema acuático (Elías-Fernández *et al.*, 2006; Gómez-Manrique & Gonçalves, 2008). En peces el valor establecido de la CL_{50} es 1 mg.L^{-1} (ANASAC, 2016). Iannacone & Alvarino (1998) señalaron que los peces son extremadamente sensibles a la perturbación ambiental. Por lo tanto numerosos peces han sido propuestos como modelos biológicos para evaluar la ecotoxicidad de sustancias químicas contaminantes, como, *P. reticulata*, tal como Bretaud *et al.* (2000) señalan que los peces se utilizan como bioindicadores y juegan un papel importante en el control de la contaminación principalmente por metales pesados.

Baser *et al.* (2003) utilizaron permetrina en bioensayos de toxicidad aguda en *P. reticulata*. Iannacone *et al.* (2007) evaluaron el impacto ecotoxicológico del insecticida carbámico cartap sobre dos especies de peces del ecosistema acuático continental. *P. reticulata* "guppy" (Poeciliidae) y *Paracheirodon innesi* (Myers 1936). Sarikaya *et al.* (2007) utilizaron fenitrotión que tiene un gran potencial contaminante tóxico para los ecosistemas acuáticos. Álvarez *et al.* (2012) evaluaron la toxicidad aguda de dos herbicidas comerciales formulados con glifosato y una solución pura frente a *P. reticulata* (Kreutz *et al.*, 2008). Los riesgos de toxicidad de los plaguicidas agrícolas para los peces son esenciales. Actualmente, muchas preguntas siguen sin resolverse. Han sido diseñados para investigar la toxicidad aguda y la concentración letal (CL_{50}) de cuatro herbicidas, dos fungicidas y dos insecticidas para los alevines de bagre de plata. Napan *et al.* (2010) indican que el metomilo es uno de los productos químicos más utilizados, como insecticida-acaricida para el control de una amplia gama de plagas. Por ello se evaluó la toxicidad aguda del metomilo en el pez introducido *Poecilia latipinna* (Lesueur 1821).

En peces, el valor establecido de la CL_{50} es 1 mg.L^{-1} (ANASAC, 2016) mientras que en los resultados de *P. reticulata* el valor a las 96h de CL_{50} fue de 6,51

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

Análisis Global:

El bioindicador más sensible ante el fungicida Kresoxim-metil fue *C. vulgaris*. Los resultados de estos ensayos brindan información de la ecotoxicidad del fungicida Kresoxim-metil sobre la calidad ambiental utilizando siete bioindicadores. En la presente investigación se deduce que Kresoxim-metil es más perjudicial en los ambientes acuáticos que en los terrestres, estos resultados coinciden con estudios que afirman que la toxicidad del fungicida sobre los ambientes acuáticos alteran la fauna acuática que a su vez es consumida por humanos, exponiéndose a intoxicación. Se ha señalado al kresoxim-metil como probable carcinógeno para los humanos. Kresoxim-metil se encuentra vigente mediante la Resolución Directoral 0064-2014-MINAGRI-SENASA-DIAIA. Los resultados obtenidos de este fungicida registrado deben ser reevaluados de acuerdo al surgimiento de nueva información técnico-científica, sobre la eficacia, toxicidad o ecotoxicidad, que pueda implicar en algunos casos restricciones en su registro o en otros hasta su prohibición. Por otro lado el uso de bioindicadores fue favorable (González & Lozano, 2004) debido a que reduce considerablemente el número de ensayos de toxicidad en mamíferos y además se

puede utilizar mayor cantidad de individuos a un menor costo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, L.A. 2004. *Toxicología ambiental*. México: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Capítulo 21. pp.359-382.
- Allen, G.R. 1991. *Field guide to the freshwater fishes of New Guinea*. Publication, no. 9. Christensen Research Institute, Madang, Papua New Guinea. 268 p.
- Álvarez, M.; Gimenez, I.T.; Saitua, H.; Enriz, R.D. & Giannini, F.A. 2012. Toxicidad en peces de herbicidas formulados con glifosato. *Acta toxicológica Argentina*, 20:5-13.
- Alves-Respostas, C. 2015. *Dos organismos marinhos à azoxistrobina e à sua formulação comercial Ortiva®*. Coimbra: [s.n.], Dissertação de Mestrado em Ecologia.
- ANASAC. 2016. *Krexim 50 SC (kresoxim metil 50 SC)*. Hoja de datos de seguridad (HDS). <http://www.anasac.cl/agropecuario/wp-content/uploads/HDS-KREXIM-50-SC.pdf>
- Anton, F.A.; Ariz, M. & Alia, M. 1993. Ecotoxic effects of four herbicides (glyphosate, alachlor, chlortoluron and isoproturon) on the algae *Chlorella pyrenoidosa* Chick. *Science of the total environment*, 134:845-851.
- Araujo, L.; Sánchez, G.; Cubillán, D.; Mercado, J.; Troconis, M. & Prieto, A. 2012. Determinación de kresoxim-metil y trifloxystrobin en muestras de agua mediante microextracción con gota suspendida y cromatografía de gases-espectrometría de masa. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3:97-106.
- Arencibia-Carballo, G., Tizol-Correa, R.A. & Rodríguez, R.O. 2010. Toxicidad de nauplios de *Artemia franciscana* a dos piretroides de uso comercial. *Revista cubana de investigaciones pesqueras*, 27:47-53.
- Authman, M.; Zaki, M.; Khallaf, E. & Abbas, H. 2015. Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. *Journal of Aquaculture Research & Development*,

