

35
2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

DESARROLLO DE UN BIOENSAYO ESTATICO
PARA EVALUAR LA TOXICIDAD RELATIVA DEL
HERBICIDA PARAQUAT SOBRE LA ESPECIE:

Oreochromis honorum.

TESIS PROFESIONAL
QUE PRESENTA
AIDA ZAPATA CRUZ
PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MAYO - 1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

| | Pag. |
|--|------|
| I INTRODUCCION | 1 |
| - Malezas Acuáticas | |
| - Herbicidas y antecedentes | |
| - Clasificación de los herbicidas | |
| - Antecedentes del Paraquat | |
| - Modo de acción | |
| - Mecanismo de acción | |
| - Toxicidad | |
| - Ensayos biológicos | |
| II AREA DE TRABAJO | 1 |
| III JUSTIFICACION | 18 |
| IV OBJETIVOS | 19 |
| V MATERIAL Y METODOS | 19 |
| A) Requerimientos previos | |
| Abastecimiento de Agua | |
| Preparación del tóxico | |
| Selección de las concentraciones del tóxico | |
| Cámaras de Prueba | |
| Organismos Prueba | |
| Aclimatación | |
| B) Prueba de Bioensayos | |
| Prueba Exploratoria | |
| Prueba formal | |
| VI DESCRIPCION DE RESULTADOS | 33 |
| Cuadros | |
| Gráficas | |
| Cálculo de las Concentraciones letales medias (CL50) | |
| (Método Litchfield-Wilcoxon) | |
| Análisis y Discusión de Resultados | |

| | Pag. |
|---|------|
| VII CONCLUSIONES | 51 |
| VIII ANEXOS | 54 |
| 1.- Términos Generales | |
| 2.- Técnica de análisis de Paraquat por el método Espectrofotométrico | |
| 3.- Tabla de selección de Concentraciones Experimentales | |
| 4.- Mojarra-tilapia <u>Oreochromis hornorum</u> | |
| 5.- Método abreviado de Litchfield-Wilcoxon | |
| IX BIBLIOGRAFIA | 78 |

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de la Comisión de Aguas del Valle de México, bajo la dirección del - Biól. Guillermo Díaz Zavaleta, Jefe del Departamento de Control de Malezas Acuáticas del CIECCA.

El objetivo de éste fué determinar por la técnica de bioen sayos la toxicidad (CL_{50}) del Herbicida Paraquat sobre la especie Oreochromis hornorum. Las CL_{50s} encontradas en un lapso de 96 horas fueron:

$24CL_{50} = 31$ mg/l, $48 CL_{50} = 24.5$ mg/l y $96CL_{50} = 16.5$ mg/l de Paraquat. Encontrándose según la clasificación de los tóxicos- de acuerdo a su grado de toxicidad (SARH, 1980), que el producto es tóxico, ya que las CL_{50s} se encuentran entre 13.5 y 36 -- mg/l de Paraquat.

Se puede considerar que niveles menores a un plazo mayor - de exposición exista la posibilidad de que se presente una toxicidad crónica. Para lo cual se recomienda someter a los organismos a prueba de bioensayo con mayor tiempo de exposición.

I INTRODUCCION

Los problemas de proliferación de plantas nocivas acuáticas mejor conocidas como infestaciones de malezas acuáticas, son de bastante consideración en varios cuerpos de aguas del país y en muchas obras hidráulicas como presas, canales y drenes de riego. Estas plantas nocivas invaden los habitats acuáticos que el hombre utiliza para riego, transporte, recreación, agua potable y otros fines, (Nat. Acad. of Science, 1980), provocando rupturas en el equilibrio ecológico de lagos y embalses artificiales, que por lo general, se manifiestan en una disminución de la productividad pesquera, en pérdidas de volúmenes considerables de agua por efecto de la evapotranspiración y en la creación de habitats favorables para el desarrollo de insectos vectores de enfermedades; también el impedimento a la navegación de pequeñas embarcaciones, la disminución en la capacidad de las obras de riego, la obstrucción en las plantas hidroeléctricas y el acortamiento de la vida útil de los embalses por azolves de materia orgánica (ICI, 1987, Guadiana y Saldaña, 1976).

MALEZAS ACUATICAS

Se denominan malezas acuáticas, aquellas plantas que obstaculizan la utilización de los recursos hidráulicos, y se imponen en forma adversa al bienestar humano. Se pueden clasificar en: a) malezas emergentes, b) malezas flotantes y

c) malezas sumergidas. Existiendo en estado dinámico, de forma que cuando se eliminan algunas, otras pueden establecerse, -- (Mitchel, 1979).

De acuerdo al Inventario Nacional de Malezas Acuáticas y su distribución, (SARH, 1981) las malezas acuáticas detectadas en México son:

| | | |
|--------------------|-----------------|------------------------------------|
| Malezas Flotantes | Lirio Acuático | <u>Eichhornia crassipes</u> |
| | Lenteja | <u>Lemna spp</u> |
| | Lchuga | <u>Pistia spp</u> |
| | Helecho | <u>Salvinia spp</u> |
| Malezas Sumergidas | Pasilla | <u>Ruppia spp</u> |
| | Cola de Caballo | <u>Potamogeton spp</u> |
| | Elodea | <u>Elodea spp</u> |
| | Hidrilla | <u>Hydrilla spp</u> |
| | Cola de Zorro | <u>Ceratophyllum sp</u> |
| Malezas Emergentes | Trapa | <u>Trapa sp</u> |
| | Loto | <u>Nelumbo spp</u> |
| | Ninga | <u>Nimphae spp</u> |
| | Tule | <u>Thypha spp</u> |
| | Aligator | <u>Alternanthera spp</u> |
| | Junco | <u>Juncus spp</u> |
| | Carrizo | <u>Paspalum sp y Phragmites sp</u> |
| | Chilillo | <u>Polygonum sp</u> |

El total de superficie aproximada cubierta por malezas acuáticas en la República Mexicana sumando la infestación - en presas, canales, drenes, lagunas, pantanos, ríos y arroyos asciende a 114.862 has. siendo las lagunas las más infestadas con (68%), seguidas de presas (17%), zonas pantanosas (12%), canales (3%) y ríos (0.05%).

De las 114.862 has. infestadas corresponde a Eichhornia crassipes (lirio acuático) el 35.05%, Ruppia spp (pasilla) 29.93% y Thypha sp (tule) el 22.67%, el resto de las especies comprende porcentajes menores al 6% cada una, (Olvera, 1984).

El Lirio Acuático y el Tule son las malezas que se encuentran más uniformemente distribuidas en el territorio nacional, por lo que son de mayor interés en virtud de su mayor distribución.

Los métodos para combatir las plantas nocivas se clasifican en: Biológicos, Químicos y Mecánicos. Los métodos Biológicos emplean enemigos naturales de las plantas nocivas, tales como insectos, organismos depredadores y enfermedades de las plantas. Los métodos Químicos incluyen el uso de agentes químicos orgánicos e inorgánicos llamados herbicidas, rociados en el follaje, aplicados en el tallo, para la lucha selectiva y no selectiva contra las plantas nocivas. Los métodos Mecánicos incluyen una extracción manual o el uso de máquinas cosechadoras. (Nat. Acad. of Science, 1989, Guadiana y Saldaña 1976).

HERBICIDAS USOS Y ANTECEDENTES:

Un herbicida es una sustancia química empleada para matar o inhibir el crecimiento de las plantas. Como los plaguicidas rara vez se aplican en forma pura, lo más frecuente es

emplearlos convenientemente formulados. Formular significa - acondicionar un plaguicida para su uso agregándole sustancias coadyuvantes que faciliten su dispersión en un vehículo por - ejemplo agua. (Sceglgio, 1976).

Debido a que el ambiente acuático es fluido, los herbicidas no siempre quedan en un lugar. Se han hecho intentos para resolver este problema mediante el uso de formulaciones y técnicas de aplicación especiales, pero la acción química exige la solubilidad del herbicida. Si el herbicida es soluble, la movilidad es un problema en los ambientes acuáticos; ésto es, pues, una diferencia esencial entre el control de plantas no civas en tierra y en el agua, (Nat. Acad. of Science, 1980).

Los intentos por combatir plantas nocivas acuáticas con el empleo de agentes químicos comenzaron, en Estados Unidos, - antes del año de 1900. La primera investigación de la que se tiene constancia fué una labor para encontrar un medio químico para la eliminación de algas planctónicas de los abastecimientos de agua para el consumo doméstico. En 1896, se encontró que el sulfato de cobre aplicado a razón de una fracción de una parte por millón exterminaba la mayoría de las especies de algas verdiazules. Al mismo tiempo se hicieron investigaciones acerca de la toxicidad del sulfato de cobre y otros compuestos metálicos para los peces y los animales invertebrados. Estudios recientes reportan que el sulfato de cobre es - altamente tóxico, ya que inhibe la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa en carpas (Ciprinus carpio). (Nemcsók et-

al, 1984). En 1902 se combatió el lirio acuático con arsenato de sodio técnica que fué abandonada por su alta toxicidad. Después de la Segunda Guerra Mundial, se empezó a utilizar como herbicida acuático el 2,4-D. Este compuesto era relativamente no tóxico para los peces, la fauna acuática invertebrada y los animales de sangre caliente, y abrió la puerta para la creación de otros herbicidas acuáticos orgánicos, (Nat. Acad. of Sciences, 1980). La toxicidad del herbicida básico 2,4-D y sus sales aminas es menor para los organismos que para las plantas, pero -- formulaciones ester son más tóxicos y pueden matar a los peces, (Chacko y Gummer, 1980).

El control de las plantas nocivas acuáticas con herbicidas es más fácil, más rápido y, en general, tiene mayor duración, y a menudo es menos caro que el control mecánico. En general, -- las plantas tratadas mueren en el lugar donde se encuentran y van extinguiéndose poco a poco.

Algunos de los herbicidas acuáticos comerciales son considerados no tóxicos a los peces dentro de un ámbito de seguridad, pero si por alguna razón se rebasara la concentración límite puede presentarse inevitablemente mortandad de peces.

Escobar (1981) determina que la aplicación de los herbicidas acuáticos puede afectar a los peces en las formas siguientes:

- 1.- Toxicidad directa.
- 2.- Alteración, en alguna forma, de su ciclo reproductivo.
- 3.- Abatimiento del oxígeno disuelto causado por la descomposición de las plantas muertas.
- 4.- La muerte de las algas planctónicas que sirven de alimento a los peces.

Se considera que algunas plantas acuáticas son parte esencial del ambiente de los peces ya que sirven de abrigo y soporte a organismos que forman parte de su dieta alimenticia.

Para evitar los efectos de toxicidad directa de los herbicidas sobre los peces es recomendable una selección cuidadosa del tipo y la concentración adecuada del herbicida a usar.

La aplicación de herbicidas a los medios acuáticos, con el fin de controlar las malezas, lleva consigo grandes peligros cuando las aguas son usadas con propósitos domésticos, piscícolas, conservación de la fauna acuática e irrigación de cultivos, por lo que es esencial tener toda la información de los efectos adversos de esta práctica. El uso de los herbicidas en las aguas se vuelve particularmente peligroso, ya que el agua es un vehículo activo de transporte y el herbicida puede salir del área de tratamiento a través de las corrientes y llegar a zonas donde causen estragos. La toxicid-

dad de los herbicidas puede repercutir sobre los humanos, - peces y fauna acuática en general, los animales de granja y sobre sus productos derivados como son la carne, huevos, leche y otros más. Crosby y Tucker, (1966), mencionan que -- el agua de riego usada en la agricultura puede presentar una amenaza potencial para los organismos de la cadena alimenticia a través de exposiciones crónicas de herbicidas presentes en el agua, por el uso incrementado de éstos.

Son aún desconocidos los efectos a largo plazo de la - mayoría de los herbicidas sobre los organismos vivos por lo que es un aspecto de preocupación pública tan delicado, que se deben seguir con cuidado todas las precauciones y todos- los procedimientos reguladores. (Nat. Acad. of Science, 1980 y Escobar, 1981).

Rojas (1978), cita que las condiciones de prueba, factores físicos y climatológicos del país de origen del herbicida son muy diversas o distintas a las condiciones de países tropicales o intertropicales donde por lo regular el uso de productos químicos para combatir las malezas es mayor; por- tal razón, antes de aplicar un herbicida se deben realizar- experimentos bajo las condiciones de la región donde se aplicará el producto para hacer la corrección y prevenir los -- daños.

CLASIFICACION DE LOS HERBICIDAS:

Los herbicidas se pueden clasificar de diferentes forma:

- a) En función de sus efectos sobre las plantas: clasificándose en selectivos y no selectivos. Los herbicidas selectivos - destruyen o impiden el crecimiento de las plantas nocivas- que se encuentran en contacto con otras sin dañarla hasta- un punto que no le permite rehacerse. Los herbicidas no se lectivos son productos químicos tóxicos que, cuando se les aplica, destruyen a todas las plantas, (Nat. Acad. of Science, 1980 y Scoglio, 1976).
- b) For la forma de acción.- destruyendo las plantas por contac to o por acción sistémica. Los herbicidas de contacto matan los tejidos de la planta donde cae el agente químico. Los - sistémicos se absorben ya sea por las raíces o por las par tes áreas de la planta y luego se translocan dentro del sis tema de la planta. Los herbicidas sistémicos tienen un efec to crónico que algunas veces logra resultados una semana o - un mes después del tratamiento (Rojas, 1978).

Dentro de los herbicidas usados para combatir malezas acuáti cas se encuentran los Bipiridilios, principalmente el Diquat - (sal de 6.7 dihidrodipirido (1.2-a:2' , 1'-c) pirazidinio) y - el Paraquat (sal de 1.1'-dimetil 4.4'-bipiridinio). Herbicidas de contacto que dañan con gran rapidez a los tejidos vegetales

Los Bupiridilos se distinguen por ser rápidamente absorbidos por las hojas de las plantas a destruir y por tener una acción muy rápida. Dentro de estos dos, el Paraquat se ha destacado por ser más selectivo y no ser residual (Nat. Acad. of Science, 1980).

ANTECEDENTES DEL PARAQUAT.

Paraquat miembro del grupo de los compuestos bupiridilos, fué descubierto por ICI (Imperial Chemical Industries) en su estación experimental de Jean-Lott's Hill, fué sintetizado -- en el siglo XIX, usado muchos años por químicos y bioquímicos como un indicador (por cambio de color) del potencial redox; - (Pomeroy 1977). En los cincuenta fué descubierto como un potencial y efectivo herbicida de vida corta; en México se empezó a utilizar en 1962, (ICI, 1987).

