

Importancia de la Ecotoxicología Microbiana Acuática:

Un Caso con el Insecticida Clorpirifos

Gustavo Eugenio Echeverri Jaramillo



UNIVERSIDAD DE
SAN BUENAVENTURA



Instituto Nacional
de Investigación e
Innovación Social

Importancia de la Ecotoxicología Microbiana Acuática

Un Caso con el Insecticida Clorpirifos



UNIVERSIDAD DE
SAN BUENAVENTURA



Instituto Nacional
de Investigación e
Innovación Social

Echeverri Jaramillo, Gustavo Eugenio.

Importancia de la ecotoxicología microbiana acuática: un caso con el insecticida clorpirifos/ Gustavo Eugenio Echeverri Jaramillo.-- 1.ed.-- Cartagena: Universidad de San Buenaventura; Editorial Bonaventuriana, 2024.

Páginas 191, 17 x 24 cm

ISBN electrónico: 978-958-5114-77-7

1. Toxicología ambiental.-- 2. Ecotoxicología.-- 3. Clorpirifos.-- 4. Toxicidad acuática.-- 5. Ecosistemas acuáticos - toxicología.-- 6. Contaminación del agua - toxicología.-- I. Tít.

Dewey: 571.95 E18

Catalogación: Biblioteca Central Fray Antonio de Marchena OFM.

© Gustavo Eugenio Echeverri Jaramillo
©Universidad de San Buenaventura, Cartagena
Editorial Bonaventuriana
Calle Real de Ternera, Diag. 32 No. 30-966
Teléfono: 653 5555

Fray Jesús Antonio Ruíz Ramírez, OFM
Rector

Nina Ferrer Araújo
Editora

editorial@usbctg.edu.co
www.editorialbonaventuriana.usb.edu.co

Editorial Bonaventuriana
Dirección editorial

Editorial Bonaventuriana
Coordinación editorial
ISBN: 978-958-5114-77-7 (Versión digital)

Mauricio Esteban Suárez
Diagramación

Mauricio Esteban Suárez
Diseño de carátula

Queda prohibida la reproducción total o parcial de este libro por cualquier procedimiento, conforme a lo dispuesto por la ley.

Cumplido el depósito legal (Ley 44 de 1993, Decreto 460 de 1995 y Decreto 358 de 2000)
Los autores son responsables del contenido de la obra

Importancia de la Ecotoxicología Microbiana Acuática

Un Caso con el Insecticida Clorpirifos

Autor:

Gustavo Eugenio Echeverri Jaramillo
Ph.D



UNIVERSIDAD DE
SAN BUENAVENTURA



Instituto Nacional
de Investigación e
Innovación Social

Autor



Gustavo Eugenio Echeverri Jaramillo

Profesor titular del Programa de Bacteriología de la Universidad de San Buenaventura, Cartagena, Colombia. Bacteriólogo de la Universidad Católica de Manizales (Manizales-Colombia). Máster en Tecnología Química, y Especialista en Química Agroalimentaria por el Instituto Químico de Sarriá (Barcelona-España). Especialista en Gestión de la Salud Ocupacional por CES-EAFIT, Medellín. Su interés es contribuir al desarrollo de la ecotoxicología y biotecnología microbiana, a la reducción de impactos en el medio ambiente, y al crecimiento del Grupo GIMA, donde ha sido gestor, fundador e investigador por 20 años.

Dedicatoria

A mi Dios, que me ha dado el entendimiento y sabiduría para proyectarla a los demás. A mi esposa Luz Aida y mis hijos Marcél y Alejandra, que me han acompañado incansablemente en esta lucha. A mi nieta Elisha que ha nacido en este proceso y que la amo con toda mi alma.

Agradecimientos

En primera instancia, a mi Dios, por darme la fuerza y la sabiduría para afrontar este proceso. Gracias a toda mi familia por el acompañamiento y apoyo espiritual en todo momento.

Muchas gracias y bendiciones a mis compañeras y amigas Consuelo Sabater Marco y María Ángeles Castillo López, por su apoyo incondicional en el departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia, España.

A Beatriz Jaramillo Colorado por su dirección y apoyo en el laboratorio. Al equipo del Grupo de Investigaciones Agroquímicas por su colaboración. A mi amigo Howard Junca por sus recomendaciones.

A todos los profesores del Doctorado en Toxicología Ambiental, de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena.

A la Universidad de San Buenaventura por su apoyo económico para llevar a cabo mis experimentos y apoyo financiero para completar mi formación doctoral. También a todos los ayudantes de laboratorio por su amabilidad y apoyo.

A todos los que colaboraron en este proceso de una forma u otra.

Gustavo Eugenio Echeverri Jaramillo

Diciembre, 2023

Contenido

Capítulo 1. Introducción.....	31
Capítulo 2. Aspectos Generales de Clorpirifos y Ecotoxicología	33
Clorpirifos un insecticida organofosforado de gran impacto ambiental	33
Concentraciones de CP en diferentes ambientes.....	36
Concentraciones máximas seguras de CP.....	38
Clorpirifos compuesto orgánico persistente global (COP).....	39
Ecotoxicología acuática.....	44
Ecosistemas acuáticos y niveles tróficos.....	44
Contaminación acuática	47
Interacciones en ecosistema acuático	48
Toxicidad acuática	49
Estudios ecotoxicológicos en sistemas acuáticos	51
Batería de organismos acuáticos	54
Bioensayos de toxicidad de mezclas	60
Evaluación de citotoxicidad.....	63
Evaluación de estrogenicidad	65
Ecotoxicología microbiana.....	66
Contaminación ambiental.....	70
Evaluación ecotoxicológica	71
Respuestas microbianas a la contaminación	73
Aplicación en biotecnología microbiana.....	83

Capítulo 3. Toxicidad Aguda del Clorpirifos y su Metabolito 3,5,6-Tricloro-2-Piridinol Solo y en Combinación con una Bateria de Bioensayos.....	87
Prefacio.....	88
Introducción	89
Materiales y métodos.....	90
Productos químicos y organismos de prueba.....	90
Ensayo de toxicidad aguda con <i>Aliivibrio fischeri</i>	90
Prueba de toxicidad aguda con <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	91
Prueba de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i>	92
Cálculo del índice de combinación	93
Análisis estadístico	93
Resultados y discusión.....	94
Exactitud de la prueba de toxicidad.....	94
Toxicidad aguda de los compuestos de prueba.....	94
Toxicidad de la mezcla.....	100
Riesgo ambiental de CP y TCP	101
Conclusiones.....	102
Capítulo 4. Ensayos Alternativos en Ecotoxicología Microbiana con un Modelo de Levaduras Marinas y Posible Aplicación en Problemas de Contaminación por Clorpirifos	103
Prefacio.....	103
Introducción	104
Materiales y métodos.....	106
Reactivos químicos.....	106
Medios de cultivos microbiológicos.....	106
Muestreo y preparación de sedimentos.....	107
Ensayo microbiológico y caracterización	108
Aislamiento y caracterización fenotípica de levaduras.....	109
Ensayo microbiológico con aplicación en biotecnología	109

Ensayo microbiológico con aplicación en ecotoxicología.....	111
Resultados y discusión.....	112
Ensayo microbiológico y caracterización	112
Aislamiento y caracterización bioquímica de levaduras.....	114
Ensayo microbiológico con aplicación en biotecnología.....	116
Ensayo microbiológico con aplicación en ecotoxicología.....	121
Conclusiones.....	123
Capítulo 5. Actividad Citotóxica y Estrogénica del Clorpirifos y su Metabolito 3,5,6-Tricloro-2-Piridinol. Estudio de las Levaduras Marinas como Potenciales Indicadores de Toxicidad.....	125
Prefacio.....	125
Introducción	126
Materiales y métodos.....	130
Compuestos de prueba	130
Prueba de citotoxicidad con líneas celulares HEK293 y N2a.....	130
Prueba de toxicidad con levaduras marinas	131
Ensayo de levadura recombinante (RYA)	133
Análisis estadístico	133
Resultados y discusión.....	134
Citotoxicidad.....	134
Ensayo de toxicidad con levaduras marinas	137
Actividad estrogénica de compuestos	143
Conclusiones.....	146
Capítulo 6. Conclusiones y Trabajo Futuro.....	149
Conclusiones.....	149
Trabajo futuro.....	151
Capítulo 7. Referencias	153

Índice de figuras

Figura 1. Clorpirifos como insecticida organofosforado	34
Figura 2. Estructuras del Clorpirifos y su metabolito 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP).....	35
Figura 3. Niveles tróficos en ecosistemas	46
Figura 4. Disciplinas de la ecotoxicología microbiana.....	69
Figura 5. Observaciones ecotoxicológicas microbianas y niveles de organización biológica	74
Figura 6. Curvas experimentales de concentración-respuesta aguda para compuestos estudiados y mezcla para <i>A. fischeri</i>	95
Figura 7. Curvas experimentales de concentración-respuesta aguda para compuestos estudiados y mezcla para <i>P. subcapitata</i>	95
Figura 8. Curvas experimentales de concentración-respuesta aguda para compuestos estudiados y mezcla para <i>D. magna</i>	96
Figura 9. Gel de acrilamida y dendograma DGGE de sedimentos en el sitio 1 y el sitio 2	112
Figura 10. Porcentaje de asimilación de todos los carbohidratos por levaduras.....	117
Figura 11. Inhibición de levaduras en superficie de agar. a) Prueba piloto 1. b) Prueba piloto 2. c) Prueba definitiva para MIC	122
Figura 12. Puntos de muestreo de sedimentos marinos en bahía de Cartagena, Colombia	131
Figura 13. Curvas experimentales de concentración-respuesta aguda para CP, TCP y mezcla CP: TCP para la línea celular HEK293 .	134
Figura 14. Curvas experimentales de concentración-respuesta aguda para CP, TCP y mezcla CP: TCP para la línea celular N2a	135
Figura 15. Viabilidad de levadura marina y CECT 1891 S. cerevisiae expuestos a diferentes concentraciones de CP (mg/L)...	138
Figura 16. Viabilidad de levadura marina y CECT 1891 S. cerevisiae expuestos a diferentes concentraciones de TCP (mg/L) .	138
Figura 17. Acute concentration-response experimental curves for yeast strains exposed to CP.....	139

Figura 18. Acute concentration-response experimental curves for yeast strains exposed to TCP	140
Figura 19. Comparación del modelo de sistema de levadura con otros organismos ensayados, expuestos a CP y TCP. Los diagramas de caja representan los valores de IC50 de l evaduras MY1, MY2, MY3, MY6, MY11 y CECT 1891	142
Figura 20. Curvas experimentales de concentración-respuesta aguda para CP y TCP en el ensayo de levadura recombinante (RYA)	145

Índice de tablas

Tabla 1. Características físicoquímicas de CP y TCP	36
Tabla 2. Umbrales de seguridad para Clorpirifos en diferentes entornos y aplicaciones.....	38
Tabla 3. Modelos para evaluar la toxicidad individual y en mezcla ...	39
Tabla 4. Observaciones ecotoxicológicas microbianas y niveles de organización biológica	94
Tabla 5. Levaduras caracterizadas bioquímicamente aisladas de sedimentos de la bahía de Cartagena	115
Tabla 6. Prueba de lipasa en superficie de agar con rojo neutro.....	118
Tabla 7. Levaduras extremófilas encontradas en sedimentos marinos (concentración de sal y temperatura)	120
Tabla 8. MIC con técnica directa CP y TCP en superficie de agar (4 levaduras).....	122
Tabla 9. IC50 (95% límites de confianza; $p < 0.05$) Recopilación de valores de los compuestos de ensayo	135
Tabla 10. Identificación de levaduras marinas usadas en este estudio	141
Tabla 11. Actividad estrogénica de compuestos CP y TCP por RYA..	144

Abreviaciones y Símbolos

AE: Condiciones aerobias.

AEL: Nivel de efecto adverso.

Antagonismo: Con referencia a la toxicidad, cuando la toxicidad de una mezcla es menor que la suma de las toxicidades de sus componentes.

Anthropogenico: Generado por las actividades del hombre.

AP: Condociões anaerobias.

BCF: Factor de bioconcentración.

Bioaccumulation factor (BAF): Concentración de una sustancia química en un animal/concentración de la misma sustancia química en su alimento.

Bioconcentration factor (BCF): Concentración de una sustancia química en un organismo/concentración de la misma sustancia química en el medio ambiente.

Biomagnificación: Aumento de la concentración de una sustancia química en organismos vivos con el paso a lo largo de la cadena alimentaria.

Biomarcador: Una respuesta biológica a una sustancia química ambiental a nivel individual o inferior que demuestra una desviación del estado normal.

Biotransformación: Conversión de una sustancia química en uno o más productos mediante un mecanismo biológico (predominantemente por acción enzimática).

Carboxilesterasas: Esterasas que hidrolizan compuestos orgánicos con enlaces éster carboxílico. Las carboxilesterasas que son inhibidas por los OP pertenecen a la categoría EC 3.1.1.1 en la clasificación IUB de enzimas.

ChE (coolinesterasa): Término general para las esterazas que hidrolizan los colinesteres.

Colinergico: Asociado con el neurotransmisor acetilcolina.

Congenero: Miembro de un grupo de compuestos estructuralmente relacionados.

Conjugado: En toxicología bioquímica, una estructura (a menudo un anión) formada por la combinación de un xenobiótico (normalmente un metabolito de fase I) con un componente endógeno, por ejemplo: sulfato de glucuronato o glutatión.

EC(D)50: Concentración (dosis) que tiene un efecto sobre el 50% de la población. También conocido como concentración media del efecto (dosis).

EC₅₀: Concentración que causa un 50% de inhibición de un proceso.

Electrofilo: Un átomo o grupo que busca electrones.

Disruptores endocrinos: Productos químicos que causan alteraciones del sistema endocrino, por ejemplo: actuando como agonistas o antagonistas en el receptor de estrógeno.

Esterasas: Enzimas que hidrolizan los ésteres.

Eucariotas: Organismos que contienen ADN dentro de sus núcleos.

FC: Condiciones facultativas.

Radical libre: Una molécula o átomo que posee un electrón desapareado.

Fugacidad: Tendencia de una sustancia química a escapar de la fase en la que se encuentra a otra fase (por ejemplo, de líquido a gas).

g: gramo.

HQ: Cociente de peligro.

Hydrofilico: 'Amante del agua'. Los compuestos orgánicos polares tienden a ser hidrófilos.

Hydrofóbico: 'Odio al agua'. Los compuestos orgánicos no polares son hidrófobos.

ka: Coeficiente de absorción.

ke: Coeficiente de eliminación.

kg: Kilogramo.

Know: Coeficiente de reparto octanol/agua.

Ko/c: Organic carbon partition coefficient.

Ko/w: Octanol-water partition coefficient.

Kp s: Kin permeability coefficient.

L: Liter.

LC₅₀: Mean lethal concentration.

LD₅₀: Lethal dose, 50% kill.

Lipophilic: 'Lipid-loving'. Such organic compounds tend to be of low polarity and are hydrophobic.

LOAEL: Lowest observed adverse effect level.

LOC: Level of concern.

LOEC: Lowest observed effects concentration, determined by statistical.

LOEL: Lowest observed effects level, determined by statistical hypothesis testing methods.

MATC: Maximum allowable toxicant concentration, determined by graphical or statistical methods.

methods. This parameter is reported as a dose.

Mg: Milligram.

mL: Milliliter.

MTC: Minimum threshold concentration, determined by statistical hypothesis-.

MW: molecular weight.

N.R.: not reported.

Neurotransmitter: Endogenous substance involved in the transmission of nerve impulses.

NOAE: No observed adverse effects level, determined by statistical hypothesis-testing methods.

NOAEC: No observed adverse effects concentration determined by statistical hypothesis testing methods. The effect is usually chosen for its impact on the species tested.

NOAEL: No observed adverse effect level.

NOE(C)D: No observed effect concentration or dose.

NOEC: No-observed-effect concentration.

NOEC:No observed effects concentration determined by hypothesis testing.

NOELo: No-observed-effect level.

NOEL: No observed effects level determined by statistical hypothesis testing.

NOSo: Not otherwise specified.

Nucleophile: An atom or group that seeks a positive charge.

OP: Organofosforados.

Polarity: Possessing electrical charge.

Ppm: Parts per million.

Procariota: Organismo que no tiene núcleo celular diferenciado mediante una membrana.

Sinergismo: Similar a potenciación; donde un componente de una mezcla, el sinergista, no causaría toxicidad si se aplica solo a la dosis en cuestión.

TCP: 3,5,6-trichloro-2-pyridinol.

Toxic equivalent (TEQ): Un valor que expresa la toxicidad de una mezcla de productos químicos en relación con la de un compuesto de referencia.

U.S.: Estados Unidos.

U.S. EPA: U.S. Environmental Protection Agency.

USDA: U.S. Department of Agriculture.

USGS: U.S. Geological Survey.

WHO: World Health Organization.

Xenobiotic: Un 'compuesto extraño' que no tiene ningún papel en la bioquímica normal de un organismo vivo.

Prefacio

El objetivo de esta investigación fue evaluar la respuesta toxicológica generada por el insecticida Clorpirifos y su metabolito 3,5,6-tricloro-2-piridinol en forma individual y en mezcla, mediante una batería de bioensayos estándar, usando organismos procariotas y eucariotas (*Aliivibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Daphnia magna*), así como en modelos eucarióticos *in vitro* con cultivos celulares animales (HEK293 y N2a), y cultivos de levaduras marinas, estudiados como posibles indicadores toxicológicos. Con los modelos anteriores, se analizó la respuesta fisiológica y toxicológica de diferentes levaduras marinas, proponiéndolas como indicadores, y así aportar al desarrollo de la ecotoxicología microbiana.

Los resultados de investigación generados se han publicado y presentado en revistas y eventos internacionales, quedando pendientes estudios que seguirán fortaleciendo la línea de investigación de procesos biológicos y de biotecnología del Grupo de Microbiología y Ambiente —GIMA— del Programa de Bacteriología de la Universidad de San Buenaventura, Cartagena.

Resumen

El uso de compuestos químicos para combatir diferentes plagas, entre ellas, los insectos, ha generado contaminación ambiental por su uso masivo e indiscriminado. La contaminación química por plaguicidas genera un gran problema ambiental, donde los ecosistemas acuáticos costeros tienen gran riesgo de impacto, especialmente en estuarios de grandes centros urbanos e industriales. Los insecticidas organofosforados, ampliamente utilizados en Colombia, son usados en agricultura y otras áreas, acumulándose en aguas, suelos y sedimentos, afectando gran variedad de organismos que no son su objetivo. El clorpirifos (CP) es uno de los insecticidas organofosforados más usados actualmente en todo el mundo, tanto en actividades agrícolas como no agrícolas. Su uso se da en ambientes internos y externos de hogares e industrias para combatir plagas, siendo fuentes de exposición para niños, mascotas, vida silvestre y en general el medio ambiente.

En ecotoxicología el uso de modelos estándar de organismos se ha empleado para medir la toxicidad aguda del clorpirifos (CP) y su metabolito principal 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) solo y en combinación utilizando una batería de prueba que comprende organismos acuáticos de diferentes niveles tróficos como bacterias marinas luminiscentes *Aliivibrio fischeri*, alga unicelular de agua dulce *Pseudokirchneriella subcapitata* y cladoceran *Daphnia magna*. Ésta última fue el organismo más sensible a los compuestos probados, siendo el CP más tóxico que su metabolito. Por el contrario, se encontró que el TCP era más tóxico que su compuesto parental para *A. fischeri* y *P. subcapitata*. En todos los casos, la mezcla de CP y su metabolito fue más tóxica que los compuestos probados por separado, multiplicándose entre 5 y 200 veces el nivel de toxicidad de CP y hasta 15 veces el nivel de toxicidad de TCP. Estos resultados indican que la coexistencia del producto

químico original y su producto de degradación en el medio ambiente puede dar lugar a una interacción sinérgica que implica un alto riesgo para los ecosistemas acuáticos.

Los sedimentos marinos están expuestos al clorpirifos-CP y su metabolito TCP, estos son una fuente de levadura (modelo eucariota) con importantes capacidades bioquímicas y fisiológicas aplicables a la biotecnología ambiental y ecotoxicología. Los factores relacionados con las características fisiológicas (temperatura/concentración de sal/concentraciones tóxicas) requieren bioensayos de laboratorio básicos, que brindan información muy importante para aplicar en estas áreas de investigación.

Las levaduras estudiadas se aislaron de sedimentos de la bahía de Cartagena y se caracterizaron bioquímicamente haciendo pruebas de antibiosis y crecimiento con concentraciones de sal de 2%, 4%, 10% y 25%, de crecimiento usando diferentes temperaturas (4°C, 25°C, 37°C y 45°C), prueba de esterasa en superficie de agar y una prueba piloto de toxicidad (CP/TCP) en superficie de agar. Se recuperó y cuantificó el ácido dextrirribonucleico (ADN) total mostrando mayores concentraciones en el sedimento liofilizado y, con la técnica DGGE (Degrading Gel Gradient Electrophoresis) se mostró una mayor diversidad de hongos.

Se aislaron 10 levaduras, el género dominante fue la *Candida* (60%), seguida de *Cryptococcus* (30%), y *Rhodotorulla* (10%), las cuales mostraron asimilación de carbohidratos, baja antibiosis entre ciertas levaduras, presencia de esterasas/lipasas en todas, crecimiento en temperaturas extremas y en concentraciones de sal obteniendo levaduras extremófilas y concentración mínima inhibidora de CP y TCP en cuatro levaduras que muestran mayor toxicidad de TCP. Se pueden utilizar técnicas microbiológicas básicas, generando información valiosa para su aplicabilidad.

El principal órgano diana del CP es el sistema nervioso que desencadena efectos predominantemente neurotóxicos, sin embargo, se han sugerido otros mecanismos de acción como la citotoxicidad y la alteración endocrina. Las agencias reguladoras y los administradores de recursos naturales reconocen cada vez más el riesgo que representan los metabolitos de los plaguicidas en los organismos no objetivo. Se evaluó la citotoxicidad y la actividad estrogénica del CP y su principal metabolito 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) mediante ensayos *in vitro*, utilizando dos líneas celulares de mamíferos (HEK293 y N2a), y una levadura recombinante. Los resultados indican que el TCP es más tóxico que el CP para

las dos líneas celulares ensayadas, siendo las células N2a más sensibles a ambos compuestos. Éstos muestran una actividad estrogénica similar siendo entre 2.500 y 3.000 veces menos estrogénica que el 17β -estradiol. Con el fin de encontrar nuevos modelos de medición de la toxicidad, las levaduras aisladas de sedimentos marinos que contienen residuos de CP se han probado contra CP y TCP mediante un ensayo de viabilidad celular. De las doce cepas de levaduras aisladas de sedimentos marinos y probadas, seis de ellas mostraron sensibilidad y una respuesta dependiente de la concentración a los compuestos probados, por lo que podrían considerarse como modelos futuros para las pruebas de toxicidad.

Capítulo 1.

Introducción

El uso indiscriminado en la agricultura y en el hogar de plaguicidas organofosforados como el Clorpirifos (Roberts y Aaron 2007), generan gran impacto ambiental sobre ecosistemas acuáticos, que, sumado a la generación de metabolitos como el TCP (Xu et al., 2008; Baskaran et al., 2003), puede aumentar los efectos sobre organismos en diferentes niveles tróficos. La medición de los efectos de estas sustancias —puras o en mezcla— es de gran importancia para determinar la magnitud de estos impactos a los ecosistemas acuáticos.

En ecotoxicología, estos efectos se miden sobre organismos estandarizados unicelulares procariotas (bacterias) o multicelulares eucariotas (crustáceos), así como en líneas celulares de mamíferos, fortaleciendo los estudios *in vitro* siguiendo directrices de la toxicología del siglo XXI.

Además de ver las diferentes respuestas de los organismos y líneas celulares estudiadas: *Aliivibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* y líneas HEK293, N2a, (O'Brien et al., 2000; Hamid et al., 2004; Rampersad 2012; Gilbert y Friedrich 2017; LePage et al. 2005; Provost 2010; Wang et al., 2015; Qiu et al., 2016; Sindi et al., 2016; Acevedo et al., 2018), y con el propósito de contribuir con el desarrollo de la ecotoxicología microbiana, siguiendo recomendaciones internacionales (Ghiglione et al., 2016; Ghiglione et al., 2017), se estudian las levaduras marinas como microorganismos, que además de ser unicelulares son eucarióticas, de fácil manejo y se proponen como indicadores ecotoxicológicos y posibles biorremediadores (Ribeiro et al., 2000; Cabral et al., 2003; Papaefthimiou et al., 2004; Esteve et al., 2009; Baronian 2004; Braconi et al., 2011; Routledge y Sumpter 1996; García-Reyero et al., 2001).

Capítulo 2.

Aspectos Generales de Clorpirifos y Ecotoxicología

Clorpirifos un insecticida organofosforado de gran impacto ambiental

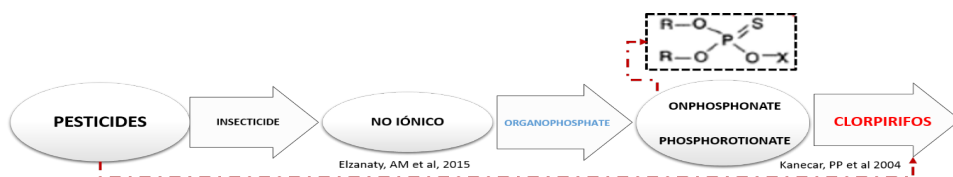
La contaminación química por plaguicidas genera un gran problema ambiental (Kazemi, M et al., 2012; Carod, E. 2002), donde los ecosistemas acuáticos costeros tienen gran riesgo de impacto y riesgo de contaminación, especialmente en estuarios de grandes centros urbanos e industriales (Wang, F et al., 2010). Los insecticidas organofosforados —ampliamente utilizados en Colombia en la Agricultura y en diferentes ambientes (Ramírez, JA et al., 2001; Kazemi, M et al., 2012; Narváez, JM et al., 2012)—, son usados indiscriminadamente (Sogorb, MA et al., 2002), acumulándose en aguas, suelos y sedimentos, afectando gran variedad de organismos que no son su objetivo (Carballo, O. 2003; Denine, GJ et al., 2008; Kazemi, M et al., 2012). Su uso, aumenta el consumo y la generación de residuos al entorno, impactando ecosistemas costeros.

El uso de compuestos químicos para combatir diferentes plagas como en el caso de los insectos, ha generado aspectos de contaminación ambiental por su uso masivo y a veces indiscriminado, que afectan el medio ambiente, encontrándose concentraciones de insecticidas en diferentes matrices ambientales, como en suelo, agua y sedimento. El problema de contaminación por insecticidas en ambientes costeros es inminente, especialmente con el organofosforado clorpirifos de uso masivo.

El empleo indiscriminado de insecticidas organofosforados es un problema de contaminación que afecta el ambiente y a los seres vivos, lo que pone en alerta a organizaciones gubernamentales, para que se tengan alternativas de control. El clorpirifos es un insecticida clorado organofosforado, uno de los más utilizados en el mundo en actividades

agrícolas y no agrícolas. Su uso se da en ambientes internos y externos de hogares e industrias para combatir plagas, siendo fuentes de exposición para niños, mascotas, vida silvestre y en general el medio ambiente (Fig. 1).

Figura 1. Clorpirifos como insecticida organofosforado



Nota. Construcción propia

El clorpirifos se libera directamente al medio ambiente cuando se utiliza como plaguicida, pudiendo ser movilizado desde su origen por el medio a lugares remotos a nivel mundial, lo que hace que sea de gran interés conocer sus impactos y así contribuir a las medidas de control (Watts M, 2013).

Las aguas costeras cercanas a estuarios y grandes centros urbanos e industriales tienen alto riesgo de contaminación (Wang, F et al., 2010); los sedimentos de ecosistemas acuáticos son reservorio natural de contaminación y donde gran cantidad de organismos están expuestos a insecticidas organofosforados (Carballo, O. 2003; Sogorb, MA et al., 2002), conllevando a su acumulación en diferentes ambientes y generando consecuencias ecológicas que producen daño o efecto ambiental, y perturbando a una gran variedad de organismos que no son su objetivo (Denine, GJ et al., 2008); representan la tercera parte en aplicación en la agricultura en Colombia, y de los más usados es el clorpirifós (Ramírez, JA et al., 2001; Kazemi, M et al., 2012; Narváez, JM et. 2012), afectando aguas superficiales, aguas subterráneas, aguas de bebida, sedimentos, suelos, alimentos y organismos vivos (Kazemi, M et al., 2012).

Muchos contaminantes emergentes, en donde se incluyen los plaguicidas organofosforados, impactan el medio ambiente y a los organismos vivos, afectando a los ecosistemas acuáticos en todo el mundo (Deblonde, T et al., 2011). La contaminación química por plaguicidas genera un gran problema ambiental (Kazemi, M et al., 2012; Carod, E. 2002); las aguas costeras cercanas a estuarios y grandes centros urbanos e industriales

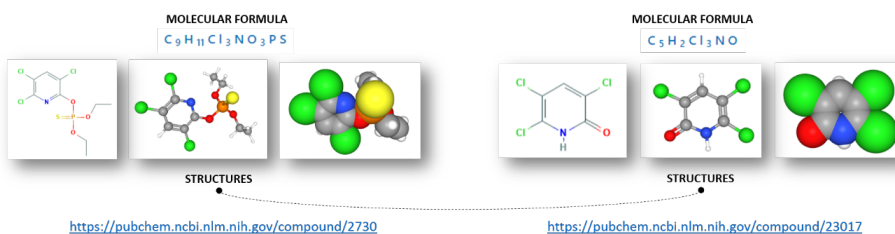
tienen alto riesgo de contaminación (Wang, F et al., 2010); los sedimentos de ecosistemas acuáticos son reservorio natural de contaminación y donde gran cantidad de organismos están expuestos a estos compuestos químicos (Carballo, O. 2003).

El clorpirifos [O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotionato], de baja solubilidad y fuerte absorción en partículas de suelo y sedimentos de agua dulce y salada, con toxicidad moderada (Carod, E. 2002. Li, X et al., 2007), es considerado un contaminante emergente en sedimentos acuáticos (Jaglal, K. 2015. John, EM et al., 2015). Los microorganismos pueden degradarlo y utilizarlo como fuente de carbono y fósforo, generando 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) y dietiltiofosfato (DETF) en su proceso de hidrólisis (Tiwari, MK et al., 2014, Murcia, AM et al., 2008. Devine, GJ et al., 2008. Varona, M et al., 2012. Mohammad, HB et al., 2008. Kazemi, M et al., 2012).

Clorpirifos y su metabolito

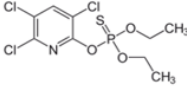
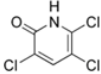
El Clorpirifos (CP) es un IOP clorado de amplio uso, baja solubilidad y fuerte absorción a las partículas de sedimentos, de toxicidad moderada y persistencia media, que genera un metabolito TCP (3,5,6-tricloro-2-piridinol), más hidrosoluble y persistente.

Figura 2. Estructuras del Clorpirifos y su metabolito 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP)



Nota. Construcción propia

Tabla 1. Características físicoquímicas de CP y TCP

	Clorpirifos (CP)	TCP
Nombre químico	O, O-diethyl O-[3,5,6-trichloro-2-pyridinyl phosphorothioate	3,5,6-trichloro-2-piridinol
		
# CAS	2921-88-2	6515-38-4
Solubilidad	2.0 mg/L at 25 °C	80.9 mg/L at 25 °C
Punto de fusión	41.5 - 42.5 °C	208 - 209 °C
Punto de ebullición	No tiene punto de ebullición a presión normal; se descompone a 160 °C.	254.8 °C
Presión de vapor	2.5 mPa at 25 °C	137.32 mPa at 20 °C
Peso molecular	350.6 g/mol	198.43 g/mol
Log K _{ow}	4.69	3.21

Nota. Construcción propia

La principal degradación del medio ambiente es 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP). Es menos tóxico que el clorpirifos. Un metabolito secundario es 3,5,6-tricloro-2-metoxipiridina (TMP) (EC2005). El clorpirifos también se puede oxidar a un activo metabolito, clorpirifos oxon (NMFS 2008). El oxon se forma rápidamente en agua clorada, pero también se degrada rápidamente a TCP (Duirk & Collette 2005). Clorpirifos oxon es aproximadamente 12 veces más tóxico que el clorpirifos (US EPA 2013a). Seis productos de degradación, incluido el clorpirifos oxon, se han identificado después de la electroquímica degradación de clorpirifos en aguas residuales (Robles-Molina et al., 2012).

Concentraciones de CP en diferentes ambientes

La concentración reportada en diferentes matrices ambientales para CP es 0.080-0.280 µg/L encontrada en aguas (Martínez et al., 2004), CP en aguas a 14.260 µg/L (Burga P. et al., 2009), en agua de ríos a 150-520 µg/L en 2010 (MOLINA et al., 2012; Benítez-Díaz & Miranda-Contreras, 2013), como CP en agua superficial de 0.016 mg/L (García Hernández et al., 2018), en suelo CP 0.015 µg/g y en sedimento de finca 2.850 µg/g, como en fresco, alimento de nopal CP 0.002 µg/g, camarón de granja 0.013 µg/g, CP en sedimentos

marinos frente a Cartagena en el Mar Caribe fueron 20-52 ng/g (RepCar, 2009), en tomate de 0.095-2.660 mg/kg y estar en naranjas (56%), uvas (35,4%), cítricos (29,6%) todo ello en escuelas primarias (García Hernández et al., 2018; Guerrero, 2003). Según la Alianza Salud y Medio Ambiente (HEAL, 2018) esto puede causar amenazas para la salud contaminando frutas y verduras (Ríos et al., 2017; Rey et al., 2018) y aguas (Sánchez et al., 2016; Fournier et al., 2019), aumentando el riesgo de contaminación a otros compartimentos ambientales como el aire, el suelo y la biota, afectando poblaciones de peces y otros organismos acuáticos que no son su objetivo, hasta llegar al ser humano por la cadena alimentaria (Feng, Y et al., 1997; Fournier et al., 2019); Schaaf, 2016; Muñoz y Lucero, 2017).

Con referencia a niveles ambientales para agua, no se detectó clorpirifos en encuestas de agua potable municipal y privada —suministros en Canadá entre 1971 y 1986— (Health Canadá, 1989). La EPA de EE. UU. (1998) ha informado de la detección de clorpirifos en aguas superficiales, la mayoría de los resultados están por debajo de 0,1 µg/litro y con un máximo informado concentración de 0,4 µg/litro. Se detectó en aguas subterráneas en menos del 1% de los pozos probados, con la mayoría de las mediciones por debajo de 0,01 µg/litro. Para alimentos, se detectó clorpirifos en solo 49 de las 6391 muestras de alimentos domésticos en los EE. UU., donde el 94% tenían concentraciones inferiores a 2,0 mg/kg (Hundley et al., 1988). Basado en encuesta de la canasta de mercado de EE. UU., se estimó que la ingesta diaria promedio de 0,241 µg (Gartrell et al., 1986).

Ingestas diarias máximas teóricas estimadas para las cinco regiones de SIMUVIMA/alimentos las dietas, basadas en los límites máximos de residuos existentes, estaban en el rango del 6 al 30% de ADI (FAO/OMS, 2000). Los valores directrices para IDA de 0,01 mg/kg de peso corporal establecida por la reunión de la JMPR de 1982 (FAO/OMS, 1983) se basó en un NOAEL de 0,1 mg/kg de peso corporal por día para inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa de eritrocitos en humanos. La JMPR de 1999 Meeting (FAO/OMS, 2000) afirmó esta IDA sobre la base del NOAEL de 1 mg/kg de peso corporal por día para inhibir la actividad de la acetilcolinesterasa cerebral en estudios en ratones, ratas y perros, utilizando un factor de seguridad 100 veces mayor y sobre la base de NOAEL de 0,1 mg/kg de peso corporal por día para la inhibición de eritrocitos actividad de la acetilcolinesterasa en humanos, utilizando un factor de seguridad de 10 veces. Debido a que el clorpirifos se usa como larvicida de mosquitos en cuerpos de agua, se siente deseable establecer un valor de referencia para el agua potable. Asumiendo una asignación del 10% de la IDA de 0,01 mg/kg de peso corporal al agua de bebida, el valor de referencia para clorpirifos es por tanto de 30 µg/litro.

Concentraciones máximas seguras de CP

Para conocer con mayor claridad el impacto de estas sustancias sobre el medio ambiente y los organismos vivos, las publicaciones referentes a concentraciones máximas seguras de CP reportadas en la literatura son LMR (Límites Máximos de Residuos) de 0.500 mg/kg para productos para consumo humano en Colombia (Guerrero, 2003). Las recomendaciones de la EPA para la protección infantil son concentraciones inferiores a 0,030 mg/L (ATSDR, 1997), el FDA con límite de tolerancia en productos agrícolas es de 0,050-15 mg/L (ATSDR, 1997), y el valor de referencia de clorpirifos es de 0,030 mg/L (OMS, 2006). Por su parte, MAC (Concentraciones máximas aceptables), establece 0,100 µg/L para clorpirifos (ríos, lagos, cuerpos de agua artificiales o altamente modificados) y criterios para la concentración tóxica de sustancias vertidas en agua dulce y salada, fijando valores guía de concentración tóxica para la vida acuática de 0.041 µg/L (García Hernández et al., 2018; Guerrero, 2003). Los valores de calidad acuática para la protección de la vida no deben exceder 0.025 µg/L (Starnner & Goh, 2013) y otros valores de referencia son los dados por la NOAA para aguas superficiales dulces (valor agudo de 0,083 µg/L y valor crónico de 0,041 µg/L), o aguas marinas (valor agudo de 0,011 µg/L y valor crónico de 0,006 µg/L) (NOAA, 2008; Mansano et al., 2017; Greenstein et al., 2008) (Tabla 2).