- 6:1-13.
- Bajguz, A. 2011. Suppression of *Chlorella vulgaris* growth by cadmium, lead, and copper stress and its restoration by endogenous brassinolide. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 60:406-416.
- Bartlett, D. W.; Clough, J. M.; Godwin, J.R.; Hall, A.A.; Hamer, M. & Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. Pest management science, 58:649-662.
- Baser, S.; Erkoc, F.; Selvi, M. & Kocak, O. 2003. Investigation of acute toxicity of permethrin on guppies *Poecilia reticulata* Chemosphere, 51:469-474.
- B A S F . 2 0 0 9 . *Kresoxim methyl*. <http://www.cdms.net/ldat/mp2QN010.pdf>.
- Brethead, S.; Toutant, J. & Saglio, P. 2000. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 47:117-124.
- Bueno, A.F. & Freitas, S. 2004. Effect of the insecticides abamectin and lufenuron on eggs and larvae of *Chrysoperla externa* under laboratory conditions. BioControl, 49:277-283.
- Capeagro. 2016. Hoja de seguridad fungicida epoxstrobin (Pyraclostrobin 13.3% + Epoxiconazole 5%). Capeagro 2016 - <https://static1.squarespace.com/static/5754b4074c2f85bf961d54d2/t/57f69b35e4fcb593852b90a0/1475779382861/KREMEX+500+WG+FICHA+TECNICA.pdf>
- Carvalho, G.A.; Carvalho, C. F.; Souza, B. & Ulhoa, J. L. R. 2002. Selectividade de insecticidas a *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). Neotropical Entomology, 31:615-621.
- Castillo, G. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas, Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Mexico. Ed. Mexico: IMT.
- Cui, F., Chai, T.; Liu, X. & Wang, C. 2017. Toxicity of three strobilurins (kresoxim methyl, pyraclostrobin and trifloxystrobin) on *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry, 36:182-189.
- De Liñan, C. 2000. Vademécum de productos fitosanitarios y nutricionales. 16 ed., Madrid, Ed. Agrotécnicas.
- Elías-Fernández, G.; Navarrete-Salgado, N.A.; Fernández-Guzmán, J.L. & Contreras-Rivero, G. 2006. Crecimiento, abundancia y biomasa de *Poecilia reticulata* en el lago urbano del parque Tezozomoc de la Ciudad de México. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 12:155-159.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2012a. Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.3000: Background and Special Considerations- Tests with Terrestrial Beneficial Insects, Invertebrates and Microorganisms. EPA 712-C-020. January 2012.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2012b. Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.3200: Soil microbial community toxicity test. EPA 712-C-015. January 2012.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2012c. Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.4500: Algal Toxicity. EPA 712-C-006. January 2012.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2016a. Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.1010: Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids. EPA 712-C-16-013. October 2016.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2016b. Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.1075: Freshwater and Saltwater Fish Acute Toxicity Test. EPA 712-C-16-007. October 2016.
- Fernández, F. 2000. Pesticides effects on *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). XXI International Congress of Entomology, Foz de Iguaçu, Brazil, pp. 20-26.
- Gallardo, J. 2004. Propiedades de los suelos forestales de montaña. Recursos Rurais. Serie cursos, 1:39-43.
- Godoy, M.S.; Carvalho, G.A.; Moraes, J.C.; Cosme, L.V.; Goussain, M. M.; Carvalho, C. F. & Morais, A. A. 2004. Seletividade de seis inseticidas utilizados en citros a pupas e adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). Neotropical Entomology, 33:359-364.
- Gómez-Manrique, W. & Gonçalves, J. 2008. Toxicidad aguda y riesgo ambiental del fipronil para guppy (*Poecilia reticulata*). The Biologist (Lima), 6:85-93.