Nombre químico: Ion de -1,1 dimetil-4,4'-dipiridilo, presente como sal de dicloruro.

Nombre común: Paraquat (Gramoxone Super)

Fórmula empírica: $C_{12}H_{14}N_2(Cl_2)$

| | |
|------------------------------------|-------|
| Peso molecular: Cación de Paraquat | 186.3 |
| Dicloruro de Paraquat | 257.2 |

Aspecto: Cristales incoloros.

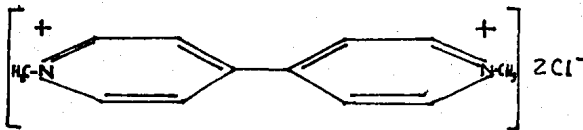
Es extremadamente soluble en agua, ligeramente soluble en los alcoholes inferiores, no soluble en los hidrocarburos. --

Se descompone a más de 300°C. Es No Volátil; estable en condiciones ácidas o neutrales, pero se hidroliza en condiciones -- alcalinas. Formulado para su uso como herbicida, es una solución acuosa que contiene 200 g/litro del catión Paraquat, agentes - humectantes, colorante azul/verde, un olor distintivo y un emé tico, (ICI 1987 y Ashton and Crafts, 1981).

La constitución química de este producto es la de "catiónes" y se presenta en forma de sales, como bromuro y cloruros; estas sales son muy solubles en agua y como comercialmente se emplean sus soluciones, que son muy corrosivas sobre metales, - se requiere la incorporación de inhibidores de corrosión en - la formulación. Para evitar daños mayores derivados de su apli cación. Las sales de Paraquat son poderosos electrolitos que - se disocian de modo notable en solución acuosa. pudiendo ser - reducidos, dando color púrpura, pero una simple agitación los reoxida; esta facilidad de oxidación-reducción desempeña un -- gran papel en su forma de actuar, y se opina que actúan sobre la fotosíntesis al bloquear o inhibir los mecanismos de oxida ción-reducción inherentes a ella (Barbera, 1976).

Los bipiridilos se distinguen por ser rápidamente absorbi dos por las hojas de las plantas a destruir y por tener una -- acción muy rápida; pero para su efectividad precisan de la luz y el oxígeno, esto indica, que depende de ellos la reducción - del herbicida durante la fotosíntesis a un radical libre el -- cual se reoxida rápidamente con el oxígeno, proporcionando el-

carácter herbicida (Baldwin, 1963). Por eso su acción es más efectiva y rápida en días soleados que en los muy nublados.- En el suelo, estos derivados no ejercen acción alguna; su -- carácter catiónico hace que sean fuertemente fijados por los puntos ácidos de arcillas y materia orgánica, y su separación de ellos se hace muy difícil requiriendo tratamientos -- enérgicos. También los absorben resinas permutadoras de ca-- tiones, propiedad que permite su separación de la materia ve-- getal durante los análisis, (Faust 1972).



MODC DE ACCION.- El Paraquat es un herbicida de contacto que daña con gran rapidez a los tejidos vegetales (Nat. Acad. of Science, 1980). Desecante no selectivo para el control de -- todas las plantas de hoja angosta y ancha, sean anuales y -- perennes y sin efecto residual.

Los tejidos vegetales quedan saturados de agua debido a la desintegración de las membranas celulares y el citoplasma, conduciendo el colapso de la estructura celular y a la desecación consecuente de los tejidos verdes, (ICI, 1987); pero su efectividad precisa luz; en la obscuridad estos productos no se translocan, pero expuestos a la luz ejercen una acción total sobre las plantas aunque solo se hubiese tratado parte de ella; por eso su acción es más efectiva y rápida en días soleados que en los muy nublados (Rojas, 1978 y Baldwin, 1963).

No es transportado de la raíz al tallo, pero si lo es -- cuando se aplica a la hoja; determina una rápida desecación -- del follaje, (Ashton and Crafts, 1981).

MECANISMO DE ACCION.- Su acción fitotóxica básica consiste en interrumpir el flujo de electrones en la fotosíntesis bloquean do el proceso; o inhibiendo los mecanismos de oxidación-reduc ción (Rojas, 1978). El agente activo es en realidad un peróxi do liberado durante la reoxidación de los radicales libres de Paraquat por electrones libres procedentes del cloroplasto --

(ICI, 1987). Las hojas absorben con rapidez el Paraquat, - esta rapidez es tal que la lluvia que cae poco después del rociado casi nunca disminuye los daños a la planta. No se sabe si este herbicida es metabolizado dentro de la planta; sin embargo, en la superficie de la planta (y en solución), la radiación ultravioleta desintegra fotoquímicamente el - Paraquat, en el suelo puede degradarse por microorganismos varios. Después de una aplicación para controlar malezas - acuáticas la concentración de Paraquat en el agua baja rápidamente y después de pocos días, generalmente no se puede detectar. Esto es debido principalmente a la adsorción rápida de la materia vegetal y al suelo, mientras que una -- parte del Paraquat se descompone fotoquímicamente (ICI, - 1987).

TOXICIDAD.- El Paraquat presenta diversos usos, entre los que destacan en la agricultura, Needham et al, (1979), han llevado a cabo estudios donde analizan las concentraciones de Paraquat en cultivos de Marihuana (Cannabis sativa) cuyo -- uso del herbicida ha sido el de controlar el cultivo y erradicarlo. La marihuana confiscada por la Drug Enforcement - Agenci (DEA) después de octubre de 1976, tiene un contenido de Paraquat entre 2 y 200 ppm. Y principalmente para combatir malezas acuáticas por su efecto rápido y sin residuos.- Estudios recientes indicaron que el Diquat y el Paraquat es usado en Florida (EUA) para el control de malezas en cultivos de cítricos, tomates y para controlar la vegetación en-

lagos y estanques (Wojeck et al, 1983).

Estudios realizados han demostrado que el Paraquat es tóxico a diferentes concentraciones y exposiciones: La principal amenaza para una persona que ha ingerido Paraquat concentrado es el efecto del químico sobre los pulmones. Trabajos experimentales indican que la entrada del Paraquat al pulmón, tiende primeramente a un mecanismo de acumulación activo que depende de la energía donde las concentraciones en el pulmón puede exceder a los niveles del plasma, esto es, produce una fibrosis pulmonar lo cual causa la muerte por un ataque al sistema respiratorio (Cavalli citado en Pomeroy, 1977). Ha sido reportado que el Paraquat ha causado 222 muertes en el mundo entre el período de 1964 y 1973 (96 accidentes, 109 suicidios y 27 en circunstancias desconocidas), (Wojeck et al, 1983)

No es volátil el Paraquat, pero cuando es inhalado produce hemorragia nasal, causada por la irritación de las membranas nasales. Existen informes en la literatura médica de daño o muerte que resultan de la exposición a Paraquat durante su aspersión. Estos casos han resultado de un mal uso del producto, causando daño a la piel y si persisten puede permitir la entrada por la piel de cantidades nocivas, (ICI, 1987, De la Jara, 1985).

Experimentos con ratas dieron los siguientes efectos: - respiración angustiosa, posición encorvada, letargia, pérdida de peso, sangrado alrededor de la nariz y diarrea. El examen después de la muerte revelo daño gastrointestinal y de los pulmones y en conejos afección respiratoria, hemorragia del pene y ano, temblores e incluso la muerte (Sharpe, - 1986).

Recientemente se ha propuesto la concentración de 0.01 ppm en peso de organismo, como límite permisible para aguas potables en el uso de Paraquat y Diquat en el control de malezas acuáticas (Brackburn, citado en Mitchel, 1979).

El Paraquat ha recibido una considerable atención mundial como herbicida acuático, trabajos de investigación han demostrado pequeñas diferencias sobre sus mecanismos de acción con el Diquat, sin embargo, el Paraquat es más efectivo en las plantas emergentes. En los Estados Unidos de America aún no tiene registro legal para su uso, aunque en muchas parte del mundo se utiliza para control de malezas (Coats, et al, 1966).

La toxicidad aguda del Paraquat en peces varía en cada especie, estas variaciones van desde 2.1 hasta 140 ppm en peso de organismo en un periodo de 96 horas. En Daphnia magna la CI_{50} (Concentración media de Inmovilización) expuesta en Paraquat (PQ^{++}) es de 11.0 mg/l con límite de confianza-

de 9.1 - 12.2, (Crosby y Tucker, 1966).

La legislación de los Estados Unidos Americanos prohíbe el uso del Paraquat en aguas potables, y el agua tratada no debe ser tomada por el humano.

ENSAYOS BIOLÓGICOS.- Para evaluar el peligro de algún contaminante presente en los cuerpos de agua, se han realizado pruebas de laboratorio de toxicología. Una de las técnicas más empleada para realizar las pruebas de toxicidad de los herbicidas, es la determinación de la CONCENTRACION LETAL MEDIA (CL_{50}), o también conocida como DOSIS LETAL MEDIA (DL_{50}), (Maciorowski, et al., 1980).

Uno de los métodos para determinar la toxicidad de cualquier material sobre organismos, es el de someter ejemplares a prueba a distintas variaciones en tiempos y diluciones del material dado. El agua y el alimento se consideran entre los vectores más importantes para la entrada de sustancias tóxicas a los organismos acuáticos (Williams and Giesey, 1978). Estas sustancias pueden encontrarse en los sistemas acuáticos en concentraciones que, puedan ejercer efectos letales, subletales y en el último caso solamente bajo condiciones crónicas pueden ejercer daños acumulándose en los tejidos (Cunningham y Tripp, 1975) en diferentes proporciones. Rose y Smith citados en Pomeroy (1977) investigaron la distribución del --

PQ⁺⁺ en tejidos de ratas después de darles una dosis de 680 μ moles/kg. peso corporal. La concentración en el plasma permaneció constante durante las 30 hrs. después de la ingestión mientras que en el pulmón se incrementó hasta 6 ó 7 veces, también se detectó PQ⁺⁺ en riñón, músculo y cerebro e hígado.

Desde hace 20 años aproximadamente, estos ensayos biológicos se han venido modificando en cuanto a su utilidad terminología y diseño experimental, (Spraje, 1970). En los trabajos de toxicología ha sido importante evaluar no solo los efectos letales sino también los subletales, de tal forma que los organismos no se vean dañados en lo que se refiere a su crecimiento, fecundidad, procesos fisiológicos y bioquímicos y en la supresión de inmuno respuestas (Mickin and Benoit, 1970 y Maciorowski, et al 1980).

Para ello fué necesario contar con un bioensayo diseñado bajo ciertos lineamientos básicos, con el fin de obtener datos confiables (EPA, 1975 y 1978), ya que este tipo de información servirá como criterio para establecer una reglamentación para la protección de la vida de los organismos.

La American Public Health Association (APHA) en su publicación "Standar Methods, 1980" tiene un capítulo dedicado a los lineamientos de bioensayos y establece la siguiente terminología (anexo 1).

II AREA DE TRABAJO

Por sus características el presente ensayo experimental se desarrolló en el Laboratorio perteneciente a la Comisión de Aguas del Valle de México, Organismo que depende de la -- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, donde se otorgó la infraestructura necesaria para el desarrollo de -- este trabajo.

III JUSTIFICACION

La toxicidad de los compuestos orgánicos o agentes contaminantes no puede ser determinada por medios químicos por lo que la detección y evaluación de ésta debe ser llevada mediante trabajos de Bioensayos bajo condiciones experimentales apropiadas. Por lo anterior el uso del herbicida Paraquat como agente de control de malezas acuáticas, requiere de un diseño experimental que permita establecer un rango permisible de -- toxicidad de manera que no afecte la vida acuática del sistema.

IV OBJETIVOS

- Diseñar experimentalmente un bioensayo estático a corto plazo para evaluar la toxicidad relativa del herbicida Paraquat.
- Evaluar la Concentración Letal Media (CL_{50}) del herbicida Paraquat sobre la especie Oreochromis hornorum.
- Describir el comportamiento de los organismos durante la prueba del bioensayo.

V MATERIAL Y METODOS

Se llevó a cabo un bioensayo estático sin renovación ya que de esta manera se pretendió simular las condiciones naturales de la actividad o cambio activo del herbicida en el agua.

I REQUERIMIENTOS PREVIOS

(A) ABASTECIMIENTO DE AGUA:

El agua requerida para la aclimatación y la realización de las pruebas se obtuvo del agua de abastecimiento del Laboratorio (agua de la llave) la cual se decloró con - Tiosulfato de Sodio (10%). El mejor criterio para determinar si es aceptable la calidad del agua es que permita la sobrevivencia y crecimiento de los organismos. -- Por lo cual se consideraron importantes los siguientes parámetros (Morales, 1988).

Temperatura: Es un factor ambiental crítico en la vida de los peces por lo que para la especie que se manejó - se considera un rango de 12 - 42°C, siendo el óptimo de 29°C.

Oxígeno Disuelto. Se recomiendan niveles mínimos de 3-5 mg/l para aquellos de zonas tropicales, aunque hay registros de tolerancia de 1.0 ppm.

pH: Los peces toleran valores de 5-9.

Alcalinidad: de 20-300 mg/l.

Dureza: de 135 - 300 mg agua de aceptable calidad.

NH₄: No debe acumularse el NH₄, ya que puede ser tóxico para los organismos, debido al equilibrio entre los iones amonio y no ionizado (NH₃) que es tóxico para los peces.

Conductividad: 200 - 300 mhos/cm mineralización media-acentuada.

Todos estos parámetros se verificaron cada vez que se cambió el agua en los acuarios o tanques de aclimatación.

Las técnicas de análisis empleadas se basaron en la metodología del APHA, (1980).

(B) PREPARACION DEL TOXICO

Para preparar la solución prueba (tóxico) se empleo el producto "Gramoxone" fabricado por ICI de México el cual contiene 200 g/l de Paraquat en su formulación, para la solución stock se empleo únicamente como solvente agua destilada libre de contaminantes. Por medio de un análisis se verificó la concentración real de Paraquat, en el producto comercial y se ajustó a las concentraciones requeridas.

Se preparó una solución stock de 1000 mg/l de Paraquat, y la estabilidad de la concentración se determinó mediante una -- curva de calibración en spectronic 20 leído en el rango de -- 380-390 de longitud de onda. (anexo 2).

(C) SELECCION DE LAS CONCENTRACIONES DEL TOXICO:

Las concentraciones en las que se aplicó el tóxico se -- seleccionaron tomando en cuenta la escala logarítmica -- que recomienda el APHA, (1980). (anexo 3).