Tabla 2. Umbral de seguridad para Clorpirifos en diferentes entornos y aplicaciones

CONCEPTO	VALOR	ORGANIZACIÓN	BIBLIOGRAFÍA
Protección infantil	> 0.030 mg/L	EPA	ATSDR, 1997
Límites de tolerancia en productos agrícolas.	0.050-15 mg/L	FDA	ATSDR, 1997
Valores de referencia	0.030 mg/L	WHO	WHO, 2006
MAC (Máxima concentración aceptable). Ríos, lagos, masas de agua artificiales o muy modificadas.	0.100 µg/L		García, J et al. 2018 Guerrero, JA . 2003
Criterios de concentración tóxica de sustancias vertidas en agua dulce y salada, estableciendo valores guía de concentración tóxica para la vida acuática.	0.041 µg/L		García, J et al. 2018 Guerrero, JA . 2003
Valores de calidad acuática para la protección de la vida.	< 0.025 µg/L		Starnner, K et al. 2013
Valores en aguas dulces superficiales	Valor agudo: 0.083 µg/L Valor crónico: 0.041 µg/L	NOOA	Buchman, MF. 2008
Valores en aguas marinas	Valor agudo: 0.011 µg/L Valor crónico: 0.006 µg/L	NOOA	Buchman, MF. 2008

Nota. Construcción propia

Estos valores han sido desarrollados por varios estudios, donde se ha incluido el efecto ecotoxicológico de muchos compuestos en organismos unicelulares y multicelulares de diferentes niveles tróficos (eucariotas autótrofos y heterótrofos, procariotas heterótrofos) (Hassan et al., 2016), permitiendo fortalecer un grupo de análisis, llamados baterías de bioensayos (Mendonça et al., 2009), bioensayos *in vivo* o *in vitro* (Schipper et al., 2010); (Moura et al., 2012).

Tabla 3. Modelos para evaluar la toxicidad individual y en mezcla*

MODELO	VALOR**				ESCALA		REF.	
1. HAZARD OF PESTICIDES LC ₅₀ (mg/L)	0 verde	0 verde	1 amarillo	1 amarillo	2 naranja	3 rojo	0=Mínimo (>100)/Slight (10-100) 1=Moderado (1-10)/High (0.1-1) 2=Extremo (0.01-0.1) 3=Super (<0.01)	(Sabra et al., 2015)
2. ECOTOXICITY VALUES EC ₅₀ (mg/L)		0 verde	1 amarillo	2 naranja	3 rojo		0=No Tóxico (>100) 1=Nocivo a organismos acuáticos (10-100) 2=Tóxico (1-10) 3=Altamente Tóxico (<1)	(United Nations, 2011)
3. CATEGORIES OF TOXICOLOGICAL CLASSIFICATION TU = 1/EC ₅₀ *100 (mg/L)		0 verde	1 amarillo	2 naranja	3 rojo		0=No Tóxico (<1) 1=Tóxico (1-10) 2=Muy Tóxico (10-100) 3=Altamente Tóxico (>100)	(Schnell et al., 2013)
4. AQUATIC ACUTE TOXICITY EC ₅₀ / IC ₅₀ (mg/L)		0 verde	1 amarillo	2 naranja	3 rojo		0=Bajo (>100) 1=Moderado (10-100) 2=Alto (1-10) 3=Muy Alto (<1)	(Decison et al., 2014)
5. GLOBALLY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION (mg/L)		0 verde	1 amarillo	2 naranja	3 rojo		0=Nivel 4 (Nocivo a organismos acuáticos) >100 1=Nivel 3 (Nocivo a la vida acuática) 10-100 2=Nivel 2 (Tóxico a la vida acuática) 1-10 3=Nivel 1 (Muy Tóxico a la vida acuática) <1	(United Nations, 2011)

*Con Globally Harmonized System of Classification

**Construcción propia

Clorpirifos compuesto orgánico persistente global (COP)

Los contaminantes orgánicos persistentes (POPs), como los insecticidas organoclorados, son compuestos químicos tóxicos que afectan la salud humana y el medio ambiente, y se han encontrado en diferentes compartimentos como agua, suelo, sedimentos y biota, con alta capacidad de acumulación y adsorción en materia orgánica en ambientes acuáticos, especialmente en sedimentos y sólidos suspendidos. Los contaminantes en ecosistemas acuáticos se reparten en suelo, sedimento, interfase sedimento agua, agua intersticial, biota e interfase aire agua, lo que permite la exposición de organismos a dosis bajas y tiempos prolongados, como a concentraciones altas en aguas contaminadas. Los microcontaminantes

tienen alta relevancia en ecosistemas acuáticos por su gran potencial ecotoxicológico, en donde se ha evaluado el riesgo con organismos acuáticos usando bioensayos con bacterias, algas, microcrustáceos y peces (FAO, 2009; Rudolf S.S. et al., 2008; Schipper, CA et al., 2010; Seguí, X et al., 2013; Stuart, M, et al., 2012; Xiuting, H. et al., 2011).

Las propiedades de COPs, son:

1. Persistencia: Los criterios son:

- Pruebas de que la vida media de la sustancia química en agua es mayor a dos meses, o que su vida media en suelo es mayor que los seis meses, o que su vida media en sedimentos es mayor que seis meses.
- Pruebas de que la sustancia química es de alguna otra forma suficientemente persistente como para justificar que sea incluida.

El clorpirifos no cumple con los umbrales de criterio anteriores, con excepción de la estadística de EPA de Estados Unidos en Comité de Revisión de COPs sobre vida media en suelos. Sin embargo, estadísticas adicionales reflejan que en varios estudios los umbrales de persistencia se cumplen tanto para suelo como para agua, y estudios de modelación indican que los criterios de persistencia se cumplen bajo condiciones del Ártico.

Los criterios de la Convención de Estocolmo aseguran con evidencia de que CP es suficientemente persistente. La persistencia en suelo por varios reportes va de unos pocos días hasta 4 años, en dependencia de la tasa de aplicación, el tipo de ecosistema y factores ambientales, en donde la vida media de disipación es significativamente más larga en suelos orgánicos que en suelos minerales (Gebremariam et al., 2012; Racke et al., 1994) de la Dow Chemical, fabricante de clorpirifos, encontró vidas medias de 175, 214, 230, 335, y 1.576 días en cinco suelos de diferentes estados de Estados Unidos, en estudios de laboratorio de disipación bajo condiciones estándar de laboratorio (25°C, oscuridad, capacidad de humedad de terreno) con tratamientos termiticidas, con tasas de aplicación más altas que las usadas en agricultura de 738-897 µg/gm. Baskaran et al., (1999) encontraron una vida media de clorpirifos de 462 días en suelo australiano de tierra rojiza-café bajo condiciones de laboratorio de temperatura constante de 25°C y humedad (60% de capacidad de retención máxima de agua), y tasas de aplicación de termiticida de 1000 mg/kg, encontrando que la descomposición hidrolítica de clorpirifos es más rápida en condiciones alcalinas.

Para sedimento y agua, los valores tienen afinidad mayor para sedimentos acuáticos que para suelos (Gebremariam et al., 2012). Una revisión de destino ambiental de la industria química Dow (Racke 1993) da un DT₅₀ de 150 a 200 días, en sedimentos anaeróbicos de arroyos, mientras que el gobierno australiano (NRA 2000) encontró 200 días, excediendo los criterios de persistencia de la Convención de Estocolmo. Para humedales construidos en busca de remoción de clorpirifos y piretroides provenientes de escurrimientos de agua de riego agrícola en California, demostró que el DT₅₀ de 106 es de más de 54 días (Budd et al., 2011).

La persistencia de clorpirifos, bajo condiciones tropicales, parece ser similar a la de endosulfan en un estudio de microcosmos de agua/sedimentos. Laabs et al., (2007) encontró que clorpirifos y endosulfan tenían DTs similares y podían ser considerados como moderadamente persistentes (clorpirifos=36.9 días; alfa endosulfan= 20.4 días; beta endosulfan = 63,6 días). La degradación de clorpirifos es significativamente más lenta en agua de mar que en agua fresca. Un estudio en California encontró un DT₅₀ de 49.4 días a 10°C para agua de mar, de manera que la temperatura tiene un efecto importante en la degradación de agua de mar (Bondarenko et al., 2004).

2. Bioacumulación: los procesos regulatorios no han requerido estudios de bioacumulación para clorpirifos, habiendo pocos estudios de bioacumulación en una variedad de especies, reportando un valor de 5.100 para el factor de bioacumulación en peces, excediendo de esta manera el valor del umbral de 5.000. Además, la mayor parte de los valores reportados de log Kow cumplen o exceden el umbral de 5, e incluso el valor más bajo (4.7) es más alto que el que registra el COP lindano, ya registrado (3.5), habiendo suficiente evidencia de que clorpirifos cumple con los criterios de evidencia fijados como sustancia química bioacumulativa.
3. Transporte de largo alcance: la vida media atmosférica, basada en condiciones templadas no cumple con el umbral fijado, sin embargo, la falta de radiación ultravioleta y de humedad atmosférica característicos del Ártico puede explicar el largo rango de transporte observado en clorpirifos a pesar de su generalmente asumida corta vida media atmosférica. Clorpirifos ha sido medido de forma sistemática en el Ártico en hielo, nieve, bruma, aire, agua de mar, sedimento lacustre, peces y vegetación, en niveles tan significativos que algunos científicos han comentado que podría tener efectos dañinos en la biota, especialmente

los organismos acuáticos. Hay suficiente evidencia de que clorpirifos cumple con los criterios y que tiene el potencial para transporte ambiental de largo alcance.

4. Efectos adversos.

Genotoxicidad y mutagenicidad: la estadística es variada, pero diversos estudios recientes indican que clorpirifos es mutagénico o genotóxico en seres humanos, ratas, ratones, hámster chino, renacuajos, peces, mosca de la fruta y células de plantas.

Cáncer: los estudios de laboratorio no han indicado cáncer, salvo por aquellos que muestran la multiplicación de células humanas de cáncer mamario. Sin embargo, hay un número considerable de estudios epidemiológicos que indican una asociación entre exposición a clorpirifos y cáncer, especialmente cáncer de pulmón y recto.

Toxicidad del sistema inmunológico: hay evidencia de toxicidad al sistema inmunológico, incluyendo efectos en linfocitos, timocitos, células T, factor de necrosis de tumor, y autoinmunidad.

Toxicidad para el desarrollo: clorpirifos es una neurotoxina para el desarrollo muy potente en bajos niveles de exposición, por debajo de los niveles que gatillan la inhibición fetal de la colinesterasa. Esto se ha demostrado en muchos estudios de laboratorio y en varios estudios epidemiológicos recientes. Las exposiciones *in utero* y en la niñez temprana pueden llevar a anormalidades de comportamiento en la adolescencia y la vida adulta. Estudios epidemiológicos encontraron retraso en el desarrollo cognitivo y psicomotor, y disminución del IQ.

Toxicidad acuática: clorpirifos es muy tóxico, de forma crónica y aguda, para organismos acuáticos. Causa descoordinación motora, retraso en la maduración, daño al crecimiento y la reproducción, deformidades, y disminución de las poblaciones. Es genotóxico, inmunotóxico, y alterador endocrino, embriotóxico, teratogénico y neurotóxico para el desarrollo.

Alteración endocrina: clorpirifos inhibe el metabolismo de la testosterona y el estradiol, y la síntesis de la testosterona. Es anti-androgénico y estrogénico, induce crecimiento de las células de cáncer mamario, y representa un riesgo de cáncer mamario vía sus acciones endocrinas. Clorpirifos disminuye los niveles de suero de cortisol y de la hormona tiroides T4, induce alteraciones en la glándula tiroides y las suprarrenales y afecta en forma diferencial en hombres y mujeres, los niveles hormonales de estimulación de la tiroides.

Toxicidad reproductiva: los efectos teratogénicos en estudios en animales incluyen malformaciones de la columna vertebral, reducción de las extremidades delanteras y traseras, falta de desarrollo de la columna, ausencia de vértebras torácicas, y paladar hendido; en seres humanos, las malformaciones de cerebro, ojos, oídos, paladar, dientes, corazón, pies, pezones y órganos genitales se han asociado a la exposición genital a clorpirifos. Otros efectos en animales incluyen disminución del peso y viabilidad fetal, aumento de la muerte del feto y de la reabsorción temprana, disminución de la motilidad y cantidad de los espermatozoides, disminución en la capacidad y viabilidad para el desarrollo de ovocitos. En los seres humanos la exposición a clorpirifos se asocia con disminución del peso y estatura al nacer; daño al ADN del espermatozoide y disminución de la concentración y motilidad del espermatozoide. Se ha encontrado clorpirifos en varios tejidos reproductivos del ser humano, incluyendo fluido cervical y semen, cordón umbilical, meconio y leche materna.

Neurotoxicidad para el desarrollo: clorpirifos es una potente neurotoxina para el desarrollo a niveles bajos de exposición, inferiores a aquellos niveles que gatillan la inhibición de la colinesterasa fetal. Esto se ha demostrado en numerosos estudios de laboratorio y varios estudios epidemiológicos recientes. Las exposiciones *in utero* y en la niñez temprana pueden llevar a anormalidades de comportamiento en la adolescencia y la edad adulta. Estudios epidemiológicos encontraron retraso del desarrollo cognitivo y psicomotor, y disminución del IQ.

Ecotoxicidad: la reevaluación de clorpirifos hecha por EPA de USA (2009A). Identificó preocupaciones sobre riesgos agudos y crónicos para pájaros, mamíferos, vertebrados terrestres, peces y vertebrados acuáticos. El clorpirifos es crónico y agudamente tóxico para organismos acuático; causa ataxia, maduración retrasada, daño al crecimiento y la reproducción, malformaciones y disminución de las poblaciones. Es genotóxico, inmunotóxico, y alterador endocrino, embriotóxico, teratogénico y es un neurotóxico para el desarrollo.

Hay suficiente evidencia de que el clorpirifos cumple con los criterios de evidencia de la Convención de Estocolmo respecto de que la sustancia química causa efectos adversos.

Ecotoxicología acuática

La ecotoxicología estudia los riesgos de contaminación del ambiente, detectando, identificando y valorando su grado de toxicidad, abarcando estudios clínicos, analíticos o experimentales. La ecotoxicología aplicada desarrolla protocolos de ensayo para usarse como herramienta de predicción temprana, en donde con organismos estándar se establecen límites de control dentro de las características de peligrosidad de las sustancias químicas tóxicas, usando criterios de riesgo de toxicidad, que las clasifica en agudas, crónicas y ecotóxicas.

La ecotoxicología acuática evalúa la calidad del agua y normaliza la contaminación para predecir el efecto de las sustancias químicas sobre organismos vivos, estudiando la respuesta fisiológica, bioquímica o inmunológica de organismos modelo. Para evaluar la calidad química del agua se tiene en cuenta la concentración máxima persistente, además de la concentración permisible o segura para el uso o exposición destinada, en donde el enfoque ecotoxicológico estima esta calidad, usando organismos como indicadores del cambio ambiental acuático. El monitoreo ambiental de sustancias químicas con potencial tóxico en el ambiente es retrospectivo y estudia efectos biológicos en los que se incluyen ensayos de toxicidad, monitoreo biológico de campo y medición de parámetros químicos convencionales. Para un monitoreo en contexto de evaluación de riesgos de productos químicos, uno de los objetivos es evaluar los efectos adversos. La evaluación de riesgo ambiental en sistemas acuáticos estudia la exposición en agua de organismos, evaluando efectos acuáticos, caracterización, estimación y reducción del riesgo, en donde se requiere más capacidad técnica en pruebas de toxicidad y análisis de exposición, como mayor investigación en métodos de evaluación que sustituyan animales y se promuevan los estudios de ecotoxicología ecológica (ONU, 2011; PNUMA/IPCS, 1999; Rudolf S.S. et al., 2008; Wang, F et al., 2010; Xiuting, H. et al., 2011).

Ecosistemas acuáticos y niveles tróficos

En ecosistemas acuáticos costeros se pueden aplicar estrategias de prevención de la contaminación y gestión de los sitios contaminados por compuestos químicos (Laane, R. et al., 2011; República de Colombia, MAVDT, 2005). En las medidas de control a este problema de contaminación

de aguas y sedimentos costeros por insecticidas recurrentes, se tienen en cuenta los procesos de degradación de plaguicidas, que son determinantes en la fase ambiental para su persistencia y toxicidad (Narváez, JM et. 2012).

La cadena trófica es la representación gráfica de la transferencia de energía a través de una serie de organismos, mientras que la red trófica es la representación gráfica de las interrelaciones existentes entre esas cadenas tróficas. Una red trófica es el mapa de las interrelaciones entre la estructura de una comunidad ecológica, su estabilidad y los procesos que ocurren dentro de un ecosistema. Se trata de la forma más elemental y efectiva de visualizar una comunidad, ya que las interacciones alimenticias permiten mapear el flujo de materiales y nutrientes, identificando las relaciones tróficas importantes a fin de definir una estructura que pueda ser comparada con otros ecosistemas. Desde el punto de vista de su estructura o topología, las redes tróficas están constituidas por nodos, eslabones y niveles tróficos.

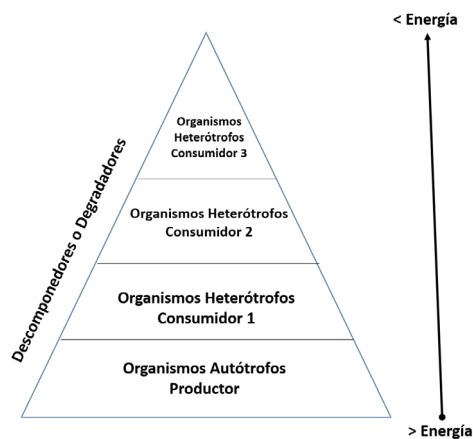
Los nodos son la representación de las especies o trofoespecies presentes, siendo estas últimas un agregado de especies que comparten depredador y/o presa en una red trófica. La suma de los nodos equivale a la riqueza de especies componentes (S). La riqueza de una red trófica no es función sólo de la riqueza biológica de una comunidad, sino del nivel de resolución adoptado para la definición de las trofoespecies. Mientras que los eslabones representan las relaciones entre nodos y cuando son direccionales, el sentido de la flecha siempre señala el sentido del flujo de energía.

Los niveles tróficos, que son grupos de especies o trofoespecies de una comunidad que ocupan un lugar equivalente en la red trófica, siendo los niveles básicos los productores, consumidores y descomponedores. Por su parte, la posición trófica es una variable continua que cuantifica el número de pasos o transferencias tróficas, es decir, determina cuántas veces la biomasa consumida por un organismo es procesada metabólicamente dentro de la cadena alimenticia. El nivel trófico indica la transformación en energía química de la dieta de un consumidor en biomasa a lo largo de la cadena, energía que está siendo transferida inicialmente de los productores primarios a los consumidores primarios, de los consumidores primarios a los consumidores secundarios, de los consumidores secundarios a los consumidores terciarios y así sucesivamente, en donde normalmente son considerados un máximo de cuatro niveles tróficos en un ecosistema.

El análisis de las redes tróficas permite obtener información de la estructura de los ecosistemas en tres diferentes niveles: individual, intermedio y de grupo. A nivel individual las medidas pueden describir la posición de una especie dentro de la red, así como su potencial efecto sobre otras especies de esta. En este caso, uno de los indicadores más importantes es el grado de centralidad, el cual se refiere al número de contactos directos que tiene una especie en la red, y se dividen en grados de entrada y grados de salida que dependen de la dirección del flujo. Los grados de salida son la suma de relaciones que una especie dice tener con las demás especies que conforman la red, es decir cuántas especies o grupos se la comen (Acero, A et al., 2012).

Para entender la dinámica de un ecosistema, es fundamental conocer la estructura y función de las comunidades que lo componen. Se han desarrollado diversos enfoques metodológicos para cuantificar la magnitud de las relaciones entre las especies o grupos de especies, y evaluar la importancia relativa que cada componente tiene en el mantenimiento general del sistema. Estos enfoques permiten estudiar los atributos relacionados con los flujos de energía que se mueven dentro de una red trófica, la dirección y magnitud del tránsito de la biomasa y el impacto recíproco entre las especies ante una perturbación externa; todos ellos representados e interpretados en un contexto de gestión de recursos naturales (Cruz, H et al., 2013; Beltrán, JE, 2008).

Figura 3. Niveles tróficos en ecosistemas



Nota. Construcción propia

La zona litoral de los ecosistemas leníticos continentales ofrece mayor cantidad de hábitats en comparación con la zona limnética, de ahí que la riqueza de especies en dicha zona sea también más alta. En general, los estudios sobre cadenas tróficas en los lagos son realizados con base en muestreos en la zona limnética, hecho que limita el análisis de las interacciones que existen entre los diferentes compartimientos de estos ecosistemas. Claramente la zona que ha concentrado la atención en los estudios ecológicos ha sido la limnética, dejando de lado las zonas riparia, litoral y bentónica, a menudo concebidas únicamente como fuente o sumidero de nutrientes y no como parte integral de las cadenas tróficas. Por tales razones, se encuentra necesario incluir en nuevos estudios muestreos en varias zonas de los ecosistemas leníticos y, de manera especial, abordar las zonas litorales con influencia de macrofitos acuáticos, ya que muchas de las interacciones bióticas que son críticas para la integridad de estos ecosistemas ocurren en estas zonas (Pedroza, A et al., 2016; Cagiga, E, et al., 2003).

Contaminación acuática

La contaminación del agua es una preocupación para la salud de los ecosistemas acuáticos, siendo de interés para la investigación la resolución de estos problemas. Los países generalmente consideran la contaminación del agua no tanto como un problema de salud, sino más bien una cuestión de conservación, estética y preservación de belleza y recursos naturales. Sin embargo, los lagos, los ríos y los arroyos han sufrido y siguen sufriendo los efectos de la contaminación del agua. Además, los problemas asociados con la contaminación del agua han empeorado en muchos países, especialmente en los de vía de desarrollo.

Las principales fuentes de contaminación del agua son inorgánicas y orgánicas, generadas por residuos sólidos, líquidos y gaseosos, generados por la industria y las viviendas, pudiendo haber compuestos de petróleo, residuos municipales, residuos agrícolas, pesticidas y drenaje ácido de minas.

Las aguas costeras cercanas a estuarios y grandes centros urbanos e industriales tienen alto riesgo de contaminación. Las descargas no controladas por desechos industriales, agrícolas y urbanos a cuerpos naturales de agua están aumentando las concentraciones de sustancias químicas, afectando el ambiente acuático y la salud humana, por lo que aumenta el

riesgo de exposición. Es por esto, que la contaminación ambiental y el uso de sustancias químicas son considerados peligros modernos, y necesitan ser identificados en el entorno.

En ecosistemas acuáticos costeros, el estado ecológico y ambiental, tiene consecuencias en la sostenibilidad de recursos y exposición humana, lo que permite tener en cuenta el mantener un buen estado químico, donde se pueden aplicar estrategias de prevención de la contaminación o de gestión de los sitios contaminados, priorizando y seleccionando opciones. La contaminación marina representa un gran problema para el ser humano y el medio ambiente, y la complejidad de ecosistemas marinos y costeros necesita la integración de protocolos de evaluación para el manejo del riesgo.

Los biomarcadores son medidas funcionales de exposición a estresores expresados a nivel de suborganismo, fisiológico y comportamental (Galloway, TS. 2006; Laane, R. et al., 2011; República de Colombia, 2005; República de Colombia, 2010; Vargas, F. 1996).

Interacciones en ecosistema acuático

Las acciones de los tóxicos individuales se ven afectadas por muchos factores, como portales de entrada, modo, metabolismo y otros descritos anteriormente. Sin embargo, los organismos generalmente están expuestos a una mezcla compleja de diferentes contaminantes.

La exposición simultánea a más de un tóxico puede tener un impacto dramático sobre el resultado de la exposición. Los tóxicos pueden interactuar para producir aditivos, efectos de potenciación, sinérgicos o antagonistas. Los factores que afectan los resultados de la exposición son complejos e incluyen, entre otras, las características de los productos químicos y la condición fisiológica del organismo (Cabrera, JM. et al., 1995; Castillo, G. 2000; DSA, 2011; Ordóñez, G. 2000; República de Colombia, 2005).

Se produce una interacción aditiva donde los efectos combinados de dos compuestos son simplemente aditivos. Sinergismo, sin embargo, describe una toxicidad combinada que es mayor que el simple efecto aditivo de dos compuestos. Potenciación describe el sinergismo donde generalmente se supone que un compuesto tiene poca o no tiene toxicidad intrínseca cuando se administra solo (con sinergismo, pues ambos los compuestos tienen una toxicidad apreciable cuando se administran por

separado). El *antagonismo* se refiere a una situación en la que la toxicidad de dos o más químicos presentes es menor de lo que cabría esperar si los productos químicos se administraran por separado. El antagonismo puede deberse a características químicas o físicas de los contaminantes, o puede deberse a las acciones biológicas de los productos químicos involucrados (FAO, 2009).

Toxicidad acuática

La toxicidad acuática de los productos químicos es uno de los principales aspectos del reglamento REACH (Reglamento CE 1907/2006) y un parámetro importante para la evaluación de sustancias. De hecho, el agua es el constituyente principal de todos los seres vivos y en la mayoría de ellos constituye más del 70% de peso mojado. Se producen muchas transferencias de energía, difusión de sustancias y reacciones enzimáticas en aguas; por esta razón tiene una preocupación biológica preeminente. Por tanto, la evaluación de la ecotoxicidad en organismos acuáticos es un paso fundamental en toda la evaluación y proceso de una sustancia química. En las pruebas de ecotoxicidad, los organismos están expuestos a diferentes concentraciones de productos químicos/contaminantes que pueden asumirse mediante la respiración o los tegumentos; entonces los mecanismos de reparto de equilibrio entre el agua y los compartimentos de absorción tienen lugar con el resultado de un aumento progresivo del tóxico en el organismo (bioconcentración).

Después de la absorción, el tóxico está sujeto a la distribución y también a los procesos metabólicos, en cuanto a excreción; por estas razones es difícil estimar la concentración interna de tóxicos y convencionalmente la toxicidad se cuantifica en términos de concentración de la sustancia en el medio (Gaggi, 1998; Paoletti et al., 1998). En particular, en ecotoxicología, cuando se presentan los acuáticos, especialmente los invertebrados, es muy difícil estimar la cantidad de tóxico asumido en el cuerpo; entonces, este parámetro es desconocido, pero se conoce la concentración del tóxico en el agua. De todos modos, también se consideró que a los vertebrados (peces o mamíferos) el tóxico puede administrarse directamente en el cuerpo (sangre y/o músculo) y, por lo tanto, ciertamente se conoce su cantidad. Entonces, estos dos casos son notablemente diferentes y en el

primer caso se pueden expresar los resultados como LC50 (Concentración letal), mientras que en el segundo como LD50 (Dosis letal) las pruebas se pueden subdividir en agudas y crónicas.

La toxicidad aguda se refiere a experimentos, por ello se lleva a cabo durante horas o días y generalmente se expresa como LC50, que corresponde a la concentración capaz de reducir la supervivencia de los organismos expuestos hasta en un 50%, o CE50, que corresponde al resaltado de un efecto adverso medible como la inmovilización. La toxicidad crónica se refiere a una exposición a largo plazo (semanas, meses) y teóricamente puede ser extendido durante todo el ciclo de vida de los organismos; los puntos finales actuales son el NOEC (Concentración sin efecto observado) y LOEC (Concentración con efecto mínimo observado) que generalmente consideran la supervivencia, el crecimiento y la reproducción. El reglamento recomienda utilizar métodos estandarizados, pero también protocolos no estandarizados bien descritos o los métodos modificados pueden ser aceptables.

Los análisis toxicológicos evalúan toxicidad por ensayos en organismos, mientras que la evaluación toxicológica de productos químicos usa bioensayos que valoran el efecto de una matriz ambiental o mezcla compleja sin necesidad de saber el tipo de sustancias químicas; estos ensayos de toxicidad incluyen pruebas que evalúan el efecto de los organismos sobre las sustancias. Hoy, los bioensayos monoespecie son aplicados en protocolos para evaluación de riesgo ambiental, pudiéndose aplicar bioensayos multiespecies en microcosmos y mesocosmos.

En la caracterización de la exposición y efecto, se requiere el uso de métodos más efectivos para su identificación y cuantificación, lo que requiere mayor desarrollo y uso de biomarcadores. Tradicionalmente los biomarcadores dan información del efecto tóxico de los contaminantes, lo que representa la evaluación de riesgo ambiental, que se complementa con un biomonitoreo, determinando los niveles de contaminantes que contribuyen a programas de monitoreo ambiental global; los biomarcadores tienen el potencial de detectar ocurrencias tempranas dando información sobre la calidad del medio ambiente con un enfoque de evaluación de la calidad ambiental acuática (Cagiga, E. et al., 2003; Laane, R. et al., 2011; Castillo, G. et al., 2000; Sánchez, P; Vargas, F, 1996; Xiuting, H. et al).

Estudios ecotoxicológicos en sistemas acuáticos

Efectos de CP Toxicidad Aguda

Para desarrollar ensayos de toxicidad acuática (SR Silva et al., 2019) se utilizan diferentes especies de vertebrados, macroinvertebrados, invertebrados, microorganismos y plantas, con métodos tradicionales (ensayos agudos y crónicos, como estimación de estos) y otros métodos (rápidos, biotest y modificado) (Mitchell et al., 2002); (Halmi, 2016) que habían sido desarrollados para una variedad de aplicaciones analíticas, tales como: soluciones acuosas en laboratorio, muestras de agua dulce y marina (Ramírez & Mendoza, 2008), evaluación ecotoxicológica de la calidad del agua marina (Losso & Ghirardini, 2010), bioensayos de agua basados en plantas (Siddiqui et al., 2011); (Iqbal et al., 2019), corriente de agua y aguas residuales (Hassan et al., 2016), ecotoxicología acuática y calidad del agua (Li et al., 2019), calidad ecotoxicológica para aguas de riego (Tamayo et al., 2019), análisis ecotoxicológico en acuarios (Tancredo et al., 2019), prueba ecotoxicológica de la calidad del agua en estuario urbano tropical (Nilin et al., 2019), ecotoxicidad aguda en unidades de tratamiento de aguas residuales (de Souza Celente et al., 2020); (Nazir et al., 2019), estudio ecotoxicológico sistemático en diferentes niveles tróficos acuáticos (Lomba et al., 2020).

Con el fin de evaluar el riesgo ecotoxicológico en ambientes acuáticos, se encuentra en la literatura el uso de varios organismos modelo para pruebas de ecotoxicidad aguda y crónica que evalúan riesgos ambientales (Vestel et al., 2016), evaluación de ecotoxicidad en ambientes acuáticos (Kováts et al., 2019), evaluación de riesgos ambientales en comunidades planctónicas (Parra Anguita et al., 2019), evaluación de riesgos ecotoxicológicos en aguas superficiales (Peteffi et al., 2019), evaluación de toxicidad biológica y seguridad en la remediación de un río (Xu et al., 2020). Además de lo anterior, los modelos para evaluar la toxicidad individual encontrados en la literatura con escalas numéricas de menor a mayor toxicidad como clasificación de peligro de plaguicidas (Sabra et al., 2015), valores de ecotoxicidad (Nations, 2011), categorías de clasificación toxicológica (Schnell et al., 2013), toxicidad acuática aguda (Decisión et al., 2014) y sistema globalmente armonizado de clasificación para toxicidad individual y mixta que genera niveles de menor a mayor toxicidad (Nations, 2011), que permiten claramente mostrar el impacto y las condiciones de seguridad de diferentes ambientes acuáticos.

Sin embargo, la evaluación de la (eco)toxicidad aguda en ambientes ha utilizado organismos modelo como *Daphnia*, *Aliivibrio fischeri* (*Vibrio fischeri*) y *Raphidocelis subcapitata* (*Pseudokirchneriella subcapitata*), que son representativos de ecosistemas acuáticos, cuyas pruebas están estandarizadas para evaluar la ecotoxicidad (Maselli et al., 2015; Mendonça et al., 2009) y que son eficaces, simples, fáciles de cultivar, reproducibles, sensibles y rentables (Urbanczyk et al., 2007; Maselli et al., 2015; Estándar, 2012; Moore et al., 1998).

El clorpirifos presenta una toxicidad moderada para varios organismos (Carod, B, 2002), donde a bajas concentraciones es altamente tóxico para peces, invertebrados acuáticos y organismos estuarinos (Zhao et al., 2017). El TCP es más tóxico que el CP y su mezcla, categorizado como moderado con posible efecto sobre los microorganismos (Feng, et al., 1997), o en otros casos, considerado altamente tóxico debido a una mayor solubilidad en ecosistemas terrestres y acuáticos (Wang, S et al., 2019). Las mezclas equitóxicas encontradas en la literatura, que incluyen clorpirifos con otros insecticidas o herbicidas organofosforados, muestran efectos aditivos y sinérgicos en modelos de insectos y anfibios (Iannacone et al., 2011), mientras que una mezcla de CP y TCP actúa de forma aditiva (Cáceres et al., 2007). Este estudio tiene como objetivo evaluar la toxicidad aguda de CP, TCP y CP puros en productos comerciales, como su efecto sobre una mezcla equimolar de CP y TCP (efecto aditivo, efecto sinérgico y, efecto antagonista), en los modelos biológicos estandarizados *Aliivibrio fischeri* (bacterias heterótrofas marinas luminiscentes), *Pseudokirchneriella subcapitata* (microalgas autótrofas unicelulares) y *Daphnia magna* (invertebrados crustáceos heterótrofos) y comparando los resultados presentados con diferentes modelos de evaluación de toxicidad encontrados en la literatura.

Ensayos *in vivo* e *in vitro*

La toxicología del siglo XXI debe profundizar en el análisis *in vitro* con relevancia *in vivo*, adquiriendo conocimientos mecanísticos de eventos toxicológicos para la identificación de biomarcadores. La implementación de tecnologías ómicas son esenciales para conocer vías y eventos claves de toxicidad en organismos y sistemas biológicos, en donde la toxicogenómica adquiere gran relevancia. Se buscan nuevas vías de establecer el nivel de no efecto, lo que hace posible monitorear el efecto a bajas concentraciones del compuesto, mostrando la información en la identificación del peligro y la evaluación del riesgo (Andersen, ME et al., 2009).

Los desafíos en ecotoxicología para el siglo XXI se direccionan hacia un realismo ecológico de evaluación de exposición y efecto, en donde haya fortalecimiento basado en ecología, con énfasis en efectos ecológicos indirectos, respuestas a múltiples estresores, vulnerabilidad de ecosistemas, modelamiento ecológico, evaluación de riesgo ecológico basado en ecología, incremento en la aplicación de las ómicas en ecotoxicología (genómica, proteómica y metabolómica), entre otros (Vighi, M et al., 2013).

Las técnicas omicas proveen una fuente potencial para la selección de biomarcadores y bioindicadores usando ensayos *in vitro* (Edwards, SW et al., 2008). La toxicogenómica es la integración de las tecnologías ómicas, la bioinformática y la toxicología, y ha sido limitada a una descripción cualitativa de alteraciones en niveles de transcripto, proteínas o metabolitos, con poca correlación toxicológica o contribuir a elucidar mecanismos de toxicidad. Los altos desarrollos en modelos computacionales y en herramientas mecanicísticas permiten abordar la identificación de biomarcadores de exposición, identificación de biomarcadores de toxicidad, extrapolación de especies, identificación de especies sensibles y análisis de toxicidad de mezclas, y una necesidad sentida es la integración de las ciencias ómicas (Boverhof, DR et al., 2006); así mismo, la toxicogenómica ha permitido el aumento del número de datos, comparado con la toxicología tradicional de ensayos *in vitro* e *in vivo*, contribuyendo a la identificación de múltiples modos de acción (MOA) y la comprensión de pasos mecanísticos involucrados en la toxicidad química, donde las tecnologías ómicas (datos de microarrays, rtPCR, proteómica y metabolómica) son aplicadas en el *screening* y priorización de programas (Wilson, VS et al., 2013).

La ecotoxicogenómica acuática, donde hay una comprensión más realística, permite el desarrollo de nuevos biomarcadores de exposición y de efecto adverso, que sustentan una evaluación de riesgo ecológico (Miracle, AL et al., 2005). La ecotoxicogenómica ayuda en la práctica de la evaluación del riesgo ecotoxicológico del suelo (van Gestel, 2012). Las técnicas toxicogenómicas (proteómica y metabolómica) se vinculan en la investigación de la toxicología acuática, basadas en puntos finales en programas de monitoreo ambiental y modelamiento ecológico con el fin de predecir efectos a nivel poblacional (Martinyuk, CJ et al., 2011).

La aplicación de bioensayos *in vitro* e *in vivo* en la evaluación de peligro toxicológico, y evaluación de riesgo e impacto en sedimentos, ha crecido en los últimos años, enfocados en la determinación rápida de peligro o

potencial de toxicidad (Scheerer, S et al., 2006). La evaluación de riesgo ecológico se ha basado en puntos finales de toxicidad aguda (EC_{50} y LC_{50}) en diferentes organismos de diferentes niveles tróficos, pero son insuficientes para evaluar el riesgo asociado con muchas clases de químicos, lo que ha permitido la introducción de técnicas moleculares avanzadas (perfiles transcripcionales y chips de DNA), como alternativa al uso masivo de bioensayos con animales. Los chips de DNA son capaces de identificar nuevos genes biomarcadores discriminadamente, pudiéndose construir reporteros celulares, que facilitan la evaluación de riesgo ecotoxicológico (ecotoxicogenómica).