- González-Pérez, Y. & Aportela-Gilling, P. 2001. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. Anuario Toxicología, 1:104-108.
- González, L. & Lozano, L. 2004. Bioindicadores como herramienta de evaluación de la calidad ambiental en la parte alta de la microcuenca Las Delicias. Umbral Científico, 5:73-82.
- Granados, Y. Díaz, M. & Ronco, A. 2004. *Bioensayo de toxicidad aguda con Daphnia magna en: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Castillo, G. (Ed.). México IMTA, Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Primera edición, pp. 52-63.
- Guilhermino, L.; Diamantino, T.; Silva, M. & Soares, A. 2000. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity?. Ecotoxicology and Environmental Safety, 46:357-362.
- Hellawell, J.M. 1986. *Biological Indicators of Freshwater Pollution and environment Management*. Elsevier, New York.
- Iannacone, J. & Alvaríño, L. 1998. Ecotoxicidad aguda del zinc sobre el "guppy" *Poecilia reticulata*. Wiñay Yachay, 2:67-74.
- Iannacone, J. & Gutierrez, A. 1999. Ecotoxicity of agrochemicals lindane and chlorpyrifos on the nematode *Panagrellus*, the microalgae *Chlorella* and the *Allium* test. Agricultura Técnica (Chile), 59:85-95.
- Iannacone, J. & Lamas, G. 2002. Efecto de dos extractos botánicos y de un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica), 65:92-101.
- Iannacone, J.; Onofre, R. & Huanqui, O. 2007. Efectos ecotoxicológicos del cartap sobre *Poecilia reticulata* "guppy" (Poeciliidae) y *Paracheirodon innesi* "neon tetra" (Characidae). Gayana, 71:170-177.
- Iannacone, J.; Alvaríño, L.; Riestra, V.; Ymaña, B.; Argota, G.; Fimia, R. & Castañeda, L. 2016. Toxicidad de agentes antiparasitarios, antimicrobianos e insecticidas sobre larvas del camarón salino *Artemia franciscana* (Crustacea: Artemiidae). Revista de toxicología, 33:31-38.
- Jaramillo, C.; Beatriz, E.; Martelo, I. & Duarte, E. 2013. Toxicidad aguda de pesticidas organofosforados y análisis de la relación cuantitativa de estructura actividad (QSAR). Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, 11: 76-84.
- Jonsson, C. M.; Paraiba, L.C. & Mendoza, M.T. 2001. Bioconcentration of the insecticide pyridaphenthion by the green algae *Chlorella saccharophila*. Chemosphere, 43:321-325.
- Kreutz, L.C.; Barcellos, L.J.G.; Silva, T.O.; Anziliero, D.; Martins, D.; Lorensen, M. & Silva, L.B.D. 2008. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. Ciência Rural, 38:1050-1055.
- Li, D.; Xie, P. & Zhang, X. 2008. Changes in plasma thyroid hormones and cortisol levels in crucian carp (*Carassius auratus*) exposed to the extracted microcystins. Chemosphere, 74:13-18.
- Lizarazo, M. 2005. Grupos funcionales de microorganismos del suelo: ciclos del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre. Suelos Ecuatoriales, 35:59-65.
- Macnaughton, S.J.; Stephen, J.R.; Venosa, A.D.; Davis, G.A.; Chang, Y.J. & White, D.C. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. Applied Environmental Microbiology, 65:3566-3574.
- Martínez, F. 2008. *Ensayo de toxicidad aguda con cladóceros de la familia Daphnidae. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo*. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). pp 99-115.
- Meffe, G. & Snelson, F. 1989. *Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae)*. Prentice Hall, Nueva Jersey, EEUU. 453 p.
- Mizell, R.F. & Schiffhauer, D.E. 1990. Effects of pesticides on pecan aphid predators *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera: Chrysopidae), *Hippodamia convergens*, *Cycloneda sanguinea* (L.), *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae), and *Aphelinus perpallidus* (Hymenoptera: Encyrtidae). Journal of economic Entomology, 83:1806-1812.
- Morales, Z.M. 1996. *Aquaguía*. Revista