Se emplearon los valores de la columna 1, para las pruebas exploratorias, multiplicando o dividiendo estos valores por un factor de 10; esto dependió del tóxico y de los organismos de prueba. Una vez determinado el intervalo de concentración, los valores intermedios se obtuvieron de las columnas 2-5, utilizándose las cuatro primeras columnas.

Los valores de las cuatro primeras columnas representan el 76% de la concentración inmediata superior.

Para seleccionar los valores de la prueba exploratoria se tomó en cuenta el límite permisible de la sustancia en el agua (0.01 mg/l), (Charles, 1971 citado en INGGO, 1980) - y como concentración máxima 100 mg/l considerada por no -

reportarse bibliográficamente la CL_{50} para la especie -
Oreochromis hornorum.

(D) CAMARAS DE PRUEBA:

Las cámaras de prueba fueron 20 peceras de vidrio unidas con silicón, las dimensiones de las peceras fueron de -- 25x30x50 y 90x50x52 cms. de 4 y 6 cm. respectivamente, -- dado que el silicón puede absorber pesticidas, los cuales son difíciles de remover, se recomendó utilizar la mínima cantidad de silicón que fuere posible, (Alabaster y Abram, 1965 citados en INGGO 1980).

Todos los acuarios nuevos o usados se lavaron de la siguiente forma, para remover contaminantes de la superficie.

(a) Lavar los acuarios con detergentes libres de fosfatos, con agua caliente (50°C ó más).

(b) Enjuagar con agua caliente (50°C ó más).

(c) Enjuagar con ácido clorhídrico al 5% para remover metales pesados.

(d) Enjuagar con acetona para remover compuestos orgánicos, principalmente pesticidas.

(e) Enjuagar dos veces con agua destilada.

Cuando fué posible, el procedimiento anterior se utilizó para el equipo que tuvo contacto con el sistema de prueba. Todo el equipo y peceras se enjuagó con el agua de dilución antes de la prueba (EPA, 1978).

(E) ORGANISMOS PRUEBA:

La especie se seleccionó tomando en cuenta su importancia económica, su distribución a nivel nacional, su disponibilidad, sensibilidad y fácil manejo en el Laboratorio (cultivables). (APHA, 1980).

La prueba de bioensayo se realizó con la especie Oreochromis hornorum, debido a que su adaptación al país ha sido amplia, principalmente en las zonas de Oaxaca, Tabasco, Chiapas, Michoacán, Veracruz, Sinaloa y Morelos, en donde se registraron capturas de 89 mil toneladas en 1986, (Morales, 1988). Una descripción de la especie se puede ver en el Anexo 4, esta se obtuvo del Centro Acuícola de Zacatepec, Morelos, de la Secretaría de Pesca. El nombre de la especie se verificó por dicho Centro. El tamaño promedio no fué mayor de 6 cm. y su peso de 4 ± 0.5 g. - Los ejemplares de prueba fueron capturados directamente de los criaderos por medio de un chinchorro, con malla-

de 1", posteriormente se seleccionaron tomando en cuenta la talla y se colocaron en bolsas de plástico de 60x80 cm. calibre 300 con doble refuerzo conteniendo agua de los estanques y enriqueciéndola con oxígeno para su transportación.

Durante el transporte, al laboratorio los organismos no estuvieron sujetos a cambios de más de 3°C. La concentración de Oxígeno Disuelto se verificó al inicio del empaque de los organismos y al llegar al laboratorio después de dos horas que duró el transporte, observándose que la saturación se mantuvo.

(F) ACLIMATACION:

Al llegar al laboratorio, ya se contaba con las peceras de aclimatación y con el agua de dilución que cumplía -- con la calidad del agua requerida para los organismos -- prueba. (Ver la sección de abastecimiento de agua inciso A). El agua en la que se transportaron los organismos se cambió gradualmente, hasta que los peces quedaron en agua de dilución al 100%.

Se mantuvo a los organismos en los pecuarios de aclimatación por un período de 16 días, para detectar la presencia de enfermedades y/o conductas anormales, así como --

para evaluar la aceptabilidad de las condiciones del laboratorio.

La calidad del agua se verificó los tres primeros días a la llegada de los organismos, posteriormente se realizaron por lo menos una vez por semana, para establecer el cuadro ambiental.

No se presentaron índices de mortandad mayores del 5% por lo que significó la ausencia de enfermedades en el lote de los organismos.

Los organismos se alimentaron 2 veces al día, con alimento Fortina proporcionado por la Piscifactoría de Zacatepec Morelos, una en la mañana y otra en la tarde en pequeñas cantidades, removiendo los residuos mediante aspersión con manguera. Los peces no fueron alimentados 96 hrs. antes de iniciar la prueba, (BETTS, citado en INGGO 1980).

Durante la aclimatación se realizaron observaciones diarias sobre su conducta o anomalías y enfermedades.

Los acuarios de aclimatación estuvieron bajo aereación mediante bombas y filtros, para ayudar a mantener la calidad del agua, y compensar la sobrecarga, ya que teori

camente se recomienda que para cada litro de agua exista una carga de 1 gr. de pez. Sin embargo en los estanques de aclimatación con un volúmen de 180 litros de agua de dilución hubo una carga de 1,100 gr. de pez, es decir -- de 6.1 gr/litro de agua, sin que hubiera existido ningún efecto adverso a la aclimatación de los peces.

Se realizó una limpieza general diaria aspirando el fondo de las peceras con una manguera.

II PRUEBAS DE BIOENSAYOS

Una vez pasado el tiempo de aclimatación, los organismos prueba fueron utilizados en la prueba de bioensayo. La prueba de Bioensayo fué de tipo estático sin renovación y a corto plazo.

PRUEBA EXPLORATORIA

Se llevaron a cabo 5 tratamientos con concentraciones de Paraquat de: 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 y 100.0 mg/l (inciso C), para ello se preparó una solución stock de 1000 mg/l de - Paraquat (inciso B).

Para la obtención de las concentraciones deseadas se requirió de la utilización de agua de cierta calidad (desti

lada), la cual no alteró el comportamiento tóxico del - Paraquat. Se utilizaron 12 acuarios de las siguientes - dimensiones 25x20x50 (inciso D), los cuales se llenaron hasta un volúmen de 30 litros de agua de la llave del - laboratorio (agua de dilución), con la solución del tóxico en las concentraciones anteriormente indicadas.

Para cada concentración se utilizó un acurio y su dupli - cado, así mismo se incluyeron 2 acuarios como testigo - conteniendo solamente agua de dilución. Las soluciones - fueron agitadas con el fin de homogeneizarlas. No se -- aplicó aereación. Después de haber transcurrido 30 minu - tos, se tomó una muestra en el centro de cada acuario a una profundidad media, para comprobar la concentración - inicial del Paraquat por medio de análisis espectrofoto - métrico y los parámetros descritos en el cuadro ambiental. En este momento se introdujeron 10 peces debidamente -- aclimatados (inciso F) con un peso aproximado de 4⁺ 0.5 g y una talla de 6 cm. máximo (inciso E).

La duración de la prueba fué de 24 hrs. y durante este - período no se les alimentó, ni se llevo a cabo la renova - ción de la solución. Durante la prueba se registraron los datos para la evaluación de parámetros físico-químicos - del agua, (cuadro 2).

Los resultados obtenidos sirvieron para seleccionar el intervalo de concentración que se empleo en la prueba definitiva; se consideró la CONCENTRACION MAS ALTA -- DENTRO DE LAS CUALES NO HAYA MUERTO NINGUN ORGANISMO - O SOLAMENTE ALGUNO Y LA MAS BAJA DE LAS CUALES SE HAYAN MUERTO LA MAYORIA O TODOS.

PRUEBA FORMAL:

La selección de las 5 concentraciones que se aplicó a esta prueba dependió de los límites marcados por la prueba exploratoria, considerando que los valores intermedios fueron determinados mediante una escala logarítmica (inciso C).

Se utilizaron 12 acuarios similares a la prueba exploratoria y se les agregaron 30 litros de la solución del tóxico/agua de dilución a las concentraciones correspondientes y 2 testigos conteniendo únicamente agua de dilución.

Las soluciones se homogeneizaron mediante agitación. No se aplicó aereación. Después de haber transcurrido 30 minutos, se tomó una muestra en el centro de cada acuario a una profundidad media, para comprobar la concentración inicial y los parámetros del cuadro ambiental. En este momento se introdujeron 10 peces por acuario (previamente aclimatados a las condiciones del

laboratorio (inciso E).

La prueba duró 96 horas y durante este tiempo no se les alimentó

Los niveles de Paraquat se estimaron cada 24 horas, así mismo se registraron los parámetros señalados en la hoja de registro para la prueba formal (cuadro 3).

VALORACION DEL PARAQUAT.

Con respecto a la preparación del tóxico se tuvo que -- determinar la concentración real de Paraquat dentro del producto comercial "Gramoxone Super", para la valoración del producto, se inició utilizando la técnica de Cromatografía de intercambio catiónico que reporta Ortho Method RM-8-9, (1976), sin embargo esta técnica no se desarrolló durante todo el experimento debido a la carencia de -- material (Resina DOWEX 50 w-x8, y el equipo de filtración), necesario para el número de muestras que se iban a generar en el desarrollo del experimento, por lo anterior se procedió a realizar pruebas alternativas para la valoración del Paraquat.

Se implementaron dos técnicas espectrofotométricas: La valoración con el reactivo de Nessler (empleada para determinar NH_4), la cual produjo una coloración amarillo-

verdosa gradual a la concentración, por la formación de una interferencia, la cual reporta el Standard Methods (1980) que es producida por la presencia de aminas y anillos aromáticos.

La técnica no presentó reproducibilidad en los datos, por lo cual se tuvo que desechar.

La valoración del Paraquat, con ditionito de sodio fue una adaptación de la técnica Cromatográfica eliminando el procedimiento de concentración. La coloración gradual debido a la reacción provocada por la combinación del Paraquat con el ditionito de sodio y sobre todo la reproducibilidad de los valores permitieron establecer la técnica tentativa para valorar el tóxico en nuestras peceras experimentales (anexo 2). La sensibilidad de la técnica se encontró en el rango de 1 a 15 mg/l de Paraquat en el Spectronic 20.

DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES LETALES MEDIAS (CL₅₀)

La CL₅₀ en las diferentes concentraciones para las 24, 48 y 96 horas de exposición fueron estimadas por el método de interpolación para lo cual se gráfico el % de mortandad sobre una escala aritmética contra la concentración del herbicida en una escala logarítmica y se interpola la concentración para el 50% de mortandad (gráfica 1).

La CL_{50} obtenida de este modo es una medida directa de la toxicidad bajo las condiciones de prueba. Con la finalidad de obtener un valor que contemple límites de confianza del 95% se utilizó para los mismos datos del método Litchfield-Wilcoxon (1949) el cual se describe en el anexo 5 .

VI DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS:

La calidad del agua durante el período de adaptación se presenta en el cuadro 1, estos son promedios de nueve muestreos que comprenden un período de 26 días, tiempo que duró la aclimatación de los peces a las condiciones del laboratorio. Durante este período no se presentaron mortandades mayores del 5%, ni enfermedades en el lote de organismos experimentales.

Los análisis físico-químicos del agua durante este período indican que la temperatura, el pH y la dureza total se mantuvieron constantes, a excepción de la alcalinidad que aumentó de 78.00 a 97.7 mg/l y los cloruros de 0.64 a 13.22 mg/l.

En el cuadro 2 se presentan los resultados de los análisis físico-químicos del agua, así como la determinación del herbicida y la mortandad presentada durante la prueba exploratoria. Los valores son el promedio de los ensayos corridos simultáneamente (el acuario y su duplicado). En los análisis la temperatura, el pH, y la conductividad no presentaron cambios. La dureza total, la alcalinidad y el oxígeno disuelto presentaron variaciones que se pueden considerar sin alteración para los peces. Los cloruros y el nitrógeno amoniacal presentan un aumento conforme la concentración de Paraquat de 12.62 a 38.31 mg/l y de 0.0 a 0.236 mg/l respectivamente.

El Paraquat como se puede observar en el cuadro 2 no fue detectado en las dos primeras concentraciones (0.01 y 0.1 mg/l) y las otras presentaron variaciones con respecto a la concen--

tracción teórica.

El cuadro 3 presenta el registro de la prueba formal, en la cual se observa que el pH, la temperatura, la dureza total y la alcalinidad total no indican alteración significativa. El oxígeno disuelto presenta una disminución gradual con respecto a la concentración del Paraquat, de 12.77 a 21.36 mg/l y de 200 a 300 umhos/cm. respectivamente.

El comportamiento de los peces durante la prueba exploratoria y formal fué comparado con el registrado durante el periodo de aclimatación, así como con las peceras testigo, observándose alteraciones en el nado, pérdida de equilibrio, espasmos y muerte.

Los resultados del Bioensayo son reportados como la CL_{50} , que es la concentración del tóxico (Herbicida) diluido en agua, que causa el 50% de mortandad de los peces de prueba en un tiempo específico. En el cuadro 4 estan registrados los datos obtenidos durante la prueba formal, en el área sombreada se especifican los porcentajes de mortandad a diferentes tiempos de exposición correspondientes a las diferentes concentraciones del tóxico usados para calcular la CL_{50} . Puede observarse que a las concentraciones mayores de 48.78 mg/l - la mortandad fué del 100% a las 24 horas, y en concentraciones menores de 11.74 mg/l a las 96 horas fué del 10%.

La gráfica 1 presenta el método de interpolación para obtener la CL_{50} a 24, 48 y 96 horas, relaciona el porcentaje de mortandad y la concentración de Paraquat en mg/l.

Las gráficas 2, 3 y 4 representan los valores de las CL_{50} a las 24, 48 y 96 horas de exposición respectivamente obtenidas por el método de Litchfield-Wilcoxon puede observarse al hacer la corrección el porcentaje de organismos obsevados -- experimentalmente es similar al porcentaje de esperados, lo cual indica que el ajuste fué óptimo para esta prueba.

En el cuadro 5 se comparan las CL_{50} a diferentes tiempos de exposición por los dos métodos, puede observarse que las CL_{50} obtenidas por el método de interpolación 24 $CL_{50} = 30.1$ 48 $CL_{50} = 24.5$ y la 96 $CL_{50} = 16.7$ mg/l se encuentran dentro del rango establecido entre el límite superior y el límite inferior del método de Litchfield-Wilcoxon.