El sistema acuático es el último reservorio de contaminantes, por lo que la ecotoxicología acuática es un elemento muy importante en ERA, en donde organismos acuáticos de diferentes niveles tróficos como algas, dafnidos y peces endógenos son organismos modelo obligados para ERA (Robbens, J et al., 2007).

Los nuevos biomarcadores dados por la toxicología genética (la toxicogenómica y proteómica), proveen de herramientas en la investigación del riesgo y su evaluación con relación a los contaminantes ambientales (Liu, SS et al., 2009). La toxicogenómica basada en biomarcadores de exposición y toxicidad están siendo usados en programas *screening*, permitiendo estratificación de poblaciones e identificando grupos sensibles (Boverhof, DR et al., 2006).

Batería de organismos acuáticos

Organismos de prueba en toxicidad acuática: En los ensayos de toxicidad acuática, los organismos procarióticos, las algas, las plantas y los animales se utilizan como especies de prueba. Una especie de prueba debe mostrar sensibilidad a un agente de estrés, sufriendo alteraciones de vitalidad, de funciones, inhibición del crecimiento, trastornos reproductivos y metabólicos.

La elección de una especie de prueba no es fácil, porque cada especie tiene su propia sensibilidad y, por lo tanto, proporciona una respuesta diferente. Es conocer la especie de prueba, que implica el conocimiento del ciclo de vida, tasa de mortalidad natural de la población y tasa de mortalidad de las primeras etapas para evitar interferencias en la mortalidad por

estrés tóxico. Frente a la respuesta, las especies que pueden sobrevivir y se reproducen en diversas condiciones ambientales son más tolerantes a los tóxicos que las especies adaptadas para vivir en condiciones definidas.

La investigación sobre el empleo de organismos animales en ecotoxicología ha tenido un notable impulso durante las últimas dos décadas, y varias especies se han utilizado en pruebas ecotoxicológicas; por lo tanto, la lista de especies que se ha propuesto y que tienen un papel en la ecotoxicología es muy larga y todavía está en progreso.

Hasta la fecha, en ecotoxicología se tiene como principio que la toxicidad potencial de una sustancia puede ser evaluada solo con baterías de pruebas de ecotoxicidad. Cada batería debe tener al menos tres especies de prueba con etapas de vida bien definidas; la prueba debe realizarse teniendo en cuenta los diferentes niveles de la red alimentaria; por lo tanto, es esencial utilizar un productor primario, como un alga unicelular, un consumidor primario, filtradores invertebrados y un consumidor secundario, como las larvas de peces. También un saprótrofo/saprófito y un alimentador de detritos debe incluirse entre las especies consideradas. De igual forma, es posible obtener resultados útiles mediante sistemas *in vitro*, como cultivos celulares de células de pez u otras. Finalmente, la batería de prueba debe tener una buena sensibilidad y una potencialidad discriminatoria para responder lo mejor posible a los contaminantes.

Entre los organismos acuáticos, los *crustáceos* tienen un papel clave en el medio ambiente por su posición intermedia en la red alimentaria y también por su amplia distribución y alta densidad; por esta razón, en las pruebas ecotoxicológicas se han propuesto varias especies de crustáceos y tienen un amplio empleo, tanto en agua dulce como en agua marina.

Utilización de crustáceos en ecotoxicología: los pequeños crustáceos son un eslabón importante dentro de la red alimentaria y juegan un papel importante como consumidores primarios y, a veces, también como consumidores secundarios, por lo que son elegibles para ser utilizados en evaluaciones ecotoxicológicas; de hecho, conectan los flujos energéticos entre los productores primarios (principalmente algas) y los consumidores de niveles superiores (como peces) y, por lo tanto, se colocan en un nivel clave en la red alimentaria. Hasta la fecha solo el Cladoceran de agua dulce *Daphnia magna* está aprobado como crustáceo adecuado para ensayos acuáticos en ecotoxicología de agua dulce.

Crustáceos de agua dulce: Daphnia magna es la especie de prueba más importante en ecotoxicología de agua dulce. La reproducción partenogénica en *Daphnia* permite tener idénticas especímenes útiles para la prueba. Durante la partenogénesis, las hembras producen huevos no fertilizados, de los cuales solo nacen las hembras. Durante condiciones ambientales adversas (extremas temperaturas, aumento de la densidad de población, acumulación de productos de excreción, escasez de alimentos disponibilidad) también se producen machos; estos machos fertilizan huevos particulares (huevos en reposo) que luego son transportados por las hembras a una estructura particular conocida como *ephippium*. A partir de estos los huevos eclosionan hembras que se reproducirán de nuevo partenogénicamente.

Daphnia magna se utiliza fundamentalmente, porque se distribuye ampliamente en agua dulce y constituye un eslabón importante en la red trófica colocándose en una posición intermedia entre productores primarios y consumidores de pescado; además, en algunos ecosistemas pequeños es el consumidor final. La cría de *Daphnia magna* en el laboratorio es fácil y, gracias a sus características biológicas, es posible obtener fácilmente una gran cantidad de ejemplares homogéneos para la edad y la tasa de crecimiento. Además, gracias a la partenogénesis es posible tener individuos idénticos; este es un factor muy importante para minimizar las variaciones individuales en la respuesta a los tóxicos. Además, *Daphnia magna* tiene un ciclo de vida corto, por lo que es posible realizar pruebas rápidas de toxicidad crónica también para más generaciones.

En la prueba de toxicidad con *Daphnia magna*, dos parámetros principales: la mortalidad y la inmovilización, son registrados y los resultados se expresan respectivamente como LC₅₀ y EC₅₀. Sin embargo, el parámetro 'inmovilización' ha sido objeto de críticas debido a que se observado en muestras 'lentas' que estaban inmóviles después de la estimulación, pero posteriormente puede volver a nadar activamente.

Las pruebas con *Daphnia magna* deben realizarse de acuerdo con estándares bien definidos. Los organismos deben tener una edad homogénea (<24 horas). En general, las pruebas deben realizarse durante 24-48 horas en condiciones de flujo estático, a 20°C y pH 7.5-8.5, con período de luz-oscuridad de 16 horas a 8 horas. El agua estándar utilizada debe tener total dureza 140-160 mg CaCO₃/l, alcalinidad 110-120 mg CaCO₃/l.

La OCDE publicó métodos recientes: el método OECD 202 (2004) se refiere al uso de dafnidos jóvenes, de menos de 24 horas, y la exposición a diferentes concentraciones de tóxicos durante 48 horas contra la prueba de control. La inmovilización debe evaluarse después de 24 y 48 horas y los resultados deben expresarse como CE₅₀. Otras especies de dafnidos, como *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia affinis* y *Ceriodaphnia dubia*, se pueden utilizar en esta prueba. El método OCDE 211 (2008) se refiere a la evaluación de la reproducción y utiliza especímenes de menor edad de 24 horas. La exposición se prolonga durante 21 días y se produce la descendencia viva, evaluando supervivencia, LOEC y NOEC son la expresión común de resultados.

Crustáceos marinos: los crustáceos marinos útiles para las pruebas ecotoxicológicas son tanto bentónicos como planctónicos y se puede elegir principalmente entre copépodos adultos y larvarios, camarones de salmuera larvarios, percebes larvales y anfípodos.

En general, *Artemia*, el camarón de salmuera típico de las aguas hipersalinas se ha considerado durante mucho tiempo la especie ‘estándar’ y se ha utilizado actualmente para evaluar la toxicidad aguda de varios contaminantes orgánicos e inorgánicos. Los especímenes de *Artemia* están fácilmente disponibles y la reproducción no muestra dificultades particulares, siendo factores importantes para promover el uso de este organismo. A pesar de esto, hasta la fecha el empleo de *Artemia* es controvertido, dada su supuesta sensibilidad inadecuada. De lo contrario, estudios recientes indicaron que la evaluación de la supervivencia en *Artemia* en las pruebas de toxicidad a largo plazo son un parámetro útil y sensible.

En ecotoxicología marina algunos copépodos, como el calanoide *Acartia tonsa* y el harpacticoides *Nitocra spinipes*, *Tisbe battagliai*, *Tigriopus fulvus* y otras *Tigriopus spp.*, y los anfípodos *Corophium insidiosus*, *Corophium orientale* y *Corophium volutator* y otras especies indicadas por ASTM (1999) parecen ser elegibles para desempeñar el papel de especies de prueba con el fin de apoyar la *Artemia*, ya ampliamente utilizada, y para reemplazar especies no fácilmente disponibles, como el mysid *Mysidopsis bahia*, un autóctono especie de las costas orientales de América del Norte, que se indicaba en algunos reglamentos sin considerar las dificultades de su importación en la UE. Los anfípodos se utilizan ampliamente en ecotoxicología, debido a su sensibilidad a varios contaminantes como los metales, para la evaluación de sedimentos en ambientes marinos y de transición, y se han empleado para elaborar pautas de calidad de sedimentos.

Los copépodos harpacticoides pueden ser organismos de prueba útiles para su amplia distribución, dada su posición clave dentro de la red alimentaria, su sensibilidad satisfactoria a los contaminantes y porque son más fáciles de criar que otros crustáceos y que los copépodos pelágicos. Además, la cría de algunos harpacticoides permite tener muchos organismos que están disponibles debido a la constante y abundante producción de descendencia con muy bajos costos y esfuerzos. En algunos harpacticoides también se puede estimular la producción de descendencia. Por estas razones, los copépodos harpacticoides parecen ser el principal candidato para desempeñar el papel de consumidor principal en ensayos ecotoxicológicos.

Hasta la fecha los estudios sobre la respuesta ecotoxicológica de *Acartia tonsa* y *Tigriopus fulvus*, dos especies elegibles para el papel de especies de prueba en ecotoxicología acuática, están en progreso con el objetivo de contribuir a la estandarización de las metodologías de prueba frente a metales.

Modelo eucariótico de levadura Saccharomyces cerevisiae en viabilidad celular: las levaduras son células eucarióticas y robustas con semejanza a la humana, tienen fácil y rápido crecimiento, además de una fácil manipulación y uso de diferentes fuentes de carbono, entre otras. Estas características las hacen fundamentales en la investigación científica, con aplicaciones en el desarrollo de biosensores, evaluación de toxicidad, respuestas metabólicas, toxicogenómica, y considerado como un organismo experimental y modelo de la biología del siglo XXI (Walmsley, RM et al., 2000. Ribeiro, IC et al., 2000. Yuan, HL et al., 2005. Bahrim, G et al., 2007. Yasokawa, D et al., 2010).

Los hongos son importantes para los ciclos biogeoquímicos y son responsables de la degradación de los xenobióticos ambientales, siendo potenciales en procesos de biorremediación (Shen, et al., 2012) (Da Silva, NA et al., 2013) (Deshmukh, R et al., 2016) (Maya, K et al., 2012) (Gadd, GM, 2016). Frente a la degradación del Clorpirifos, se han estudiado hongos como —*Verticillium* sp. DSP, *Acremonium* sp. GFRC-1, *Phanerochaete chrysosporium*, *Hypholoma fasciculare*, *Coriolus versicolor*, *Acremonium* sp. GFRC-1, *Trichoderma* sp., *Trichosporium* sp., *Aspergillus niger*, *Trichoderma viridae*, *Aspergillus* sp. *Fusarium* sp.—, TCP —*Acremonium* sp GFRC-1, *Cladosporium cladosporioides* Hu-01, *Ganoderma* sp JAS4—, Clorpirifos y TCP —*Cladosporium cladosporioides* Hu-01— (Shen, S et al., 2012; Quintero, JC. Xie, H et al., 2010; (Kukhrestha, G et al., 2011; Tiwari, M. K et al., 2014; Yadav, M et al., 2015; Yadav, M et al 2015; Farthan, M et al., 2012; Peng, L et al., 2013; Singh, DP et al., 2011; Li, J et al., 2010).

Las levaduras con capacidad degradativa pueden utilizar sustratos hidrófobos como triglicéridos de aceites y grasas, alcanos, ácidos grasos e hidrocarburos (Hassanshahian, M et al., 2012). Levaduras sedimentarias, tales como *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccaromyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Kloeckera*, *Rhodotorula*, *Trichosporum* y *Pullularia*, degradaron diésel (Da Costa, E et al., 1979). La levadura *Candida tropicalis* biodegradó el m-cresol y fenol (Jing, B et al., 2006). Los plaguicidas como dinitrofenol (*Saccharomyces cerevisiae*) (Zaharia, M et al., 2013), así como la degradación de compuestos organofosforados, Diazinón (*Rhodotorula glutinis* y *Rhodotorula rubra*), (Bempelou, ED et al., 2013), Malatión, Demeton-S y VX p-s (*Saccharomyces cerevisiae*), (Makkar, MS et al.) y Metamidofos (*Saccaromyces rouxii* WY-3).

Métodos fluorométricos basados en células con indicadores fluorogénicos: para evaluar la toxicidad aguda en ambientes acuáticos por levadura, se utilizan diferentes técnicas como la espectrofotometría para medir la disminución de la emisión de fluorescencia o bioluminiscencia (Välimaa et al., 2008). Los métodos fluorométricos *in vitro* basados en células utilizan indicadores o marcadores fluorescentes o fluorogénicos para evaluar la citotoxicidad (Fritzsche y Mandenius, 2010). La prueba de reducción de resazurina se ha utilizado como indicador de la viabilidad celular en diferentes tipos de ensayos (Carneiro, 2009; Pace & Leadbetter, 2016; O'Brien et al., 2000), aplicado a sistemas biológicos y ambientales, en bacterias, levaduras, cultivo de hongos, protozoos y células de mamíferos (Rampersad, 2012, Rodríguez & Josán, 2017; Ibáñez et al., 2012; Zare et al., 2015; Chadha & Kale, 2015; Moraes, 2017; Prakash et al., 2017; Kim y Jang, 2018; Knapp, 2018; Bitacura, 2018; Sangkaew et al., 2018; Blaži y Fischer, 2019; Zuas, 2008).

El uso de rojo neutro para evaluar la endocitosis activa (integridad del lisosoma y del aparato de Golgi) es de menor sensibilidad, se utiliza para evaluar la citotoxicidad *in vitro* en células animales CHO, además se implementa como modelo de células cultivables realizando medidas colorimétricas, a la vez de predecir toxicidad aguda *in vivo* por el efecto de diferentes sustancias químicas (Zwolak, 2015) y citotoxicidad evaluada para la integridad de los lisosomas en fibroblastos murinos (García et al., 2019).

Bioensayos de toxicidad de mezclas

Tanto los sistemas celulares como los microorganismos manipulados genéticamente se han utilizado para medir la toxicidad de compuestos individuales y de mezclas presentes en el medio ambiente (agua, suelo y sedimentos). Dichos bioensayos tienen varias ventajas, siendo simple, rápido y económico. Pueden proporcionar evidencia de la existencia en muestras ambientales de productos químicos con propiedades tóxicas, actuando individualmente o en combinación. Algunos de ellos proporcionan medidas del funcionamiento de ciertos modos de acción, dando así evidencia de los tipos de compuestos responsables de los efectos tóxicos; bioensayos simples que utilizan amplias indicaciones de toxicidad, como letalidad o reducción de la tasa de crecimiento como puntos finales.

La deficiencia de los sistemas de bioensayo dificulta las respuestas tóxicas que miden los efectos tóxicos por organismos de vida libre, si se exponen a las mismas concentraciones de productos químicos en el campo. Estos sistemas simples no se reproducen en vertebrados e invertebrados vivos. Los factores toxicocinéticos son determinantes de la toxicidad y pueden existir diferencias muy grandes de la toxicidad entre especies debido a diferencias metabólicas. Los sistemas de bioensayo tienen un potencial considerable para biomonitoreo y evaluación de riesgos ambientales, dando una indicación rápida de toxicidad, para llegar a métodos más sofisticados que establezcan causa y efecto, incluido el análisis químico y los ensayos de biomarcadores en organismos vivos. En el contexto del biomonitoreo, son útiles para comprobar la calidad de las aguas superficiales y efluentes, y para dar una alerta temprana de problemas de contaminación, teniendo ventajas considerables sobre el análisis químico, siendo más baratos y pudiendo medir la toxicidad de compuestos que escapan a la detección de la sustancia química en el laboratorio.

Varios bioensayos utilizan microorganismos, como la prueba Microtox dando una medida no específica de toxicidad, utilizando el microorganismo bioluminiscente marino *Vibrio fischeri*, que emite luz debido a la acción de la enzima luciferasa, midiéndose la toxicidad por el grado de inhibición de la luz.

Un tipo de prueba más específico es el ensayo de mutagenicidad bacteriana y su ejemplo más conocido es la prueba de Ames. Este tipo de prueba ha sido ampliamente utilizado en la industria química para seleccionar

pesticidas y medicamentos en busca de propiedades mutagénicas. En la prueba de Ames, las cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium* dependientes de histidina están expuestas a sustancias químicas individuales o mezclas. La mutación se manifiesta por una pérdida de histidina, con dependencia a las tasas de mutación que están relacionadas con la dosis. Una característica importante de la prueba de Ames es que incorpora un sistema de activación metabólica con alta actividad monooxigenasa. Así, se puede hacer una distinción entre contaminantes que son en sí mismos mutagénicos y otros que requieren activación metabólica por parte del sistema P450.

Se han utilizado varias líneas celulares de mamíferos y peces para realizar pruebas de toxicidad, algunos de ellos midiendo mecanismos particulares. Se han desarrollado sistemas de bioensayo que prueban la toxicidad mediada por el receptor Ah. Líneas celulares de hepatoma de ratones, que contienen el receptor Ah, y las células de este tipo se han transfectado con genes indicadores. Un ejemplo es el CALUX sistema, donde la interacción de PCB coplanares, dioxinas, etc., con el receptor Ah de las células del hepatoma desencadenan la síntesis de luciferasa y la consiguiente emisión de luz. La ocupación del receptor Ah por estos compuestos determina la cantidad de luz que se emite. Por tanto, el sistema CALUX puede dar una medida integrada de los efectos de mezclas de compuestos polihalogenados sobre el receptor Ah, y una indicación, por lo tanto, del potencial de tales mezclas para causar toxicidad.

En otro ejemplo, se han utilizado líneas de hepatocitos de peces para detectar la presencia de estrógenos ambientales. Cultivos primarios de hepatocitos de trucha arco iris que contienen el receptor de estrógeno puede mostrar niveles elevados de vitelogenina cuando se expone a estrógenos ambientales. Ensayos con este sistema, junto con ensayos para la producción de vitelogenina en peces machos enjaulados, han demostrado la presencia de actividad estrogénica en desagües de aguas residuales. El receptor de estrógeno es sensible a una serie de compuestos ambientales, incluido el organoclorado dicofol y o, p'-DDT, nonil fenoles (bastante débiles) y naturalmente fitoestrógenos presentes. Una vez más, un sistema de ensayo que se basa mecánicamente puede dar una medida integrada de los efectos adversos de mezclas de productos químicos ambientales. También se han desarrollado líneas de hepatocitos de peces que pueden mostrar el citocromo P450A1 inducción debida a HAP y compuestos aromáticos policlorados planos que se unen al receptor Ah.

Aparte de las ventajas científicas que ofrece esta nueva tecnología, también ha sido acogido por organizaciones que buscan una reducción en el número de animales utilizados en pruebas de toxicidad.

-Potenciación de la toxicidad en mezclas

La potenciación es a menudo la consecuencia de interacciones a nivel toxicocinético, especialmente la inhibición de desintoxicación o aumento de la activación. Las consecuencias de tal potenciación pueden ser evidentes no solo a nivel animal completo, sino también en las respuestas mejoradas de biomarcadores ensayos que miden la toxicidad. Los biomarcadores de exposición por si solos no deben reflejar la potenciación a nivel toxicocinético.

El verdadero problema de la potenciación es anticipar dónde puede ocurrir, cuando los únicos datos de toxicidad disponibles son para los compuestos individuales que constituirán la mezcla, siendo un tema frecuente en la regulación de plaguicidas. Al considerar la toxicidad de mezclas, se tiende a suponer que los productos químicos interactuarán de forma aditiva, a menos que haya pruebas claras de lo contrario, enfoque que ha funcionado bien en la práctica, con importantes excepciones. Se debe prestar plena consideración a los mecanismos conocidos de potenciación cuando surgen dudas sobre la posible toxicidad de las mezclas. Donde existe un riesgo aparente por buenas razones mecánicas, se deben realizar pruebas para establecer la toxicidad de las mezclas en cuestión. De esta forma, los recursos muy limitados disponibles para probar las mezclas deben centrarse en los casos más importantes.

Con el rápido crecimiento de la comprensión de la base mecanicista de la toxicidad, es posible anticipar dónde se produce una potenciación sustancial de la toxicidad ocurrida. En este campo, nada puede sustituir al conocimiento experto. Los recursos hacen que no exista ningún requisito legal general para las pruebas de toxicidad de mezclas de productos químicos industriales, que pueden liberarse al medio ambiente. Incluso si tales recursos existiesen, tal ejercicio sería en gran medida una pérdida de tiempo, porque la potenciación de la toxicidad en mezclas es un evento raro.

A medida que crece la comprensión de los mecanismos bioquímicos que conducen a una fuerte potenciación de toxicidad, se debe prestar más atención a la liberación de compuestos que no son tóxicos en sí mismos, pero que pueden aumentar la toxicidad de los contaminantes ya presentes en el ambiente. Los fungicidas EBI, pueden potenciar la toxicidad de los insecticidas

piretroides y fosforotionato. Además, puede haber situaciones en las que su uso en la agricultura aumente los peligros que presentan ciertos insecticidas comúnmente aplicados a la vida silvestre (Walter, CH, 2001).

Evaluación de citotoxicidad

El uso indiscriminado de plaguicidas en diferentes actividades humanas genera contaminación de ecosistemas costeros como los estuarios, los cuales soportan cargas de contaminación generando alto impacto (Deblonde et al., 2011; Nilin et al., 2013). Los insecticidas organofosforados, como el clorpirifos (CP), pueden causar efectos en los seres vivos a diferentes niveles tróficos, incluidos organismos no objetivo (Jaglal, 2015; Marín, 2017; Bejarano et al., 2017), que contribuyen ecológicamente a la producción primaria, reciclaje y descomposición de nutrientes (De Lorenzo et al., 2001), a través de efectos indirectos que alteran directamente los niveles tróficos inferiores, y que a su vez pueden afectar los niveles superiores (Preston, 2002).

Las células vivas responden rápidamente a diferentes condiciones ambientales adversas (Gómez, 2006) y, las pruebas *in vitro* se consideran una alternativa al análisis *in vivo* de reemplazo en toxicología (Hernández & Ibis, 2014; Bhattacharya et al., 2019; Mushtaq et al., 2018). La evaluación de la citotoxicidad y la proliferación en diferentes tipos de células, desde microorganismos hasta mamíferos, se centra en pruebas simples *in vitro*, donde se mide la viabilidad celular (O'Brien et al., 2000; Pace & Leadbetter, 2016). Los análisis de ensayos *in vitro* utilizan bacterias, levaduras, protozoos, como cultivos de células de mamíferos y humanos, para determinar múltiples criterios de valoración en toxicología (Knight, 2008).

La evaluación de la citotoxicidad y la proliferación en diferentes tipos de células, desde microorganismos hasta mamíferos, se centra en pruebas sencillas *in vitro*, donde se mide la viabilidad celular (O'Brien et al., 2000; Pace & Leadbetter, 2016). En la evaluación de la citotoxicidad, líneas celulares como las células embrionarias de riñón humano (HEK) y los neuroblastos de ratón (N2a) se han utilizado para efectos neurotóxicos y neurodegenerativos, siendo modelos biológicos de gran importancia (LePage et al., 2005; Gojanovich et al., 2016; Provost, 2010; Acevedo-Barrios et al., 2018; Güner et al., 2019; Ghorbani et al., 2019; Soudy et al., 2019). El uso de estas líneas celulares en la toxicidad de plaguicidas se ha investigado

en insecticidas organofosforados (Chedik et al., 2019), como el paratión y el clorpirifos con su metabolito TCP (Y. Wang et al., 2019; Van Emon et al., 2018) y con el herbicida Paraquat (Cai et al., 2019).

El uso de pruebas microbiológicas y toxicológicas con organismos procariotas o eucariotas se ha aplicado en el estudio de la contaminación ambiental (Mager & Ferreirat, 1993; Lucau et al., 2005; Välimaa et al., 2008). En la práctica microbiológica, se utilizan una amplia variedad de indicadores para determinar el estado fisiológico y la viabilidad de cultivos celulares (Grela et al., 2018), destacando el modelo de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizado para muchos estudios de respuesta celular general a los desequilibrios metabólicos, además de evaluar una amplia variedad de sistemas (Terziyska et al., 2000) y buscar cambios en parámetros fisiológicos, bioquímicos, citológicos, morfológicos y genéticos (Mager & Ferreirat, 1993; Lucau et al., 2005). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo unicelular, eucariota, no patógeno y fácil de manipular, que se utiliza como sistema un modelo para determinar las respuestas fisiológicas a los efectos tóxicos de los herbicidas y se propone para evaluar la toxicidad (viabilidad) de los contaminantes ambientales (Cabral et al., 2004; Esteve et al., 2009) y la citotoxicidad a diferentes compuestos químicos (Hollis & Killham, 2000).

Saccharomyces cerevisiae responde al estrés térmico, osmótico y oxidativo (Folch et al., 2004), preferido para el estudio de la respuesta al estrés en células eucariotas, por tratarse de un modelo sencillo, económico, de fácil manipulación genética, de secuencia genómica conocida, como la conservación de mecanismos moleculares entre levaduras y células humanas, por homología en sistemas de mamíferos, y puede sobrevivir a diferentes condiciones ambientales, donde pueden ser evaluados desde el punto de vista toxicológico (Bahrim et al., 2007; Välimaa et al., 2008; Yasokawa & Iwahashi, 2010; SC dos Santos et al., 2012; Gaytán et al., 2013; Mattiazzi et al., 2013).

El uso de bioensayos *in vitro* con levaduras es de gran importancia para incorporarlos en el seguimiento de respuestas citotóxicas y genotóxicas. Se utilizan para evaluar la toxicidad aguda de la batería de organismos de diferentes sensibilidades (Amaeze et al., 2015; Rojíčková-Padrťová et al., 1998). *Saccharomyces cerevisiae* se ha estudiado en la determinación de la viabilidad celular (Bitacura, 2018), generando una respuesta metabólica a nivel intracelular y midiendo su actividad con colorantes vitales, donde las células vivas son capaces de reducir estos indicadores redox (Bahrim et al., 2007).

La evaluación de la toxicidad de diferentes plaguicidas como Azoxistrobina, Cimoxanil y Diuron, se ha realizado midiendo la inhibición metabólica en *S. cerevisiae* a nivel de síntesis de ATP, siendo más rápido, más económico y menos sensible que con *Daphnia magna* y, más rápido y sensible que con *Vibrio fischeri* (Esteve et al., 2009). El fungicida Mancozeb fue evaluado con *S. cerevisiae* con herramientas toxicoproteómicas para monitorear estados de respuesta toxicológica y su adaptación de respuesta a estos pesticidas (P. M. Santos et al., 2009; Armengaud et al., 2014). El desarrollo de la toxicogenómica ha permitido observar cambios en la expresión génica tras la exposición a toxinas en la levadura *S. cerevisiae*, respondiendo al estrés químico (Yasokawa & Iwahashi, 2010; SC dos Santos et al., 2012; Mattiazzi et al., 2013; McHale et al., 2014). La toxicología funcional ha permitido el estudio del plaguicida persistente Dieldrin con *S. cerevisiae* (Gaytán & Vulpe, 2014). El efecto ecotoxicológico del insecticida Clorpirifos ha sido evaluado en diferentes microorganismos unicelulares, como en las cianobacterias por ser la base nutricional de los consumidores a altos niveles tróficos (Shoaib et al., 2012). El clorpirifos induce una respuesta al estrés en *Klebsiella* sp. (S. Wang et al., 2013).

Esto deja en claro la importancia de desarrollar o adaptar ensayos *in vitro* con el uso de modelos biológicos eucariotas de líneas celulares HEK y N2a, así como levaduras aisladas de sedimentos marinos contra el efecto citotóxico de CP, TCP y mezcla, y se puede ver si existe son diferentes respuestas a una cepa de control de *S. cerevisiae*. Además, si estos compuestos muestran actividad estrogénica se utiliza una levadura modificada, para ello, se propone evaluar la citotoxicidad sobre las líneas celulares y levaduras aisladas en el medio marino, como ver la actividad estrogénica en la levadura modificada, utilizando un método fluorimétrico y ensayando las respuestas a la resazurina y marcadores rojos neutros.

Evaluación de estrogénicidad

Los contaminantes ambientales clasificados como disruptores endocrinos —algunos pesticidas—, tienen un efecto estrogénico al inducir receptores de estrógenos humanos (RYA, YES), que pueden evaluarse con ensayos basados en levaduras y cuantificarse mediante métodos fluorogénicos (Noguerol et al., 2006; Anwer et al., 2016; Westlund et al., 2018; Gerunova et al., 2019). Estudios con la levadura *S. cerevisiae* recombinante, mediante

un ensayo *in vitro* (Routledge & Sumpter, 1996; Coldham et al., 1997; Vinggaard et al., 2015; Fang et al., 2000; Tanaka et al., 2001), se ha aplicado al monitoreo de disruptores endocrinos en aguas superficiales (N. García et al., 2001), sedimentos de ambientes acuáticos (Legler et al., 2002), aguas residuales y aguas superficiales (Murk et al., 2002; Pawlowski et al., 2003; Huggett et al., 2003; Vieira et al., 2015), evaluación de tratamiento de aguas residuales (Onda et al., 1998), aguas de río (Quiros et al., 2005) y compuestos organoclorados en extractos de pescado (N. García et al., 2005- 2007).

Ecotoxicología microbiana

Debido a su ubicuidad, abundancia y actividades metabólicas, los microorganismos juegan un papel crucial en el ciclo biogeoquímico de elementos en el ambiente. En cualquier perturbación en la actividad y diversidad de los microorganismos es probable que la comunidad genere impactos significativos, no solo en términos de biogeoquímica, sino también la resiliencia de los ecosistemas.

Actividades humanas e industrialización han dado lugar a la liberación de millones de toneladas de sustancias químicas y contaminantes en los ambientes, siendo algunos de ellos tóxicos para los organismos vivos. Sin embargo, hay una falta de información sobre los efectos de la toxicidad a nivel de ecosistema, en donde los estudios de toxicidad usan especies que incluyen plantas (germinación), gusanos (supervivencia de las lombrices de tierra) y microorganismos (prueba de bioensayo Microtox), para evaluar el efecto del contaminante en los organismos objetivo.

La ecotoxicología microbiana representa una disciplina emergente que abarca la ecología microbiana, la toxicología microbiana, la química y la física, las cuales ofrecen un gran potencial en la evaluación del destino y el impacto ambiental de contaminantes a nivel de ecosistema.

La primera parte del término '*ecotoxicología microbiana*' pone el interés en los microorganismos como una gran fracción de la biota del ecosistema. Los microorganismos no solo se ven afectados por contaminantes, sino que también desempeñan funciones esenciales en los ecosistemas. La variedad de funciones que realizan incluye la transducción de energía solar en energía orgánica: materia, transformar, descomponer y mineralizar la materia orgánica, además de contribuir a la retención y transformación de

materiales (incluidos los contaminantes) en ecosistemas acuáticos. En sí mismo, el enfoque 'microbiano' previsto en la ecotoxicología microbiana no debe mantener una gran distancia de otras disciplinas compartiendo el interés común por los microorganismos, y en el caso de la ecotoxicología microbiana, esta se centra en los efectos y respuestas de los microorganismos y los procesos que catalizan a los contaminantes.

La segunda parte del término 'ecotoxicología microbiana' es, a su vez, un compuesto de dos términos diferentes, correspondientes a las disciplinas '*ecología*' y '*toxicología*'.

En el pasado, estos dos se separaron y evolucionaron individualmente, ignorando mutuamente el uno al otro. La *ecología* destinada a comprender las razones por las que los sistemas naturales funcionan y por qué había un orden en la distribución de especies, poblaciones y comunidades. La *toxicología* se ha centrado especialmente en comprender los efectos adversos de los productos químicos, fuertemente determinados a cuantificar la dosis (concentraciones) de sustancias químicas respectivas a sus efectos sobre los organismos vivos. La aplicación de conceptos ecológicos a la respuesta de contaminantes en las comunidades biológicas ha sido rara, aunque con importantes excepciones.

La tolerancia comunitaria inducida (PICT) describió que un tóxico podría ejercer una presión de selección hacia una comunidad más tolerante, cuando se aplica a una concentración durante una duración adecuada. La comunidad biológica, por lo tanto, experimentó un cambio composicional o fisiológico progresivo en la tolerancia general al tóxico, lo que lleva a una explicación causal de efectos de los productos químicos en la comunidad. Este concepto también reconoció que la tolerancia a uno o varios estresores fue modificada por factores externos (ambientales), y que podrían ocurrir efectos cruzados entre tóxicos y otros factores ambientales estresantes. Este concepto revolucionario abrió la perspectiva hacia una mayor conciencia de la necesidad de incorporar la perspectiva ecológica en la maquinaria toxicológica. Ésta es ya la perspectiva de la ecotoxicología microbiana moderna. Según Ghiglione et al (2016), la ecotoxicología microbiana está relacionada con la taxonomía y biodiversidad microbiana funcional que, a su vez, es importante para apoyar funciones del ecosistema y asegurar su estabilidad y recuperación.

Los microorganismos son los organismos más abundantes del planeta, siendo las bacterias la mayor diversidad de microorganismos y metabólica, en donde una variedad de métodos dependientes de cultivo determina la gran diversidad de vida microbiana, siendo las técnicas microbianas moleculares las que han mostrado ampliar el conocimiento de esta gran diversidad. En particular, el advenimiento de la secuenciación de próxima generación de bajo costo de tecnologías ha llevado a un aumento exponencial de microorganismos basados en secuencias de estudios comunitarios que investigan la diversidad de taxones y la estructura de la comunidad (análisis de genes de ARNr) y/o función microbiana, a través de la metagenómica de microorganismos presentes en el medio ambiente, proporcionando nuevos conocimientos de las funciones y adaptaciones ecológicas y biológicas de los microbios, y así comprender la diversidad microbiana y complejidad de la función del ecosistema.

En ambientes naturales, los microorganismos interactúan con componentes bióticos y abióticos de sus ecosistemas, esenciales para la función del ecosistema con funciones clave específicas (ciclos biogeoquímicos, biodegradación de contaminantes e impactos de microorganismos sobre la actividad y salud de plantas y animales, incluidos los seres humanos).

Las comunidades microbianas juegan un papel central en el funcionamiento de los ecosistemas, lo que cualquier perturbación en la actividad y diversidad de la comunidad microbiana conduce a impactos significativos en términos de ciclos biogeoquímicos y de resiliencia del ecosistema, por lo que los impactos ecológicos de contaminantes a escala microbiana y sobre las diversas funciones que desempeñan en el ecosistema, junto con el papel de las comunidades microbianas en la ecodinámica del ecosistema afectado por contaminantes, han formado la base de la ecotoxicología microbiana (Ghiglione et al., 2016), una disciplina que ha surgido de la ecología microbiana.

Figura 4. Disciplinas de la ecotoxicología microbiana



Nota. Construcción propia, basada del autor Ghiglione, JF. et al., 2016

La ecotoxicología microbiana es una nueva disciplina que abarca la ecología microbiana, toxicología microbiana, la química y la física. Esta nueva disciplina puede se distingue de la toxicología microbiana, ya que esta última tiene efectos tóxicos de los compuestos sobre un determinado microorganismo e infieren la toxicidad para toda la comunidad, mientras que la ecotoxicología microbiana tiene como objetivo recopilar todos los diferentes enfoques, tales como métodos analíticos, mediciones enzimáticas, mediciones de toxicidad y métodos independientes del cultivo, entre otros, para tener una evaluación precisa de los compuestos tóxicos en toda la comunidad. Esto es un desarrollo significativo a partir del trabajo de toxicología microbiana simple, que requiere el estudio de enfoques ecotoxicológicos a nivel comunitario. Sin embargo, el resultado de la ecotoxicología microbiana tiene relevancia ecológica.

En consecuencia, esta disciplina se ha ido consolidando recientemente. Durante algún tiempo, los ecologistas microbianos han estado realizando e informando exitosamente estudios sobre la biorremediación de compuestos tóxicos. La mayoría de estos estudios han usado métodos analíticos como la cromatografía de gases —espectrometría masas— para confirmar la degradación de los contaminantes; sin embargo, también hay la necesidad de evaluar la toxicidad de los compuestos restantes después de la remediación con varios métodos de toxicidad como el bioensayo Microtox y la prueba Toxi-chromoPad. Estas pruebas se han utilizado durante más de veinte años y se pueden clasificar como: pruebas de una sola especie, transformaciones de carbono y nitrógeno, pruebas enzimáticas, mediciones de biomasa y pruebas que evalúan cambios en diversidad microbiana (Ghiglione et al. 2016; Ghiglione et al., 2014; Cravo, C et al., 2017).