- especializada en acuariofilia y otras mascotas. Naucalpan, México.
- Mukerjee, M. 1997. Trends in Animal Research. Scientific American, 276:86-93.
- Napan, K.; Llanos, C. & Paredes, C. 2010. Toxicidad aguda de metomilo en *Poecilia latipinna* (Lesueur 1821) (Poeciliidae). The Biologist (Lima), 8:21-28.
- Nieto, P. & García, D. 2010. Bacterias diazotroficas y solubilizadoras de fósforo aisladas de las especies forestales altoandinas colombianas *Weinmannia tomentosa* y *Escallonia myrtilloides*. Revista Intropica, 5:63-76.
- NM (Norma Mexicana). 2010. *Análisis de agua-evaluación de toxicidad aguda con Daphnia magna, Straus (Crustacea - Cladocera) - Método de prueba* (Cancela a la NMX-AA-087-SCFI -1995). NMX-AA-087-SCFI-2010. Secretaría de Economía.
- Núñez, E.Z. 1988. Chrysopidae (Neuroptera) del Perú y sus especies más comunes. Revista Peruana de Entomología, 31:69-75.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) 1992. *Test No. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test*. OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070103-en>OECD.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) 2000. *Test No. 217: Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test*. OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070240-en>
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) 2008. *Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test*. OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070127-en>
- Olazo, E.V.G. 1987. Lo neuropteros asociados con los cultivos cítricos de la provincia de Tucuman y descripción de una nueva especie de *Nemerobius* (Hemerobiidae). CIRPON (Centro de Investigaciones para la Regulación de Poblaciones de Organismos Nocivos), Revista Investigación, 5:37-54.
- Parma de Croux, M.; Loteste, A. & Campana, M. 2002. Toxicidad aguda del piretroide ciperpermetrina en *Poecilia reticulata* y *Cnesterodon decemmaculatus* (pisces, Poeciliidae) Revista Revista FABICIB - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, 6:69-74.
- Persoon, G.; Baudo, R.; Cotman, M.; Blaise, C.; Thompson, K.; Moreira-Santos, M.; Vollat, B.; Törökne, A. & Han, T. 2009. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test – Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems, 393:1-29.
- Resolución Directoral 0064-2014-MINAGRI-SENASA-DIAIA.
- Riva J, M.; López Ribas, D. & Fabián-Mumbrú, L. 1998. Toxicidad de plaguicidas organofosforados en microalgas acuáticas. Boletín Intexter (UPC), 113:25-29.
- Romero, D.; Martínez-López, E.; Hernández-García, A. & García-Fernández, A.J. 2006. Valoración de las alteraciones provocadas por diferentes agentes tóxicos sobre *Daphnia magna* a través de un ensayo "on line". Revista de Toxicología, 23:113-117.
- Royero, R. 1993. *Peces Ornamentales de Venezuela*. Cuadernos Lagoven. Editorial Arte, S.A. 105 pp.
- Sáenz, M.E. & Di Marzio, W. 2009. Ecotoxicidad del herbicida Glifosato sobre cuatro algas clorófitas dulceacuícolas. Limnetica, 28:149-158.
- Sancho, E.; Villarroel, M.J. & Ferrando M.D. 2016. Assessment of chronic effects of tebuconazole on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna* after different exposure times. Ecotoxicology and Environmental Safety, 124:10-17.
- Sarikaya, R.; Selvi, M.; Koçak, O. & Erkoç, F. 2007. Investigation of acute toxicity of fenitrothion on guppies *Poecilia reticulata*. Journal of Applied Toxicology, 27:318-321.
- Schumuck, R. 1997. Effects of Euparen® M on honey bees and selected beneficial arthropods-Information about the use of the pesticide during blossom and in IPM cultures. Pflanzen- Nachrichten Bayer, 50:233-246.
- Shaw, J.; Pfrender, M.; Eads, B.; Klaper, R.; Callaghan, A.; Sibly, R.; Colson, I.; Jansen, B.; Gilbert, D. & Colbourne, J. 2008. *Daphnia* as an emerging model for

- toxicological genomics. *Advances in Experimental Biology*, 2:1872-2423.
- Torres, M.A.; Barros, M.P.; Campos, S.C.G.; Pinto, E.; Rajamani, S.; Sayre, R.T. & Colepicolo, P. 2008. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71:1-15.
- Tyagi, V.; Chopra, A.; Durgapal, N. & Kumar, A. 2007. Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of Toxicity and Treatment efficacy of Municipal Sewage Treatment Plant. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 11:61-67.
- Vázquez, T.; Maldonado, C.; Marañón, S. & Espina, S. 2005. Estrés producido por concentraciones terapéuticas de sulfato de cobre en *Carassius auratus* (Pisces, Cyprinidae). *Hidrobiológica*, 15:35-42.
- Wainwright, M. & Pugh, G.J.F. 1973. The effect of three fungicides on nitrification and ammonification in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 5:577-584.
- Warming, T.P.; Mulderij, G. & Christoffersen, K.S. 2009. Clonal variation in physiological responses of *Daphnia magna* to the strobilurin fungicide azoxystrobin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28:374-380.
- Yeomans, J.C. & Bremner, J.M. 1985. Denitrification in soil: effects of insecticides and fungicides. *Soil Biology and Biochemistry*, 17:453-456.

Received December 28, 2017.
Accepted May 30, 2018.