MARCO AMBIENTAL

| P E C E R A S | | | | | | |
|-------------------------------|------------------|------|------------------|------|----------------|------|
| ORGANISMOS MUERTOS | No. | % | No. | % | No. | % |
| | 8 | 1.34 | 7 | 1.17 | 5 | 0.84 |
| PARAMETROS FISICO-QUIMICOS | 1 | | 2 | | 3 | |
| | 260 ORG / 180 L. | | 260 ORG / 180 L. | | 75 ORG / 30 L. | |
| TEMPERATURA AMBIENTE (°C) | 24.0 | | 24.0 | | 23.7 | |
| TEMPERATURA AGUA (°C) | 23.0 | | 23.0 | | 22.9 | |
| PH | 7.9 | | 7.9 | | 7.6 | |
| CONDUCTIVIDAD SMMOS / CM | 230 | | 220 | | 244 | |
| DUREZA TOTAL MG / l | 72.07 | | 73.1 | | 73.7 | |
| ALCALINIDAD TOTAL MG / l | 80.0 | | 78.0 | | 97.71 | |
| NN ₅ MG / l | 5.36 | | 5.24 | | 7.79 | |
| OXIGENO DISUELTO MG / l | 8.0 | | 7.6 | | 4.9 | |
| CLORUROS MG / l | 9.64 | | 9.64 | | 13.22 | |

NOTA: LOS VALORES SON PROMEDIOS DE 9 MUESTRAS, DURANTE UN LAPSO DE 26 DIAS. (PERIODO DE ACLIMATACION.)

CUADRO I

HOJA DE REGISTRO DE BIOENSAYOS PARA LA PRUEBA EXPLORATORIA

MATERIAL QUE SE ESTA PROBANDO: PARAQUAT (1,1'DIMETIL 4,4'BIPIRIDILO)
 FUENTE DEL AGUA DE DILUCION; AGUA DE LA LLAVE DEL LABORATORIO
 ESPECIE DE PRUEBA: ~~Oreochromis mossambicus~~ LUGAR DE CAPTURA: ZACATEPEC MOR.
 NUM. DE ORGANISMOS POR CONCENTRACION: 10 PISCIFACTORIA-PESCA
 FECHA: 29-07-88 COMIENZO: 11.00 AM

| (PQ) (mg/l) | TIEMPO (hrs.) | TEMP. AMB. (°C) | TEMP. AGUA (°C) | pH | COND. (umhos/cm) | D.T. (mg/l) | A.T. (mg/l) | CLORURDS (mg/l) | NH4 (mg/l) | O.D. (mg/l) | (PQ)- (mg/l) | ORGANISMOS MUERTOS |
|----------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----|---------------------|----------------|----------------|--------------------|---------------|----------------|-----------------|-----------------------|
| TESTIGO | 0.5 | 21.0 | 22.5 | 7.8 | 200 | 88.08 | 75 | 12.82 | 0.000 | 8.0 | 0.00 | 0 |
| | 6.0 | 21.0 | 23.0 | 7.5 | 200 | 75.07 | 78 | 12.82 | 0.005 | 5.9 | 0.00 | 0 |
| | 12.0 | 21.0 | 23.0 | 7.3 | 200 | 81.08 | 79 | 12.82 | 0.013 | 5.5 | 0.00 | 0 |
| | 18.0 | 21.0 | 23.0 | 7.1 | 200 | 74.07 | 78 | 12.82 | 0.009 | 5.4 | 0.00 | 0 |
| | 24.0 | 20.5 | 19.0 | 7.1 | 200 | 73.07 | 78 | 12.82 | 0.000 | 4.4 | 0.00 | 0 |
| 0.01 | 0.5 | 21.0 | 22.5 | 7.9 | 200 | 73.07 | 77 | 12.82 | 0.000 | 8.1 | N.D. | 0 |
| | 6.0 | 21.0 | 23.0 | 7.7 | 200 | 74.07 | 79 | 12.13 | 0.004 | 5.4 | N.D. | 0 |
| | 12.0 | 21.0 | 23.0 | 7.5 | 200 | 75.07 | 78 | 12.82 | 0.014 | 5.1 | N.D. | 0 |
| | 18.0 | 21.0 | 23.0 | 7.2 | 200 | 76.07 | 76 | 12.82 | 0.019 | 5.0 | N.D. | 0 |
| | 24.0 | 20.5 | 19.0 | 7.2 | 200 | 74.07 | 76 | 12.82 | 0.000 | 4.4 | N.D. | 0 |
| 0.10 | 0.5 | 21.0 | 22.5 | 7.9 | 200 | 76.07 | 77 | 13.10 | 0.000 | 8.0 | N.D. | 0 |
| | 6.0 | 21.0 | 23.0 | 7.7 | 200 | 74.07 | 81 | 13.10 | 0.018 | 5.1 | N.D. | 0 |
| | 12.0 | 21.0 | 23.0 | 7.5 | 200 | 81.08 | 78 | 13.10 | 0.083 | 4.7 | N.D. | 0 |
| | 18.0 | 21.0 | 23.0 | 7.2 | 200 | 75.07 | 77 | 12.82 | 0.028 | 4.7 | N.D. | 0 |
| | 24.0 | 20.5 | 19.0 | 7.2 | 200 | 73.07 | 77 | 12.82 | 0.000 | 4.5 | N.D. | 0 |
| 1.00 | 0.5 | 21.0 | 22.5 | 8.0 | 200 | 77.07 | 76 | 12.82 | 0.000 | 5.9 | 0.55 | 0 |
| | 6.0 | 21.0 | 23.0 | 7.7 | 200 | 72.07 | 78 | 14.56 | 0.038 | 5.6 | 0.73 | 0 |
| | 12.0 | 21.0 | 23.0 | 7.5 | 200 | 83.08 | 77 | 14.07 | 0.060 | 4.9 | 0.70 | 0 |
| | 18.0 | 21.0 | 23.0 | 7.2 | 200 | 77.07 | 74 | 14.07 | 0.038 | 4.9 | 0.57 | 0 |
| | 24.0 | 20.5 | 19.0 | 7.3 | 200 | 77.07 | 78 | 11.85 | 0.000 | 4.4 | 0.72 | 0 |
| 10.00 | 0.5 | 21.0 | 22.5 | 8.1 | 200 | 78.43 | 76 | 15.52 | 0.000 | 5.7 | 11.35 | 0 |
| | 6.0 | 21.0 | 23.0 | 7.7 | 200 | 80.07 | 80 | 14.85 | 0.073 | 5.1 | 11.35 | 0 |
| | 12.0 | 21.0 | 23.0 | 7.5 | 200 | 84.08 | 78 | 14.49 | 0.075 | 4.8 | 11.45 | 0 |
| | 18.0 | 21.0 | 23.0 | 7.2 | 200 | 80.07 | 77 | 16.00 | 0.060 | 4.7 | 11.55 | 0 |
| | 24.0 | 20.5 | 19.0 | 7.1 | 200 | 81.08 | 79 | 14.55 | 0.000 | 4.4 | 11.29 | 0 |
| 100.00 | 0.5 | 21.0 | 22.5 | 8.0 | 275 | 80.08 | 70 | 38.31 | 0.220 | 5.4 | 116.80 | 0 |
| | 6.0 | 21.0 | 23.0 | 8.0 | 275 | 78.07 | 70 | 37.34 | 0.238 | 4.4 | 114.80 | 10 |
| | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

- :FIN DE LA PRUEBA
 COND.:CONDUCTIVIDAD
 D.T.:DUREZA TOTAL
 A.T.:ALCALINIDAD TOTAL
 NH4 :AMONIO
 (PQ) :CONCENTRACION DE PARAQUAT
 (PQ)-:CONC. REAL DE PARAQUAT
 N.D.:NO DETECTADO

OBSERVACIONES: EN LA CONCENTRACION MAS ALTA LOS PECES NADARON SIN DIRECCION,
 CON ESPASMOS Y PERDIERON EL EQUILIBRIO, MURIENDO MAS TARDE. APROXIMADAMENTE
 DESPUES DE 2 HRS. DE HABER INICIADO LA PRUEBA EXPLORATORIA.

HOJA DE REGISTRO DE BIOENSAYOS PARA LA PRUEBA FORMAL

MATERIAL QUE SE ESTA PROBADANDO: PARAQUAT (1,1'DIMETIL 4,4' BIPIRIDILO)
FUENTE DEL AGUA DE DILUCION: AGUA DE LA LLAVE DEL LABORATORIO
ESPECIE DE PRUEBA: OREOCHROMIS MOORCHANI **LUGAR DE CAPTURA: ZACATEPEC MOR.**
NO. DE ORGANISMOS POR CONCENTRACION: 10
TEMPERATURA DEL ENSAYO: AGUA: 19-20C **AMBIENTE: 19-22C**
FECHA: 9-05-88 **COMIENZO: 16:00 P.M.**

COMIENZO

| | | | | | | | | | | |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CONCENTRACION mg/l* | 10.87 | 11.74 | 17.99 | 25.55 | 32.88 | 48.78 | 86.22 | 88.16 | 113.2 | 0 |
| OXIGENO DISUELTO mg/l | 7.3 | 7.3 | 7.2 | 7.2 | 7.2 | 7 | 6.9 | 6.7 | 6.5 | 7.3 |
| pH | 7.6 | 7.6 | 7.6 | 7.5 | 7.6 | 7.6 | 7.6 | 7.7 | 7.7 | 7.5 |
| DUREZA TOTAL mg/l | 71.07 | 74.07 | 71.57 | 70.08 | 67.06 | 69.88 | 69.08 | 69.08 | 69.08 | 69.58 |
| ALCALINIDAD TOTAL mg/l | 77.5 | 76 | 77 | 76.5 | 77 | 77.5 | 81.5 | 81.5 | 85.5 | 74 |
| NH4 mg/l | 77 | 74 | 77 | 78 | 78 | 78 | 78 | 77 | 72 | 76 |
| CLORUROS mg/l | 15.42 | 16.14 | 17.58 | 19.03 | 20 | 23.37 | 26.88 | 32.04 | 38.82 | 12.77 |
| CONDUCTIVIDAD umhos/cm | 215 | 214 | 214 | 224 | 226 | 232 | 285 | 275 | 300 | 200 |

*CONCENTRACIONES PROMEDIO DURANTE LA PRUEBA FORMAL

| | | | | | | | | | | |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 24 HRS. | | | | | | | | | | |
| No. DE PECES MUERTOS | 0 | 0 | 0 | 2 | 6.5 | 10 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| OXIGENO DISUELTO mg/l | 4.8 | 5.3 | 4.8 | 4.9 | 5 | 5.4 | 5.8 | 5.7 | 7.7 | 5.2 |
| pH | 7.6 | 7.6 | 7.8 | 7.5 | 7.5 | 7.7 | 7.7 | 7.7 | 7.6 | 7.5 |
| DUREZA TOTAL mg/l | 75.07 | 66.06 | 73.08 | 67.08 | 69.08 | 64.08 | 66.08 | 73.07 | 72.07 | 72.07 |
| ALCALINIDAD TOTAL mg/l | 77 | 74 | 77 | 76 | 76 | 78 | 78 | 79 | 77 | 76 |
| NH4 mg/l | 0.11 | 0.16 | 0.22 | 0.24 | 0.29 | 0.37 | 0.3 | 0.31 | 0.4 | 0.13 |
| CLORUROS mg/l | 15.42 | 16.38 | 17.35 | 17.83 | 19.28 | 23.81 | 27.85 | 33.74 | 39.04 | 13.49 |
| CONDUCTIVIDAD umhos/cm | 205 | 210 | 215 | 225 | 225 | 240 | 250 | 275 | 300 | 200 |
| 48 HRS. | | | | | | | | | | |
| No. DE PECES MUERTOS | 0 | 0 | 1 | 5.5 | 9 | - | - | - | - | 0 |
| OXIGENO DISUELTO mg/l | 3.7 | 3.7 | 3.2 | 3.2 | 4 | - | - | - | - | 4.3 |
| pH | 7.1 | 7.1 | 7.1 | 7.1 | 7.1 | - | - | - | - | 7.1 |
| DUREZA TOTAL mg/l | 71.07 | 72.07 | 75.07 | 71.07 | 70.07 | - | - | - | - | 71.07 |
| ALCALINIDAD TOTAL mg/l | 75 | 76 | 75 | 74 | 76 | - | - | - | - | 74 |
| NH4 mg/l | 0.22 | 0.24 | 0.41 | 0.7 | 1 | - | - | - | - | 0.34 |
| CLORUROS mg/l | 15.04 | 15.83 | 18.15 | 19.42 | 21.38 | - | - | - | - | 12.13 |
| CONDUCTIVIDAD umhos/cm | 227 | 240 | 250 | 250 | 260 | - | - | - | - | 215 |
| 96 HRS. | | | | | | | | | | |
| No. DE PECES MUERTOS | 0 | 1 | 5.5 | 10 | - | - | - | - | - | 0 |
| OXIGENO DISUELTO mg/l | 3.3 | 3.1 | 1.4 | 0.4 | - | - | - | - | - | 3.6 |
| pH | 7.2 | 7.2 | 7.3 | 7.4 | - | - | - | - | - | 7.3 |
| DUREZA TOTAL mg/l | 72.07 | 70.07 | 71.07 | 68.06 | - | - | - | - | - | 69.07 |
| ALCALINIDAD TOTAL mg/l | 75 | 78 | 79 | 81 | - | - | - | - | - | 71 |
| NH4 mg/l | 0.58 | 0.49 | 0.83 | 1.29 | - | - | - | - | - | 0.6 |
| CLORUROS mg/l | 14.53 | 15.53 | 16.98 | 17.95 | - | - | - | - | - | 12.62 |
| CONDUCTIVIDAD umhos/cm | 225 | 250 | 250 | 250 | - | - | - | - | - | 205 |

OBSERVACIONES: AL SER INTRODUCIDOS LOS PECES EN LAS CONCENTRACIONES MAS ALTAS, NADARON SIN DIRECCION Y CON MOVIMIENTOS TORPES, COMO ESPASMOS Y PERDIENDO EL EQUILIBRIO. EN MENOS DE 2 Y 8 HORAS DE HABER COMENZADO LA PRUEBA MUERE LA TOTALIDAD DE LOS PECES EN LAS CONCENTRACIONES DE 113.2 Y 88.6 mg/l RESPECTIVAMENTE.