Contaminación ambiental

La contaminación ambiental es un término que se refiere a la liberación, descarga o eliminación de diversos contaminantes (sólidos, líquidos o gases) físicos, químicos y biológicos, como consecuencia de la difusión de la contaminación y los procesos industriales, sin el tratamiento adecuado para cumplir con las regulaciones estándar requeridas antes de vertido en el medio ambiente (agua, aire y suelo), provocando una amenaza para los seres humanos, animales, plantas y todo el medio ambiente. Desafortunadamente, aproximadamente del 90% al 95% de las aguas residuales urbanas sin tratar son tóxicas y cancerígenas. Los productos químicos generados se descargan directamente en aguas corrientes en países en desarrollo sin el tratamiento adecuado. La contaminación también es una grave amenaza a la calidad del agua en países desarrollados, incluidos EE. UU., Reino Unido y Australia.

El agua, el aire y el suelo contaminados impactan la biosfera, incluidos los humanos, debido a la dependencia de las condiciones ambientales seguras de la cadena alimentaria. Contaminantes físicos, químicos y biológicos que se descargan directa o indirectamente en el medio ambiente tendrán un impacto en los organismos vivos. La eliminación de estos contaminantes al medio ambiente representa un paso en la restauración de las funciones y servicios del ecosistema de los que dependemos para mantener tanto la salud humana como la del ecosistema.

Los sistemas biológicos y microorganismos —en particular— están desempeñando un papel cada vez más importante en la limpieza o remediación de sitios y la biorremediación, la cual se practica ampliamente como un enfoque seguro y ecológico para la limpieza de diversos contaminantes, tales como hidrocarburos de petróleo, metales pesados, plaguicidas y productos de desecho en industrias químicas y de papel.

Los microorganismos en particular son útiles en la degradación de contaminantes de dos formas generales:

- Muchos *microorganismos*, incluidos los autóctonos de un entorno particular puede degradar los contaminantes o transformarlos en compuestos menos tóxicos, reduciendo la concentración de contaminantes y disminuyendo de manera importante su toxicidad y efectos en el medio ambiente.
- Los propios microorganismos pueden servir como indicadores importantes de contaminación, ya que cualquier impacto ambiental se traduce en cambios comunitarios. Además, dado que los microorganismos son ubicuos en el medio ambiente, una respuesta comunitaria a los contaminantes ambientales puede ser observada.

Evaluación ecotoxicológica

Los análisis químicos tradicionales son la forma habitual de evaluar la degradación de contaminantes y monitorear los niveles de contaminación, así como evaluar los impactos en varios organismos. Sin embargo, estas técnicas (cromatografía de gases-espectrometría de masas, GCMS para hidrocarburos y espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente, ICPMS para metales) no son efectivos para evaluar la eficacia del método de limpieza en términos de reducción de la toxicidad y biodisponibilidad, o para evaluar los resultados ecotoxicológicos del proceso en el ecosistema en los sitios tratados.

La reducción de la concentración de contaminantes no significa necesariamente una reducción de su toxicidad, esto debido a muchas razones posibles como se ha demostrado anteriormente. Por tanto, la integración entre datos analíticos químicos, valoraciones ecotoxicológicas y la evaluación del riesgo da una mirada más holística en estos procesos.

La comunidad microbiana es necesaria, aunque rara vez se lleva a cabo, para evaluar la eficiencia del enfoque utilizado para tratar el área contaminada y el medio ambiente resultante con resultados en términos de sus efectos sobre los ecosistemas y los seres humanos.

Los indicadores clave del riesgo, que representan los productos químicos para la salud humana y otros organismos en el medio ambiente, están relacionados con la biodisponibilidad del contaminante, que se puede definir como la diferencia entre la cantidad de contaminante al que un organismo está expuesto, y la dosis real de la sustancia que el organismo recibe. Muchos factores determinan la biodisponibilidad ambiental de un contaminante, siendo: (a) la solubilidad del contaminante en la solución del suelo, (b) las tasas de transferencia de masa química, específicamente el peso molecular de la fracción desorbida y (c) el tipo de organismo expuesto a las sustancias químicas.

Para examinar el impacto de los productos químicos en la biota —una variedad de pruebas de toxicidad—, se han propuesto métodos y procedimientos como la inhibición de bioluminiscencia bacteriana natural, que se conoce como prueba Microtox, bacteria marina, *Aliivibrio fischeri* (también conocido como *Vibrio fischeri* y anteriormente conocido como *Photobacterium phosphoreum*). La bioluminiscencia resulta de un conjunto complejo de reacciones de producción de energía controladas por la expresión de seis genes con luz, siendo una producción inducida a alta densidad celular, que, al haber inhibición de las enzimas por el contaminante, altera la tasa de expresión génica y, posteriormente, la cantidad de bioluminiscencia emitido.

La prueba Microtox se utiliza para determinar la toxicidad de un contaminante y se aplica comúnmente como una prueba rápida de bioensayo, en un intento de alertar (en las agencias) al monitoreo sobre las posibles condiciones tóxicas, así como la evaluación rápida de los cambios en calidad ambiental. El punto final de esta prueba es la determinación de la concentración de un contaminante que provoca una reducción de la bioluminiscencia en un 50% después de cierto tiempo, generalmente 5, 10 y 15 min. Esto se conoce como Concentración Efectiva 50 (EC₅₀). Por otro lado, una prueba de toxicidad crónica tiene como objetivo evaluar la toxicidad de una sustancia mediante la detección de cambios fisiológicos y funciones, y generalmente se realiza en organismos macroscópicos.

Hasta ahora, los enfoques de ecotoxicología microbiana incluyen la medición de parámetros biogeoquímicos (fotosíntesis, respiración, desnitrificación, descomposición, y potencial enzimático), así como el uso de Microtox, biosensores y bioreporteros, con el fin de evaluar los efectos de los contaminantes en la comunidad microbiana.

Sin embargo, existe el requisito de un mejor indicador de toxicidad para toda la comunidad microbiana en el sistema, con el fin de relacionar funciones específicas como las actividades enzimáticas a ciertos grupos de organismos y su abundancia. Con el advenimiento de secuenciación de próxima generación, podemos detectar diferencias en genes funcionales en los genes *alkB* a nivel comunitario involucrados en la degradación del alcano, y si combinamos esta técnica con pruebas de ecotoxicidad microbiana, será más fácil evaluar el nivel de toxicidad para toda la comunidad. Por tanto, uno de los retos en *Ecotoxicología Microbiana* puede ser incorporar y establecer la metagenómica como una ayuda en la recopilación de niveles de toxicidad fiables.

Adicionalmente, es necesario realizar estudios de biorremediación para reducir el contaminante por debajo de la protección ambiental local, y para realizar el postratamiento se deben aplicar pruebas de toxicidad con el fin de confirmar la ausencia de toxicidad en el sitio. Los límites máximos de agencias determinan si la concentración del contaminante (o la de intermedios) está dentro de los límites deseados, pudiendo ser tóxicos para varios organismos.

Además, de los indicadores de toxicidad clásicos como EC_{50} , LC_{50} y LD_{50} , es importante que las pruebas toxicológicas microbianas, como los bioinformes aceptados internacionalmente, sirvan para poder lograr un consenso sobre los niveles máximos de toxicidad y el establecimiento de la Ecotoxicología Microbiana como una nueva disciplina que sirve para tal tarea.

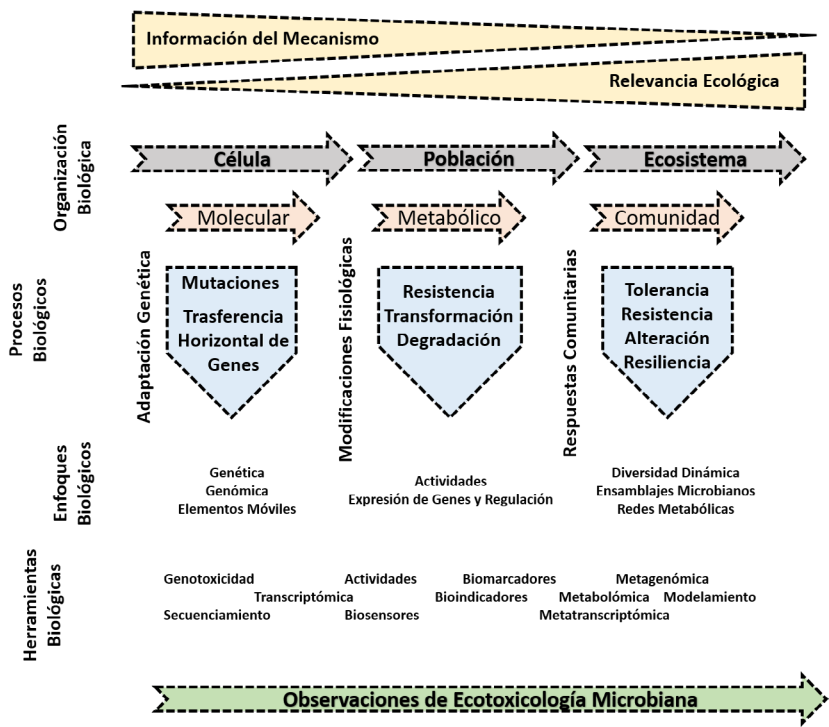
Respuestas microbianas a la contaminación

Microbiología y química en el ambiente

El conocimiento de estudios conjuntos en procesos ambientales químicos y bacterianos, es de suma importancia para la Ecotoxicología Microbiana. La contaminación ambiental generada por las actividades humanas es importante para evaluar y mitigar los efectos. Los *microorganismos* se encuentran

entre los primeros afectados por contaminantes y son actores esenciales en el funcionamiento del ecosistema. La evaluación de los efectos de la contaminación sobre los microorganismos es de suma importancia. Su respuesta puede servir para informar los efectos y las capacidades de recuperación del ecosistema. El comportamiento de los microorganismos en respuesta a la contaminación química se ha estudiado ampliamente.

Figura 5. Observaciones ecotoxicológicas microbianas y niveles de organización biológica



Nota. Construcción propia basada en Cravo, C et al., (2017)

Fisiología y metabolismo microbianos

Las respuestas fisiológicas de los *microorganismos* a los contaminantes han sido inicialmente abordadas por enfoques basados en cultivo. Muchos contaminantes pueden ser degradados o transformados por *acción microbiana*, donde los *microorganismos* se adaptan y seleccionan para

compuestos xenobióticos introducidos en el medio ambiente. En la mayoría de los casos, las capacidades de biodegradación o vías metabólicas se han descrito en el modelo y, por tanto, características fisiológicas, morfológicas, taxonómicas y metabólicas han sido estudiadas para comprender mejor las capacidades potenciales y el comportamiento de los *microorganismos* frente a los contaminantes.

Las vías microbianas implicadas en la degradación de contaminantes orgánicos se han estudiado intensamente durante décadas. Los microorganismos han desarrollado diversas estrategias para degradar contaminantes orgánicos en presencia y en ausencia de oxígeno molecular. La versatilidad metabólica y la flexibilidad genética, junto con las estrategias comunitarias, son primordiales, pues permiten a los microorganismos resistir la presencia de contaminantes.

Las herramientas ecotoxicológicas permiten determinar las capacidades microbianas para eliminar contaminantes y representan así herramientas útiles para la implementación y el seguimiento de procesos de biorremediación. Dado que los microorganismos son omnipresentes, donde se pueden desarrollar y explotar potencialmente estrategias para cada ecosistema y cualquier contaminante. Sin embargo, el desafío futuro de la Ecotoxicología Microbiana será proponer enfoques integrados para evaluar el impacto de contaminación múltiple, incluidos los contaminantes emergentes. Para este propósito básico, el conocimiento de la Ecología Microbiana con un punto de vista holístico es de suma importancia en donde se debe fomentar dicha investigación básica.

Biomarcadores en ecotoxicología microbiana

De la especie a la comunidad

En la evaluación de riesgos ambientales, la Organización Mundial de la Salud definió el *biomarcador* como “casi cualquier medida que refleje una interacción entre un sistema biológico y un peligro potencial, que puede ser químico, físico o biológico. La medida de la respuesta puede ser funcional y fisiológica, bioquímica a nivel celular o una interacción molecular” (OMS 1993). Para poner énfasis en el vínculo entre un biomarcador y el sistema se propone a un biomarcador como:

un elemento biológico [incluidos los productos químicos biogénicos] que pertenece a un sistema más amplio cuya observación se espera que proporcione información sobre este sistema basado en el conocimiento *a priori* de los vínculos e interacciones existentes entre el biomarcador y este sistema (Invemar, 2006).

Esta definición tiene un alcance más amplio que la definición dada en la ecología del estrés, la cual se limita a medidas moleculares, celulares, genéticas, inmunológicas y fisiológicas, en donde se espera que informe sobre las alteraciones ecológicas.

Los biomarcadores se clasifican según el tipo de información que proporcionan:

- Información sobre la exposición
- Información sobre los efectos
- Información sobre la susceptibilidad a una perturbación

Se espera que los biomarcadores de efecto, los más comunes, informen sobre las consecuencias de una perturbación, como la exposición a tóxicos, ya sea porque miden directamente algunos procesos esenciales del ecosistema (producción primaria o producción secundaria), o porque se ha establecido una relación causal entre las alteraciones de los biomarcadores y los efectos en niveles superiores de organización biológica (individuo, población y ecosistema).

La investigación de biomarcadores es muy común en ecotoxicología, especialmente en ambientes marinos y ambientes de agua dulce, pero sigue siendo controvertido, ya que los vínculos e interacciones existentes entre los biomarcadores y la salud de los ecosistemas no siempre son lo suficientemente bien conocidos. Vale la pena mencionar que la mayoría de los estudios se basan en macroorganismos (invertebrados o peces), centrados principalmente en predecir efectos de la contaminación en poblaciones, a partir de respuestas bioquímicas en los individuos. La inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en invertebrados y peces es un biomarcador de exposición a insecticidas organofosforados. En *Gammarus fossarum*, la inhibición de AChE se correlacionó con la alteración de la velocidad de alimentación y locomoción, promoviendo el uso de AChE como biomarcador de efecto a nivel poblacional.

Los biomarcadores de efecto y exposición de peces no solo se desarrollan por su relevancia en el efecto ecológico, sino también por su similitud (en términos de fisiología) con los humanos. En comparación con otros grupos de organismos, el uso de biomarcadores microbianos en ecotoxicología sigue siendo escaso. Los *biomarcadores microbianos específicos* de la especie se pueden utilizar para detectar la presencia de especies de interés en el medio ambiente, como bacterias patógenas o cianobacterias tóxicas. Por ejemplo, en pruebas de toxicidad que incluyen varios metales se encontró que el plomo (Pb) inhibe específicamente la delta-aminolevulinato deshidratasa (ALAD) en una cepa ambiental de *Pseudomonas putida*, de acuerdo con observaciones previas en eucariotas multicelulares. Además, mientras que la actividad ALAD fue proporcional a la biodisponibilidad de Pb en *P. putida*, esta actividad se mantuvo estable bajo exposición a Pb en una *P. aeruginosa* resistente a metales, donde se sugirió el uso de la actividad ALAD de *P. putida* como biomarcador de exposición al Pb.

Aunque los biomarcadores específicos de especies pueden ser útiles para buscar ciertas especies o para detectar efectos de exposición específicos, los biomarcadores microbianos —medidos en el medio ambiente— pueden referirse a *comunidades microbianas*, incluidas un gran número de especies que interactúan, como bacterias degradantes de xenobióticos (Pesce et al., 2013).

En ecología, una comunidad se refiere a una unidad ecológica compuesta por diferentes especies que ocupan un área en particular, generalmente interactuando entre sí y su ambiente. Los principios de la ecología comunitaria aplicados a la comprensión de los efectos de la contaminación en los ecosistemas dan lugar a una rama de la ecotoxicología denominada ecotoxicología comunitaria, que más tarde fue aplicado a comunidades microbianas. Este enfoque tiene un gran interés en la ecotoxicología, ya que los biomarcadores microbianos cubren una amplia gama de mediciones, desde la determinación de la concentración de sustancias químicas biogénicas (ácidos grasos fosfolípidos a la evaluación de actividad microbiana, actividad fotosintética o capacidad de adaptación) (Pesce et al., 2016).

Además, la sensibilidad de las comunidades microbianas se puede diferir mucho de la especie única, encontrándose que las comunidades de las biopelículas son más sensibles al herbicida diurón que una sola especie con una CE_{50} para biovolumen de diatomeas (es decir, la concentración

para la cual el biovolumen de diatomeas se reduce en un 50%) de 0,09 μg de diurón L, después de 8 días de exposición, mientras que en especies únicas anteriores pruebas en diferentes especies de algas, la CE_{50} para el crecimiento osciló entre 4 y 30 lg L.

En este contexto, los biomarcadores microbianos comunitarios tienen muchas ventajas en comparación con otros biomarcadores utilizados en ecotoxicología. En particular, es probable que el enfoque de biomarcadores a nivel comunitario detecte la exposición (utilizando biomarcador de exposición), pero también para estimar los efectos directos e indirectos que ocurren en un a nivel de población, comunidad o ecosistema. En efecto, las respuestas a nivel comunitario pueden considerarse como biomarcadores para un conjunto de comunidades o un ecosistema. Cabe mencionar que las comunidades microbianas desempeñan un papel clave en el funcionamiento de los ecosistemas (comunidad de biopelículas en ecosistemas y en la dinámica de los contaminantes, como reacciones de desintoxicación microbiana llevadas a cabo por comunidades microbianas, y por lo que se necesitan más estudios de campo para validar el uso de tales biomarcadores como herramientas de diagnóstico para ayudar a identificar las presiones e impactos tóxicos en el ecosistema.

En ecosistemas acuáticos, investigaciones ecotoxicológicas comunitarias en agua, como biopelículas, ilustran cómo un enfoque de biomarcadores múltiples a nivel comunitario puede revelar la presencia y los efectos de contaminantes a múltiples escalas. Las biopelículas o biofilms (también conocido como perifiton) son comunidades microbianas bentónicas complejas y estructuradas formando una estructura 3D en una matriz compuesta por sustancias poliméricas extracelulares. Las biopelículas de agua dulce desempeñan un papel clave en el funcionamiento del ecosistema fluvial y también es probable que se vean afectados por contaminantes, por lo que muchos estudios han investigado el impacto de los contaminantes en la estructura y función de estas comunidades.

Los biomarcadores microbianos específicos de los diferentes componentes de biofilm se han utilizado para identificar los efectos directos, pero también indirectos de la contaminación, como el efecto indirecto del herbicida diurón, inhibidor de la fotosíntesis, sobre las bacterias dentro de las comunidades de biopelículas. Además, el uso de diferentes biomarcadores puede permitir la captura de los efectos agudos y crónicos de un tóxico. Dentro de este marco, se espera que los biomarcadores

fisiológicos detecten la exposición aguda, mientras que los biomarcadores estructurales, basados en la composición de la comunidad, pueden informar sobre los efectos de la exposición crónica.

Teniendo en cuenta esta complejidad, la ecotoxicología microbiana investiga los efectos de los contaminantes en las especies objetivo, y también el impacto de la contaminación en:

- Interacciones bióticas (algas/bacterias en biopelículas).
- Niveles tróficos más altos (a través de la implicación de comunidades microbianas en la cadena alimentaria).
- Procesos importantes como producción primaria, descomposición de materia orgánica, y ciclo de nutrientes.

Por tanto, es probable que la ecotoxicología microbiana revele un impacto químico no fácilmente demostrado por las herramientas de biomonitoreo actuales.

Biomarcadores microbianos basados en la comunidad (Adaptación)

Es bien sabido que los compuestos tóxicos representan un riesgo real para las comunidades naturales, incluso en concentraciones bajas, ya que la exposición a largo plazo afectará el conjunto de especies, lo que lleva a la selección de las más tolerantes, que se desempeñarán mejor en las condiciones de contaminación predominantes, proceso comúnmente llamado adaptación comunitaria. Esto ha sido demostrado en ecosistemas acuáticos con comunidades de invertebrados y algas microbentónicas, siendo el marco conceptual para el uso de índices de contaminación en el biomonitoreo, que se basan sobre la presencia o ausencia de especies tolerantes o el PICT (Tolerancia comunitaria inducida por contaminación), que a su vez parte de la visualización de un aumento general de la tolerancia de una comunidad al tóxico en comparación con una comunidad referencia, lo cual da como resultado la selección de los organismos más tolerantes, así como el establecimiento de mecanismos de desintoxicación.

Si las comunidades microbianas se encuentran en casi todas partes, esto se debe a su alto grado de flexibilidad metabólica, tolerancia fisiológica y diversidad. Esta adaptación puede aparecer a nivel genético, a través de una expresión elevada de los genes que construyen esta tolerancia y también a nivel comunitario mediante un cambio en la composición

de la comunidad, seleccionando las especies más tolerantes. Sobre la adaptación comunitaria a tóxicos, pudiendo encajar como biomarcadores de adaptación.

Los tres diferentes tipos son:

- Los genes de resistencia
- La composición de especies
- La adquisición de tolerancia al estrés oxidativo

Los productos químicos representan un cierto riesgo para las comunidades microbianas, pero los efectos pueden ser acumulativos o sinérgicos con otros factores de estrés que también afectan a los microorganismos en ecosistemas de agua dulce. El gran desafío al que se enfrentan los ecotoxicólogos microbianos es discernir los efectos de las sustancias químicas causados por coexistencia a factores de estrés en las comunidades microbianas, y esto requiere la capacidad de utilizar e integrar técnicas nuevas y las tradicionales para describir con precisión sus respuestas y escalar hasta el ecosistema (Cravo, C et al., 2017).

La ocurrencia de especies de microorganismos resistentes en un entorno contaminado, pueden ser usados como indicadores relevantes ecológicamente y en sensibilidad frente al deterioro de la contaminación ambiental, por lo que se utilizan en test de toxicidad microbiana (Giller, KE et al., 1998), con ejemplos de microlgas como biomarcadores bioquímicos de contaminación marina (Torres, MA et al., 2008); *Vibrio qinghaiensis* sp. Nov-Q67 frente a Clorpirifos (Zhang, YH et al., 2008; Zhou, X et al; Liu, SY, et al., 2012; Zhang, J et al., 2011); *Photobacterium phosphoreum* evaluando toxicidad (Fernández, A et al., 1995); *Bacillus stearothermophilus* como modelo de screening de toxicidad química en perturbación de membrada por tóxicos lipídicos (Donato, MM et al., 2000); *Vibrio fischeri* como bioindicador para medir perturbación metabólica por agentes físicos y químicos (Scheerer, S et al., 2006); *Aliivibrio Fischeri* y *Vibrio qinghaiensis* para el monitoreo de la contaminación ambiental y biosensores (Ma, XY et al., 2014).

Además, con el desarrollo de la ecotoxicología (Vighi, M et al., 2013; Boverhof, DR et al., 2006; Wilson, VS et al., 2013), se presentan estudios con *Sacharomyces cereviciae* siendo este el modelo más poderoso de la toxicogenética para evaluar toxicidad de suelos y aguas contaminadas (Yasokawa, D. et al., 2010); también hay otros modelos con *Danio rerio*,

Daphia magna, *Lemna minor* y *Xenopus tropicalis* en ambientes acuáticos, así como *Arabidopsis thailiana*, *Caenorhaptiles elegans* y *Eisetnia foetida* en ambientes terrestres, entre otros (Snape, JR et al., 2004).

Las estrategias de prevención de la contaminación y gestión de los sitios contaminados por compuestos químicos (Laane, R et al., 2011; Rep. Col. MAVDT. 2005), pueden ser desarrolladas y aplicadas dentro de la biotecnología ambiental, usando sistemas biológicos como los microorganismos para prevenir, mitigar o eliminar contaminantes químicos en el medio ambiente, basados en procesos metabólicos de degradación microbiana (Blanch, AR. 2010); se han usado microorganismos degradadores como controladores de contaminación por plaguicidas, por su capacidad funcional, resistencia y adaptación a ambientes estresados (Vidotti, EC et al., 2004), en donde bacterias, microalgas y hongos son ejemplos de estos procesos (Fernández, A et al., 1995; Giller, KE et al., 1998; Liu, SY et al., 2012; Ma, XY et al., 2014; Sheever, S et al., 2006) y con el desarrollo de la ecotoxicología, estudios con la levadura *Sacharomyces cereviciae* como modelo para evaluar toxicidad de suelos y aguas contaminadas (Boverhof, DR et al., 2006; Vighi, M et al., 2013; Wilson, VS et al., 2013).

La aplicación de los procesos degradativos es utilizada en la biorremediación de ambientes contaminados (Landis, Wayne G. et al., 2005), destacando los procesos de descontaminación de ambientes marinos, a través de la biotecnología ambiental (Kalogerakis, N. et al., 2014), en donde la eliminación de contaminantes y su toxicidad, así como la de bioprocesos ecoeficientes ambientalmente, es una alternativa de solución al problema ambiental de contaminación química (Pakshirajan, K. et al., 2014). El aprovechamiento de microorganismos que se encuentran en diferentes ecosistemas pueden ser usados para restaurar sitios contaminados, a través de la biorremediación por su potencial de degradación, naciendo una interdisciplina emergente de la toxicología llamada 'Ecotoxicología Microbiana' (Ghiglione, JF. Et al., 2015; Ghiglione, JF. et al., 2016). Así mismo, la ecotoxicología, estudia los riesgos de contaminación del ambiente (Cabrera, JM et al., 1995), desarrollando protocolos de ensayo para predecir el efecto de las sustancias químicas sobre organismos vivos, estudiando la respuesta fisiológica, bioquímica o inmunológica en organismos modelo (Cagiga, E et al., 2003; Castillo, G. 2004).

En estos estudios, y según la visión de la toxicología para el siglo XXI, se recomienda el reemplazo de animales por métodos *in vitro* en el laboratorio, así como incluir aspectos de la nanobiotecnología (Berg, N. et al., 2011; Hartung, T. 2011; Andersen, ME et al., 2009; Vighi, M et al., 2013), en donde el uso de levaduras y otros microorganismos son usados en bioprocesos y diferentes bioreactores, para ver la efectividad en la degradación de diferentes compuestos, incluyendo clorpirifos, así como la detoxificación o reducción de toxicidad aplicando diferentes baterías de test (Li, H. et al., 2015; Sponza, DT et al., 2010; Dosta, J et al., 2011; Chishti, Z et al., 2013; Zhou, S et al., 2015).

Se han usado microorganismos degradadores como controladores de contaminación por plaguicidas por su capacidad funcional, resistencia y adaptación a ambientes estresados (Vidotti, EC et al., 2004); se plantea la reducción de la toxicidad de contaminantes químicos por la capacidad metabólica de transformación de los microorganismos basada en la biodegradación de compuestos orgánicos, inorgánicos y radioactivos (Chatterjee, O et al., 2016); la ocurrencia de especies de microorganismos resistentes en un entorno contaminado, pueden ser usados como indicadores relevantes ecológicamente y en sensibilidad frente al deterioro de la contaminación ambiental, por lo que se utilizan en test de toxicidad microbiana (Giller, KE et al., 1998) con ejemplos de microalgas como biomarcadores bioquímicos de contaminación marina (Torres, MA et al., 2008); *Vibrio qinghaiensis* sp. Nov-Q67 frente a Clorpirifos (Zhang, YH et al., 2008; Zhou, X et al. Liu, SY, et al. 2012; Zhang, J et al., 2011); *Photobacterium phosphoreum* evaluando toxicidad (Fernández, A et al., 1995); *Bacillus stearothermophilus* como modelo de screening de toxicidad química en perturbación de membrada por tóxicos lipídicos (Donato, MM et al., 2000); *Vibrio fischeri* como bioindicador para medir perturbación metabólica por agentes físicos y químicos (Scheerer, S et al., 2006); *Aliivibrio*, *Fischeri* y *Vibrio qinghaiensis* para el monitoreo de la contaminación ambiental y biosensores (Ma, XY et al., 2014). Además, con el desarrollo de la ecotoxicología, estudios con *Sacharomyces cerevisiae* como modelo más poderoso de la toxicogenética para evaluar toxicidad de suelos y aguas contaminadas (Vighi, M et al., 2013; Boverhof, DR et al., 2006; Wilson, VS et al., 2013).

El aprovechamiento de microorganismos que se encuentran en diferentes ecosistemas ha sido aprovechado en un área de investigación interdisciplinar emergente de la toxicología llamada 'Ecotoxicología Microbiana', que pretende estudiar el impacto de los compuestos químicos a escala

microbiana, como su diversidad, abundancia o actividad, así como su rol en los procesos ecodinámicos de los contaminantes, así como su fuente, su transferencia, degradación y/o transformación, que permiten monitorear, ver calidad ambiental y restauración de sitios contaminados, a través de la biorremediación donde se aprovechan los microorganismos por su potencial de biodegradación (Ghiglione, JF. Et al., 2015; Ghiglione, JF. et al., 2016).

Aplicación en biotecnología microbiana

El clorpirifos es un compuesto con una degradación microbiana y una degradación abiótica por hidrólisis. La ruta principal de degradación del clorpirifos en todos los sistemas como agua, suelo, animales y vegetales, se inicia al romperse el enlace ester-fósforo, produciendo TCP (3,5,6-tricloro-2-piridinol), que no presenta actividad insecticida, pero que ha demostrado efecto tóxico en microorganismos de suelos y aguas (Dow Agrosiences, 2008).

Se han usado microorganismos degradadores como controladores de contaminación por plaguicidas, por su capacidad funcional, resistencia y adaptación a ambientes estresados (Vidotti, EC et al., 2004), en donde bacterias, microalgas y hongos son ejemplos de estos procesos (Fernández, A et al., 1995; Giller, KE et al., 1998; Liu, SY et al., 2012; Ma, XY et al., 2014; Sheever, S et al., 2006) y con el desarrollo de la ecotoxicología, estudios con la levadura *Sacharomyces cerevisiae* como modelo para evaluar toxicidad de suelos y aguas contaminadas (Boverhof, DR et al., 2006; Vighi, M et al., 2013; Wilson, VS et al., 2013). Los microorganismos pueden degradar el CP y utilizarlo como fuente de carbono y fósforo, generando 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) y dietiltiofosfato (DETF) en su proceso de hidrólisis (Tiwari, MK et al., 2014). Los hongos son importantes para los ciclos biogeoquímicos y son responsables de la degradación de los xenobióticos ambientales, siendo potenciales en procesos de biorremediación (Shen, S et. 2012. Maya, K et al., 2012).

En referencia a levaduras con capacidad degradativa, estas pueden utilizar sustratos hidrófobos como triglicéridos de aceites y grasas, alcanos, ácidos grasos e hidrocarburos (Hassanshahian, M et al., 2012); plaguicidas como dinitrofenol fue degradado por *Saccharomyces cerevisiae* (Zaharia, M et al., 2013). Por su parte, frente a la degradación de compuestos organofosforados, se establece: Diazinón —*Rhodotorula glutinis* y

Rhodotorula rubra—, (Bempelou, ED et al., 2013); malatión, Demeton-S y VX p-s —*Saccharomyces cerevisiae*— y metamidofos —*Saccaromyces rouxii* WY-3— (Makkar, MS et al., 2013).

El aprovechamiento de microorganismos que se encuentran en diferentes ecosistemas pueden ser usados para restaurar sitios contaminados, a través de la biorremediación por su potencial de degradación, naciendo una interdisciplina emergente de la toxicología llamada 'Ecotoxicología Microbiana' (Ghiglione, JF. Et al., 2015; Ghiglione, JF. et al., 2016). Así mismo, la ecotoxicología, estudia los riesgos de contaminación del ambiente (Cabrera, JM et al., 1995), desarrollando protocolos de ensayo para predecir el efecto de las sustancias químicas sobre organismos vivos, estudiando la respuesta fisiológica, bioquímica o inmunológica en organismos modelo (Cagiga, E et al., 2003; Castillo, G. 2004). Estos estudios y según la visión de la toxicología para el siglo XXI, se recomienda el reemplazo de animales por métodos *in vitro* en el laboratorio, así como de ir incluyendo aspectos de la nanobiotecnología (Berg, N. et al., 2011; Hartung, T. 2011; Andersen, ME et al., 2009; Vighi, M et al., 2013), en donde el uso de levaduras y otros microorganismos son usados en bioprocesos y diferentes bioreactores, para ver efectividad en la degradación de diferentes compuestos, incluyendo clorpirifos, así como la detoxificación o reducción de toxicidad aplicando diferentes baterías de test (Li, H. et al., 2015; Sponza, DT et al., 2010; Dosta, J et al., 2011; Chishti, Z et al., 2013; Zhou, S et al., 2015).

La biotecnología ambiental usa sistemas biológicos para prevenir, mitigar o eliminar contaminantes químicos en el medio ambiente, basados en procesos metabólicos de degradación microbiana (Blanch, AR. 2010); el aprovechamiento de los procesos degradativos es utilizado en la biorremediación de ambientes contaminados (Landis, Wayne G. et al., 2005), destacando los procesos de descontaminación de ambientes marinos, a través de la biotecnología ambiental (Kalogerakis, N. et al., 2014). Dentro de la biotecnología ambiental, surgen temáticas a desarrollar, donde se incluyen la eliminación de contaminantes y su toxicidad, así como la de bioprocesos ecoeficientes ambientalmente, siendo alternativas de solución al problema ambiental de contaminación química (Pakshirajan, K. et al., 2014); así mismo, la ecotoxicología estudia los riesgos de contaminación del ambiente, detectando, identificando y valorando su grado de toxicidad, pudiendo abarcar estudios clínicos, analíticos o experimentales (Cabrera, JM. et al., 1995), desarrollando protocolos de ensayo para usarse como herramienta de predicción temprana, como para predecir el efecto de las

sustancias químicas sobre organismos vivos, estudiando la respuesta fisiológica, bioquímica o inmunológica de organismos modelo (Cagiga, E. et al., 2003; Castillo, G, 2004).

Teniendo en cuenta la visión de la toxicología para el siglo XXI, los expertos recomiendan el reemplazo del uso de animales fortaleciendo los métodos *in vitro*, así como de ir incluyendo aspectos de la nanobiotecnología (Berg, N. et al., 2011; Hartung, T. 2011; Andersen, ME et al., 2009; Vighi, M et al., 2013).

Capítulo 3.

Toxicidad Aguda del Clorpirifos y su Metabolito 3,5,6-Tricloro-2-Piridinol Solo y en Combinación con una Batería de Bioensayos

Prefacio

La toxicidad aguda del clorpirifos (CP) y su principal metabolito 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), solos y en combinación, se han evaluado utilizando una batería de pruebas que comprende organismos acuáticos de diferentes niveles tróficos: bacterias marinas luminiscentes *Aliivibrio fischeri*, alga unicelular de agua dulce *Pseudokirchneriella subcapitata* y cladoceran *Daphnia magna*. Como era de esperar, *D. magna* fue el organismo más sensible a los compuestos probados, siendo el CP más tóxico que su metabolito. Por el contrario, se encontró que el TCP era más tóxico que su compuesto original para *A. fischeri* y *P. subcapitata*. En todos los casos, la mezcla de CP y su metabolito fue más tóxica que los compuestos probados por separado, multiplicándose entre 5 y 200 veces el nivel de toxicidad de CP y hasta 15 veces el nivel de toxicidad de TCP. Estos resultados indican que la coexistencia de la sustancia madre y su producto de degradación en el medio ambiente puede resultar en una interacción sinérgica que implica un alto riesgo para los ecosistemas acuáticos.

Introducción

Los compuestos organofosforados se encuentran entre los productos químicos más utilizados en todo el mundo. Aunque su uso principal es como plaguicidas en agricultura, acuicultura, control de vectores o uso doméstico (Roberts y Aaron 2007), también se puede utilizar para la fabricación de plástico (Yadav et al., 2017), retardantes de llama o fluidos hidráulicos (Andresen et al., 2004). Debido a su baja especificidad, pueden causar efectos severos y duraderos en la población de especies acuáticas no objetivo, particularmente invertebrados (SSchulz y Liess, 1999; Fulton y Key, 2001). El clorpirifos (CP) es un organofosfato clorado de amplio espectro [O, O-dietil O- (3,5,6-triclor-2-piridil) fosforotioato] con actividad insecticida, nematocida y acaricida que se utiliza en diferentes cultivos, así como en pastos y en plantas ornamentales (John y Shaik, 2015). A pesar de que el CP se ha retirado del uso doméstico en muchos países, su producción y consumo aumentan dramáticamente cada año (John y Shaik, 2015), debido a su bajo costo económico. Lo que ha llevado a la contaminación de ecosistemas terrestres y de agua dulce y marinos en muchas regiones del mundo (Wightwick y Allinson 2007, Gebremariam et al., 2012, Álvarez et al., 2013).

Como se sabe, el principal mecanismo de toxicidad de la CP es la inhibición de la acetilcolinesterasa, que está presente en todos los vertebrados, afectando a otras especies no objetivo, como abejas, lombrices de tierra o peces (Jin et al., 2015). Se considera de moderada a extremadamente tóxica para las aves (Moore et al., 2014). Además de producir trastornos en el sistema nervioso, se han documentado daños al sistema inmunológico y alteraciones endocrinas (Li et al., 2013, Ventura et al., 2016).

También se ha detectado en alimentos de áreas urbanas y rurales, polvo del piso y aire interiores, muestras de orina, etc., lo que genera importantes preocupaciones para la salud humana (Morgan et al., 2005). Durante los últimos años se ha estudiado la presencia y disipación de CP en hortalizas como lechuga, arroz, maíz o tomate detectando niveles significativos (Zhang et al., 2012, Gvozdenac et al., 2013, Han et al., 2013, Ge et al., 2015). Según la EPA, la CP se considera moderadamente tóxica y está clasificada en la categoría de toxicidad II (USEPA 2011). Sin embargo, después de varios estudios, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) reconsideró el nivel de toxicidad concluyendo que el CP es de valor 0 mucho más tóxica de lo que se aconsejaba anteriormente en la Comisión Europea de Salud (EFSA 2013).

Según las características fisicoquímicas de la CP, esta se retiene fuertemente en el suelo con vidas medias que varían entre 1 y 24 semanas (Eisler, 2000). Esta variabilidad puede atribuirse al contenido de carbono orgánico, la humedad o la actividad microbiana (Racke, 1993). Su entrada en sistemas acuáticos salados o de agua dulce puede ser causada por escorrentías de suelos contaminados o por erosión y transporte de partículas de suelo.

Los estudios sobre el destino ambiental de la CP y sus mecanismos de degradación revelaron el 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) como el principal producto de degradación (Xu et al., 2008) producido por mecanismos hidrolíticos y fotolíticos (Baskaran et al., 2003). Este es más móvil que la molécula madre debido a su mayor solubilidad en agua, lo que provoca una contaminación generalizada del suelo y los medios acuáticos.

Con respecto a los estudios de ecotoxicidad, se encontró que la CP es altamente tóxica para aves como el pasto común, el gorrión común, los faisanes de cuello anillado y las palomas comunes con una LC_{50} variada de 5.6 a 10 mg/kg (Solomon et al., 2001, Christensen et al., 2009, Eng et al. 2017). En los sistemas acuáticos, se considera muy altamente tóxico para los invertebrados, los peces de agua dulce y los organismos estuarinos y marinos con valores de LC_{50} que oscilan entre 1 ng/L y 10 µg/L (Barron y Woodburn, 1995; Varó et al., 2002; Ali y Kumar, 2012; Wang et al., 2014; Majumder y Kaviraj, 2019). Se ha encontrado cierto grado de bioacumulación en varias especies, incluido el TCP y otros metabolitos (Thomas y Mansingh, 2002; Ashauer et al., 2006; Katagi, 2010).

Si bien existe una cantidad considerable de información relacionada con la ecotoxicidad de las sustancias químicas CP y TCP, no debe olvidarse que rara vez se encuentran individualmente. El hecho es que las sustancias químicas aparecen mezcladas en sitios contaminados, más a menudo la sustancia química original está en combinación con sus productos de degradación u otras sustancias químicas. Este es el caso de CP y TCP. Por lo tanto, el objetivo principal del presente estudio fue examinar la toxicidad interactiva de la CP y su principal producto de degradación como mezcla, basándose en la toxicidad observada de los productos químicos individuales y su combinación con modelos biológicos estandarizados como bacterias marinas luminiscentes *Aliivibrio fischeri*, alga unicelular de agua dulce *Pseudokirchneriella subcapitata* e invertebrados *Daphnia magna*.

Materiales y métodos

Productos químicos y organismos de prueba

Clorpirifos (CAS: 2921-88-2), (O, O-diethyl O-3,5,6-tricloropiridin-2-il fosforotionato; CP) 99,7% estándar analítico y su metabolito 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) (CAS: 6515-38-4) 99,3%, el estándar analítico se obtuvo de Sigma-Aldrich y el producto comercial (CP 44,5%–480 g/L, disolvente, emulsionante y otros 55,5%) fue fabricado por Dow AgroSciences. Las propiedades de los compuestos seleccionados utilizados en este estudio se describen en la Tabla 1.

Se prepararon soluciones madre de compuestos y series de diluciones en agua destilada o en el medio de cultivo apropiado para cada ensayo de toxicidad. El organismo de prueba *Aliivibrio fischeri* (cepa NRRL B-11177) fue suministrado por Fisher Scientific (Madrid, España); el alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Algatoxkit, MicroBioTest Inc, Gent, Bélgica) y las ephippias (huevos inactivos) del crustáceo *Daphnia magna* (Daphtoxkit, MicroBioTest Inc, Gent, Bélgica) fueron suministrados por ECOTest S.L. (Valencia, España). El agua empleada en los experimentos fue de grado Milli-Q. Todos los reactivos utilizados para las pruebas de bacterias, algas y crustáceos fueron de grado analítico. Para todos los bioensayos, se realizaron controles de sensibilidad de rutina utilizando la sal $K_2Cr_2O_7$ (Sigma-Aldrich, reactivo analítico).

Ensayo de toxicidad aguda con Aliivibrio fischeri

El ensayo de inhibición de la luminiscencia de bacterias se realizó de acuerdo con la directriz ISO 11348-3: 2007 (ISO, 2007) con las modificaciones que se describen a continuación:

Las bacterias se expusieron a concentraciones iniciales de 15 mg/L de CP, TCP o CP comercial, durante 30 min. La mezcla CP: TCP (1:1) se ensayó a una concentración inicial de 4 mg/L. Inmediatamente antes de iniciar el ensayo, se reconstituyeron las bacterias liofilizadas y luego se preparó una suspensión bacteriana con el medio descrito en la guía (NaCl 20 g/L; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 2.035 g/L; KCl 0.30 g/L). Como diluyente, se usa NaCl al 2% en

agua destilada. Para el ensayo se utilizaron microplacas blancas de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Corning Inc., Nueva York, EE.UU.). Cada placa contenía 8 réplicas de controles (diluyente y suspensión bacteriana), 4 réplicas de cada concentración de compuestos ensayados (contaminante, diluyente y suspensión bacteriana) y 4 blancos (diluyente). El volumen total por pocillo fue de 200 µl.

La preparación del ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera: se prepararon diluciones en serie para cada muestra directamente en NaCl al 2% en una microplaca con el módulo inyector del lector de microplacas Tecan Infinite M200; esta placa se mantuvo a 15°C durante 1 hora. Otra microplaca se llenó manualmente con la suspensión de bacterias y se mantuvo a 15°C durante 15 min. Después del período de incubación, se controló la luminiscencia para ambas placas. Luego, el contenido de la primera placa se transfirió a la segunda placa con una pipeta multicanal, se incubó a 15°C durante 30 min y se midió la luminiscencia. Para evaluar la reducción de la bioluminiscencia, los valores se procesaron de acuerdo con el protocolo ISO para obtener los porcentajes de inhibición de la luminiscencia.

Prueba de toxicidad aguda con Pseudokirchneriella subcapitata

Se realizó una prueba de inhibición del crecimiento miniaturizado con *P. subcapitata*, según el protocolo ISO 8692: 2012 (ISO, 2012a). El alga se expuso a concentraciones iniciales de 50, 2,1, 6,3 y 0,1 mg/L de CP, TCP, CP comercial y mezcla, respectivamente, durante 72 horas. *P. subcapitata* se tomó del sistema comercial Algal Toxkit F. El organismo, inmovilizado en perlas de algas, se desinmovilizó y se resuspendió en el medio basal de Bold (Bischoff y Bold 1963). El cultivo madre resultante se mantuvo en un matraz de 250 mL, se agitó (150 rpm) bajo luz blanca continua (6.000–10.000 lux) y se incubó a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ en una cámara calentada. Se utilizó un cultivo de algas de tres días como inóculo en las pruebas de toxicidad.

Los ensayos se llevaron a cabo en microplacas transparentes de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Corning Inc., Nueva York, EE. UU.). Cada prueba consistió en 16 réplicas de control (medio de cultivo y algas), 8 réplicas de cada concentración de compuestos ensayados (contaminante, medio de cultivo y algas) y 8 réplicas de blanco (medio de cultivo). Se realizaron

diluciones en serie con medio de cultivo a dos de la solución madre de cada compuesto. Las microplacas se llenaron automáticamente utilizando el módulo inyector del lector de placas Tecan Infinite M200. La concentración inicial de células en cada pocillo fue de 10^4 células/mL y el volumen final de 300 μ L. Las microplacas se introdujeron en bolsas de plástico transparentes llenas de CO₂ al 2% y se incubaron en las mismas condiciones que los cultivos madre. El crecimiento de los cultivos se midió cada 24h por la fluorescencia del contenido *in vivo* de clorofila a, a 430 nm y 663 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente. Todos los datos de fluorescencia se transformaron en valores de concentración celular y se determinaron los porcentajes de inhibición del crecimiento de las algas expuestas a compuestos y mezcla, de acuerdo con el protocolo.

Prueba de toxicidad aguda con Daphnia magna

La evaluación de la toxicidad de los productos químicos CP, TCP y CP comercial con *D. magna* se realizó de acuerdo con la directiva ISO 6341: 2012 (ISO, 2012b). Las efipias se lavaron con agua corriente, se re-suspendieron con agua reconstituida (0,294 mg/L CaCl₂ · 2H₂O; 0,123 mg/L MgSO₄ · 7H₂O; 0,065 mg/L NaHCO₃; 0,0058 mg/L KCl; dureza 250 mg/L como CaCO₃; pH 7,8 $\pm$ 0,5) y se incubó a 22 $\pm$ 1°C con iluminación constante (3000-4000 lux) en una cámara climática.

En la prueba de toxicidad, los neonatos, que tienen menos de 24h desde la eclosión, fueron expuestos a diluciones seriadas (factor de dilución 2) de CP, TCP o CP comercial, preparadas con medio de reconstitución a partir de una solución madre de 31,3, 250 y 3,9 μ g/L, respectivamente. La mezcla CP: TCP (1: 1) se ensayó a una concentración inicial de 7,8 μ g/L. Los ensayos consistieron en controles y concentraciones de prueba y se realizaron en placas de Petri (5,5 cm de diámetro). Todas las soluciones se evaluaron por cuadruplicado. Se transfirieron cinco individuos de *D. magna* a cada placa de Petri que contenía 10 ml de solución de prueba o medio de reconstitución (controles). Las placas se incubaron durante 24 h en la oscuridad a una temperatura constante de 20 $\pm$ 2°C en una cámara climática, y se contó el número de individuos inmóviles y vivos para obtener el porcentaje de inmovilidad.

Cálculo del índice de combinación

Con el fin de cuantificar el sinergismo, efecto aditivo o antagonismo de la combinación binaria de CP y TCP (1:1), se calcularon los valores del índice de combinación (IC) a una tasa de inhibición en los parámetros de toxicidad del 50% (IC₅₀) utilizando la ecuación descrita por Chou (2006) y Yang et al., (2017). Los efectos de la mezcla CP: TCP (1:1) sobre los organismos ensayados se clasificaron de acuerdo con Chou (2006) quien describió una clasificación detallada de CI <0.1 sinergismo muy fuerte, sinergismo fuerte 0.1-0.3, sinergismo 0.3-0.7, sinergismo 0.7- 0.85 sinergismo moderado, 0.85-0.90 sinergismo leve, 0.90-1.10 casi aditivo, 1.10-1.20 leve antagonismo, 1.20-1.45 antagonismo moderado, 1.45-3.3 antagonismo, 3.3-10 antagonismo fuerte, > 10 antagonismo muy fuerte.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron para verificar si estaban ajustados a una distribución normal y homogeneidad de varianza, y se analizaron mediante el uso de un ANOVA de una vía, seguido de un análisis post-hoc utilizando la prueba de diferencia mínima de significación (LSD) de Fisher para determinar las diferencias entre las medias y la corrección de Dunnett prueba para determinar el valor NOEC. La IC₅₀ (concentración que inhibe la luminiscencia de las bacterias o el crecimiento de algas en un 50%) y la LC₅₀ (concentración que inhibe la movilidad de los microcrustáceos en un 50%) se calcularon mediante análisis Probit. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un intervalo de confianza del 95% y un nivel de significancia de $p < 0.05$ con el programa Statgraphics v.6.0 y el programa SPSS Statistics v.20.

Resultados y discusión

Exactitud de la prueba de toxicidad

La precisión de las pruebas de toxicidad aguda, expresada como coeficiente de variación (CV%) para $K_2Cr_2O_7$ y los valores de Cl_{50} fueron 33,3% para *A. fischeri*, 23,0% para *P. subcapitata* y 36,1% para *D. magna*. Los datos de precisión entre laboratorios de un estudio de métodos de prueba de toxicidad aguda utilizando el dicromato de potasio tóxico de referencia muestran valores de Cl_{50} de 18,71, 1,19 y 1,12 mg/L para *A. fischeri*, *P. subcapitata* y *D. magna*, respectivamente, con CV de 32,9, 23 y 50% (ISO, 2007; 2012a, b). Los valores de $K_2Cr_2O_7$ IC_{50} en las directivas están más cerca de los valores informados aquí (*A. fischeri* IC_{50} 13,7 mg/L, *P. subcapitata* IC_{50} 3,1 mg/L y *D. magna* IC_{50} 1,9 mg/L).

Toxicidad aguda de los compuestos de prueba

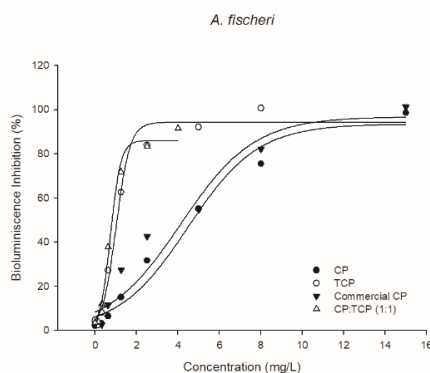
Los datos experimentales con *A. fischeri*, *P. subcapitata* y *D. magna* expuestos a CP, TCP, CP comercial y mezcla CP: TCP (1:1) se presentan como curvas de concentración-respuesta (Figuras 1-3). Los valores de NOEC e IC_{50} para cada compuesto o mezcla se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Observaciones ecotoxicológicas microbianas y niveles de organización biológica

Compuesto	<i>A. fischeri</i> (mg/L)		<i>P. subcapitata</i> (mg/L)		<i>D. magna</i> (µg/L)	
	NOEC	IC_{50}	NOEC	IC_{50}	NOEC	IC_{50}
CP Puro	0.63	3.7 (2.5 – 6.0)	<2.1	4.9 (4.8 – 5.1)	0.49	1.21 (0.97 – 1.49)
CP Comercial	0.31	2.9 (2.3 – 4.0)	0.26	1.11 (1.08 – 1.15)	0.24	0.72 (0.58 – 0.91)
TCP	0.31	0.98 (0.73 – 1.35)	0.087	0.29 (0.28 – 0.32)	2.0	9.2 (7.3 – 11.4)
CP:TCP (1:1)	0.16	0.78 (0.57 – 1.12)	0.0063	0.022 (0.021 – 0.023)	0.12	0.62 (0.48 – 0.78)

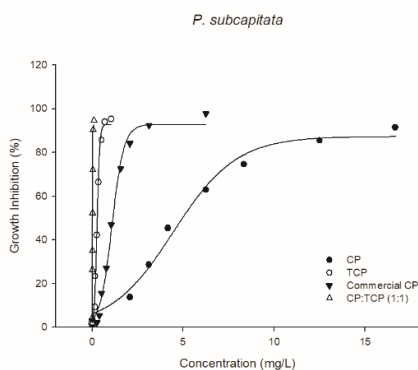
Como se observa en la Figura 1, el rango de concentraciones que causan efectos significativos ($p < 0.05$) a *A. fischeri*, estuvo entre 1.25 y 15 mg/L para CP, entre 0.63 y 15 mg/L para CP comercial y TCP, siendo de 0.31 a 4 mg/L para la mezcla, lo que indica una mayor toxicidad para este último.

Figura 6. Curvas experimentales de concentración-respuesta aguda para compuestos estudiados y mezcla para *A. fischeri*



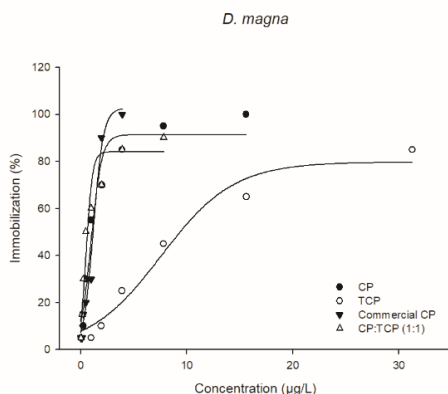
En el caso de las algas (Fig. 7), las concentraciones que causaron efectos significativos ($p < 0.05$) con respecto al control fueron mayores a CP que a otros compuestos, entre 2.1 y 50 mg/L; para CP y TCP comerciales, las concentraciones variaron de 0.52 a 6.3 mg/L y de 0.15 a 2.1 mg/L, respectivamente.

Figura 7. Curvas experimentales de concentración-respuesta aguda para compuestos estudiados y mezcla para *P. subcapitata*



Las concentraciones de efecto significativo de la mezcla de CP: TCP fueron notablemente más bajas, entre 0,008 y mg/L y 0,10 mg/L. Por último, el rango de concentraciones que causan efectos significativos ($p < 0.05$) en la movilidad de *D. magna* fue visiblemente más bajo que las algas y bacterias, entre 0.98 y 31.3 $\mu\text{g/L}$ para CP, entre 3.9 a 250 $\mu\text{g/mL}$ para TCP y entre 0.49 a 3.9 $\mu\text{g/L}$ para PC comercial; para la mezcla de CP: TCP, las concentraciones oscilaron entre 0,24 y 7,8 $\mu\text{g/L}$ (Fig. 8).

Figura 8. Curvas experimentales de concentración-respuesta aguda para compuestos estudiados y mezcla para *D. magna*



El TCP fue, aproximadamente, 4 y 17 veces más tóxico que el compuesto original para las bacterias y las algas, respectivamente. Sin embargo, para *D. magna*, el TCP fue menos tóxico con un valor de CI_{50} de 9.17 $\mu\text{g/L}$, seguido de CP puro con un valor de CI_{50} de 1.2 $\mu\text{g/L}$, como se indica en la Fig. 8. El CP comercial y la mezcla de CP: TCP mostraron una toxicidad similar con valores de CI_{50} de 0,72 y 0,62 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. A diferencia de la CP, la TCP no inhibe la actividad de la acetilcolinesterasa. La CP pura fue menos tóxica que la CP comercial en todos los casos. La mayor sensibilidad de los organismos estudiados a este último en comparación con el compuesto puro podría reflejar el aumento de la biodisponibilidad de la formulación. La toxicidad de la mezcla para los organismos analizados fue mayor que para el TCP y el CP puro y comercial, con valores de CI_{50} de 0,79 mg/L, 0,022 mg/L y 0,62 $\mu\text{g/L}$ para *A. fischeri*, *P. subcapitata* y *D. magna*, respectivamente.

Con base en sus valores de toxicidad, los tres organismos utilizados en este estudio respondieron de manera muy diferente a la mezcla de CP, TCP, CP comercial y CP: TCP (Tabla 1). *D. magna*, como se esperaba, fue más sensible a los compuestos que *P. subcapitata* y *A. fischeri*, presentando valores de IC_{50} de orden $\mu\text{g/L}$ para todos los compuestos. Se sabe que los plaguicidas organofosforados inhiben la actividad de la acetilcolinesterasa (Fulton y Key, 2001) que no está presente en bacterias y organismos de algas.

Barron y Woodburn (1995) en su revisión de la ecotoxicología de la PC, señalan a los invertebrados como los organismos más sensibles en comparación con los moluscos marinos y las algas. La toxicidad de la CP, basada en valores de CL_{50} , para catorce especies de crustáceos de agua dulce osciló entre 0,06 y 700 $\mu\text{g/L}$, siendo los cladóceros los más sensibles. Los valores de LC_{50} reportados en la literatura para varias especies de cladóceros varían de 0.015 $\mu\text{g/L}$ a 340 $\mu\text{g/L}$ (Kersting y Van Wijngaarden, 1992; Van Wijngaarden et al., 1993; Bailey et al., 1996; Moore et al., 1998; Tomlin, 2000; Guilhermino et al., 2000; Sherrard et al., 2002; Brock, 2003; Zalizniak y Nugegoda, 2006; Cáceres et al., 2007, Palma et al., 2008); sin embargo, la mayoría de los valores de toxicidad estuvieron entre 0.06 y 1.7 $\mu\text{g/L}$.

Estos valores son similares a los datos de toxicidad obtenidos en este trabajo para *D. magna* tanto para CP pura (1,2 $\mu\text{g/L}$) como comercial (0,72 $\mu\text{g/L}$). La aplicación de CP en un ensayo de microcosmos por Daam et al., (2008) provocó cambios significativos en las comunidades biológicas de agua dulce siendo el cladoceran *Moina micrura* la especie más susceptible con NOEC de 0.1 $\mu\text{g/L}$. Van Wijngaarden y Leeuwangh (1989) encontraron una NOEC de 0.065 $\mu\text{g/L}$ para *Daphnia pulex* en estanques. Los datos de las pruebas de laboratorio de PC pura y comercial obtenidos para el cladocerano en este trabajo fueron más altos, con NOEC de 0.49 y 0.24 $\mu\text{g/L}$, respectivamente (Cuadro 1).

Caracterización de la toxicidad aguda de la CP por Giddings et al., (2014) comparando los valores de HC_5 (Concentración peligrosa para el 5% de las especies) mostró que los crustáceos eran más sensibles ($HC_5 = 0.034 \mu\text{g/L}$), seguidos de los insectos ($HC_5 = 0.087 \mu\text{g/L}$) que eran los peces menos sensibles ($HC_5 = 0.812 \mu\text{g/L}$).

En nuestro trabajo, *A. fischeri* ha sido el organismo más tolerante a CP, TCP y mezcla de acuerdo con Palma et al., (2008) quien indicó que las bacterias no son tan sensibles a los insecticidas y herbicidas como otros organismos acuáticos. Los efectos ecotoxicológicos del herbicida atrazina y

los insecticidas sulfato de endosulfán y CP fueron evaluados por Palma et al., (2008) utilizando una batería de prueba que mostró una mayor sensibilidad del microcrustáceo *D. magna* que de la bacteria *A. fischeri*. Minagh y Col. (2009) también encontraron que el sistema modelo de *A. fischeri* era menos sensible que el ensayo de exposición a *D. magna*. Los valores de Cl_{50} de CP pura y comercial obtenidos en este estudio para *A. fischeri* han sido de 3,7 y 2,9 mg/L, respectivamente. Estos valores son similares al valor de Cl_{50} de 2.8 mg/L obtenido por Palma et al., (2008), pero fue menor que lo informado por Somasundaram et al., (1990) para las mismas bacterias (46 mg/L) analizadas en el Microtox.

Los datos sobre la toxicidad de la CP en las algas en la literatura son diversos. Una revisión ecotoxicológica llevada a cabo por Barron y Woodburn (1995) informa que concentraciones de CP superiores a 100 $\mu\text{g/L}$ produjeron toxicidad para las algas de agua dulce y salada, con diferencias entre especies de al menos dos órdenes de magnitud, indicativas de alta toxicidad de las algas. La revisión de la NRA de CP (2000) informó un valor de EC_{50} de 96h para el alga verde *Scenedesmus subspicatus* de 660 $\mu\text{g/L}$. De Lorenzo y Serrano (2003) encontraron disminuciones significativas en la tasa de crecimiento de la población de alga marina *Dunaliella tertiolecta* a concentraciones de CP superiores a 400 $\mu\text{g/L}$ y una inhibición del crecimiento del 50% a 769 $\mu\text{g/L}$. La CE_{50} a las 72h para *P. subcapitata* fue de 64 $\mu\text{g/L}$ (NRA 2000). La toxicidad de la PC (EC_{50}) para cinco especies de algas informada por Nikolenko y Amirkhanov (1993) fue mucho menor, varió de 6 a 42 mg/L. En este estudio, la CE_{50} para *P. subcapitata* se encontró en 4.9 y 1.11 mg/L para CP y CP comercial, respectivamente. *D. tertiolecta* era más sensible que la especie de algas de agua dulce *P. subcapitata* y más sensible que muchos peces e invertebrados a varios plaguicidas (USEPA, 1999).

La toxicidad de la CP pura y comercial obtenida en *P. subcapitata* fue mayor que la toxicidad informada por Chen et al., (2016). Los datos sobre la toxicidad de la CP en las algas en la literatura son diversos. Una revisión ecotoxicológica llevada a cabo por Barron y Woodburn (1995) informa que concentraciones de CP superiores a 100 $\mu\text{g/L}$ produjeron toxicidad para las algas de agua dulce y salada, con diferencias entre especies de al menos dos órdenes de magnitud, indicativas de alta toxicidad de las algas. La revisión de la NRA de CP (2000) informó un valor de EC_{50} de 96h para el alga verde *Scenedesmus subspicatus* de 660 $\mu\text{g/L}$. De Lorenzo y Serrano

(2003) encontraron disminuciones significativas en la tasa de crecimiento de la población de alga marina *Dunaliella tertiolecta* a concentraciones de CP superiores a 400 µg/L y una inhibición del crecimiento del 50% a 769 µg/L.

La CE₅₀ a las 72h para *P. subcapitata* fue de 64 µg/L (NRA, 2000). La toxicidad de la CP (EC₅₀) para cinco especies de algas informada por Nikolenko y Amirkhanov (1993) fue mucho menor, varió de 6 a 42 mg/L. En este estudio, la CE₅₀ para *P. subcapitata* se encontró en 4.9 y 1.11 mg/L para CP y CP comercial, respectivamente. Por su parte, la *D. tertiolecta* era más sensible que la especie de algas de agua dulce *P. subcapitata* y más sensible que muchos peces e invertebrados a varios plaguicidas (USEPA, 1999). La toxicidad de la CP pura y comercial obtenida en *P. subcapitata* fue mayor que la toxicidad informada por Chen et al., (2016) para *Chlorella pyrenoidosa* y *Merismopedia* sp. con valores de CE₅₀ a las 72h de 11,46 y 25,80 mg/L, respectivamente, y que la toxicidad en cianobacterias *Spirulina platensis* (CE₅₀ de 33,65 mg/L) informada por Bhuvaneswari et al., (2018).

Los valores de NOEC de siete días de CP para seis especies de algas de agua dulce estuvieron entre 10 y 100 µg/L (Anzecc y Armcanz, 2000), mucho más bajos que los valores de NOEC encontrados para *P. subcapitata* (p <0.05) a una concentración de CP pura por encima de 2.1 mg/L y a una concentración comercial de CP de 0,26 mg/L y *Merismopedia* sp. con valores de CE₅₀ a las 72h de 11,46 y 25,80 mg/L, respectivamente, y que la toxicidad en cianobacterias *Spirulina platensis* (CE₅₀ de 33,65 mg/L) informada por Bhuvaneswari et al., (2018). Los valores de NOEC de siete días de CP para seis especies de algas de agua dulce estuvieron entre 10 y 100 µg/L (Anzecc y Armcanz, 2000), mucho más bajos que los valores de NOEC encontrados para *P. subcapitata* (p <0.05) a una concentración de CP pura por encima de 2.1 mg/L y a una concentración comercial de CP de 0,26 mg/L.

En cuanto a los ensayos con peces e invertebrados, el metabolito TCP muestra ser de leve a moderadamente tóxico, consistente con su carácter hidrófilo (NRA, 2000), sin embargo, al igual que el CP, varios autores han observado un alto grado de variabilidad entre las especies de *Daphnia*. El TCP no inhibe la acetilcolinesterasa y, en general, es menos tóxico para los organismos acuáticos que el CP (USEPA 2008). Sin embargo, se descubrió que el TCP es más tóxico que su químico parental CP para la supervivencia de *Daphnia carinata* en medio de cultivo de cladoceran por Cáceres et al., (2007), mientras que el TCP no mostró toxicidad para el organismo hasta una concentración de 2 µg/L en agua natural.

Los valores de TCP encontrados en la literatura para *D. magna* variaron entre 2.9 y 10.4 mg/L (Base de datos PubChem, Gorzinski et al., 1991). La LC_{50} de TCP de 9.2 $\mu\text{g/L}$ reportada en este estudio para *D. magna* fue más cercana a la encontrada por Cáceres et al., (2007) para *D. carinata* con una CL_{50} de 0,20 $\mu\text{g/L}$. El organismo más sensible al metabolito TCP fue la *Daphnia* seguida por el alga con valores de toxicidad (IC_{50}) de 9.2 $\mu\text{g/L}$ y 0.29 mg/L, respectivamente.

La toxicidad del TCP para *D. carinata* (0,20 $\mu\text{g/L}$) informada por Cáceres et al., (2007) también fue mucho mayor que la toxicidad para *P. subcapitata* reportada en la base de datos PubChem (EC_{50} 0.61 mg/L), pero la toxicidad del metabolito para *D. magna* (LC_{50} 10.4 mg/L) fue mucho menor que para el alga (USEPA 2008). En un bioensayo Microtox, el TCP tuvo una CL_{50} de 18,6 mg/L para *A. fischeri*, lo que indica un efecto solo a una alta concentración ambiental poco realista (Somasundaram et al., 1990), pero para las mismas bacterias encontramos una toxicidad mucho menor (CL_{50} 0,98 mg/L).

Toxicidad de la mezcla

Para todos los organismos analizados, la toxicidad de la mezcla de CP: TCP fue mayor que la de los compuestos por separado, con valores de CI_{50} de 0,79 mg/L, 0,022 mg/L y 0,62 $\mu\text{g/L}$ para *A. fischeri*, *P. subcapitata* y *D. magna*, respectivamente. Estos resultados sugieren que la CP y su producto de degradación pueden interactuar sinérgicamente. Para cuantificar esta interacción de los compuestos, se calculó un Índice de Combinación (IC) y se clasificó según Chou (2006) al 50% de efecto de los organismos ensayados. Los valores de CI obtenidos indican un sinergismo muy fuerte para *P. subcapitata* ($CI = 0.04$), un sinergismo fuerte para *D. magna* ($CI = 0.29$) y sinergismo para *A. fischeri* ($CI = 0.51$). Cáceres et al., (2007) reportaron resultados similares cuando usaron medio de cultivo de cladoceran como medio de ensayo obteniendo valores similares de CL_{50} , 0.24 $\mu\text{g/L}$ y 0.20 $\mu\text{g/L}$ para CP y TCP, respectivamente, y se observó un aumento de toxicidad para la mezcla (0.08 $\mu\text{g/L}$), lo que indica una fuerte sinergia entre los productos químicos.

Riesgo ambiental de CP y TCP

Según las categorías de toxicidad basadas en los valores de CI_{50} (Naciones Unidas, 2011), la CP pura y comercial puede clasificarse como tóxica para *A. fischeri* y *P. subcapitata*. Todos los compuestos fueron muy tóxicos para el cladoceran *D. magna*, pero para *A. fischeri* y *P. subcapitata* sólo lo fueron la mezcla de TCP y CP: TCP. Estos resultados indican un alto riesgo ambiental para los ecosistemas acuáticos.

Las concentraciones ambientales de CP reportadas por algunos autores en cuerpos de agua por aplicación directa al agua o entrada indirecta oscilaron entre 0.5 $\mu\text{g/L}$ y 700 $\mu\text{g/L}$ (Wood y Stark, 2002; USEPA, 2002; Moore et al., 2002, Mazanti et al., 2003, Bonifacio et al., 2017). En nuestro estudio, el nivel sin efecto y el primer nivel de efecto observable en *D. magna* fueron 0.24 y 0.49 $\mu\text{g/L}$ para el insecticida comercial, respectivamente, y 0.12 y 0.24 $\mu\text{g/L}$ para la mezcla CP: TCP, respectivamente. Estas concentraciones son mucho más bajas que las que se encuentran típicamente en los ambientes acuáticos; así, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el CP puede actuar en ecosistemas acuáticos a niveles que producen efectos tóxicos a los microcrustáceos. Palma y Col. (2008) sugieren un riesgo potencial para las especies de animales acuáticos debido a la exposición aguda a CP, que puede influir en la densidad de algunas poblaciones de crustáceos.

La presencia de CP y su metabolito TCP en ecosistemas acuáticos es una preocupación, porque su mezcla puede causar alteraciones en varios aspectos como parámetros de comportamiento, neurológicos y reproductivos en microcrustáceos que tienen una posición clave en la cadena alimentaria (De Silva y Samayawardhena, 2005; Özcan Oruç, 2010). Sin embargo, el TCP no mostró toxicidad en agua natural hasta una concentración de 2 $\mu\text{g/L}$ debido a su degradación mediada por microbios (Cáceres et al., 2007).

Además, se tiene en cuenta que determinadas condiciones físicas como el pH pueden modificar la estabilidad de CP en los sistemas acuáticos. Se ha demostrado un aumento de la tasa de hidrólisis con el pH: la vida media en el agua puede variar de 1,5 días a pH 8 a 100 días a pH 7 (Tomlin, 2000). De Silva y Samayawardhena (2005) informaron una vida media de CP de 16 a 77 días en cuerpos de agua dulce de acuerdo con las condiciones ambientales. Varios investigadores han examinado el comportamiento de CP en aguas naturales y sedimentos y, en general, han observado vidas

medias de disipación mucho más cortas que en los estudios de laboratorio debido a fuerzas disipativas y degradantes (por ejemplo, volatilización, hidrólisis) en aguas naturales y sedimentos (Barron y Woodburn, 1995).

Conclusiones

Generalmente, los estudios de toxicidad basados en contaminantes individuales no son suficientes para predecir la toxicidad real en el medio ambiente. Se sabe que los productos químicos no están solos en los ecosistemas, sino que se presentan como mezclas. Los compuestos parentales es posible encontrarlos junto a sus productos de degradación, y estos pueden interactuar entre sí y provocar un aumento de los efectos tóxicos. Además, en el medio ambiente existen muchas especies de organismos por lo que es necesario realizar estudios sobre una batería de organismos. Debido a eso, en este estudio se dilucidó la toxicidad tanto simple como binaria de CP y TCP para *V. fischeri*, *P. subcapitata* y *D. magna*.

Los resultados muestran que la respuesta del ensayo de toxicidad a los compuestos estudiados depende de la sensibilidad de las especies utilizadas. En cuanto a las especies de crustáceos, *D. magna* fue el organismo más sensible para CP puro, CP comercial, TCP y mezcla CP: TCP (1: 1). El TCP era más tóxico que el compuesto original para las bacterias y las algas; sin embargo, para el cladoceran, el TCP fue menos tóxico. El compuesto más tóxico, para todos los modelos biológicos estudiados, fue la CP comercial. La toxicidad debida al efecto sinérgico de la CP y su metabolito TCP podría resultar en efectos negativos para los productores primarios y consumidores en concentraciones ambientales más bajas de lo esperado.

Capítulo 4.

Ensayos Alternativos en Ecotoxicología Microbiana con un Modelo de Levaduras Marinas y Posible Aplicación en Problemas de Contaminación por Clorpirifos

Prefacio

Los sedimentos marinos están expuestos al clorpirifos-CP y su metabolito TCP y son una fuente de levadura (modelo eucariota) con importantes capacidades bioquímicas y fisiológicas aplicables a la biotecnología ambiental y ecotoxicología. Los factores relacionados con las características fisiológicas (temperatura/concentración de sal/concentraciones tóxicas) requieren bioensayos de laboratorio básicos, que brindan información muy importante para aplicar en estas áreas de investigación.

Este estudio tuvo como objetivo mostrar y describir las respuestas de las levaduras marinas con el uso de técnicas microbiológicas rápidas y económicas en el laboratorio. Se procesaron los sedimentos de la bahía de Cartagena, se aislaron levaduras en agar YPD, se caracterizaron bioquímicamente con API 20C y se realizaron pruebas de antibiosis en agar por crecimiento inhibitorio, así como crecimiento a concentraciones de sal (2/4/10/25%), crecimiento a temperaturas (4/25/37/45°C) en agar YPD y prueba de esterasa de superficie de agarosa mediante visualización de opacidad y cambio de color, además de una prueba piloto de toxicidad (CP/TCP) en superficie de agar. Se recuperó y cuantificó el ácido dextrorribonucleico (ADN) total mostrando mayores concentraciones en el sedimento liofilizado y, con la técnica DGGE (Degradation Gel Gradient Electrophoresis) se mostró una mayor diversidad de hongos.

Se aislaron 10 levaduras con el género más dominante *Candida* 60%, *Cryptococcus* 30% y *Rhodotorulla* 10%, las cuales mostraron asimilación de carbohidratos, baja antibiosis entre ciertas levaduras, presencia de esterasas/lipasas en todas, crecimiento en temperaturas extremas y en concentraciones de sal obteniendo levaduras extremófilas y concentración mínima inhibidora de CP y TCP en cuatro levaduras que muestran mayor toxicidad de TCP. Se pueden utilizar técnicas microbiológicas básicas, generando información valiosa para su aplicabilidad.

Introducción

La biotecnología y ecotoxicología utiliza microorganismos aislados de diferentes hábitats para prevenir mitigar o eliminar contaminantes químicos del medio ambiente (Ortega, 2016). La búsqueda de microorganismos en ambientes especiales como los ecosistemas marinos, donde factores como concentraciones de sal, temperaturas, simbiosis con otros organismos, presencia de contaminantes, entre otros, promueven la resistencia a variables físicas y químicas que conducen a una condición fisiológica para la producción de ingredientes activos (Debbab et al., 2010), basados en procesos metabólicos de degradación microbiana.

La contaminación química por plaguicidas genera un gran problema ambiental, donde los ecosistemas acuáticos costeros tienen un alto riesgo de impacto y contaminación, especialmente en los estuarios de los grandes centros urbanos e industriales y su uso incrementa el consumo y generación de residuos al ambiente, afectando los ecosistemas costeros (Wang et al., 2010). Insecticidas organofosforados (OPI) como Clorpirifos (CP), y su metabolito TCP (3,5,6-tricloro-2-piridinol), más hidrosolubles y persistentes (Ramírez y Lacasaña, 2001; Sogorb y Vilanova, 2002), que se acumula en aguas, suelos y sedimentos, afectando a un gran número de organismos no objetivo (Devine et al., 2008).