CUADRO DE MORTANDAD REGISTRADA EN LA PRUEBA FORMAL

| CONCENTRACION DEL HERBICIDA | No. DE ORGANISMOS EXPERIMENTALES EX-PUESTOS | NUMERO DE ORGANISMOS EXPERIMENTALES MUERTOS DESPUES DE : | | | | | | | |
|-----------------------------|---|--|-----|---------|----|---------|-----|---------|----|
| | | 24 Hrs. | | 48 Hrs. | | 72 Hrs. | | 96 Hrs. | |
| | | No. | % | No. | % | No. | % | No. | % |
| TESTIGO 0.00 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10.87 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11.74 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 10 |
| 17.99 | 10 | 0 | 0 | 1 | 10 | 3.8 | 38 | 5.8 | 58 |
| 25.56 | 10 | 2 | 20 | 5.8 | 58 | 10 | 100 | - | - |
| 32.88 | 10 | 6.8 | 68 | 9 | 90 | - | - | - | - |
| 48.78 | 10 | 10 | 100 | - | - | - | - | - | - |
| 66.22 | 10 | 10 | 100 | - | - | - | - | - | - |
| 88.16 | 10 | 10 | 100 | - | - | - | - | - | - |
| 113.20 | 10 | 10 | 100 | - | - | - | - | - | - |

MORTANDAD REGISTRADA EN LA PRUEBA FORMAL.

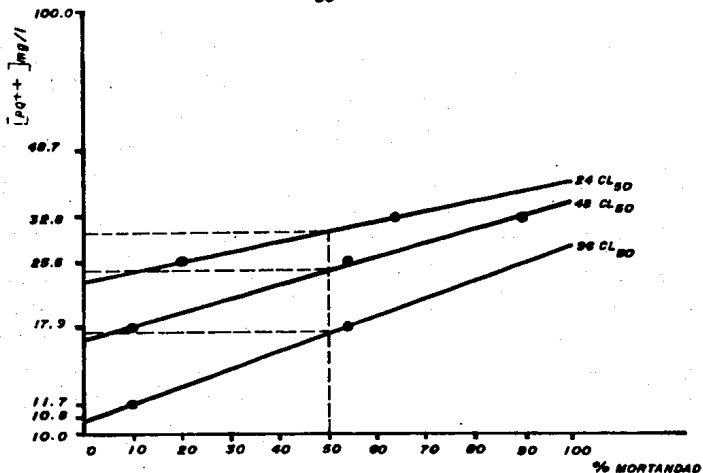
LA ZONA SOMBRREADA INDICA EL % USADO PARA DETERMINAR LA CL₅₀

CUADRO 4

- 38 -

METODO DE INTERPOLACION PARA OBTENER LA

CL₅₀ A 24 , 48 Y 96 HRS.



POR INTERPOLACION SE OBTUVIERON
LOS SIGUIENTES VALORES PARA LA
CL₅₀ EN LOS DIFERENTES TIEMPOS
DE EXPOSICION.

24 CL₅₀ = 30.1

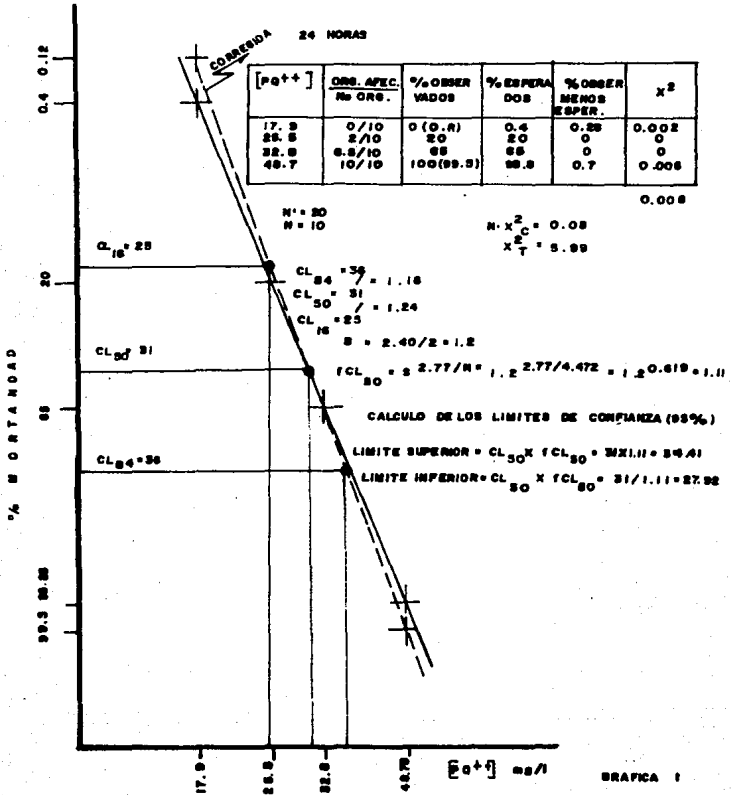
48 CL₅₀ = 24.8

96 CL₅₀ = 16.7

GRAFICA 1

DETERMINACION Y CALCULO DE LA CL₅₀ A LAS 24 HORAS POR EL

METODO LITCHFIELD - WILCOXON



DETERMINACION Y CALCULO DE LA CL₅₀ A LAS 48 HORAS POR EL METODO LITCHFIELD - WILCOXON

48 HORAS

| [Po +] | ORG. AFEC. No. ORG. | % OBSER VADOS | % ESPE RADOS | % OBSER. MENOS ESPER. | X ² |
|--------|------------------------|------------------|-----------------|-----------------------------|----------------|
| 11.7 | 8/10 | 0 (0) | 0.1 | 0.07 | 0 |
| 17.9 | 1/10 | 10 | 10 | 0 | 0 |
| 25.5 | 5.5/10 | 55 | 55 | 0 | 0 |
| 32.9 | 9/10 | 90 | 90 | 0 | 0 |

N = 10
N > 10

N · X₀² = 0
X² = 8.99

CL₈₄ = 30.5 / = 1.24

CL₅₀ = 24.5 / = 1.27

CL₁₆ = 19.2

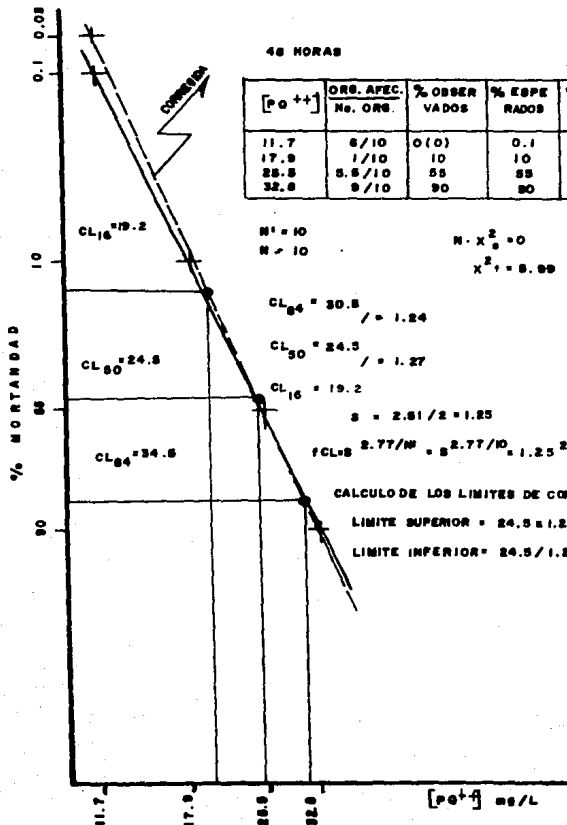
s = 2.51/2 = 1.25

fCL₅ = 2.77/N = 2.77/10 = 1.25 2.77/3.16 = 1.25 · 0.87 = 1.22

CALCULO DE LOS LIMITES DE CONFIANZA (95%)

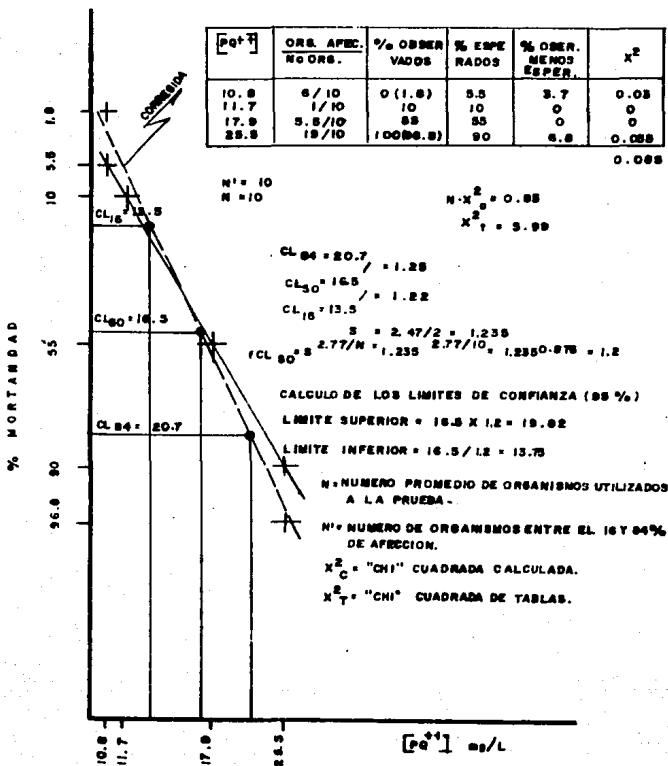
LIMITE SUPERIOR = 24.5 + 1.22 = 25.89

LIMITE INFERIOR = 24.5 / 1.22 = 20.08



GRAFICA 2

DETERMINACION Y CALCULO DE LA CL₅₀ A LAS 96 HORAS POR EL
METODO LITCHFIELD - WILCOXON



RESULTADOS DE LA CL₅₀ A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICION

CONCENTRACIONES (mg / l)

| | TESTIGO | 0.00 | 10.87 | 11.74 | 17.95 | 25.56 | 32.88 | 48.78 | |
|---------|---------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| 24 HRS. | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 20 % | 68 % | 100 % | | MORTALIDAD % |
| 48 HRS. | 0 % | 0 % | 0 % | 10 % | 58 % | 80 % | — | | |
| 72 HRS. | 0 % | 0 % | 0 % | 38 % | 100 % | — | — | | |
| 96 HRS. | 0 % | 0 % | 10 % | 58 % | — | — | — | | |

LA ZONA SOMBRADA INDICA EL % DE MORTALIDAD CON RESPECTO AL TIEMPO Y A LA CONCENTRACION DE PARAGUAT.

| METODO | 24 CL 50 | 48 CL 50 | 96 CL 50 |
|---------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| INTERPOLACION | 30.1 | 24.5 | 16.7 |
| LITCHFIELD | 31 | 24.5 | 16.5 |
| WILCOXON | L. SUP. = 34.41 L. INF. = 27.92 | L. SUP. = 30.5 L. INF. = 19.2 | L. SUP. = 19.83 L. INF. = 13.73 |

CUADRO 5

ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

La prueba del bioensayo comprendió tres etapas:

El período de aclimatación, la prueba exploratoria y la prueba formal.

Durante el período de aclimatación de 26 días las variaciones en los análisis físicos y químicos se presentaron en la -- pecera # 3, debidas a la sobrecarga de organismos, pero manteniéndose dentro del marco ambiental reportado en la literatura para la especie (Pullin y Lowe-Connell 1982).

La limpieza de los estanques, la dosificación del alimento (6%/peso) y el sistema de aereación, fueron los principales -- factores que ayudaron a mantener la calidad del agua dentro del rango permisible para la especie.

La mortandad que se presentó durante el período de aclimatación 3.5%, fué menor a la reportada en el APHA (1980), del -- 10% como límite máximo para desechar el lote de organismos, -- por lo cual los peces fueron aceptados para la prueba como organismos experimentales.

La aceptación de los peces a las condiciones del laboratorio marcaron el inicio de la siguiente fase.

En la prueba exploratoria los rangos de concentración del tóxico que se consideraron fueron de 0.01 a 100 mg/l teóricamen-

te, el valor mínimo es reportado en la literatura como límite máximo permisible para aguas potables el "rango" máximo fué establecido empíricamente puesto que no se reporta bibliográficamente un límite de toxicidad para esta especie.

Para valorar la concentración real de Paraquat contenido en el producto comercial Gramoxone Super, se corrieron las dos técnicas simultáneamente (Cromatografía de Intercambio catiónico y la Espectrofotométrica con ditionito de sodio), obteniéndose 316 y 315 gr/l de Paraquat, respectivamente, observándose con lo anterior que el producto contiene un 66% más de Ión activo que reporta su formulación en la etiqueta-200 gr/l.

Considerando que la concentración real del Paraquat es de 315gr/l, se realizaron las concentraciones descritas en la metodología.

En la determinación del amonio por el metodo de Nessler en las muestras, presentaron un falso positivo, al producir una interferencia a lo cual se procedió a utilizar el método del Fenato reportada en APHA (1980).

A excepción de los cloruros que aumentaron de 12.62 a 38.21 mg/l y el amonio que aumentó de 0.0 a 0.236 mg/l, entendiéndose este aumento en los cloruros gradual a la concentración

de Paraquat, en el caso del amonio, el aumento se debió principalmente a los desechos de los peces. Considerándose ambos no tóxicos para encontrarse dentro de los límites marcados - por Morales, (1988), de 250 mg/l para cloruros y 0.1 mg/l -- para amonio.

El oxígeno disuelto bajó ligeramente debido a la carga de organismos, sin embargo, la concentración se mantuvo siempre dentro del óptimo de 5-8 mg/l.

Los porcentajes de mortandad quedaron establecidos en el rango de 10 mg/l a 100 mg/l de Paraquat, ya que se consideró la CONCENTRACION MAS ALTA DENTRO DE LAS CUALES NO HAYA MUERTO NINGUN ORGANISMO O SOLAMENTE ALGUNO Y LA MAS BAJA DE LAS CUALES SE HAYAN MUERTO LA MAYORIA O TODOS.

La determinación del Paraquat en las concentraciones de - 0.01 y 0.1 mg/l, no se detectaron por la sensibilidad de la técnica espectrofotométrica de 15 a 1 mg/l.

En la prueba formal la calidad del agua considerando los parámetros físico-químicos no presentó variaciones significativas, excepto en el Oxígeno Disuelto, Amonio, Cloruros y -- Conductividad, en donde las variaciones fueron más marcadas. El Oxígeno Disuelto bajo poco con respecto a las concentraciones, pero si se observó una disminución gradual con respecto al tiempo (de 7.3 a 1.4 mg/l), esto debido a la sobrecarga y a la falta de aereación del agua principalmente; con --

respecto a la concentración de 25.56 mg/l de PQ^{++} se observa en la gráfica 5(c), que disminuye hasta 0.4 mg/l, debido al tiempo de exposición y a la posible presencia de residuos orgánicos de los organismos experimentales.

En los cloruros, el aumento fué gradual conforme a la concentración de Paraquat, hasta un valor máximo de 39.04 mg/l en la concentración de 113 mg/l, debido a la presencia del cloro en la molécula de Paraquat; en la gráfica 5(a), se observa una relación lineal entre los cloruros y las concentraciones de Paraquat.

Los valores de amonio aumentaron con respecto al tiempo, en la grafica 5(b) se puede observar que a las 96 horas se presentó la máxima concentración de amonio de 1.29 mg/l, presumiblemente se debió a los desechos de los organismos y a que se mantuvo sin renovación el agua durante el transcurso de la prueba.

Morales (1988), reporta un límite máximo de 0.1 mg/l de amonio para la especie, sin embargo en el experimento aún en las peceras testigo, se presentaron valores mayores sin causar mortandad. Pullin, y Lowe-McConnell, (1982) reportan que la especie Sarotherodon aureus en estanques experimentales toleraron 11 ppm a un pH de 8 y a una temperatura de 27°C.

Como se observa en la gráfica 5(d), la conductividad fué aumentando en relación a la concentración de Paraquat.

Con respecto a la dureza total y a la alcalinidad total se observaron pequeñas variaciones de 71.07-75.07 mg/l y de 75-85 mg/l respectivamente sin llegar a ser significativas de acuerdo al cuadro ambiental.

El pH no tuvo alteraciones importantes y siempre se mantuvo en la alcalinidad de 7.1-7.6.

La conducta de los peces en general durante la prueba exploratoria y la formal fué la siguiente:

Al inicio de la prueba en las concentraciones bajas, se observe una alteración en su comportamiento de nado que tendió a disminuir con el tiempo de exposición, hasta considerarse sin afección para los peces, en las concentraciones altas, la conducta fué: nado desesperado, pérdida de respuesta a estímulos externos, pérdida de equilibrio, espasmos y muerte después de dos horas.

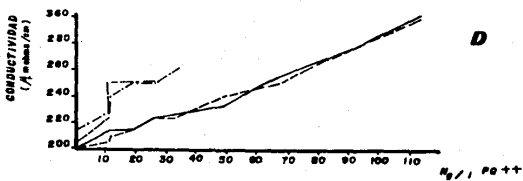
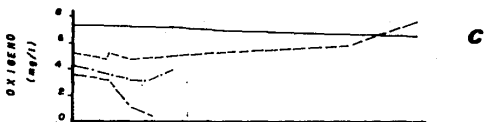
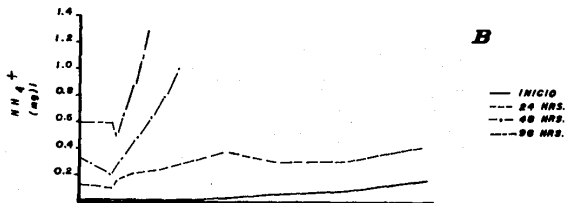
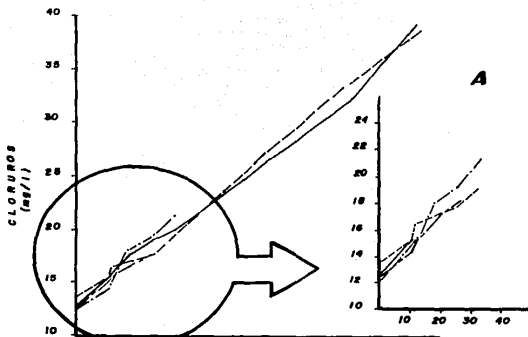
En la determinación de la CL_{50} por medio de los dos métodos, se observa que los valores de las mismas a diferentes tiempos de exposición, no tuvieron diferencias ya que de acuerdo al -

método de Litchfield y Wilcoxon donde se marca un límite de confianza del 95% los valores resultantes obtenidos por el método de interpolación siempre estuvieron dentro del rango.

De acuerdo a la publicación del Manual de Bioensayos, -- elaborado por el Centro de Investigación y Estudios para el Control y Calidad del Agua (SARH, 1980), existe un cuadro - donde clasifican los tóxicos de acuerdo a su grado de toxicidad.

- 1) Parcialmente no tóxico
umbral letal agudo alrededor de 10 000 mg/l
- 2) Ligeramente tóxico
umbral 1000 - 10 000 mg/l
- 3) Moderadamente tóxico
umbral 100 - 1000 mg/l
- 4) Tóxico
umbral 1 - 100 mg/l
- 5) Muy tóxico
umbral abajo de 1 mg/l

Por lo cual nuestro producto se cataloga como tóxico ya que las CL_{50g} se encuentran entre 13.5 y 36 mg/l de Paraquat.



GRAFICOS PARAMETROS QUIMICOS VS. CONCENTRACION DE PARAQUAT (PO^{++}) EN LA PRUEBA FORMAL

CONCLUSIONES

Ante la problemática que presenta el uso de productos químicos en el medio acuático, y en especial para el control de malezas acuáticas, se ha hecho indispensable el generar información para conocer el comportamiento y efecto en los organismos de estos compuestos tóxicos; por lo anterior es importante realizar trabajos experimentales para determinar los efectos que producen en las comunidades y además sobre la calidad del agua.

Dentro de estos trabajos se encuentran los Bioensayos que han sido una metodología útil para la valoración tóxica tanto de los desechos industriales como productos químicos sobre las comunidades acuáticas, de esta manera se expresa la respuesta que presentan los organismos a determinadas sustancias y concentraciones.

Aunque el objetivo del bioensayo fué obtener una indicación aproximada de la concentración del herbicida Paraquat que probablemente sea peligrosa a la especie Oreochromis hornorum en su ambiente natural, los resultados de tal prueba son solamente una guía aproximada de las implicaciones ecológicas de la existencia de esta sustancia en el medio, y no pueden ser usados para predecir exactamente el riesgo que involucran. Es --

decir, los valores de las concentraciones letales (CL_{50s}), son indicadores muy útiles de la toxicidad aguda de las sustancias probadas bajo las condiciones experimentales, pero es importante tener bien claro que no son las concentraciones que se pueden considerar como seguras o inocuas a los habitats expuestos a la contaminación. Ya que las concentraciones que no se pueden demostrar que sean tóxicas dentro de las primeras 96 horas de exposición, pueden ser muy tóxicas en una exposición continua. Las CL_{50s} encontradas en un lapso de 96 horas en la especie Oreochromis hornorum (24 CL_{50} =31 mg/l, 48 CL_{50} = 24.5 mg/l y 96 CL_{50} = 16.5 mg/l de Paraquat) comprueban la toxicidad del producto. Es muy probable que a niveles menores de concentración y a un plazo mayor de exposición se presente una toxicidad crónica. Para lo cual se recomienda el realizar pruebas de bioensayos con mayor tiempo de exposición.

La CL_{50} encontrada en esta prueba no es un dato que se pueda extrapolar para otras especies, ya que la sensibilidad a productos tóxicos es diferente en cada una pero sí puede dar pauta para el manejo del producto.

Aunque los valores de la CL_{50} no son considerados como concentraciones seguras para los habitats, la Aquatic Life Advisory Committee, 1955, recomienda que las pruebas de toxicidad de bioensayos rígidamente controladas forman la base

Para la determinación de las concentraciones permisibles o -
niveles seguros de los contaminantes.

A N E X O 1

TERMINOS GENERALES:

ACLIMATACION.- Acostumbrar los organismos prueba a diferentes condiciones medio ambientales, tales como temperatura, luz y calidad del agua.

RESPUESTA.- El efecto de la medida biológica del material probado. En pruebas de toxicidad aguda usualmente es la muerte, - en pruebas de bioestimulación es el incremento de biomasa.

CONTROL.- Ensayar con organismos en cámaras experimentales - bajo condiciones controladas expuestos a agua de dilución o agua natural a la cual ellos estan normalmente expuestos.

TERMINOS DE TOXICIDAD:

DOSIS.- Cantidad de sustancia tóxica que entra al organismo.

TOXICIDAD.- Efectos adversos causados a los organismos prueba por "polucionantes", generalmente un veneno o mezcla de venenos. La toxicidad esta en función a la concentración y - al tiempo.

TOXICIDAD AGUDA.- Involucra una respuesta relativamente a corto plazo (Muerte y otro efecto), que por lo general ocurre dentro de los cuatro días de exposición.

TOXICIDAD CRONICA.- Efectos a largo plazo que pueden estar relacionados con cambios en el apetito, crecimiento, metabolismo, reproducción y aún muerte.

CONCENTRACION LETAL (CL).- Concentración tóxica que produce la muerte de los organismos prueba. Un sub-índice es empleado (CL_{10} , CL_{50} , CL_{70}) para indicar el porcentaje de animales que perecen a una determinada concentración de la sustancia a prueba. Los efectos que un tóxico produce a los organismos depende de su concentración y del tiempo de exposición, por lo cual el tiempo debe ser incluido al expresar el resultado.

CONCENTRACION EFECTIVA (CE).- Es utilizada cuando se determina otro factor diferente a la muerte. La concentración efectiva-media (EC_m) es la concentración que produce un efecto específico o respuestas, como: pérdida de equilibrio; parálisis; desarrollo anormal; o cualquier otro efecto subletal. Cuando se utiliza "CE" se debe especificar claramente el efecto medido.

TIPOS DE BIOENSAYOS.- Se clasifica a los bioensayos por la forma en que se aplica la solución de prueba en:

BIOENSAYOS ESTATICOS.- Son aquellos en los cuales los organismos permanecen en la misma solución durante todo el tiempo de la prueba.

BIOENSAYOS RENOVABLES.- Los organismos son transferidos a una solución de prueba recientemente preparada en intervalos periódicos, usualmente cada 24 horas.

BIOENSAYOS DE FLUJOS CONTINUO.- A las cámaras de prueba se les introduce y extrae un volumen constante de la mezcla del agua de dilución y tóxico, obteniendo así un flujo continuo. Comúnmente se renueva cinco veces al día la solución de prueba.

Los Bioensayos también se clasifican de acuerdo a su duración: a corto plazo, intermedios y a largo plazo, y su uso dependerá de los objetivos del estudio, así como de las características de los organismos prueba (ciclo de vida), por lo regular la duración de un bioensayo a corto plazo conta de 24 o 96 horas, intermedio de 14 o 90 días y a largo plazo contempla desde una parte a todo el ciclo de vida, o incluso sobre las generaciones siguientes de la especie a prueba son utilizadas debido a que en los bioensayos anteriores, los efectos subletales escapan a la observación.

TECNICA DE ANALISIS DE PARAQUAT POR EL METODO ESPECTROFOTOMETRICO

PRINCIPIO.- El Paraquat (ión de 1,1 dimetilo-4,4' dipiridilo presente como sal de dicloruro), $C_{12}H_{14}N_2(Cl_2)$; su constitución química es la de catión, se disocia de modo notable en solución acuosa, pudiendo ser reducido, dando color púrpura, pero una simple agitación, los reoxida. Posee una gran capacidad de Oxidación-reducción.

El método tiene un principio colorimétrico en que el catión forma un electrón en presencia de agentes reductores tales - como el Ditionito de Zinc o de Sodio y forma radicales libres, dando un compuesto de color azul, (Barbera, 1976 and Ledwith - citado en Pomeroy, 1977).

La intensidad del color producido en la reacción es proporcional a la concentración de Paraquat presente en la muestra, permitiendo su análisis por espectrofotometría, (Ortho Method RM-8-8, 1976), calculando la concentración del Paraquat por comparación relativa con una curva patrón, obtenida a partir de las lecturas de absorbancia (densidad óptica (D.O.) de soluciones de Paraquat conocidas.

La sensibilidad de la técnica es de 1 a 15 mg por litro - de Paraquat para el Aparato "Spectronic 20"

INTERFERENCIAS:

- 1.- A bajas concentraciones de Paraquat (0.05 ppm) el di tionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) reacciona ocasionalmente dando una absorción falsa, lo cual afecta el espectro obtenido, si esto ocurre, la determinacióndebe repetirse con solución de ditionito fresca. Si el problema persiste se puede eliminar variando la concentración de la solución de ditionito empleando 0.1 - 0.2% peso/volumen en hidróxido de Sodio 0.3N.

- 2.- El ditionito de sodio es un compuesto muy inestable por lo que se debe leer rápidamente después de ser adicionado a la muestra, ya que si no se hace, el Paraquat se oxida rápidamente, perdiendo el color.

- 3.- La agitación no debe ser muy brusca porque puede provocar el proceso de oxido-reducción rápidamente, perdiendo el color. (Ortho Method RM-8-B, 1976).

APARATOS Y EQUIPO

- Spectronic 20
- Tubos de ensaye
- Matraces aforados

REACTIVOS:

- Agua destilada
- Dicloruro de Paraquat ($C_{12}H_{14}N_2 (Cl_2)$) químicamente puro, 99.4%.
- Solución de Ditionito de Sodio al 0.2% en NaOH al 0.3N.
Estos reactivos son inestables y se deben guardar solo de 1 a 1½ horas ($Na_2S_2O_4$) · 2H₂O.
- Solución estandar de Paraquat en agua.
Disolver 0.001 gr. de Paraquat (99.4%) y aforar a 100 ml.
Esta solución tiene una concentración de 10 mg de PQ⁺⁺ por litro, siendo equivalente a 1 ml. de esta solución a 0.01 mg de PQ⁺⁺ por litro.

PREPARACION DE LA CURVA DE CALIBRACION:

Se preparó una serie de estandares de las siguientes concentraciones de Paraquat, 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.9, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0, 13.0, 14.0, 15.0 mg/l, tomando una alícuota de 10 ml., adicionando 4 ml. del Ditionito - de Sodio al 0.2% a cada tubo y mezclando bien. Obteniendo la longitud de onda adecuada del aparato en este caso Spectronic 20 (380, 385 y 390 nm), se leyeron los estandares (cuadro 1), graficando en papel milimétrico las concentraciones en el eje "X" y la absorbancia en el eje "Y" de cada solución.

Para obtener la curva de Paraquat se realizaron 5 repeticiones, no encontrándose diferencia significativa entre ellas; se promediaron los datos (cuadro 1) y se obtuvo la curva ajustándose por mínimos cuadrados (Spiegel R.B. 1987).

| CONCENTRACION DE PARAQUAT | D.O. \bar{X} | D.O. CORREGIDA |
|------------------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | 0.06 | 0.1 |
| 2 | 0.127 | 0.164 |
| 3 | 0.219 | 0.228 |
| 4 | 0.313 | 0.292 |
| 5 | 0.391 | 0.356 |
| 6 | 0.438 | 0.42 |
| 7 | 0.511 | 0.484 |
| 8 | 0.589 | 0.548 |
| 9 | 0.638 | 0.612 |
| 10 | 0.708 | 0.676 |
| 11 | 0.768 | 0.74 |
| 12 | 0.809 | 0.804 |
| 13 | 0.876 | 0.864 |
| 14 | 0.928 | 0.932 |
| 15 | 0.961 | 0.996 |

Conc. de Paraquat - Concentraciones conocidas de Standar de Paraquat.