Cuando los contaminantes interactúan con los microorganismos se generan dos áreas primordiales, una la toxicología microbiana donde se mide la adaptación y dosis-respuesta, y la biotecnología microbiana, donde se involucran los procesos de biodegradación (Ghiglione et al., 2016). Los microorganismos degradantes se han utilizado como controladores de la contaminación por plaguicidas, debido a su capacidad funcional, resistencia

y adaptación a ambientes estresados (Vidotti y Rollemberg, 2004). Bacterias, microalgas y hongos son ejemplos de estos procesos (Ma et al., 2012; Scheerer et al., 2006).

La búsqueda o bioprospección de levaduras en diferentes hábitats es un tema de gran interés en microbiología y biotecnología aplicada donde se destacan importantes desarrollos (Alperstein et al., 2020), además la aplicación de levaduras marinas está a la vanguardia de las aplicaciones industriales (Saleh et al., 2020). El uso de levaduras en aplicaciones basadas en biotecnología microbiana y ecotoxicología se sustenta en el hecho de que se proponen como organismos experimentales (Botstein y Fink, 2011), siendo catalogadas como organismos modelo para evaluar la toxicidad y ecotoxicidad de plaguicidas (Esteve et al., 2009; Braconi et al., 2015). El desarrollo de la ecotoxicología resalta estudios con la levadura *Sacharomyces cereviciae* como modelo para evaluar la toxicidad de suelos y aguas contaminadas (Vighi y Villa, 2013). Frente a la degradación de compuestos organofosforados se encuentran Diazinón (*Rhodotorula glutinis* y *Rhodotorula rubra*), (Bempelou et al., 2013); Malatión, Demeton-S y VX p-s (*Saccharomyces cerevisiae*) y Methamidophos (*Saccaromyces rouxii* WY-3) (Berg et al., 2011; Wever et al., 2012).

La literatura muestra la aplicación de técnicas microbiológicas básicas, como por ejemplo: técnicas de difusión en placa y dilución en tubo para MIC para evaluar la toxicidad (Hassen, 1998); bioensayos con algas por difusión en agar (Harshwardhan y Nandkar, 2016); ensayo de difusión con papel de filtro sobre agar (Hayyan et al., 2013); ensayo de difusión en agar (ADA) con diferentes concentraciones tóxicas (Välimaa et al., 2008); microorganismos halófilos utilizados en biotecnología (González y Peña, 2002); aislamiento de microorganismos halófilos productores de hidrolizados extracelulares en agar con 10% de sal (Rohban et al., 2009); actividad esterasa y lipasa en agar (Buzzini y Martini, 2002) y actividad esterasa por opacidad en agar (Kumar et al., 2006); además se presenta la medición de los efectos de los plaguicidas en comunidades bacterianas con métodos de cultivo dependientes (Imfeld y Vuilleumier, 2012); y técnicas *in vitro* para medir esterases (Gilham y Lehner, 2005), entre otras.

Levaduras aisladas de sedimentos marinos y considerando conocer algunas respuestas bioquímicas, crecimiento a diferentes condiciones de temperatura, crecimiento a diferentes concentraciones de sal, la respuesta en la producción de esterasa/lipasa, la interacción entre levaduras y su

comportamiento al insecticida Clorpirifos con su metabolito, permitiendo conocer estas respuestas en diferentes morfotipos aislados, por lo que este estudio tuvo como objetivo mostrar y describir las respuestas de las levaduras marinas con el uso de técnicas microbiológicas rápidas y económicas en el laboratorio.

Materiales y métodos

Reactivos químicos

Los reactivos químicos utilizados en esta investigación fueron de grado analítico para glucosa, lactosa, maltosa, cloruro de sodio, nitrato de amonio, fosfato monopotásico, sulfato de disodio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio y sulfato de zinc (Merck). urea, Tween 80, Chorpyrifos (CP) 99,7% y 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) 99,3% eran de Sigma-Aldrich.

Medios de cultivos microbiológicos

Se utilizaron bases puras de agar, peptona, extracto de malta y extracto de levadura para preparar los medios (Becton Dickinson, BD) como agar extracto de malta salino (extracto de malta 20 g, NaCl 10 g, agar 17 g, cloranfenicol 200 ug/L y agua destilada 1000 ml). Agar papa dextrosa PDA (papa 200 g, glucosa 20 g, agar 15 g y agua destilada 1000 mL). Levadura-peptona-dextrosa, caldo YPD (extracto de levadura 10 g, peptona 20 g, dextrosa 20 g, cloranfenicol 0.5 g, agua destilada 1000 mL).

Al medio sólido se le añadió agar 15 g/L), caldo lactosa (extracto de carne 3 g, peptona 5 g, lactosa 5 g, agua destilada 1000 mL) y medio salino mínimo, MSM (NH₄NO₃ 12 g, KH₂PO₄ 8 g, Na₂SO₄ 2 g, KCl 4 g, MgSO₄.7H₂O 1 g, CaCl₂ 0.5 g, ZnSO₄.7H₂O 0,26 g, NaCl 20 g, cloranfenicol 200 ug/L, y agua destilada 1000 mL).

Muestreo y preparación de sedimentos

Se tomaron muestras de sedimentos superficiales marinos en la bahía de Cartagena, Colombia, en 9 estaciones: E1 (Latitud 10.390262/Longitud -75.533290), E2 (Latitud 10.3199 29/Longitud -75.541060), E3 (Latitud 10.318369/Longitud -75.526882), E4 (Latitud 10.325081/Longitud -75.517751), E5 (Latitud 10.36755/Longitud -75.510444), E6 (Latitud 10.375544/Longitud -75.516585), E7 (Latitud 10.382154/Longitud -75.532465), E8 (Latitud 10.391596/Longitud -75.591964) y Latitud 10.397261/Longitud -75.540941), teniendo en cuenta una distancia de 300-500 m de las fuentes de contaminación.

Las estaciones 1-3 están influenciadas por la desembocadura de aguas dulces del río Magdalena que transportan una gran cantidad de contaminantes del centro del país (metales, pesticidas, hidrocarburos, etc.); estaciones 4-5 con la zona industrial Mamonal (hidrocarburos, metales, pesticidas, etc.); estación 6 con zona industrial Bosque (antigua zona industrial en casco urbano) y estación 7-9 por aguas residuales y lluvias urbanas (materia orgánica, microorganismos patógenos, etc.).

Los sedimentos se tomaron con una draga, tipo Ekman. Los sedimentos frescos (SF) se recogieron en matraces de vidrio esterilizados con calor y se refrigeraron con hielo hasta su almacenamiento en laboratorio a -20°C para los análisis respectivos. Los sedimentos liofilizados (SL) se prepararon de la misma manera que el SF, pero el matraz se llenó hasta la mitad (el sedimento liofilizado es de fácil manejo, se presenta mejor conservación y estabilidad de sus componentes químicos y biológicos). El frasco de vidrio congelado tenía su boca grande cubierta con papel de aluminio y parafilm, perforada en toda su superficie. Los matraces de todas las estaciones se llevaron a liofilizador y en condiciones de temperatura a -50°C y presión de 0,1 PSI (FreeZone 1 serie Labconco), durante 36-48 horas para asegurar una liofilización completa.

Ensayo microbiológico y caracterización

DGGE (electroforesis en gel de gradiente degradante) de ADN total de sedimentos

- Extracción y cuantificación de ADN total en sedimentos: extracción del ADN total en cada uno de los sedimentos de las estaciones (sedimento fresco 0.5 gy sedimento liofilizado 0.25 g), siguiendo las instrucciones del fabricante de Power Soil, DNA Isolation KIT, MO BIO Laboratories Inc. La cuantificación del ADN en cada muestra se realizó en el fluorómetro QUBIT, Invitrogen, tomando 2 µl de ADN y siguiendo las instrucciones del fabricante, reportando los resultados en µg/ml. Las muestras de ADN se conservaron a -20°C (Akbar et al., 2014; Santos et al., 2010; Tedersoo et al., 2015).
- DGGE (Electroforesis en Gel de Gradiente Degradante). (Santos et al., 2010; Tedersoo et al., 2015).
- Amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa): se realizó una siguiente PCR utilizando los cebadores ITS4-EF4 (ITS4: secuencia 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; EF4: secuencia 5'-GGAAGGG [G/A] TGTATTATTAG-3 ') en un primera ronda con un volumen de reacción total de 25 µl (agua 19,25 µl, tampón 2,5 µl, MgCl₂ 1,25 µl, ITS4 0,5 µl, EF4 0,5 µl, dNTP 0,5 µl, BSA 1% 0,25 µl, Taq 0,25 µl, ADN 0,25 µl) y Condiciones de PCR 94°C durante 5 min, 35 ciclos: 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1,30 min, 72°C durante 5 min y finalizar a 4°C. Un segundo cebador ITS1FGC-ITS2 redondos (IT1FGC: secuencia 5'CGCCCGCCGCGCGCGCGCGGGGACGGGG-GGCTTGGCATTAGAGGAAGTBAA-3'; ITS2: secuencia 5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') con volumen total de reacción de 50 l (agua 39 l, T10X 5 l, ITS2 1 l, ITS1FGC 1 µl, dNTP 1 µl, Forma 0.5 µl, Taq 0.5 µl, ADN 2 µl) y condiciones de PCR 94°C durante 5 min, 35 ciclos, distribuidos de la siguiente forma: 55° C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos, 72°C durante 10 min. Los amplicones se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa.
- Procedimiento DGGE: Se preparó un gel de acrilamida al 8% con un gradiente desnaturante de 30-60% de formamida. Se corrieron veinte µl de cada amplicón de muestra desde cada estación por triplicado de amplicón a 75 V durante 16 horas. El gel se coloreó durante 1h en solución de tinte SYBER. Las fotos resultantes se analizaron con el software BioNumerics, v5.10.

Aislamiento y caracterización fenotípica de levaduras

- Aislamiento y conservación: se aislaron levaduras de muestras de sedimentos frescos (SF) y sedimentos liofilizados (SL); Se tomó 1 g de muestra y se mezcló con 10 ml de NaCl al 0,9% y 0,5 ml de Tween 20. La mezcla se agitó con vórtex durante 2 min y se dejó reposar durante 2 min para decantar las partículas, realizando una dilución 10X del sedimento. 100 µl de diluciones 10x y 100x con solución salina se extendieron en placa (triplicado) en agar extracto de malta (extracto de malta al 2%) y se incubaron a 25°C durante 5-7 días. A cada uno de los crecimientos se le añadió agar extracto de malta para su purificación y cada morfotipo purificado, sembrado por duplicado en tubos con algodón en inclinaciones de agar papa dextrosa, para su almacenamiento a 4°C (reservas de hongos filamentosos y levaduras). Además, se utilizaron caldos YPD, lactosa y MSM (con y sin cloranfenicol) para el aislamiento de más levaduras con Clorpirifos a 50 ppm, incubando YPD y lactosa a 25°C durante 5-7 días y agitando a 180 rpm el MSM para 30 días a temperatura ambiente (25-28°C). El control de calidad se basó en el mantenimiento de medios, para un control de crecimiento y control de la esterilización (Mabrouk et al., 2010; Kossuga et al., 2011).
- Caracterización bioquímica de levaduras: para confirmar un cultivo puro de cepas de levadura, se sembraron colonias puras en medio sólido y se transfirieron a nuevos medios. Los cultivos se revisaron al microscopio con tinción de Gram; observando levaduras ovaladas de diferentes tamaños y color azul y, además de confirmar la ausencia de células bacterianas. Se utilizó el sistema de identificación bioquímica para levaduras, API 20 C AUX® System (bioMérieux), siguiendo las instrucciones del fabricante (Matei et al., 2011).

Ensayo microbiológico con aplicación en biotecnología

- Asimilación de carbohidratos por levaduras aisladas de sedimentos: se determinó mediante la caracterización bioquímica de las levaduras mediante el sistema API 20 C AUX® (Bio Mérieux), donde se recogieron los datos de asimilación en cada una de las levaduras y se reportaron como positivos (+) o negativos (-).

- Crecimiento de levadura: las levaduras conservadas se volvieron a colocar en YPD Agar 3% NaCl y se incubaron durante 24h a una temperatura de 25-28° C. Se transfirieron cinco colonias a caldo YPD 3% NaCl y se incubaron durante 24h a una temperatura de 25-28°C, a 0.5 de la escala MacFarland, obteniendo el inóculo para el experimento posterior.
- Pruebas de simbiosis o antibiosis de levaduras aisladas de sedimentos:
 - Ensayo de superficie de agar: se sembró cada levadura sobre la superficie de agar YPD perpendicularmente y las demás levaduras en paralelo, asegurando el contacto directo y se incubó durante 48h a una temperatura de 25-28°C; los resultados se codificaron como simbiosis-crecimiento (+), antibiosis-zona de inhibición del crecimiento (-) y antibiosis baja (o).
- Ensayo piloto y definitivo en superficie de agar en la detección de esterasas/lipasas en levaduras:
 - Exposición de inóculo en agar para esterasas: se prepararon dos agares (Agar Tween 80-opacidad y Agar Tween 80-indicador), que se inocularon con inóculos de levadura con un volumen de 3 ul por triplicado y se incubaron durante 5 días a una temperatura de 25-28°C; la prueba se consideró positiva para el Agar de opacidad Tween 80 con una zona de aclaramiento alrededor del inóculo y una zona con cambio de color de rojo a amarillo, midiendo los halos en milímetros (mm), siendo O = Negativo, 1-5 mm = Bajo, 6-10 mm = Medio y 11-15 mm = Alto.
- Crecimiento de levadura en diferentes condiciones de concentración de sal y temperatura:
 - Exposición de inóculos a diferentes concentraciones de NaCl y temperaturas: se prepararon Agars YPD, YPD + 2% NaCl, YPD + 4% NaCl, YPD + 10% NaCl e YPD + 25% NaCl, donde se inocularon las levaduras radialmente en la superficie y se incubaron a 4°C, 25°C, 37°C y 45°C durante 48h, donde se vio un crecimiento positivo (+), negativo (-) y bajo (o).

Ensayo microbiológico con aplicación en ecotoxicología

Ensayos piloto para la determinación de MIC (Concentración Mínima Inhibitoria) de clorpirifos y su metabolito TCP en superficie de agar

- Prueba piloto 1: sobre superficie en agar YPD, extendiendo homogéneamente 100 ul de una levadura con hisopo estéril, y colocando sensidiscos de 6 mm, donde se añadieron 25 ul de CP y TCP en concentraciones de 500, 250, 125, 60, 30, 15, 0 ppm, incubando durante 48 horas a una temperatura de 25-28°C y viendo una zona de inhibición alrededor del sensidisco.
- Prueba piloto 2: sobre superficie en Agar YPD, esparciendo homogéneamente 100 ul de una levadura con hisopo estéril, agregando 5 ul de CP y TCP directamente sobre la superficie a concentraciones de 500, 250, 125, 60, 30, 15, 3.7, 1.8, 0.9, 0.45, 0.23, 0.12, 0.06, 0.03, 0.0015 y, 0 ppm, incubando durante 24 horas a una temperatura de 37°C y viendo la zona de inhibición del crecimiento (+). La CIM se define como la concentración donde comienza el crecimiento en la zona de contacto de la sustancia analizada (-).
- Prueba definitiva para determinación de CMI: sobre superficie en Agar YPD esparciendo homogéneamente 100 ul de cuatro levaduras con hisopo estéril, añadiendo 5 ul de CP y TCP po triplicado directamente sobre la superficie a concentraciones de 500, 250, 125, 60, 30, 15, 3.7, 1.8, 0.9, 0.45, 0.23, 0.12, 0.06, 0.03, 0.0015 y, 0 ppm, incubando durante 24 horas a una temperatura de 37°C y viendo zona de inhibición del crecimiento (+). La CMI se define como la concentración donde comienza el crecimiento en la zona de contacto de la sustancia analizada (-).

Las bandas en el gel muestran un mayor número en E1 a E5 (sitio 1), con respecto a E6 a E9 (sitio 2). El dendrograma se puede observar en los dos grupos o sitios, donde el sitio 1 tiene una mayor diversidad de hongos en comparación con el sitio 2. Cabe señalar que la estación 6 del sitio 2 se incorporó al sitio 1, este hecho se presenta porque la estación está cerca de una tradicional zona industrial en el casco urbano (Bosque), donde se encuentran algunas industrias, talleres automotrices y otros que afectan a la bahía.

La técnica de liofilización de sedimentos marinos permite una mejor manipulación y conservación de este tipo de muestras ambientales, presentando altas concentraciones de ADN, debido a su concentración de microorganismos, lo que puede ser aplicable al análisis de DGGE. Esta técnica se utilizó para ver la extracción de ADN en heces (Ruiz y Rubio, 2009), no encontrándose datos en la bibliografía para este tipo de muestras marinas como los sedimentos.

Con estas muestras de sedimentos de las nueve estaciones y con excelentes concentraciones de ADN, en este estudio se pretende dar un panorama general de la diversidad de hongos filamentosos y levaduras para aplicar la técnica DGGE (Akbar et al., 2014; Santos et al., 2010; Tedersoo et al., 2015). Para ello, trabajar con dos sitios distintos, sitio 1 con 5 estaciones y sitio 2 con 4 estaciones, los cuales claramente mostraron mayor diversidad de hongos y levaduras en el sitio 1. Estas son áreas de mayor impacto ambiental con mayor dinámica; en esta zona se encuentran influencia de la zona industrial Mamonal, la desembocadura de la bahía de Cartagena y canales de alcantarillado y lluvia, como el Canal del Dique que trae agua dulce del interior del país, y puede arrastrar grandes cargas de sedimentos que podrían contener microorganismos; sin embargo, la estación 6 agrupada en el sitio 2 se incluyó en el dendrograma del sitio 1, porque está cerca de un área industrial urbana que contamina la bahía.

Este hecho, en el que las estaciones 1-6 se agrupan en el sitio 1 y donde hay más bandas de hongos, podría explicarse por altos ingresos de contaminantes, dando un proceso de nutrientes y ayudar a su metabolismo que mantendría estos morfotipos, donde tienen competitividad, ventajas y su función dentro de los ecosistemas, entre otros (Wang et al., 2019; Alvarenga et al., 2013; Deshmukh et al., 2016).

Aislamiento y caracterización bioquímica de levaduras

Aislamiento en Agar Malt (MAE).

Se aseguró el aislamiento de morfotipos de sedimentos frescos de cada estación, por triplicado y en diluciones 10-1 y 10-2. A las 72h hubo crecimientos con tendencia de E1 a E5 (sitio 1). De los aislamientos de levadura en este medio, en el sitio 1 (estaciones 1 y 4), solo se aislaron dos levaduras, lo que permitió buscar otras estrategias, a fin de tener otros morfotipos aislados, donde se aisló levadura G35 en sedimento fresco de estación 1 y levadura G43 en la estación 4 de sedimento fresco.

Aislamiento de levaduras en caldo YPD, caldo lactosa y caldo MSM con 50 ppm de CP.

Al tener solo 2 morfotipos de levadura aislados de MEA G35 y G43), y utilizando otros medios con sustratos específicos para el crecimiento de levaduras (YPD1), se podrían aislar ocho morfotipos más, el caldo de lactosa (LAC4, LAC6 y LAC7) es más relevante y el caldo mineralizado (CP1, CP2, CP4 y CP8) con CP como fuente de energía es mucho más específico.

Está claro que las levaduras se aislaron en todos los medios probados, lo que hace que la recuperación de sedimentos sea más efectiva. Sin embargo, el caldo de lactosa mostró una recuperación de levaduras en un 30%, mientras que el MSM con 50 ppm de CP fue de 40%, lo que indica ser un medio muy efectivo en la selección de levaduras con potencial para tomar la CP como fuente de energía.

Caracterización bioquímica de levaduras.

Las levaduras aisladas de sedimentos superficiales en la bahía de Cartagena se caracterizaron bioquímicamente con API 20 C. Su aparición se puede ver en Tabla 5.

Tabla 5. Levaduras caracterizadas bioquímicamente aisladas de sedimentos de la bahía de Cartagena

Yeast	API 20C
G35	<i>Cryptococcus laurentis</i>
G43	<i>Candida spherica</i>
YPD1	<i>Candida famata</i>
LAC4	<i>Rhodotorulla glutinis</i>
LAC6	<i>Rhodotorulla minuta</i>
LAC7	<i>Rhodotorulla sp.</i>
CP1	<i>Candida sp.</i>
CP2	<i>Candida krusei/inconspicua</i>
CP4	<i>Candida famate</i>
CP8	<i>Candida krusei/inconspicua</i>

Del total de morfotipos de levaduras aisladas y caracterizadas bioquímicamente, el 60% fueron del género *Candida*, el 30% de *Rhodotorulla* y el 10% de *Cryptococcus*, siendo evidente la dominancia del género *Candida* en estos sedimentos, destacando su aislamiento del medio MSM con 50 ppm CP, como en MAE, mientras que el género *Rhodotorulla* se aisló solo del caldo de lactosa. Las levaduras marinas pueden ser saprofitas o patógenas para plantas o animales y se encuentran regularmente en ecosistemas marinos aeróbicos (Fell, 2001). Las primeras levaduras marinas se descubrieron en el océano Atlántico, y los géneros aislados más grandes fueron *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* y *Rhodotorulla*, similar a los resultados de este estudio (Kutty y Philip, 2008; Moubasher et al., 2018).

En sedimentos estuarinos de Brasil, el género *Candida* se encontró como el más dominante, coincidiendo con este estudio (Soares et al., 1997; Kutty et al., 2013) con prevalencia de *Candida tropicalis* y otros patógenos, y con una función clara en la descomposición, ciclo de nutrientes y biotransformación de compuestos xenobióticos en ambientes contaminados (Soares et al., 1997). Asimismo, en la India se encontraron en aguas costeras los géneros de *Pichia*, *Cryptococcus*, *Kodmera*, *Zylyanoides* y los géneros de *Candida* y *Rhodotorulla* con capacidad de acumular ácidos grasos poliinsaturados, los cuales se encontraron en estos sedimentos (Jape et al., 2016).

En Colombia, el conocimiento de la diversidad de hongos, incluidas las levaduras, ha sido limitado, donde los sedimentos y el agua son hábitats importantes en la búsqueda de especies con potencial industrial, biotecnológico y de biorremediación. En dos lagos artificiales los géneros de *Candida*, *Cryptococcus*, *Williopsis*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Tricosporum* y *Yarrowia*, grupo en el que se encontraron las levaduras aisladas en este estudio (Silva et al., 2014).

Por estrategia general de aislamiento siendo las estaciones 1, 3 y 4 con más aislamientos, pertenecientes al sitio de mayor diversidad (sitio 1) mostrado por la técnica DGGE. Se obtuvo un mayor número de levaduras mediante técnicas de aislamiento más específicas, completando así un número total de levaduras para su posterior análisis.

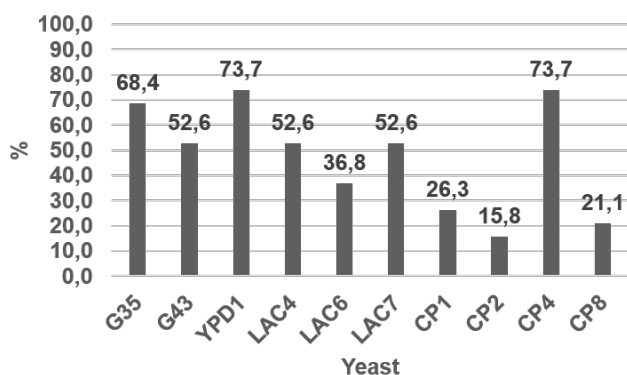
Ensayo microbiológico con aplicación en biotecnología

Asimilación de carbohidratos por levaduras aisladas de sedimentos.

Los carbohidratos son fuente de carbono y energía para las levaduras, por lo que tienen un metabolismo que se puede utilizar para procesos biotecnológicos; la asimilación de carbohidratos puede determinar la versatilidad metabólica. Al analizar estas respuestas de asimilación de carbohidratos por los morfotipos de levaduras marinas aisladas de los sedimentos superficiales, los porcentajes generales de asimilación de cada carbohidrato son obtenidos por todas las levaduras estudiadas.

La asimilación de glucosa es destacada por todas las levaduras (100%) y con 90% de glicerol y N-acetilglucosamina. Porcentaje categorizado de asimilación de carbohidratos por levadura (0-25% = Bajo, 26-50% = Medio, 51-75% = Medio alto, 76-100% = Alto). Haciendo una clasificación en cuatro categorías, según los porcentajes de asimilación de las levaduras aisladas y estudiadas, 16% fue alto, 10% Bastante alto, 58% medio y 16% bajo. Teniendo en cuenta cada levadura y viendo el porcentaje de asimilación de todos los carbohidratos, se puede ver el comportamiento de las levaduras frente al metabolismo como fuente de carbono y energía (Fig. 10).

Figura 10. Porcentaje de asimilación de todos los carbohidratos por levaduras



El porcentaje de asimilación de todos los carbohidratos por la levadura se categoriza en 0-25% = Bajo, 26-50% = Medio, 51-75% = Bastante alto, 76-100% = Alto, presentando 20%, 20%, 60% y 0%, respectivamente. Al ver morfotipos de levaduras de forma individual y por asimilación de carbohidratos en general, la categoría más alta fue Bastante Alto con 60% (morfos G35, G43, YPD1, LAC4, LAC7 y CP4), Medio con 20% (morfotipos LAC6 y CP1), Bajo con 20% (morfotipos CP2 y CP8) y Alto = 0%. Se destaca la versatilidad de asimilación de carbohidratos de estas levaduras aisladas.

El crecimiento de levaduras en un hábitat depende de los azúcares y otros nutrientes disponibles (Sansone, 2007). La asimilación de carbohidratos a partir de levaduras ha fortalecido su identificación debido a la diferencia entre diferentes géneros (Mendoza, 2005). Al comparar la asimilación de carbohidratos en este estudio con uno que aisló *Rhodotorulla glutinis* de entornos clínicos y ambientales, la asimilación de glucosa fue del 100%, mientras que la asimilación de glicerol en este estudio fue del 90%, en comparación con el 50% (García et al., 2004).

Pruebas de simbiosis o antibiosis de levaduras aisladas de sedimentos.

El análisis de simbiosis y antibiosis de levaduras aisladas es importante en biotecnología microbiana, por su uso en la biodegradación de contaminantes, ya que las interacciones positivas (simbiosis) pueden ser utilizadas en consorcios microbianos, generando mejores eficiencias en estos procesos.

Se puede observar una baja antibiosis en algunos morfotipos, pero en general, estos morfotipos pueden usarse mezclándolos y formando consorcios para la biodegradación de diferentes plaguicidas, como los insecticidas organofosforados. Los consorcios microbianos que involucran levaduras como *Saccaromyces* con bacterias son de gran importancia para la mejora en la producción de metabolitos en procesos biotecnológicos (Pinto et al., 2019). Se ha utilizado un consorcio de levadura compuesto por *Saccaromyces* y *Candida* para producir múltiples enzimas (Shariq y Sohail, 2019). Se probó un consorcio de microalgas con levadura *Candida* aislada de aguas residuales para aumentar los ácidos grasos en la producción de biodiesel (Suastes et al., 2019), así como la producción de bioetanol con un consorcio de levaduras *Candida* y *Hanseniospora* (Lara et al., 2019) y aceite. Esta producción se efectuó con un consorcio de la microalga *Chlamydomonas* y la levadura oleaginosa *Lipomyces* (Zuccaro et al., 2018).

Ensayo piloto y definitivo en superficie de agar en la detección de esterazas/lipasas en levaduras.

Se realizó una prueba piloto para las 2 técnicas (opacidad y rojo neutro), donde se descartó la opacidad por falta de claridad en las zonas de aclarado, mientras que el rojo neutro mostró cambios de color muy claros, siendo esta última la prueba elegida.

Tabla 6. Prueba de lipasa en superficie de agar con rojo neutro

Código Levadura	Levadura	Diametro Total (Promedio En Mm)	Scale (Mm) Negativo=0; Bajo=0.1-5; Medio=5.1-10; Alto=10.1-15
G35	<i>Cryptococcus laurentis</i>	10.3	Alto
CP2	<i>Candida krusei/inconspicua</i>	9	Mediano
YPD1	<i>Candida famata</i>	5.3	Mediano
LAC4	<i>Rhodotorulla glutinis</i>	10.6	Alto
C	<i>Saccharomyces cereviciae</i>	10.6	Alto
CP8	<i>Candida krusei/inconspicua</i>	8	Mediano
CP1	<i>Candida sp.</i>	8.3	Mediano
LAC7	<i>Rhodotorulla sp.</i>	10	Mediano
G43	<i>Candida spherica</i>	10	Mediano
CP4	<i>Candida famate</i>	12	Alto
LAC6	<i>Rhodotorulla minuta</i>	10	Mediano

Se presentó una respuesta positiva a la enzima en todos los morfotipos de levaduras estudiadas, distribuida entre respuesta media y alta en 64% (CP2, YPD1, CP8, CP1, LAC7, G43, LAC6) y 36% (G35, LAC4, Control, CP4) respectivamente. Lo anterior, permite tener un signo de respuesta degradante al organofosforado clorpirifos.

Los microorganismos producen lipasas y fosfolipasas, como los hongos filamentosos de los géneros *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Penicillium* (Maldonado et al., 2012; Yadav et al., 1998; Martinez, et al., 2019; Alvarenga et al., 2015), que se pueden aplicar en el campo biotecnológico como en la biodegradación del clorpirifos con fosfotriesterasas (Messias et al., 2011). Se han encontrado los géneros de levadura *Candida*, *Torulopsis*, *Issatchenkia*, *Yarrowia*, *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Cryptococcus*, *Hansenulla*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Wickerhamomyces*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula*, *Trichosporum* (Alvarenga et al., 2015; Hong et al., 2015; et al., 2020; Aamri et al., 2019; Demera et al., 2019; Sahay y Chouhan, 2018), así como la levadura *Guehomyces* aislada en la Antártida (Sahay y Chouhan, 2018), como el psicotrópico filamentoso hongos *Penicillium* y *Pseudogymnoascus* (Moubasher et al., 2018).

Crecimiento de levadura en diferentes condiciones de concentración de sal y temperatura.

En biotecnología microbiana, las condiciones ambientales de los microorganismos son muy importantes, especialmente las condiciones extremas, donde los microorganismos extremófilos están en constante búsqueda para ser utilizados en bioprocesos. Con estas levaduras se estudiaron la concentración de sal (microorganismos marinos) y la temperatura. Se determinaron crecimientos masivos a temperaturas de 25°C y 37°C (microorganismos mesófilos), hasta una concentración de sal del 4%, con algunos de crecimiento lento al 10%; en comparación con los crecimientos a 4°C (microorganismos psicrófilos), los cuales crecieron lentamente, mostrando aumento de hasta un 25% de sal. Asimismo, el crecimiento a 45°C (microorganismos termófilos), donde presentaron crecimientos masivos hasta 2% de sal y crecimientos lentos hasta 4% (Tabla 7).

Tabla 7. Levaduras extremófilas encontradas en sedimentos marinos (concentración de sal y temperatura)

Levaduras extremas	Crecimiento 4°C	Crecimiento 45°C	Crecimiento 2% NaCl	Crecimiento 4% NaCl	Crecimiento 10% NaCl	Crecimiento 25% NaCl
Control 51669 Saccharomyces cerevisiae					X	
43 Candida spherica	X				X	X
YPD1 Candida famata		X		X	X	
LAC6 Rhodotorulla minuta	X	X	X			X
CP1 Candida sp.		X		X		
CP2 Candida krusei/incospicua		X	X			
CP8 Candida krusei/incospicua		X		X		

De las levaduras extremófilas, seis eran del género *Candida* (dominante) y una del género *Rhodotorulla*. Los crecimientos extremos estuvieron presentes en levaduras aisladas de los sedimentos con extracto de malta, lactosa y YPD, sugiriendo la adaptación de estas levaduras a las condiciones físicas y químicas de estos ambientes tratados.

La diversidad de levaduras en los ecosistemas acuáticos tiene gran flexibilidad para tolerar diferentes rangos de salinidad, temperatura, niveles de saturación de oxígeno y diferentes estresores en el ambiente, siendo los géneros dominantes *Rhodotorulla*, *Candida* y *Cryptococcus* (Butinar et al., 2005). Se han aislado levaduras xerotolerantes u osmotolerantes a concentraciones de NaCl de 10 y 15%, encontrándose *Candida*, *Rhodotorulla*, *Torulopsis*, *Pichia* y *Debaryomyces* (Bass et al., 2008). Así como levaduras aisladas a grandes profundidades en océanos, representadas por el género *Cryptococcus* (Hassan et al., 2017) y *Cryptococcus* aisladas de un glaciar en

Pakistán, capaces de crecer entre 4-15°C, resistiendo concentraciones de NaCl de 10-20% (Hassan et al., 2016). *Candida* y *Cryptococcus werw* aislados en la Antártida (Jacques et al., 2014) y, en el Ártico *Debaryomyces*, *Millerozyma*, *Cryptococcus* y *Rhodotorulla* (Ballester et al., 2017). Se han encontrado levaduras psicotolerantes, halotolerantes y alcalófilas como *Debaryomyces* y *Saccharomyces* en la superficie de plantas (Sansone, 2007) y, estudiando una *Candida* aislada de la Antártida para aplicarla en la fermentación del vino (Palma et al., 2008). Los géneros aislados en este estudio *Candida* y *Rhodotorulla*, que mostraron crecimiento a temperaturas de 4 y 45°C, así como concentraciones de NaCl de 2, 4, 10 y 25%, concuerdan con los estudios antes mencionados.

Ensayo microbiológico con aplicación en ecotoxicología

Ensayos piloto para la determinación de MIC (Concentración Mínima Inhibitoria) de clorpirifos y su metabolito TCP en superficie de agar.

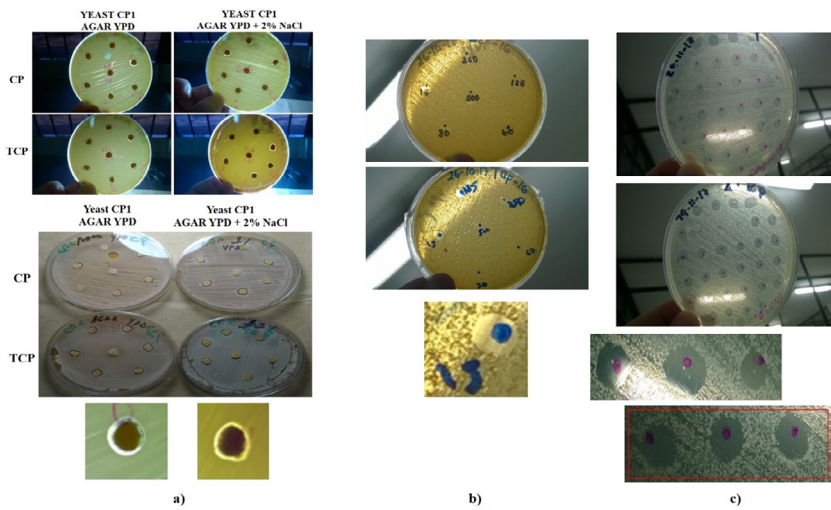
Aplicar una técnica de superficie sobre agar que pueda mostrar el efecto de diferentes concentraciones del insecticida clorpirifos y su metabolito TCP. La técnica se aplicó con el principio antibiograma utilizando discos de papel impregnados con cada concentración, así como la técnica directa donde se aplicó cada concentración sobre el agar previamente difundido con la levadura piloto utilizada para estas pruebas.

Prueba piloto 1: Esta técnica mostró una zona de inhibición muy pequeña alrededor del disco de papel, lo que puede representar una pequeña difusión de las sustancias estudiadas, lo que justificaba ver la otra técnica donde el compuesto se colocaba directamente sobre la superficie.

Prueba piloto 2: en esta técnica se realizaron más diluciones de las sustancias, mostrando zonas claras de inhibición del crecimiento sobre la cantidad de sustancia en diferentes concentraciones, teniendo un comportamiento más claro que la técnica anterior, lo que permitió elegirla para probar la técnica final y tomando cuatro levaduras.

Prueba definitiva para la determinación de la MIC: como mostró la prueba piloto 2, aquí se confirmó, dando excelentes resultados y viendo zonas claras de inhibición, para poder leer la MIC de cada sustancia en cada una de las cuatro levaduras estudiadas. (Fig. 11).

Figura 11. Inhibición de levaduras en superficie de agar.
a) Prueba piloto 1. b) Prueba piloto 2. c) Prueba definitiva para MIC



Determinación de MIC: la técnica se probó con todas las diluciones realizadas con CP y TCP, para encontrar la concentración que inhibía la levadura en el área del volumen de gota colocada sobre el agar previamente difundido con la levadura a estudiar (Tabla 8).

Tabla 8. MIC con técnica directa CP y TCP en superficie de agar (4 levaduras)

	7.5 ppm	3.7 ppm	1.8 ppm	0.9 ppm	0.45 ppm	0.23 ppm	0.12 ppm	0.06 ppm	0.03 ppm	0.015 ppm	C-	MIC ppm
CP1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	1.8
TCP1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	0.45
CP2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	0.9
TCP2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	0.45
CP3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	0.45
TCP3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	0.45
CP4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	0.45
TCP4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	0.45

Las MIC encontradas en estas levaduras estaban entre 0.45-1.8 ppm para CP y 0.45 ppm para TCP, donde las cepas 1 y 2 se diferenciaron entre estas sustancias, siendo menor concentración para el metabolito TCP, que a menor concentración inhibió es más tóxico; sin embargo, para las otras 2 cepas no difirió a la concentración más baja de 0.45 ppm. Algunos autores muestran respuestas a la CP en microorganismos unicelulares como la bacteria *Allavibrio fischeri*, con 2,84, 0,046 y 2,94 ppm (Somasundaram et al., 1990; Mansour et al., 2015; Mansour et al., 2015). También con las microalgas *Synechocystis* 0.074 ppm, *Kumvophorum* 0.013 ppm y, *Glueocapsa* 0.080-0.3 ppm (Shoaib et al., 2012), como en el alga verde *Ankistromus* 22.44 ppm (Asselborn et al., 2015). Según datos aún no publicados por el autor, con *Allavibrio fischeri* se encontró una respuesta a CP de 4.18 ppm y TCP ppm; con *Pseudokirchneriella subcapitata*, la respuesta a CP fue de 4,93 ppm y a TCP de 0,294 ppm. Los datos presentados en este estudio son una primera aproximación que implica un estudio más profundo y con técnicas más adecuadas como la fluorometría, donde se miden los efectos de estas sustancias en métodos estándar con los microorganismos mencionados, incluyendo las levaduras como modelo.