D.O. \bar{X} - Densidad óptica promedio de 5 repeticiones de la -
curva.

D.O. Corregida - Densidad óptica corregida por mínimos cua-
drados.

$$y = a_0 + a_1 X$$

DONDE:

$$a_0 = 0.036$$

$$a_1 = 0.064$$

PROCEDIMIENTO:

Se tomó una alícuota de 10 ml. de la muestra problema en un tubo de ensaye, adicionando 4 ml. de solución de Ditionito de Sodio al 0.2%, tapando el tubo y mezclando invirtiendo de extremo a extremo 2 veces el tubo.

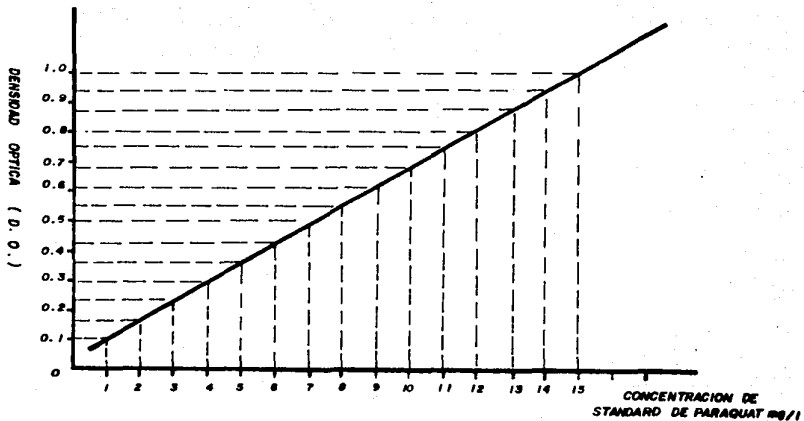
Se vació la muestra rápidamente leyéndose en el espectro fotómetro la absorbancia en el valor máximo y a 5 nm a cada lado del máximo (\pm 5 nm). Realizándose por duplicado cada muestra, se sacó promedio.

En nuestro aparato Spectronic 20 el máximo fué 385 por lo que se leyó a 380, 385 y 390 nm.

NOTA: Se debe buscar el máximo para cada aparato.

EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

Para una muestra de 10 ml, la curva da directamente el contenido de Paraquat, expresado en miligramos por litro.



CURVA DE CALIBRACION PARA LA DETERMINACION DE PARAQUAT CON EL
 ESPECTROFOTOMETRO SPECTRONIC 20 A UNA LONGITUD DE ONDA
 DE 380 \pm 5 m μ

ANEXO 3

TABLA DE SELECCION DE CONCENTRACIONES
EXPERIMENTALES

| CONCENTRACIONES EN INTERVALOS A ESCALA LOGARITMICA | | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
| COLUMNA 1 | COLUMNA 2 | COLUMNA 3 | COLUMNA 4 | COLUMNA 5 |
| 10 | | | | 8.7 |
| | | | 7.8 | 6.9 |
| | | 6.9 | | 4.9 |
| | | | 4.2 | 3.7 |
| | 3.2 | | | 2.9 |
| | | | 2.4 | 2.1 |
| | | 1.8 | | 1.88 |
| | | | 1.55 | 1.18 |
| 1.0 | | | | |

ANEXO 4

Tilapia Oreochromis hornorum

Antecedentes y Distribución

La Tilapia, es de origen africano, representada por cerca de 100 especies, desarrollándose con éstos, pesquerías con alto índice de productividad, con capturas para el año de -- 1960, del orden de 600 mil toneladas en Africa (Frye, 1972-- citado en Morales 1988). Fué introducida a México, el 10 de julio de 1964, procedente de Auburn Alabama, E.E.U.U., su -- adaptación en el país, ha sido amplia principalmente en las zonas tropicales como sucede en los estados de Oaxaca, Tabasco, Chiapas, Michoacán, Veracruz y Sinaloa, en donde se registran capturas anuales de 89 mil toneladas, 1986 (Pesca).

BIOLOGIA DE LA TILAPIA

Las tilapias o mojarra africanas como se las conoce comúnmente en México, son especies aptas para el cultivo en zonas tropicales y subtropicales del país.

Se encuentran en agua lénticas principalmente. Son especies euritermas siendo el rango de tolerancia de 12° a 42°C.

La temperatura ideal para su cultivo fluctúa entre 25°C, aunque a 18°C también logran reproducirse.

Son peces eurihalinos y que pueden vivir en aguas dulce, salobres y marinas, el rango de tolerancia es de 0/00 a 40 - 0/00 y en algunos casos arriba de esta salinidad.

Soportan concentraciones de oxígeno muy bajas, su requerimiento mínimo es de 0.5 mg/l.

Se reproducen a temprana edad, alrededor de las 8 o 10 - semanas, teniendo una talla entre 7 a 16 cm. por lo que dificulta el control de la población. En las especies T. hornorum y T. mossambica el macho presenta marcada territorialidad, sobre todo en época de reproducción.

Son de fecundación externa y el número de huevecillos - producidos por la hembra varía según la especie, talla y peso de los reproductores, así una hembra de 200 gr. tiene de 800 a 1000 huevecillos por desova.

Los hábitos alimenticios son diferentes según la edad y la especie, aceptan la más variada alimentación artificial que va desde los desechos de la comida casera (como restos de carne, tortillas y pan, etc.) hasta vegetales como hojas de maíz, fruto de palma, pulpas de café, etc.

TAXONOMIA

De acuerdo con la Secretaría de Pesca (1982), las Tilapias existentes en México se clasifican de la siguiente manera:

| | | |
|-----------|---|----------------|
| Phylum | : | Chordata |
| Subphylum | : | Gnathostomata |
| Clase | : | Osteichthyes |
| Subclase | : | Actinopterygii |
| Orden | : | Perciformes |
| Suborden | : | Percoidi |
| Familia | : | Cichlidae |
| Género | : | Oreochromis |
| Especie | : | O. hornorum |

Características de Oreochromis hornorum

Es característico de esta especie la forma del cuerpo -- "corta" y "robusta", cuando son pequeños los organismos, su coloración es gris plateado con barras longitudinales y transversales; conforme para el tiempo la coloración se torna verde pardusco, opaco, en los machos, y las hembras toman un color amarillo pardoso pálido tendiéndose a acentuar la coloración totalmente negra en los machos, con bordes rojos en las aletas dorsal y caudal.

CICLO BIOLÓGICO:

Huevo.- Son de colores semejantes entre las especies, van desde un color amarillo huevo antes de ser fecundado, hasta un amarillo pálido hasta antes de llevarse a cabo la aclosión, el tamaño varía entre 2.2 a 4.3 mm.

Alevines.- Esta etapa dura alrededor de 3 a 5 días y la sobrevivencia de estos es a base de nutrientes y proteínas contenidos en el saco vitalino, al término de esta fase el alevín presenta un tamaño de 0.5 a 1 cm. posterior a esta talla se le considera cría.

Juvenil.- Se considera a partir de una talla de 7 cm. - hasta alrededor de los 10 cm. en un lapso de dos meses de edad, y a medida que ésta es mayor las exigencias -- nutritivas se van diferenciando y se asemejan más a las de los adultos.

Adulto.- Es la última etapa de su desarrollo, en la que presentan tallas de 10 a 18 cm. y debiendo pesar de 70- a 100 gr., talla que se obtiene alrededor de los tres - meses y medio de edad.

NUTRICION:

Las especies omnívoras son las que presentan una mayor diversidad en los alimentos que consumen, a nivel de alevinieren fitoplancton y zooplancton, en las etapas de crifa y juvenil, además de ser planctófagas, consumen insectos y como adultos su nutrición es a base de microcrustáceos, insectos y plantas acuáticas. Las especies herbívoras presentan una alimentación que predomina en consumo de fitoplancton en las etapas de crifa y juvenil. En el adulto su consumo en hábitats naturales es a base de algas y plantas marginales sumergidas de mayor tamaño.

CRECIMIENTO:

Es isométrico (crece igual la cabeza que la cola), y depende de varios factores: temperatura, densidad, tipo de alimento.

| ESTADIO | TALLA CMS. | PESO GRS. | TIEMPO EN DIAS |
|-----------|------------|-------------|----------------|
| Huevo | 0.2 - 4.3 | 0.01 | 3 - 5 |
| Alevín | 0.7 - 1.0 | 0.10 - 0.12 | 10 - 15 |
| Crifa 1y2 | 3 - 5 | 0.5 - 4.7 | 15 - 30 |
| Juvenil | 7 - 12 | 10 - 50 | 45 - 60 |
| Adulto | 10 - 18 | 70 - 100 | 70 - 90 |

CONDUCTA:

Sus hábitats reproductivos son muy característicos: El macho es el que se encarga generalmente de la construcción - del nido en el fondo del estanque, y presenta coloraciones - muy vistosas durante la época de reproducción y apareamiento. Ejerce cierta territorialidad cuidando el nido, esperando a la hembra para su apareo. Al unirse con el macho, éste realiza movimientos continuos uniendo los extremos de sus aletas-caudales, luego el macho presiona con la cabeza el vientre - de la hembra provocando que expulse los huevecillos para depositar sobre ellos el esperma llevándose a cabo la fecundación.

El huevo fertilizado es recogido por la hembra depositándolos en la cavidad interior de la mandíbula (incubación bucal).

Las hembras ejercen agresividad con otros peces durante la etapa de incubación que dura entre 3 y 5 días. Esta misma actitud se observa aún cuando las crías se han formado completamente y nadan en cardumen. Al notar la presencia de otro pez cerca del cardumen vuelven a protegerlos en la cavidad bucal. Este comportamiento se realiza 8 días después de la eclosión.

El macho después de fecundar a una hembra puede aparearse

con otra, mientras que la hembra tiene un período de recuperación que varía entre los 20 y 30 días.

CALIDAD DEL AGUA:

Relación de parámetros físico-químicos y los rangos en los que se puede desarrollar la Tilapia.

| PARAMETRO | MINIMA | OPTIMA | MAXIMA |
|------------------------|--------|---------|--------|
| Temperatura | 12 | 24 - 29 | 42 |
| Oxígeno (mg/lt) | 1 | 5 | 8 |
| pH | 5 | 7 | 9 |
| Salinidad (mg/lt) | 0 | 12 - 13 | 40 |
| Transparencia (cms) | 75 | 45 | 20 |
| Dureza (mg/l) | 20 | 135 | 300 |
| Alcalinidad (mg/l) | 20 | 75 | 300 |
| NH ₄ (mg/l) | — | 0.1 | 0.1 |

Temperatura.- La tilapia se distingue por gustar de temperaturas elevadas en el agua (termófila, por lo tanto este parámetro deberá ser controlado en el estanque, los rangos óptimos se encuentran entre 24 y 29°C ya que fuera de estos límites puede decaer la actividad reproductiva.

Oxígeno Disuelto.- El rango óptimo es arriba de los 5 mg/lt, al ser menor la reproducción disminuye y su metabolismo también.

CO₂ LIMITE DE TOLERANCIA.- Entre 50 y 100 ppm provocando stress, y si se prolongan demasiado, causa la muerte, ya que actúa como un depresivo respiratorio. Para una reproducción sin problemas el rango óptimo es que no rebase los 30 ppm.

SALINIDAD.- A concentraciones por abajo del 20%.

CLORUROS.- Para aguas potables el máximo es de 250 mg/l.

ANEXO 5

METODO ABREVIADO DE LITCHFIELD Y WILCOXON:

El método de Litchfield y Wilcoxon, (1949), se ha utilizado para estimar el ajuste de "la línea trazada a ojo", su pendiente, y los límites de confianza del 95% de la CL_{50} . El procedimiento general es:

Paso 1: Tabular los datos incluyendo: la concentración del tóxico (mg/l); el número de organismos afectados; por -- ciento observado de organismos afectados (ver cuadro 4). No es necesario enlistar dos 100% o dos 0% de organismos afectados por la concentración, mayor o menor, del tóxico a prueba.

Paso 2: Graficar el por ciento de organismos afectados - contra la concentración del tóxico, en papel de probabilidad logarítmica de dos ciclos; el 0 y el 100 % no son particular mente aquellos en la región del 40 y 60% de organismos afectados.

Paso 3: Utilizando la línea trazada se lee y enlista, - para cualquier concentración, el por ciento "esperado" de organismos afectados. Utilizando el por ciento esperado, se ---

calcula con la Tabla 1 un valor corregido para cada 0 y 100% obtenido en la prueba. Debido a que los valores de la tabla son números enteros, es necesario obtener valores intermedios por interpolación. Los valores corregidos se grafican y se observa que tanto ajustan a la línea de los datos graficados; si después de graficar los valores esperados corregidos para el 0 y el 100% de afectados, el ajuste no es satisfactorio, se traza una línea diferente y se obtiene una serie nueva de valores esperados.

Paso 4: Enlistar las diferencias entre cada valor observado (o corregido) y el valor esperado correspondiente. Utilizando cada una de las diferencias y el valor esperado correspondiente, se lee y enlista el valor de " X^2 " en el Nomograma de Fig. 2 (se traza una línea recta que conecta la escala del porcentaje esperado con la escala de " X^2 " indicará el valor de X^2). Se suman los valores de X^2 y el total es multiplicado por el número promedio de organismos utilizados en la prueba, obteniéndose de esta forma la X^2 calculada de la línea.

Los grados de libertad son el número de puntos graficados menos dos, $N = K - 2$. Si la X^2 calculada es menor a la X^2 del nomograma, para N grados de libertad, la línea está bien ajustada y entre los datos no hay diferencias significativas, si la X^2 calculada es mayor, los datos son heterogéneos y la-

línea no está bien ajustada. Si se presenta este último caso, los datos no pueden ser utilizados para calcular la CL_{50} .

Paso 5: Determinación de los límites de confianza de la CL_{50} ; se lee en la línea ajustada, la concentración de tóxico para el por ciento de afectados correspondientes al 16, 50 y 84% (CL_{16} , CL_{50} , CL_{84}); se calcula la función de la pendiente S , según:

$$S = \frac{CL_{84} / CL_{50} + CL_{50} / CL_{16}}{2}$$

De la tabulación de los datos, se determina N' que es definida como: el número total de organismos de prueba afectados en el intervalo del 16 al 84% de organismos afectados. - Se calcula el exponente $(2.77/N')$ para la pendiente y el factor, fCL_{50} , que es utilizado para establecer los límites de confianza de la CL_{50} . " $fCL_{50} = S(2.77/N')$ ". fCL_{50} puede ser obtenida directamente del monograma (Fig. 4), trazando una línea recta apropiada a los valores de base y exponente, dando el valor de " f ".

CALCULO DE LOS LIMITES DE CONFIANZA DE LA CL_{50}

Límite superior con 95% de probabilidad = $CL_{50} \times fCL_{50}$

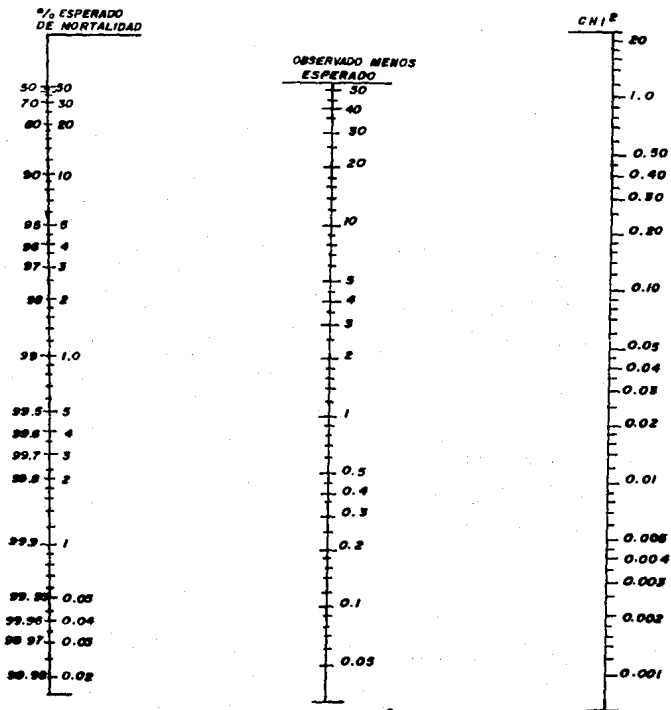
Límite inferior con 95% de probabilidad = CL_{50} / fCL_{50}

TABLA I VALORES CORREGIDOS PARA EL 0% Y 100% DE AFECTADOS

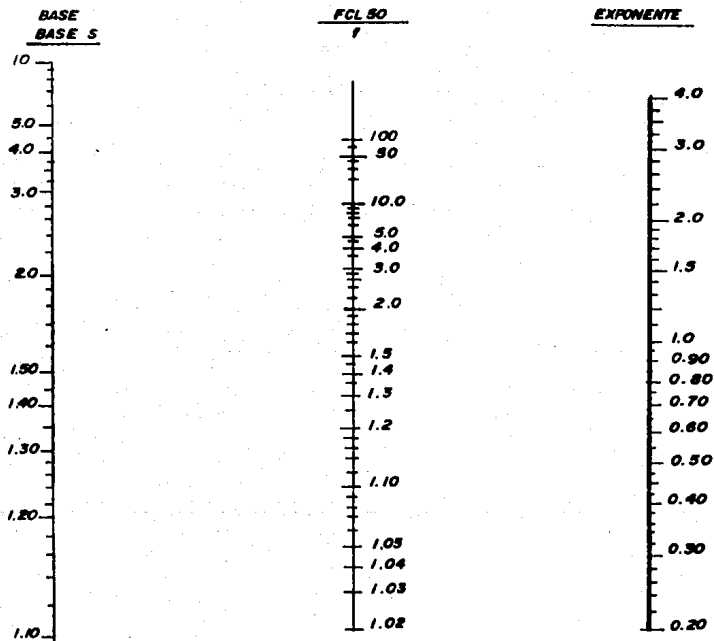
| VALOR ESPERADO | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 0.0 | --- | 0.3 | 0.7 | 1.0 | 1.3 | 1.6 | 2.0 | 2.3 | 2.6 | 2.9 |
| 10.0 | 3.2 | 3.5 | 3.8 | 4.1 | 4.4 | 4.7 | 4.9 | 5.2 | 5.5 | 5.7 |
| 20.0 | 6.0 | 6.2 | 6.5 | 6.7 | 7.0 | 7.2 | 7.4 | 7.0 | 7.8 | 8.1 |
| 30.0 | 8.3 | 8.4 | 8.6 | 8.8 | 9.0 | 9.2 | 9.3 | 9.4 | 9.6 | 9.8 |
| 40.0 | 9.3 | 10.0 | 10.1 | 10.2 | 10.3 | 10.4 | 10.4 | 10.4 | 10.4 | 10.5 |
| 50.0 | --- | 89.5 | 89.6 | 89.6 | 89.6 | 89.7 | 89.7 | 89.8 | 89.9 | 90.0 |
| 60.0 | 90.1 | 90.2 | 90.4 | 90.5 | 90.7 | 90.8 | 91.0 | 91.2 | 91.4 | 91.6 |
| 70.0 | 91.7 | 91.9 | 92.2 | 92.4 | 92.6 | 92.8 | 93.0 | 93.3 | 93.5 | 93.8 |
| 80.0 | 94.0 | 94.3 | 94.5 | 94.8 | 95.1 | 95.3 | 95.6 | 95.9 | 96.2 | 96.5 |
| 90.0 | 96.8 | 97.1 | 97.4 | 97.7 | 98.0 | 98.4 | 98.7 | 99.0 | 99.3 | 99.7 |

TABLA II VALORES DE χ^2 ($p = 0.05$)

| GRADOS DE LIBERTAD (N) | χ^2 |
|------------------------|----------|
| 1 | 3.84 |
| 2 | 5.99 |
| 3 | 7.82 |
| 4 | 9.49 |
| 5 | 11.10 |
| 6 | 12.50 |
| 7 | 14.10 |
| 8 | 15.50 |
| 9 | 16.90 |
| 10 | 18.50 |



NOMOGRAMA PARA LA OBTENCION DE CHI² DE EL % ESPERADO DE AFECTADOS Y DE OBSERVADOS MENOS ESPERADOS (PASO 4)



**NOMOGRAMA PARA ELEVAR LA BASE 5 A UN EXPONENTE
FRACCIONAL**

BIBLIOGRAFIA REPORTADA

- Anónimo (1980). "Manual de Bioensayos" Centro de Investigación y Estudios para el Control y Calidad del Agua. S.A.R.H. p. 1-33.
- APHA-AWWA-WPCF, (1980). "Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater" American Public Health -- Association-United States of America; p. 615-643, 723-739.
- Ashton & Crafts (1981) "Mode of Action of Herbicides" Ed. Wiley-Interscience USA. p 1-14.
- Baldwin, B.C. (1983). "Translocation of Diquat in plants" - Nature, June 1, Vol. 198, p 872-873.
- Barbera Claudio (1976). "Pesticidas Agrícolas" Ed. Omega, España. 450-490.
- Chacko, V.T. and Gummer, Wm. D. (1980). "Content and Distribution Pattern of 2,4-D in the Red River". Environment. Canadá, Technical Bulletin N. 115. p. 1-11.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Coats, G.E., Funderburk Jr., H.H. Lawrence, J.M. Davis, D.E.

(1966). "Factors affecting persistence and --
inactivation of Diquat and Paraquat". Weed Res.
Vol. 46 p. 58-66.

Crosby, D.G., and Tucker, R.K. (1966). "Toxicity of aquatic
herbicides to *Daphnia magna*". Science, Vol. -
154, p. 289-290.

Cunningham P. and Tripp M. (1975). "Factors affecting the acumu-
lation and removal mercury from tissues of the
american oyster Crassostrea virginica Mar. Bio.
31, p. 311-319.

De la Jara Fernando, (1985). "Manual de Toxicología y Tratamien-
to de las Intoxicaciones con plaguicidas AMIPFAC
(Asociación Mexicana de la Industria de Plaguici-
das y Fertilizantes, A.C.) México. p. 58-73.

Environmental Protection Agency United States, EPA, (1975). "Bioa-
ssay in Pollution Analysis and Control. Water --
Programs Operation.

Environmental Protection Agency United States, EPA, (1978). "Bioa-
ssay in Water Quality Analysis and Effluent Moni-
toring Training Manual".

- Escobar Cruz, W (1981). "Manual para el Control Químico de Malezas Acuáticas". S.A.R.H. y C.I.E.C.C.A. pp.87.
- Faust, S.D. (1972). Fate of Organic Pesticides in the Acuatc Environment. A Symposium sponsored by the division of Pesticides Chemistry at the 161 st. Meeting of the American Chemical Society. Washington, D.C. American Chemical Society 1972. P. 280.
- Guadiana, J.A. y Saldaña, H. (1976). "El Lirio Acuático en México, problemas y soluciones". Recursos Hidráulicos. Vol. V, Núm. 4. p. 590-602.
- I.C.I. de México (1987). "Instructivo para el uso del Herbicida Paraquat (Gramoxone Super) ICI División Agrícola. pp. 9.
- INGGO, S.C. (1980). "Bioacumulación de metales pesados y plaguicidas en especies acuáticas de importancia económica". Capítulo VIII. Ingeniería Geofísica. p. 187-220.
- Litchfield, J.T. and F. Wilcoxon, (1949). "A simplified Method of evaluating dose-effect experiments". Pharmacol. Exp. Ther. p. 99-113.

Maciorowski, A.F. and Little L., Sims J.L. (1980). "Biossays Procedures and results". Literatura review - Journal Water Pollution Control Federation, - 52 (6): p. 1630-1655.

Mickin, J. and Benoit, (1970). "Effects of long term exposure to copper on survival reproduction and growth of brook trout (Salvelinus fontinalis). J. -- fish Res. Board Can. 28:655.

Mitchel, D.S., (1979). "Aquatic vegetation and it's use and control. U.N.E.S.C.O. Paris, pp. 135.

Morales, D.A. (1988). "Manual Técnico para el cultivo de la - Tilapia en los Centros Acuicolas de la Secretaría de Pesca". Secretaría de Pesca pp. 202.

National Academy of Sciences. (1980). "Plantas nocivas y como combatirlas". Vol. 2, Ed. Limusa, México. p. 167-239, 383-405.

Needham, L. and Paschal D. et. al. (1979). "Determination of Paraquat in Marijuana by Reversed-Phase Paired Ion High Performance Liquid Chromatographic.- Journal of Chromatographic Science Vol. 17, - February p. 87-90.

- Nemcsok, J.A. Nemeth, ZS. Buzás and L. Boross. (1964). "Effects of copper, Zinc and Paraquat on Acetylcholinesterase activity in carp Cyprinus carpio L.). Aquatic Toxicology, 5. p. 23-31.
- Olvera, V.V., (1984). "Control y aprovechamiento de Malezas Acuáticas en México". SARH, México, D.F.
- Ortho Method RM-8-8, Analysis of Paraquat Residues. Chevron Chemical Co. Richmond, Calif., Jul. 28, 1976.
- Pomeroy, A.A. (1977). "Biochemical Mechanisms of Paraquat Toxicity", Academic Press. United States of America. pp. 240.
- Pullin, R.S.V. and Lowe-McConnell, R.H. (1982). "The Biology and Resources Management". p. 119-123.
- Rojas Garcidueñas H. (1978). "Manual Teórico Práctico de Herbicidas y Fitorreguladores". Ed. Limusa, México. pp. 120.
- SARH. (1981). "Inventario Nacional de Malezas Acuáticas y su Distribución S.G.U.A.P.C. México, D.F.
- Secretaría de Pesca, (1986) "La pesca en México Desarrollo y Perspectivas". 33,37, 87-90, México, D.F.

Sceglia F. O. (1976) "Herbicidas" Ed. Hemisferio Sur, Argentina
pp. 101.

Sharpe Robert (1986). "La Prueba DL₅₀ (Dosis Letal 50) condenada
por científicos y humanistas "Revista La voz de
los Animales" Año 11 Núm. 49, 1987 México - pp.
23.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Conti E. (1987) Acute toxicity of three detergents and two - insecticides in the lugworm, *Arenicola Marina* (L) a histological and a scanning electron microscopic study. Aquatic toxicology, 10:325-334.
- Crossland N.O. (1982) Aquatic toxicology of Cypermethrin, II Late and Biological Effects in Pond Experiments. Aquatic toxicology, 2:205-222.
- Douglas M.T. et. al. (1986) A proposal for the reduction of animal numbers required for the acute toxicity to fish test (LC₅₀ Determination) Aquatic toxicology, 8:243-249.
- Johnson, B.T., et.al. (1971). Biological magnification and degradation of DDT and Aldrin y Freshwater invertebrates. Journal Fisheries Research board of Canada- Vol. 28 No. 5:705-709.
- Johnston, P.A. (1987) Acute toxicity of inorganic selenium upon growth and reproduction. Aquatic toxicology, - 10:335-352.

- Leslie, A.J. (1976). Herbicides, physiology, biochemistry, - Ecology, 2d. Vol. 1 and 2 Academic Press Grain Britain pp: 321-345.
- López M.M.P. (1975) Bioensayos en tres especies, Tilapia melano pleura Cyprinus carpio y Micropterus salmoides, para probar la toxicidad de las aguas residuales en dos industrias (ingenio azucarero, tenería y aguas residuales domésticos de la Cd. de Cuernavaca, Morelos" Tesis UANL. pp. 46.
- Muirhead, R.C. (1971). Pesticides and freshwater fauna, Academic Press New York p. 67-70.
- Nicholson, P.H. (1969). Occurrence and significance of Pesticides Residues in water. Journal the Washington Academy of Sciences. Vol. 59, N4-5 p. 77-85.
- Stephenson, R.R. (1982). Aquatic toxicology of Cypermotheint - acute toxicity to some freshwater fish and invertebrates in laboratory test. Aquatic toxicology, 2 p. 175-185.
- Woltering, D.M. (1984) The growth response in fish chronic and eary life stage toxicology tests, Acritical - Review. Aquatic toxicology 5 p-1-21.

Spiegel, R.B. (1987). "Estadística". McGraw Hill. México,
D.F. p. 217-238.

Spraje, J. (1970). Measurement of pollutant for acute toxicity to fish II utilizing and applying bioassay results. Water Res. 4:3-32.

Williams D. and Giesey J. (1978). Relative importance of food water source to cadmium up take by Gambusi affinis (Pescilidae) Enviro. Res., 16:326 - 332.

Mojeck J.A., et.al. (1983). Worker Exposure to Paraquat and Diquat. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 12, - 65-70.