La literatura menciona el uso de técnicas *in vitro* con bacterias, como la difusión en agar, donde la MIC se propone como el estándar de oro para medir las actividades antimicrobianas de sustancias naturales (Ramírez y Marín, 2009). Se probaron diferentes sustancias antifúngicas contra el hongo filamentoso *Fusarium* midiendo la MIC (Iqbal et al., 2010). La levadura *Talaromyces* se probó con un control de *Candida* para determinar la MIC en placas de Petri y ver la respuesta a las sustancias antifúngicas (Luo et al., 2019). La MIC se determinó en agar con levaduras *Saccaromyces*, *Candida* y *Yarrowia* para ver la respuesta tóxica a los metales de cromo y manganeso (Trioui et al., 2019).

Conclusiones

Al presentar los resultados del estudio anterior, se consideran los siguientes aspectos: se encontró que el proceso de liofilización es un buen método para el manejo y manipulación del sedimento con altas concentraciones de ADN. La técnica DGGE muestra mayor diversidad de hongos y levaduras en el sitio 1 (mayor impacto por desembocadura del canal Dyke y zona industrial Mamonal). En la estrategia global de aislamiento existe mayor

número de hongos filamentosos a levaduras, siendo las estaciones 1, 3 y 4 las mejores, y reflejando consistencia con la mayor diversidad de hongos y levaduras mostrada con la técnica DGGE. Se deben utilizar diferentes estrategias para obtener más aislados de levaduras, por ejemplo, diez levaduras de sedimentos marinos en aislamientos que presentaron concentraciones de PC aisladas; en la levadura, hay predominio del género *Candida* (60%), *Cryptococcus* (30%) y *Rhodotorulla* (10%). Las técnicas microbiológicas básicas se pueden utilizar en áreas de gran importancia, como la biotecnología y la ecotoxicología microbianas. Toda la levadura mostró asimilación de carbohidratos de glucosa 100% y glicerol, n-acetilglucosamina en 90%. Se evidenció una baja antibiosis entre determinadas levaduras, resultados importantes a tener en cuenta en el uso de consorcio microbiano. La presencia de esterasa/lipasa se determina en todas las levaduras aisladas. Se demuestra el crecimiento de levaduras en condiciones extremas de temperatura (4°C/25°C/37°C/45°C) y concentraciones de sal (sin sal/2%/4%/10%/25%), encontrándose levaduras extremófilas. Se determina la concentración mínima inhibitoria de CP y TCP en cuatro levaduras, mostrando mayor toxicidad de TCP.

Capítulo 5.

Actividad Citotóxica y Estrogénica del Clorpirifos y su Metabolito 3,5,6-Tricloro-2-Piridinol. Estudio de las Levaduras Marinas como Potenciales Indicadores de Toxicidad

Prefacio

El clorpirifos (CP) es uno de los insecticidas organofosforados más utilizados en la actualidad en todo el mundo. Aunque el principal órgano diana de la CP es el sistema nervioso que desencadena efectos predominantemente neurotóxicos, se han sugerido otros mecanismos de acción como la citotoxicidad y la alteración endocrina. Las agencias reguladoras y los administradores de recursos naturales reconocen cada vez más el riesgo que representan los metabolitos de los plaguicidas en los organismos no objetivo. En el presente estudio, la citotoxicidad y la actividad estrogénica de CP y su principal metabolito 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) se evaluaron mediante ensayos *in vitro*, utilizando dos líneas celulares de mamíferos (HEK293 y N2a), y una levadura recombinante.

Los resultados indican que el TCP es más tóxico que el CP para las dos líneas celulares ensayadas, siendo las células N2a más sensibles a ambos compuestos. Dichos compuestos muestran una actividad estrogénica similar siendo entre 2.500 y 3.000 veces menos estrogénica que el 17 β -estradiol. Con el fin de encontrar nuevos modelos de medición de la toxicidad, las levaduras aisladas de sedimentos marinos que contienen residuos de CP se

han probado contra CP y TCP mediante un ensayo de viabilidad celular. De las 12 cepas de levadura probadas, 6 de ellas mostraron cierta sensibilidad y una respuesta dependiente de la concentración a los compuestos probados, por lo que podrían considerarse como modelos futuros para las pruebas de toxicidad, aunque son necesarias más investigaciones y pruebas.

Introducción

El clorpirifos (CP) es uno de los insecticidas organofosforados más utilizados en la actualidad en todo el mundo. Su mayor uso es en agricultura en frutas, granos, hortalizas, algodón, caña de azúcar y café (Solomon et al., 2014), aunque también se usa en ganadería, plantas ornamentales y el césped de campos de golf. Como consecuencia de su uso generalizado, así como de sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad), se lava fácilmente en aguas subterráneas y superficiales, incluso en el medio marino, provocando la acumulación en sedimentos, dada su hidrofobicidad (Giesy et al., 1999; Gebremariam et al., al. 2012). El principal producto de degradación de la CP es el 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) (Xu et al., 2008) producido por mecanismos hidrolíticos y fotolíticos (Baskaran et al., 2003). El TCP es más soluble en agua que el compuesto original, lo que provoca una alta movilidad que causa contaminación en suelos y ambientes acuáticos.

La acción insecticida de la PC se basa en inhibir la actividad de la acetilcolina esterasa. Produce un exceso de acetilcolina en la sinapsis que resulta en hiperactividad, espasmos musculares que pueden provocar parálisis, insuficiencia respiratoria e incluso la muerte (Barron y Woodburn 1995; Slotkin 2004, 2005). Aunque el principal órgano diana de CP es el sistema nervioso, desencadenando efectos predominantemente neurotóxicos, existen otros mecanismos de acción como la citotoxicidad, efectos sobre la síntesis de macromoléculas (Qiao et al., 2001; Howard y Pope 2002; Slotkin et al., 2008; Gupta et al., 2010) y alteraciones endocrinas (Viswanath et al., 2010; Ventura et al., 2012, 2016). Existe evidencia de genotoxicidad y mutagenicidad de CP en numerosos estudios realizados en ratas, peces, sapos y células humanas (Ojha et al., 2011; Sandal y Yilmaz 2011; Muller et al., 2014; Ezzi et al., 2016). Las propiedades carcinogénicas de CP se han evidenciado a través de una variedad de estudios epidemiológicos, particularmente cáncer de pulmón y recto (Alavanja et al., 2004; Lee et al., 2007). Asimismo, CP también se ha relacionado con el cáncer de mama en ratas y células humanas (Nishi

y Hundal 2013; Ventura et al., 2016, 2019), provoca anomalías en el sistema inmunológico de trabajadores y animales de laboratorio (Gotoh et al., 2001; Navarro et al., 2001) y se han reportado numerosos casos de toxicidad reproductiva (Nandi et al., 2009; Farag et al., 2010; Bernabò et al., 2011) como efectos teratogénicos en ratas (Farag et al., 2003; Tian et al., 2005) y anomalías en los espermatozoides humanos (EPA, 2008).

Recientemente, varias organizaciones como la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), el Comité de Plantas, Animales, Alimentos y Piensos (PAFF), Pesticide Action Network (PAN) o US EPA han revisado el uso de CP, lo que ha llevado a muchos países a restringirlo o prohibirlo. Entonces, la Unión Europea (UE) ha adoptado la no aprobación de la sustancia activa CP (EC, 2020). Por su parte, Canadá propuso una prohibición de CP el 31 de mayo de 2019. En Estados Unidos, los gobiernos estatales han tomado medidas para regularlo (Backstrom y Garson, 2020). Sin embargo, durante muchos años ha sido uno de los pesticidas organofosforados más utilizados (John y Shaik, 2015), detectando sus residuos en muchos productos agrícolas como verduras y frutas (Guerrero, 2003; García et al., 2017; Rey et al., 2018). Su uso extensivo en Colombia ha provocado la contaminación de sistemas acuáticos, agua dulce y salada, sedimentos y acumulación en organismos (Tobón-Marulanda et al., 2012).

Un aspecto importante de los plaguicidas se deriva de la posible actividad disruptiva endocrina que provoca efectos en el desarrollo del organismo. Desde 2007, año en que la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) incluyó el insecticida CP en un borrador de la lista inicial de sustancias químicas para la detección de disruptores endocrinos (EPA, 2007), estudios limitados indican que CP puede afectar el sistema endocrino (De Angelis et al., 2007; Viswanath et al., 2010; Ventura et al., 2012, 2016), pero aún se necesitan más pruebas (Yu et al., 2015). La mayoría de estos estudios, relacionados con la toxicidad en humanos, dependen en gran medida del uso de animales, pero en los últimos años se ha observado una clara tendencia a sustituirlos por otros estudios que representan alternativas más rápidas y rentables (Braconi et al., 2011; Heinonen y Tähti, 2013).

Una de las alternativas más comunes es el uso de células cultivadas artificialmente, que responden rápidamente a diferentes condiciones ambientales adversas. Estas pruebas *in vitro* son económicas, fáciles de realizar y pueden utilizarse como pruebas preliminares que pueden llevar

al científico a decidir si es necesario realizar más pruebas (Meneau, 2014; Mushtaq et al., 2018). Además, son útiles para analizar una gran cantidad de muestras (Aslantürk, 2017). Pueden usar células que varían desde microorganismos hasta células de mamíferos y humanos. La evaluación de la citotoxicidad se centra en pruebas simples, en las que se mide la viabilidad celular y/o la proliferación de células. Los agentes químicos pueden afectar la salud y el metabolismo celular, a través de diferentes mecanismos, como la destrucción de la membrana, la inhibición de la síntesis de proteínas, la unión irreversible a los receptores, la inhibición del alargamiento del ácido nucleico y las reacciones enzimáticas (Ishiyama et al., 1996; Aslantürk, 2017).

Existen diferentes clasificaciones para los ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular, las más utilizadas son fluorescencia colorimétrica, luminiscente, etc., según los tipos de medición de los puntos finales (O'Brien et al., 2000; Hamid et al., 2004; Rampersad, 2012; Gilbert y Friedrich, 2017), utilizando una amplia variedad de células. En la evaluación de la citotoxicidad, líneas celulares como las células embrionarias de riñón humano (HEK) y los neuroblastos de ratón (N2a) se han utilizado para efectos neurotóxicos y neurodegenerativos, siendo modelos biológicos de gran importancia (LePage et al., 2005; Provost, 2010; Wang et al., 2015; Qiu et al. 2016; Sindi et al. 2016; Acevedo et al. 2018). Estas líneas celulares han sido elegidas para evaluar la toxicidad de plaguicidas organofosforados, como paratión (Wang et al., 2019), paraquat (Cai et al., 2019) y CP (Van Emon et al., 2018).

Los indicadores microbiológicos (organismos procariotas y eucariotas) también se utilizan ampliamente en el estudio de la contaminación ambiental para determinar la viabilidad de cultivos celulares (Grela et al., 2018). Entre ellos, el modelo de levadura *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los más utilizados. Las levaduras son modelos potencialmente buenos para evaluar la toxicidad de los contaminantes ambientales (Ribeiro et al., 2000; Cabral et al., 2003; Papaefthimiou et al., 2004), tienen similitudes con las células de mamíferos, especialmente en lo que respecta a la funcionalidad de proteínas homólogas (Braconi et al., 2011). Son fáciles de mantener y cultivar, reduciendo la variabilidad encontrada con organismos más complejos (Esteve et al., 2009). Además, las levaduras pueden proporcionar información de relevancia directa para otros eucariotas y pueden aislarse de una amplia gama de entornos, como sedimentos marinos, anaeróbicos y sitios contaminados (Baronian 2004).

Dado el elevado número de levaduras que probablemente existan, es probable que la levadura de tipo salvaje resulte ser una fuente considerable de indicadores de toxicidad (Braconi et al., 2011). Los ensayos de toxicidad a corto plazo, basados en la medición de cambios en cultivos de levadura para estimar el impacto de compuestos tóxicos, se utilizan cada vez más. Estos ensayos son relativamente simples, rápidos, rentables y requieren pequeños volúmenes de muestra, por lo que pueden ser de interés como herramientas alternativas para la detección preliminar y para su inclusión en una batería de pruebas. Fai y Col. (2009a, b) examinaron los efectos de varios fungicidas y otros contaminantes en una amplia gama de especies de levadura y propusieron la inclusión del bioensayo de inhibición de la fluorescencia de resorufina en una batería con otros biomarcadores en la selección rápida de muestras ambientales.

Se han desarrollado ensayos más precisos para detectar actividades específicas de compuestos químicos como la actividad disruptiva endocrina como un RYA (ensayo de levadura recombinante) utilizando una cepa de *S. cerevisiae* modificada genéticamente (Routledge y Sumpter, 1996; García-Reyero et al., 2001), que contiene el gen del receptor de estrógeno humano (hER) en el cromosoma principal vinculado a un gen indicador lacZ que codifica la enzima β -galactosidasa que se produce y secreta al medio, y cuya reacción específica de reacción es fácil de seguir utilizando un conveniente (cromogénico o sustrato enzimático fluorogénico).

El objetivo principal del presente estudio es contribuir a un mayor conocimiento de la toxicidad del CP y su principal metabolito TCP, mediante pruebas rápidas *in vitro* utilizando dos líneas celulares de mamíferos y levaduras aisladas en nuestro laboratorio de sedimentos marinos expuestos a CP con el objetivo de proporcionar nuevos indicadores microbiológicos para su uso en pruebas de toxicidad. Asimismo, con la intención de aportar nuevos datos sobre la potencial actividad estrogénica de los compuestos, estos han sido sometidos a pruebas RYA.

Materiales y métodos

Compuestos de prueba

Clorpirifos (CAS: 2921-88-2) (O, O-diethyl O-3,5,6-tricloropiridin-2-il fosforotionato; CP) 99,7% estándar analítico y su metabolito 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) (CAS: 6515-38-4) 99,3%, y el estándar analítico se obtuvo de Sigma-Aldrich. Se prepararon soluciones madre de compuestos y series de diluciones en el medio de cultivo o disolvente apropiado según los ensayos de toxicidad realizados. El agua empleada en los experimentos fue de grado Milli-Q. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Prueba de citotoxicidad con líneas celulares HEK293 y N2a

La citotoxicidad de los compuestos se ha evaluado utilizando dos líneas celulares, N2a (neuroblastoma de ratón) y HEK293 (riñón embrionario humano) amablemente proporcionadas por el Instituto de Biomedicina (Valencia, España). Los ensayos se basan en la reducción de resazurina, por actividad metabólica de las células, transformadas en resorufina, un compuesto altamente fluorescente que permite la medición espectroscópica (Czekanska, 2011). Las células de cultivo se mantuvieron en DMEM (medio Eagle modificado de Dubelcco) suplementado de manera apropiada con glutamina, penicilina-estreptomicina y suero bovino fetal y se incubaron a 37°C y en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% (Koppikar et al., 2010). Cuando las células lograron una confluencia del 70-90%, se recolectaron mediante tripsinización y se contaron.

Se preparó una suspensión de 1×10^5 células/mL en DMEM suplementado, con lo cual se inoculó una placa de cultivo de tejidos (100 μ L/pocillo). Después de 24 horas, las células se expusieron a 5 μ L de compuestos de prueba para obtener un intervalo de concentraciones finales de 6,3 a 1600 mg/L que se ensayaron por cuadruplicado. Los controles negativos y los blancos se ejecutaron simultáneamente. Las placas se incubaron nuevamente (24 h), se retiró el medio y se agregaron 100 μ L de solución de resazurina 15 μ M en DMEM suplementado. Finalmente, la placa se incubó durante 4h nuevamente y se midió la fluorescencia (Ex560/Em590) usando un espectrofluorómetro Tecan Infinite M200. Todos los reactivos de células

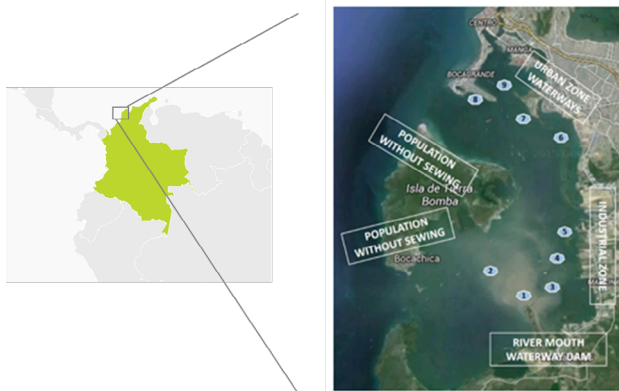
de cultivo y las placas fueron suministrados por VWR® International Eurolab S.L. (Barcelona, España). Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad, utilizado para calcular el IC₅₀ (concentración que inhibe la viabilidad celular a la mitad).

Prueba de toxicidad con levaduras marinas

Aislamiento y conservación de levaduras marinas.

Se aislaron levaduras de muestras de sedimento fresco de 9 localidades en la bahía de Cartagena (Colombia) (Fig. 12). Los sedimentos se recolectaron con una draga, tipo Ekman, en contenedores estériles, los cuales fueron transportados refrigerados al laboratorio donde se mantuvieron a -20 °C hasta su análisis. Para aislar las levaduras se realizó el siguiente procedimiento: se suspendió 1g de sedimento en 10 mL de NaCl al 0.9% conteniendo Tween 20 al 0.05%, se homogeneizó en vortex por 2 min y se dejó reposar 2 min más para decantar las partículas, luego se esparcieron 100 µL de dilución en placas con MEA (Malt Extract Agar, Difco) por triplicado y se incubó a 25°C durante 5-7 días. Las presuntas levaduras se subcultivaron en placas MEA y se identificaron mediante API 20 C AUX® System (BioMérieux). Los aislados de levadura se cultivaron en tubos que contenían MEA, se mantuvieron a 4°C para estudios posteriores y se conservaron a -80°C en crioviales Microbank™-Blue (Pro-Lab Diagnostics).

Figura 12. Puntos de muestreo de sedimentos marinos en bahía de Cartagena, Colombia



Ensayo de viabilidad con levaduras.

Se cultivó un asa de colonias de levadura cultivadas en tubos MEA en 50 ml de medio SD suplementado con glucosa (concentración final al 2%) y se incubó durante la noche a 25°C en un agitador orbital (150 rpm). El cultivo resultante se diluyó con el mismo medio hasta una densidad óptica de 0,5 (1×10^6 células/ml) a 600 nm y se usó para el ensayo de microplaca. Se prepararon soluciones madre de CP y TCP, a una concentración de 250 mg/L, en medio SD con DMSO (1%). Se añadió cultivo de levadura a microplacas blancas de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Corning Inc., Nueva York, EE.UU.) como se describe a continuación: Primero, la placa se llenó con 100 μ L/pocillo de cultivo de levadura; se añadieron 100 μ L/pocillo de las soluciones madre de CP o TCP a la segunda fila y se realizaron diluciones en serie 1: 2 transfiriendo 100 μ L de la segunda a la tercera fila y así sucesivamente hasta 1:64. Para cada levadura, se realizaron cuatro réplicas de controles (cultivo de levadura SD) y cuatro réplicas de diluciones seriadas de contaminantes (soluciones CP o TCP). El volumen total por pocillo fue de 100 μ L. El control de SD más DMSO también se ejecutó en la última fila.

Las placas cubiertas se incubaron en una incubadora con agitación durante 6 horas a 25°C. Pasado este tiempo, se sacaron las placas y se centrifugaron a 1.200 rpm. El contenido acuoso se eliminó con una pipeta Pasteur acoplada a una bomba de vacío, y se añadieron a cada pocillo 100 μ L de solución de resazurina (12,5 μ M en PBS). Luego, las placas se incubaron a 25°C, pero el tiempo de incubación requerido para medir el efecto de los compuestos varió de una especie de levadura a otra debido a la diferente capacidad para reducir la resazurina. Como indicaron Fai y Grant (2009a), la inhibición máxima de la fluorescencia de resorufina en relación con el control se utilizó en comparación de efectos. Algunas especies causaron reducción de resazurina a resorufina rosa y luego a hidrorresorufina incolora y no fluorescente en el primer minuto y otras especies entre 20 y 60 min de incubación. La fluorescencia se determinó mediante el lector de microplacas Tecan Infinite M200 a 530 nm (λ_{ex}) y 590 nm (λ_{em}). Se informaron las viabilidades celulares con respecto al control utilizando datos de fluorescencia. Para el bioensayo se realizaron controles de sensibilidad utilizando la sal $K_2Cr_2O_7$ (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en las mismas condiciones. Se calcularon los valores de CI_{50} de CP y TCP para especies de levadura.

Ensayo de levadura recombinante (RYA)

Se realizó RYA para evaluar la actividad estrogénica. Utiliza una cepa modificada genéticamente de *S. cerevisiae* que contiene el gen del receptor de hormonas estrogénicas humanas. Si las sustancias analizadas tienen actividad estrogénica, se unen a hER, activando el gen lacZ, que expresa la enzima β -galactosidasa, generando una reacción que se mide espectrofotométricamente añadiendo el sustrato enzimático apropiado.

El ensayo de levadura recombinante se realizó como describen Noguerol et al., (2006). Brevemente, un cultivo nocturno de levadura en medio SD [6,7 g/L de YNBAA/AS-base nitrogenada de levadura sin aminoácidos de Difco (Basilea, Suiza) y 5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] más glucosa, histidina y metionina se utilizaron a una densidad óptica final de 0,1 (600 nm).

Los ensayos se realizaron en una microplaca de 96 pocillos. La primera columna se llenó con una dilución 1:20 v/v del compuesto para ensayar en el cultivo de levadura y luego se diluyó en una serie 1: 2, a través de la placa. Las concentraciones de ensayo de cada compuesto fueron de 8 mg/L. Las columnas 10, 11 y 12 están llenas de toxicidad, controles positivos (17 β -estradiol) y negativos, respectivamente. Una vez llena, la placa se incubó durante 6 h a 30 °C a 120 rpm en agitación orbital. Luego, para liberar proteínas activas de las células, se añadió un reactivo de extracción de proteína de levadura Y-PER (PIERCETM, Rockford, IL, EE. UU.), y se incubó adicionalmente a la misma temperatura durante 30 min. Luego, se agregaron 50 μ L de sustrato enzimático, previamente preparado en un tampón apropiado, y se leyó la actividad de β -galactosidasa por fluorescencia usando un espectrofluorómetro (TECAN Infinite M2000) a 360 nm de excitación y longitudes de onda de emisión de 460 nm. Se registró la fluorescencia durante 20 min (una medición cada 42 s).

La actividad enzimática se calculó como la pendiente de la regresión lineal de las unidades de fluorescencia representadas frente al tiempo y, a continuación, se calculó la actividad relativa derivada de los controles positivos y negativos. La actividad estrogénica se calculó a partir de la curva de dosis-respuesta (actividad relativa de β -galactosidasa frente a concentración química) y se expresó como valores de CE_{50} aparentes para cada compuesto. Estos valores se convirtieron a EEQ, equivalentes de estradiol usando la siguiente ecuación (Esteban et al., 2014; Balsiger et al., 2010), donde EC_{50} (17 β -estradiol) es 72.73×10^{-6} mg/L (Piña et al., 2009) y C es la concentración de ensayo del compuesto:

$$EEQ = \frac{EC_{50}(17\beta - \text{estradiol})}{EC_{50}(\text{compound})} \times C(\text{compound})$$

Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando un ANOVA de una vía seguido de un análisis post-hoc mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, a través del programa Statgraphics v.6.0. Los valores de IC_{50} se calcularon mediante análisis Probit (programa SPSS Statistics v. 16.0). Se tomó una $p < 0.05$ para indicar significancia estadística.

Resultados y discusión

Citotoxicidad

El potencial citotóxico de CP y TCP, y una mezcla equimolar de CP: TCP (1: 1), también se evaluó mediante el ensayo Alamar Blue utilizando sistemas basados en células con dos líneas celulares HEK293 y N2a de mamífero. La exposición a estos compuestos y su mezcla produjo una citotoxicidad significativa sobre la viabilidad celular (Fig. 13 y 14).

Figura 13. Curvas experimentales de concentración-respuesta aguda para CP, TCP y mezcla CP: TCP para la línea celular HEK293

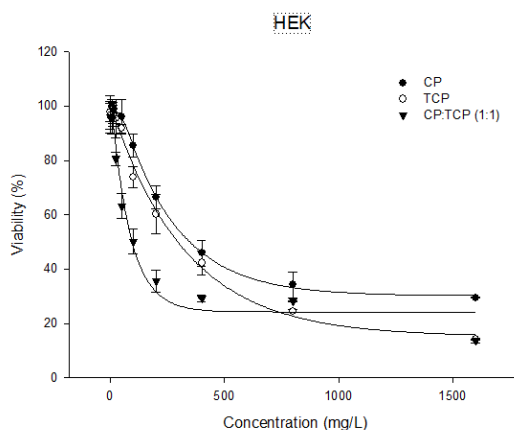
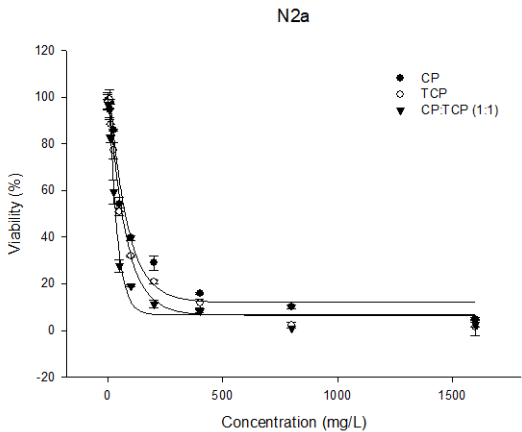


Figura 14. Curvas experimentales de concentración-respuesta aguda para CP, TCP y mezcla CP: TCP para la línea celular N2a



Como era de esperar, la viabilidad de las células disminuyó al aumentar las concentraciones de CP y TCP. Los valores de CI_{50} de compuestos puros, con sus límites de confianza del 95%, para las líneas celulares se presentan en la Tabla 9. CP y TCP en concentraciones de 451 y 295 mg/L, respectivamente, dieron 50% de citotoxicidad con HEK293 y en concentraciones de 90.0 y 61,6 mg/L, respectivamente, dieron 50% de citotoxicidad con N2a. Los valores de CI_{50} de la mezcla CP: TCP (1: 1) fueron 71,8 (54,5–94,4) mg/L para HEK293 y 16,7 (12,3–21,4) mg/L para N2a.

Tabla 9. IC_{50} (95% límites de confianza; $p<0.05$) Recopilación de valores de los compuestos de ensayo

	CP	TCP	CP:TCP (1:1)
HEK293	451 (360 - 580)	295 (247 - 357)	71,8 (54,5 – 94,4)
N2a	90.0 (73.6 – 109.8)	61.6 (55.3 – 68.4)	16,7 (12,3 – 21,4)
MY1	13.8 (12.3 – 15.3)	1.17 (0.57 – 1.95)	--
MY2	14.9 (13.3 – 16.5)	2.9 (2.0 – 3.8)	--
MY3	10.0 (8.5 – 11.7)	0.44 (0.14 – 0.94)	--
MY6	26.3 (23.7 – 29.0)	0.80 (0.28 – 1.55)	--
MY11	3.4 (2.8 – 4.1)	0.15 (0.03 – 0.41)	--
CECT 1891	10.9 (9.7 – 12.2)	3.4 (2.3 – 4.7)	--
<i>A. fischeri</i> ^a	3.7 (2.5 – 6.0)	0.98 (0.73 – 1.35)	0.78 (0.57 – 1.12)
<i>P. subcapitata</i> ^a	4.9 (4.8 – 5.1)	0.29 (0.28 – 0.32)	0.022 (0.021 – 0.023)
<i>D. magna</i> ^a	1.1 (0.7 – 1.5)	9.2 (7.3 – 11.4)	0.62 (0.48 – 0.78)

^a Echeverri-Jaramillo et al. (2020)

Después de 24h de exposición de las células, se ha descubierto que el metabolito TCP es más citotóxico que el compuesto original CP y la mezcla era más citotóxica que CP y TCP. Después de la exposición a CP en concentraciones de 0 a 400 mg/L, la viabilidad de las células HEK293 disminuyó lentamente hasta un 45,8%, pero para el N2a disminuyó rápidamente hasta un 16,0%. De la misma forma, TCP a las mismas concentraciones, produjo una disminución en la viabilidad de HEK293 y N2a hasta 42,3 y 11,6%, respectivamente. En la exposición a CP: TCP (1: 1) (0-400 mg/L), la viabilidad disminuyó rápidamente, al 29,2% para HEK293 y al 8,3% para N2a. A concentraciones de CP y TCP de 0 a 100 mg/L, la viabilidad de las células HEK293 experimentó una pequeña variación; se observó el mismo efecto de 0 a 25 mg/L para las células N2a. Los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad indicaron una mayor tolerancia de las células HEK293 a CP, TCP y la mezcla en el rango de concentración de 0 a 1,600 mg/L.

En este artículo, se probó la citotoxicidad de CP y su metabolito TCP en dos sistemas con células de mamíferos. Los resultados indican que el TCP es más tóxico que el CP para las dos líneas celulares ensayadas. Se observó una sensibilidad diferente entre líneas celulares, siendo las células N2a más sensibles lo que podría deberse a diferentes mecanismos de acción de los compuestos. Álvarez-Navarro (2017) realizó una prueba de citotoxicidad en las mismas líneas celulares para el cribado de toxicidad de varios contaminantes ambientales, detectando también una mayor sensibilidad para las células N2a. Del mismo modo, Lovecka et al., (2015) en un ensayo citotóxico utilizando las dos líneas celulares HEK293 y HepG2 expuestas a herbicidas, bromoxinilo, cloroxinilo e ioxinilo, demostró una menor sensibilidad para HEK293.

Se sabe que la toxicidad aguda de CP está mediada por la inhibición de la acetilcolinesterasa por la producción del metabolito activo CP oxon (Barron y Woodburn 1995; Mangas et al., 2016), pero varios estudios sugieren que la PC puede influir directamente en la replicación y diferenciación celular (Das y Barone 1999; Dam et al., 2000; Qiao et al., 2001), que también se extienden a sus principales metabolitos CP oxon y TCP. El trabajo actual se aborda en esta línea. Las líneas celulares se seleccionaron como modelos adecuados para su uso con ensayos de citotoxicidad *in vitro* porque son representativas de dos tejidos diana para muchos pesticidas. La línea celular de neuroblastoma N2a de ratón se ha utilizado regularmente en la investigación de neurotoxicidad y pesticidas para estudios de detección

y mecanicistas (Veronesi, 1992; Perreault et al., 2011; Pawlowicz et al., 2013; Pisapia et al., 2017). Por otro lado, HEK293, línea celular de riñón embrionario humano, se usa ampliamente como modelo *in vitro* para ensayos de citotoxicidad para probar los efectos del estrés oxidativo y otras propiedades relacionadas (Waly et al., 2013; Lovecka et al., 2015).

Una alta actividad para los artrópodos y una toxicidad relativamente baja para los mamíferos en modelos animales se ha probado en gran medida para CP (Giddings et al., 2014; Ezzi et al., 2016). Los resultados obtenidos aquí respaldan esta afirmación con valores de CI_{50} para líneas celulares entre 90 y 400 veces más altos en comparación con *D. magna* (Echeverri et al., 2020) (Tabla 1). Además, el grado de citotoxicidad de varios insecticidas en células humanas (HEK293, HeLa y HepG2) informado por Yun et al., (2017) fue significativamente más baja que la de las células de insectos (Tn5b1-4, Sf-9 y S2). En este artículo, CP mostró relativamente poca citotoxicidad en células HEK293 durante 24 h de exposición. Esto podría estar relacionado con la actividad neurotóxica de CP, lo que resulta en una menor expresión de citotoxicidad en células no neuronales.

Ensayo de toxicidad con levaduras marinas

Identificación de levaduras marinas.

Se aislaron un total de veintiséis levaduras del sedimento marino de la bahía de Cartagena (Colombia). Se seleccionaron al azar once levaduras marinas para el bioensayo de toxicidad. Su identificación se presenta en la Tabla 2.

Efectos de CP y TCP sobre levaduras marinas.

Para investigar la capacidad de las levaduras como bioindicadores de toxicidad, se realizó un bioensayo usando los aislados de levadura de sedimentos marinos. Once levaduras marinas y la especie CECT 1891 *S. cerevisiae* fueron expuestas a diferentes concentraciones de CP y TCP. La viabilidad de los organismos tratados y no tratados se evaluó utilizando el método de resazurina (Fig. 4 y 5). La inhibición máxima de la fluorescencia de la resorufina en relación con el control se obtuvo generalmente dentro de los 20 a 60 minutos de incubación para las cepas MY1, MY2, MY3, MY6, MY11 y CECT 1891 *S. cerevisiae*. Las cepas MY4, MY5, MY7, MY8, MY9 y MY10

metabolizaron la resorufina fluorescente a la hidrorresorufina transparente rápidamente, en el primer minuto y, en este momento, no se pudo observar efecto a las concentraciones estudiadas.

Figura 15. Viabilidad de levadura marina y CECT 1891 *S. cerevisiae* expuestos a diferentes concentraciones de CP (mg/L)

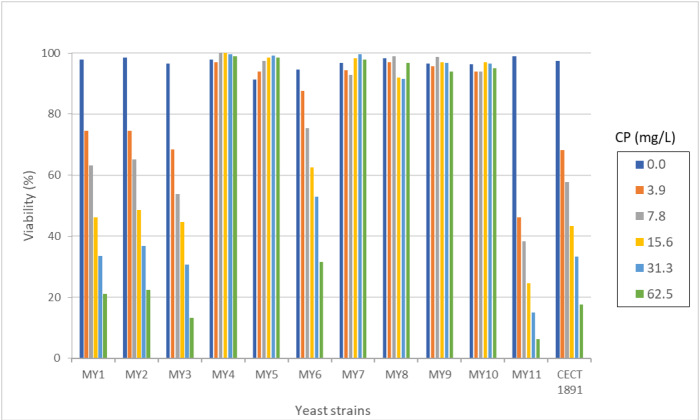
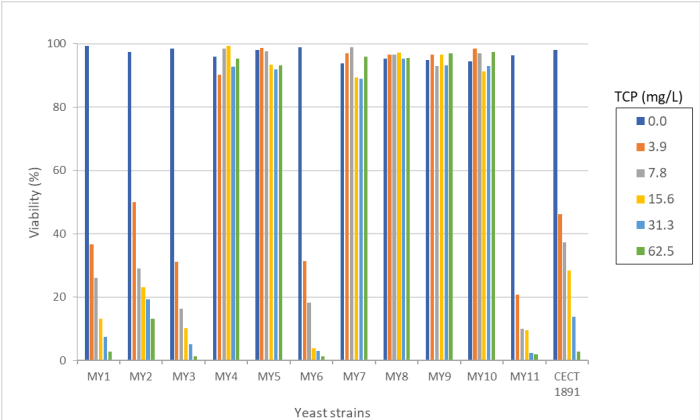


Figura 16. Viabilidad de levadura marina y CECT 1891 *S. cerevisiae* expuestos a diferentes concentraciones de TCP (mg/L)



Los datos experimentales con las seis levaduras más sensibles a CP y TCP se presentan como curvas de concentración-respuesta (Fig. 15 y 16). Los valores de CI_{50} para ambos compuestos se presentan en la Tabla 9. Las cepas MY3, MY6 y MY11 fueron más sensibles a TCP que MY1, MY2 y CECT 1891 *S. cerevisiae*, siendo la cepa MY11 la más sensible a este compuesto, y CECT 1891 *S. cerevisiae* el más resistente. Para las levaduras expuestas a CP, las cepas MY1, MY2, MY3, MY8 y CECT 1891 *S. cerevisiae* fueron más resistentes que la cepa MY11. Como se observó, esta última mostró mayor sensibilidad a CP y TCP que las otras cepas de levadura, con valores de CI_{50} de 3.4 y 0.15 mg/L, respectivamente. El TCP fue más tóxico para las levaduras que el CP con IC_{50} entre 0,15 y 3,4 mg/L para las primeras y entre 3,4 y 26,3 mg/L para las últimas. Las cepas de levadura MY1, MY2 y CECT 1891 *S. cerevisiae* mostraron una sensibilidad similar a TCP; estas mismas cepas más MY3 lo mostraron frente a CP con valores de CI_{50} de 1,17 a 3,4 mg/L y de 10,0 a 14,9 mg/L, respectivamente.

Figura 17. Acute concentration-response experimental curves for yeast strains exposed to CP

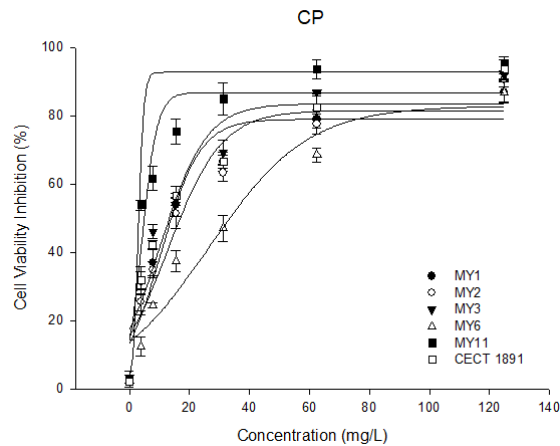
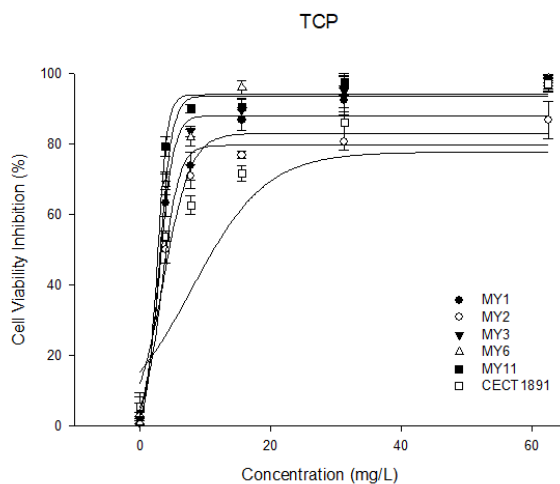


Figura 18. Acute concentration-response experimental curves for yeast strains exposed to TCP



Para evaluar la sensibilidad del bioensayo de inhibición de resorufina, se comparó la respuesta de la mayoría de las levaduras sensibles estudiadas en este trabajo con el ensayo de citotoxicidad y otras pruebas estandarizadas (*Aliivibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Daphnia magna*) (Echeverri et al., 2020). Parecía haber diferencias considerables en la sensibilidad entre las líneas celulares y los otros organismos (Tabla 11). La bacteria *A. fischeri*, el cladoceran *D. magna* y la levadura MY11 R., minuta fueron los organismos más sensibles a CP, y *A. fischeri*, MY11 R. minuta y el alga *P. subcapitata* lo fueron a TCP. Las líneas celulares HEK293 y N2a fueron las más tolerantes a los compuestos estudiados con valores de IC_{50} que variaron de 61,6 a 451 mg/L. El TCP fue más tóxico que el CP para todos los organismos y líneas celulares con una CI_{50} de 0,15 a 295 mg/L y de 3,4 a 451 mg/L, respectivamente.

Esteve y col. (2009) evaluaron la actividad metabólica de la levadura *S. cerevisiae* expuesta a tres pesticidas y compararon el efecto tóxico con los bioensayos estándar de *D. magna* y *A. fischeri*. Concluyeron que el bioensayo de levadura fue 96 veces más rápido que el bioensayo de toxicidad de *D. magna*, pero tuvo menor sensibilidad; sin embargo, *A. fischeri* fue el más tolerante a los pesticidas. Varios autores informaron valores de toxicidad

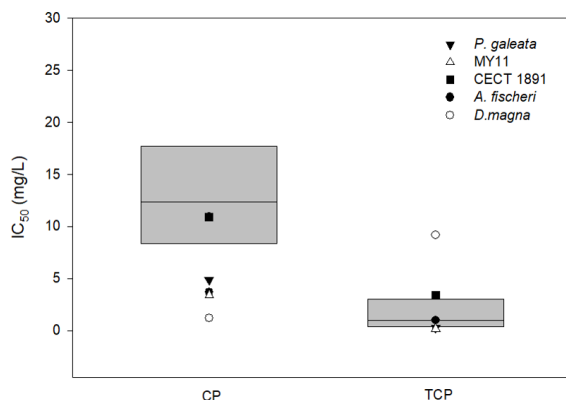
de distintos fungicidas para *D. magna* entre <0.01 y 4.3 mg/L (Ferrando et al., 1992; Freeman y Nizani 1997; Bartlett et al., 2001; Fai y Grant, 2009b). En nuestro estudio, el bioensayo de *D. magna* fue más sensible al insecticida CP que los bioensayos de levaduras, bacterias y algas, lo cual es evidente considerando su modo de acción; sin embargo, para el TCP, el bioensayo de microcrustáceos fue el menos sensible. A diferencia de la CP, la TCP no inhibe la actividad de la acetilcolinesterasa (Qiao et al., 2001). La toxicidad de CP y TCP en *A. fischeri* fue del mismo orden que la levadura más sensible MY11 *R. minuta*.

Tabla 10. Identificación de levaduras marinas usadas en este estudio

Levadura	Identificación
MY1	<i>Cryptococcus laurentis</i>
MY2	<i>Candida krusei/inconspicua</i>
MY3	<i>Candida famata</i>
MY4	<i>Rhodotorulla glutinis</i>
MY5	<i>Candida lipolytica</i>
MY6	<i>Candida krusei/inconspicua</i>
MY7	<i>Candida</i> sp.
MY8	<i>Rhodotorulla</i> sp.
MY9	<i>Candida spherica</i>
MY10	<i>Candida famata</i>
MY11	<i>Rhodotorulla minuta</i>

La sensibilidad de la levadura tipo CECT 1891 *S. cerevisiae* a la CP no fue significativamente diferente de la media de los valores de CP IC₅₀ de las seis levaduras más sensibles (MY1, MY2, MY3, MY6, MY11 y CECT 1891). En cambio, este tipo de levadura fue 2,3 veces más tolerante que el promedio de TCP. Los valores medios de IC₅₀ de levadura para CP (13,2 mg/L) y TCP (1,5 mg/L) fueron 4 y 10 veces más altos que los de CP y TCP IC₅₀ de la levadura más sensible MY11, respectivamente (Fig. 19).

Figura 19. Comparación del modelo de sistema de levadura con otros organismos ensayados, expuestos a CP y TCP. Los diagramas de caja representan los valores de IC₅₀ de levaduras MY1, MY2, MY3, MY6, MY11 y CECT 1891



Aunque, *S. cerevisiae* es un modelo experimental propuesto por varios autores para evaluar los efectos de los contaminantes ambientales en los hongos no objetivo, debido a una amplia distribución, dada por células de crecimiento rápido, facilidad de cultivo, genoma no patógeno y completamente secuenciado (Kitagawa et al., 2003; Papaefthimiou et al., 2004; Fay y Grant, 2009a) hay otra especie de levadura que podría usarse en estudios ambientales (Baronian 2004; Fai y Grant 2009a; Vadkertiová y Slávikova, 2011). En este estudio, MY11 mostró una alta sensibilidad a los compuestos estudiados comparable a la sensibilidad de *A. fischeri* y *P. subcapitata* (Fig, 19). Sin embargo, fueron necesarios más ensayos para establecer MY11 como levadura representativa en una batería de pruebas de toxicidad para evaluar los contaminantes ambientales.

El bioensayo de levadura ha sido sensible, dando concentraciones inhibitorias comparables a los valores de CI₅₀ más bajos de varios fungicidas reportados en la literatura para *S. cerevisiae* y otros hongos (Zerva et al., 1996; Freeman y Nizzani 1997; López et al., 2003). Encontramos que la toxicidad de CP y TCP, como media de IC₅₀ de las especies de levadura, era ciento treinta (CP) y quince (TCP) veces mayor que el valor de IC₅₀ más bajo encontrado por los autores antes mencionados.

Actividad estrogénica de compuestos

La actividad estrogénica de los compuestos seleccionados fue determinada por RYA. Se obtuvieron curvas de dosis-respuesta para cada compuesto y se presentan en la Fig. 20 como gráficos de la actividad relativa de *β -galactosidasa*, en unidades arbitrarias, frente a la concentración del compuesto. Los resultados mostraron que ambos compuestos fueron capaces de unirse al receptor de estrógeno con afinidades similares.

La Tabla 11 muestra los valores de concentración efectiva al 50% (CE₅₀) para cada compuesto, calculados usando métodos de regresión lineal estándar, así como la concentración más baja a la que se detectó actividad estrogénica (CL). Ambos compuestos muestran una actividad estrogénica similar, como se verifica a partir de los valores de CE₅₀. Para comparar con el estándar de 17 β -estradiol, se calcularon los equivalentes (EEQ) como se describe en el punto 2.4 de la sección Material y Métodos. Estos valores representan la concentración de 17 β -estradiol que provoca la misma respuesta que los compuestos a la concentración inicial del ensayo. En términos de potencia relativa, los compuestos estudiados representan entre 2.500 y 3.000 veces menos estrogenicidad que el 17 β -estradiol.

Por otro lado, CP y TCP causaron actividad estrogénica en concentraciones tan bajas como 0.04 mg/L y 0.07 mg/L, respectivamente, cuyas actividades estrogénicas corresponden a 14.5 ng/L y 25.5 ng/L de EEQ, respectivamente, valores por debajo de CE₅₀ de 17 β -estradiol (72,73 ng/L). Sin embargo, considerando que CP y TCP se detectan en los cuerpos de agua en niveles que van desde 0.5 μ g/L a 700 μ g/L (Mazanti et al., 2003, Bonifacio et al., 2017), la actividad de disrupción endocrina debe considerarse para un riesgo completo, por ello la evaluación en muestras ambientales sospechosas debe contener CP y TCP. Se ha demostrado que RYA es una excelente herramienta para el cribado de muestras naturales por su contenido de sustancias con actividad estrogénica (García-Reyero et al., 2001, 2005; Brix et al., 2010).

Tabla 11. Actividad estrogénica de compuestos CP y TCP por RYA

Compound	EC ₅₀ (mg/L) ^a	C _L (mg/L) ^b	EEQ (mg/L) ^c
CP	0.20	0.04	2.9 × 10 ⁻³
TCP	0.23	0.07	2.5 × 10 ⁻³

^a EC₅₀, concentración de ligando que da el 50% de la respuesta máxima

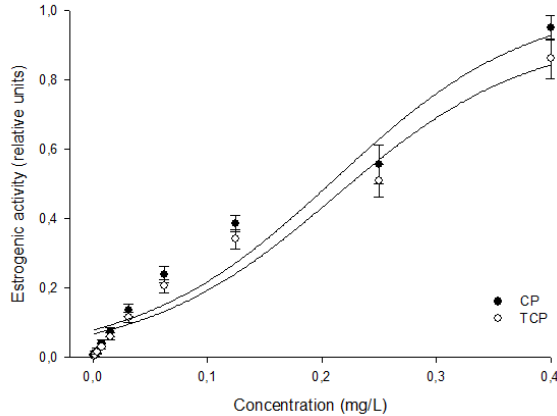
^b C_L, concentración más baja con actividad estrogénica

^c EEQ (equivalentes de estradiol), concentración de 17 β-estradiol que provoca la misma respuesta que el compuesto a la concentración inicial EC₅₀

La actividad de disrupción endocrina de CP se ha evidenciado en los últimos años a través de estudios que van desde ensayos *in vivo* e *in vitro* hasta estudios epidemiológicos. Varias investigaciones describen la PC como un potente compuesto antiandrogénico (Usmani et al., 2003; Joshi et al., 2007, Viswanath et al., 2010), que afecta la capacidad reproductiva en los hombres. Estudios epidemiológicos recientes han demostrado asociaciones significativas entre la exposición materna y paterna a CP y daños testiculares (Uchendu et al., 2013). La actividad estrogénica de CP también ha sido verificada mediante varios estudios: Ventura et al., (2012) demostraron que CP en concentraciones ambientales promueve la proliferación de células de cáncer de mama, a través del receptor de estrógeno (ER-α). Otros autores también encontraron que era estrogénico utilizando células ováricas de hámster chino (Kojima et al., 2004).

También se han demostrado efectos sobre la tiroides, que provocan efectos nocivos sobre el desarrollo cerebral del feto (Ghisari y Bonefeld, 2005). Haviland y Col. (2010) detectaron un aumento de los niveles de hormona tiroidea en ratones hembra expuestos a PC, cuyo comportamiento de aprendizaje se alteró en consecuencia. Además, la presencia de residuos de CP en los alimentos ha suscitado un interés generalizado, considerando que dosis bajas podrían alterar la función del sistema hormonal en humanos y vida silvestre, provocando efectos adversos (Yu et al., 2015).

Figura 20. Curvas experimentales de concentración-respuesta aguda para CP y TCP en el ensayo de levadura recombinante (RYA)



Se destacan los estudios realizados en animales, sin embargo, estos ensayos *in vivo* requieren mucho tiempo y son laboriosos. Teniendo en cuenta que la alteración endocrina es una forma de toxicidad que a menudo es difícil de probar, es necesario proponer una serie de ensayos *in vitro* para su uso como un primer cribado del disruptor endocrino (Bishop y Willet, 2014).

La mayoría de estos ensayos se clasifican en tres categorías (Kinnberg, 2003):

1. Ensayos de unión al ligando competitivo del receptor de estrógeno (RE) que miden la afinidad de unión de una sustancia química por el RE;
2. Ensayos de proliferación celular que miden el aumento en el número de células sensibles al estrógeno (E-screen);
3. Ensayos de genes indicadores que miden la actividad transcripcional y traduccional dependiente de la unión a ER.

Las características, el rendimiento y el uso de estos ensayos en la detección de actividades estrogénicas de los disruptores endocrinos se han revisado y discutido en otra parte (Zacharewski 1998; Andersen et al., 1999; Fang et al., 2000; Kinnberg 2003).

De los tres tipos de ensayos *in vitro*, en el de tipo 3 se presentan ensayos de genes, en los cuales, sus indicadores reflejan más ventajas en comparación con los demás: los ensayos competitivos de RE (1) son significativamente menos sensibles y los ensayos de proliferación celular (2) consumen más tiempo. Sin embargo, los ensayos de genes indicadores se consideran más específicos y fiables para un cribado de primer nivel de la actividad estrogénica. Además, se puede llevar a cabo con células de mamífero o de levadura, aunque las primeras tienen el principal inconveniente de que sus células son más difíciles y caras de cultivar, a la vez que son más susceptibles a efectos citotóxicos. El ensayo de levadura recombinante (RYA), clasificado como ensayos de tipo 3, puede considerarse como una herramienta robusta, rápida y sensible para evaluar la actividad de alteración endocrina putativa en el medio ambiente, así como para la detección de nuevos compuestos químicos a un costo moderado (Noguerol et al.2006, Brix et al.2010).

El CP se incluyó en listas de sustancias químicas para la detección de la actividad de los disruptores endocrinos (EPA 2007; EC, 2002). Aunque algunos autores han demostrado la actividad disruptora endocrina de CP como se mencionó anteriormente, organizaciones internacionales como EPA (EPA, 2015) y EFSA (EFSA, 2019) han declarado que todavía se necesitan más pruebas para demostrar que CP es un disruptor endocrino. Aunque los resultados obtenidos aquí indican una estrogénicidad débil de los compuestos probados en comparación con el estradiol, deben considerarse en estudios de evaluación de riesgos adicionales, ya que son ubicuos y pueden acumularse en organismos en concentraciones altas, lo suficiente para inducir efectos similares al estradiol.

Conclusiones

En resumen, este estudio se realizó con tres sistemas modelo *in vitro*. Se ha investigado la idoneidad de los ensayos basados en células de mamíferos. La variabilidad de las respuestas celulares observadas en este trabajo respalda la necesidad de utilizar líneas celulares representativas de diferentes tejidos diana para sustancias químicas y contaminantes ambientales, como HEK293 y N2a. Las levaduras están ampliamente distribuidas y juegan un papel importante en los ecosistemas, además, son fáciles de mantener y cultivar en laboratorio.

Koch y Col. (1993) ha propuesto las levaduras como modelos alternativos de toxicidad y, más recientemente, varios autores lo apoyan (Ribeiro et al., 2000; Cabral et al., 2003; Braconi et al., 2011, 2016). Los resultados actuales también sugieren que la levadura es un modelo confiable para una detección preliminar de la toxicidad de los contaminantes ambientales, aunque se necesitan más investigaciones y pruebas para establecer su exactitud y precisión. El ensayo de levadura recombinante (RYA) mostró una ligera actividad estrogénica de CP y TCP por lo que puede considerarse como una alternativa a los ensayos *in vivo*. RYA se ha utilizado para demostrar la actividad estrogénica de compuestos individuales y muestras ambientales (García-Reyero et al., 2004; Puy-Azurmendi et al., 2014), y tiene como objetivo la detección rápida de ligandos potenciales para receptores hormonales y la identificación de señales de alteración endocrina a concentraciones más bajas y tiempos de exposición más cortos (Piña et al., 2009).

Por otro lado, los resultados también confirman la necesidad de estudiar la toxicidad no solo de los compuestos parentales, sino también de sus metabolitos como se puede ver con el producto metabólico TCP, que resultó más tóxico que el CP. Además, los niveles que producen efectos tóxicos de CP en todos los sistemas modelo ensayados aquí fueron más altos que las concentraciones ambientales informadas por algunos autores en cuerpos de agua (Mazanti et al., 2003; Bonifacio et al., 2017).

Capítulo 6.

Conclusiones y Trabajo Futuro

Conclusiones

- La ecotoxicología busca conocer los efectos de los contaminantes químicos frente a los organismos en diferentes niveles tróficos que se encuentran en los ecosistemas terrestres y acuáticos.
- Los estudios de toxicidad, basados en contaminantes individuales, no son suficientes para predecir la toxicidad real en el medio ambiente, ya que los productos químicos no están solos en los ecosistemas, sino que se presentan como mezclas, en donde pueden interactuar entre sí y provocar un aumento de los efectos tóxicos en diferentes especies, haciendo necesario los estudios sobre baterías de organismos diferentes.
- Al comparar la toxicidad tanto simple como binaria de CP y TCP para *V. fischeri*, *P. subcapitata* y *D. magna*, se pudo determinar que la respuesta tóxica depende de la sensibilidad de las especies utilizadas, siendo el crustáceo, *D. magna* el organismo más sensible para CP puro, CP comercial, TCP y mezcla CP: TCP (1: 1).
- El TCP fue más tóxico que el compuesto original para las bacterias y las algas, con excepción del crustáceo.
- El compuesto más tóxico, para todos los modelos biológicos estudiados, fue el CP comercial.
- La toxicidad debida al efecto sinérgico de la CP y su metabolito TCP podría resultar en efectos negativos para los productores primarios y consumidores en concentraciones ambientales más bajas de lo esperado.
- Se aislaron diez levaduras de sedimentos marinos con predominio del género *Candida* (60%), *Cryptococcus* (30%) y *Rhodotorulla* (10%).
- Todas las levaduras estudiadas presentaron asimilación de carbohidratos de glucosa 100% y glicerol, n-acetilglucosamina en 90%, con baja antibiosis entre levaduras con el fin de usarlas en futuro como consorcios microbianos. Todas presentaron prueba positiva de esterasa/lipasa, enzimas de importancia en la degradabilidad de CP.

- Se demuestra el crecimiento de levaduras en condiciones extremas de temperatura a 4°C, 25°C, 37°C y 45°C, y concentraciones de sal al 2%, 4%, 10% y 25%, encontrándose levaduras extremófilas.
- Se determina la concentración mínima inhibitoria de CP y TCP en cuatro levaduras sobre agar, determinando mayor toxicidad de TCP.
- Se realizaron pruebas de toxicidad de CP y TCP sobre dos sistemas modelo eucarióticos basados en células de mamífero *in vitro*, como HEK293 y N2a, mostrando que el TCP es más tóxico que el CP para las dos líneas celulares ensayadas, siendo las células N2a más sensibles a ambos compuestos, por ser una línea celular de neuroblastoma de ratón.
- El ensayo de levadura recombinante (RYA) mostró una ligera actividad estrogénica de CP y TCP, por lo que puede considerarse como una alternativa a los ensayos *in vivo*. Los CP y TCP muestran una actividad estrogénica similar siendo entre 2.500 y 3.000 veces menos estrogénica que el 17 β -estradiol.
- Con el fin de encontrar nuevos modelos de medición de la toxicidad, las levaduras aisladas de sedimentos marinos que contienen residuos de CP se han probado contra CP y TCP mediante un ensayo de viabilidad celular. De las 12 cepas de levadura probadas, 6 de ellas mostraron cierta sensibilidad y una respuesta dependiente de la concentración a los compuestos probados, por lo que podrían considerarse como modelos futuros para las pruebas de toxicidad, siendo modelo confiable para una detección preliminar de la toxicidad de los contaminantes ambientales, ampliamente distribuidas en los ecosistemas, de fácil mantenimiento y facilidad de cultivo.
- Por otro lado, los resultados también confirman la necesidad de estudiar la toxicidad no solo de los compuestos parentales, sino también de sus metabolitos como se puede ver con el producto metabólico TCP, que resultó más tóxico que el CP. Además, los niveles que producen efectos tóxicos de la CP en todos los sistemas modelo ensayados aquí fueron más altos que las concentraciones ambientales informadas por algunos autores en cuerpos de agua.

Trabajo futuro

Al ver la necesidad de seguir estudios con levaduras marinas y así, fortalecer el área de la ecotoxicología microbiana y la línea de investigación de procesos biológicos y Biotecnología del Grupo de Investigación Microbiología y Ambiente del Programa de Bacteriología de la Universidad de San Buenaventura Cartagena, se proponen los siguientes estudios:

- Según los resultados de las diferentes respuestas de *sensibilidad* mostradas por las levaduras marinas estudiadas, se requiere seguir profundizando en la búsqueda de biomarcadores de exposición y efecto, así como el desarrollo de Biosensores con células completas de levadura.
- Con relación a las diferentes respuestas de *resistencia* que presentaron estas levaduras marinas, se iniciarán los estudios de biodegradación de CP y TCP individual y en mezcla, probando levaduras solas y en consorcio a nivel de laboratorio y en microcosmos.

Capítulo 7. Referencias

Referencias del Capítulo 2

- Andersen, M. E., et al., (2009). Toxicity testing in the 21st century: Bringing the vision to life. *Forum Series, Part I. Toxicology Science*, 107(2), 324-330.
- Acero, A., Cero, C., & Caraballo, P. (2012). Análisis de las relaciones tróficas en un lago de inundación de la Amazonía colombiana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 4(1), 102-120.
- ATSDR. (1997). *Chlorpyrifos Cas # 2921-88-2* (Informe de septiembre).
- Baskaran, S., Kookana, R. S., & Naidu, R. (2003). Contrasting behaviour of chlorpyrifos and its primary metabolite, TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol), with depth in soil profiles. *Soil Research*, 41(6), 749-760. <https://doi.org/10.1071/SR02062>
- Beltrán, J. E. (2008). *Ecología y medio ambiente: Tecnología en gestión pública ambiental*. ESAP.
- Boverhof, D. R., et al., (2006). Toxicogenomics in risk assessment: Applications and needs. *Toxicological Sciences*, 89(2), 352-360.
- Cabrera, J. M., et al., (1995). La toxicología en la atención primaria de salud. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 11(3).
- Cáceres, T., He, W., Naidu, R., & Megharaj, M. (2007). Toxicity of chlorpyrifos and TCP alone and in combination to *Daphnia carinata*: The influence of microbial degradation in natural water. *Water Research*, 41(19), 4497-4503. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.025>
- Cagiga, E., et al., (2003). Impactos ambientales en emplazamientos contaminados: Métodos rápidos de evaluación. *Ingeniería Química*. www.alcion.es

- Carballo, O. (2003). Los bioensayos de toxicidad en sedimentos marinos. *Revista de Tecnología en Línea, RETEL*, (pp.33-69). <http://www.sertox.com.ar/rete/default.htm>
- Carod Benedico, E. (2002). Insecticidas organofosforados: De la guerra química al riesgo laboral y doméstico. *Medifam*, 12(5), 51–62. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1131-57682002000500005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Castillo, G., & Ordóñez, G. (2000). Salud ambiental: Conceptos y actividades. *Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health*, 7(3).
- Cravo, C., Cagnon, C., Lauga, B., & Duran, R. (2017). *Microbial ecotoxicology*. Springer. Gewerbestrasse, Suiza.
- Cruz, V. H., Morales, M. V., Navia, A. F., Rodríguez, J. M., & del Monte, P. (2013). Análisis funcional de la red trófica de Bahía Magdalena Baja California Sur, México. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(3), 519-544.
- Deblonde, T., et al., (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 442-448.
- Decision, I., Sciences, C., & Studies, L. (2014). A framework to guide selection of chemical alternatives. *In A Framework to Guide Selection of Chemical Alternatives*. <https://doi.org/10.17226/18872>
- Denine, G. J., et al., (2008). Uso de insecticidas: Contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25(1), 74-100.
- Donato, M. M., et al., (2000). Membrane lipid composition of *Bacillus stea- rothermophilus* as affected by lipophilic environmental pollutants: An approach to membrane toxicity assessment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39, 145-153.
- Dirección de Salud Ambiental (DSA). (2011). *Manual de procedimientos técnicos para la vigilancia sanitaria en salud ambiental*. Dirección Regional de Salud Ancash.

- Ribeiro, I. C., Verissimo, I., Moniz, L., Cardoso, H., Sousa, M. J., Soares, A. M. V. M., & Leao, C. (2000). Yeasts as a model for assessing the toxicity of the fungicides Penconazol, Cymoxanil and Dichlofluanid. *Chemosphere*, 41(11), 1637–1642. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00039-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00039-4)
- Robbens, J., et al., (2007). Ecotoxicological risk assessment using DNA Chips and cellular reporters. *Trends in Biotechnology*, 25(10), 460–466.
- Rudolf, S. S., et al., (2008). Measuring and monitoring persistent organic pollutants in the context of risk assessment. *Marine Pollution Bulletin*, 57, 236–244.
- Sabra, F., El-Deeb Mehana, E.-S., & Soliman Sabra, F. (2015). Pesticides toxicity in fish with particular reference to insecticides. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*, 3(1), 2321–1571. <https://www.researchgate.net/publication/272575872>
- Sánchez, P. (n.d.). *Valoración ecotoxicológica de la contaminación de origen agrario: Incorporación de bioensayos en los protocolos de evaluación del riesgo ambiental* (Memoria para optar al grado de doctor).
- Scheerer, S., et al., (2006). Bioluminescence of *Vibrio fischeri* in continuous culture: Conditions of stability and intensity photoemission. *Journal of Microbiological Methods*, 67(3), 321–329.
- Schipper, C. A., Rietjens, I. M. C. M., Burgess, R. M., & Murk, A. J. (2010). Application of bioassays in toxicological hazard, risk, and impact assessments of dredged sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 60(11), 2026–2042. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.018>
- Schnell, S., Olivares, A., Piña, B., Echavarri-Erasun, B., Lacorte, S., & Porte, C. (2013). The combined use of the PLHC-1 cell line and the recombinant yeast assay to assess the environmental quality of estuarine and coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 77(1–2), 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.09.047>
- Seguí, X., et al., (2013). Fuzzy model for risk assessment of persistent organic pollutants in aquatic ecosystems. *Environmental Pollution*, 178, 23–32.

- Siddiqui, A. H., Tabrez, S., & Ahmad, M. (2011). Validation of plant-based bioassays for the toxicity testing of Indian waters. *Environmental Monitoring and Assessment*, 179(1–4), 241–253. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1732-9>
- Silva, L. M., et al., (2014). Yeast diversity associated to sediments and water from two Colombian artificial lakes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 135–142.
- Snape, J. R., et al., (2004). Ecotoxicogenomics: The challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 67(2), 143–154.
- Sogorb, M. A., et al., (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamates and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, 128(3), 215–228.
- Standard, I. (2012). *ISO 6341, 2012* (Vol. 2012).
- Standard, I. (2012). *ISO 8692* (Vol. 2012).
- Starner, K., & Goh, K. S. (2013). Chlorpyrifos-treated crops in the vicinity of surface water contamination in the San Joaquin Valley, California, USA. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 91, 287–291. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1024-5>
- Stuart, M., et al., (2012). Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*, 415, 1–21.
- Tamayo, M., Gime, E., Martinez, N., Hernandez, O., Fimia, R., & Iannacone, J. (2019). Microbiological, chemical, and ecotoxicological quality of waters used for irrigation in the Yabú Valley, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. *Biotempo*, 16(1), 85–98. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v16i1.2179>
- Tancredo, K. R., Ferrarezi, J. V., da Costa Marchiori, N., & Martins, M. L. (2019). Ecotoxicological assays to determine the median lethal concentration (LC50) of formalin for fish. *Aquaculture International*, 27(3), 685–694. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00354-w>
- Tiwari, M. K., et al., (2014). Kinetics of biotransformation of chlorpyrifos in aqueous and soil slurry environments. *Water Research*, 51, 73–85.

- Torres, M. A., et al., (2008). Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 1–15.
- United Nations. (2011). *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)* (4th ed.).
- Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J., & Dunlap, P. V. (2007). Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida*, and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov., and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(12), 2823–2829. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65081-0>
- US EPA. (1998). *Drinking water assessment of chlorpyrifos*. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.
- Van Gestel, C. A. M. (2012). Soil ecotoxicology: State of the art and future directions. *ZooKeys*, 176, 275–296.
- Vargas, F. (1996). Prevención y control del riesgo de los productos químicos. *Revista Española de Salud Pública*, 70, 409–420.
- Varona, M., et al., (2012). Impacto en la salud y el medio ambiente por exposición a plaguicidas e implementación de buenas prácticas agrícolas en el cultivo de tomate, Colombia, 2011. *Revista Chilena de Salud Pública*, 16(2), 96–106.
- Vestel, J., Caldwell, D. J., Constantine, L., D'Aco, V. J., Davidson, T., Dolan, D. G., Millard, S. P., Murray-Smith, R., Parke, N. J., Ryan, J. J., Straub, J. O., & Wilson, P. (2016). Use of acute and chronic ecotoxicity data in environmental risk assessment of pharmaceuticals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(5), 1201–1212. <https://doi.org/10.1002/etc.3260>
- Vidotti, E. C., et al., (2004). Algas: Na economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. *Química Nova*, 27(1), 139–145.
- Vighi, M., et al., (2013). Ecotoxicology: The challenges for the 21st century. *Toxics*, 18–35.
- Walker, C. H. (2001). *Organic pollutants: An ecotoxicological perspective*. Taylor & Francis.

- Wang, F., et al., (2010). Comparative toxicity of chlorpyrifos and its oxon derivatives to soil microbial activity by combined methods. *Chemosphere*, 78, 319–326.
- Watts, M. (2012). Chlorpyrifos: Un posible COP a nivel global. In *Pesticide Action Network Norteamérica* (PANNA).
- WHO/SDE/WSH/03.04/87. (2004). Chlorpyrifos in drinking-water. *Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*. World Health Organization.
- Wilson, V. S., et al., (2013). Utilizing toxicogenomic data to understand chemical mechanism of action in risk assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2(1), 299–308.
- Xiuting, H., et al., (2011). Assessment of typical pollutants in waterborne by combining active biomonitoring and integrated biomarkers response. *Chemosphere*, 84, 1422–1431.
- Xu, R. R., Pei, Z. T., Wang, W. Q., Zhang, M., Zhang, L. L., Zhang, J., Wang, W. Q., Sun, L. W., & Zhang, Y. M. (2020). Assessment of biological toxicity and ecological safety for urban black-odor river remediation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(3), 1025–1039. <https://doi.org/10.3390/ijerph17031025>
- Yasokawa, D., et al., (2010). Toxicogenomics using yeast DNA microarrays. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(5), 511–522.
- Zhang, J., et al., (2011). Evaluation on the toxicity of ionic liquid mixture with antagonist and synergism to *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67. *Chemosphere*, 82, 1024–1029.
- Zhang, Y. H., et al., (2008). Prediction for the mixture toxicity of six organophosphorus pesticides to the luminescent bacterium Q67. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 880–888.
- Zhao, Y., Wendling, L. A., Wang, C., & Pei, Y. (2017). Behavior of chlorpyrifos and its major metabolite TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol) in agricultural soils amended with drinking water treatment residuals. *Journal of Soils and Sediments*, 17(4), 889–900. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1586-z>
- Zhou, X., et al., (n.d.). Modeling and prediction for the acute toxicity of pesticide mixtures to the freshwater luminescent bacterium *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67.

Referencias del capítulo 3

- Ali, D., & Kumar, S. (2012). Study the effect of chlorpyrifos on acetylcholinesterase and hematological response in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *IIOAB Journal*, 3(1), 12-18.
- Álvarez, M., du Mortier, C., & Fernández Cirelli, A. (2013). Behavior of insecticide chlorpyrifos on soils and sediments with different organic matter content from Provincia de Buenos Aires, República Argentina. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224, 1453. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1453-0>
- Andresen, J. A., Grundmann, A., & Bester, K. (2004). Organophosphorus flame retardants and plasticizers in surface waters. *Science of The Total Environment*, 332(1-3), 155-166. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.04.021>
- Australian and New Zealand Environment and Conservation Council & Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand. (2000). *Australian and New Zealand guidelines for fresh and marine water quality*. Canberra.
- Ashauer, R., Boxall, A., & Brown, C. (2006). Uptake and elimination of chlorpyrifos and pentachlorophenol into the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(4), 542-548. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0317-z>
- Bailey, H. C., DiGiorgio, C., Kroll, K., Hinton, D. E., Miller, J. L., & Starrett, G. (1996). Development of procedures for identifying pesticide toxicity in ambient waters: Carbofuran, diazinon, chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(6), 837-845. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150604>
- Barron, M. G., & Woodburn, K. B. (1995). Ecotoxicology of chlorpyrifos. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 144, 1-93. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2550-8_1
- Baskaran, S., Kookana, R. S., & Naidu, R. (2003). Contrasting behaviour of chlorpyrifos and its primary metabolite, TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol), with depth in soil profiles. *Soil Research*, 41(6), 749-760. <https://doi.org/10.1071/SR02062>

- Bhuvaneswari, G. R., Purushothaman, C. S., Pandey, P. K., Gupta, S., & Kumar, H. S. (2018). Toxicological effects of chlorpyrifos on growth, chlorophyll a synthesis, and enzyme activity of a cyanobacterium, *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(6), 2980-2990. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.706.351>
- Bishoff, H. W., & Bold, H. C. (1963). Some soil algae from enchanted rock and related algae species. *University of Texas Publication*, 6318, 43-59.
- Bonifacio, A. F., Ballesteros, M. L., Bonansea, R. I., Filippi, I., Amé, M. V., & Hued, A. C. (2017). Environmentally relevant concentrations of a chlorpyrifos commercial formulation affect two neotropical fish species, *Cheirodon interruptus* and *Cnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere*, 188, 486-493. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.156>
- Brock, T. (2003). Relevance of ecological protection goals in the evaluation of aquatic risks of chlorpyrifos. *Discussion paper on the workshop exposure and effects of chlorpyrifos following use under southern European conditions*. Catania, Italy.
- Cáceres, T., He, W., Naidu, R., & Megharaj, M. (2007). Toxicity of chlorpyrifos and TCP alone and in combination to *Daphnia carinata*: The influence of microbial degradation in natural water. *Water Research*, 41(21), 4497-4503. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.025>
- Chen, S., Chen, M., Wang, Z., Qiu, W., Wang, J., Shen, Y., Wang, Y., & Ge, S. (2016). Toxicological effects of chlorpyrifos on growth, enzyme activity, and chlorophyll a synthesis of freshwater microalgae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 45, 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.05.032>
- Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 261-681. <https://doi.org/10.11124/pr.58.3.10>
- Christensen, K., Harper, B., Luukinen, B., Buhl, K., & Stone, D. (2009). *Chlorpyrifos general fact sheet*. National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. <http://npic.orst.edu/factsheets/chlorpgen.html>

- Daam, M. A., Crum, S. J. H., Van den Brink, P. J., & Nogueira, A. J. A. (2008). Fate and effects of the insecticide chlorpyrifos in outdoor plankton-dominated microcosms in Thailand. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(11), 2530-2538. <https://doi.org/10.1897/07-628.1>
- De Lorenzo, M. E., & Serrano, L. (2003). Individual and mixture toxicity of three pesticides: Atrazine, chlorpyrifos, and chlorothalonil to the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 38(4), 529-538. <https://doi.org/10.1081/PFC-120023511>
- De Silva, P. M. C. S., & Samayawardhena, L. (2005). Effects of chlorpyrifos on reproductive performances of guppy (*Poecilia reticulata*). *Chemosphere*, 58(9), 1293-1299. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.030>
- Eisler, R. (2000). *Handbook of chemical risk assessment: Health hazards to humans, plants, and animals* (Vol. 2: Organics). Lewis Publishers.
- Eng, M. L., Stutchbury, B. J. M., & Morrissey, C. A. (2017). Imidacloprid and chlorpyrifos insecticides impair migratory ability in a seed-eating songbird. *Scientific Reports*, 7, Article number 15176. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15446-x>
- European Food Safety Authority (EFSA). (2013). International framework dealing with human risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. *EFSA Journal*, 11, 3313-3382. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3313>
- Fulton, M. H., & Key, P. B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1), 37-45. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200104>
- Ge, J., Lu, M. X., Wang, D. L., Zhang, Z., Liu, X., & Yu, X. (2015). Dissipation and distribution of chlorpyrifos in selected vegetables through foliage and root uptake. *Chemosphere*, 144, 201-206. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.072>
- Gebremariam, S. Y., Beutel, M. W., Yonge, D. R., Flury, M., & Harsh, J. B. (2012). Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments. In D. M. Whitacre (Ed.), **Reviews of environmental contamination and toxic*

- Gebremariam, S. Y., Beutel, M. W., Yonge, D. R., Flury, M., & Harsh, J. B. (2012). Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments. In D. M. Whitacre (Ed.), *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 123-175). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1463-6_3
- Giddings, J. M., Williams, W. M., Solomon, K. R., & Giesy, J. P. (2014). Risks to aquatic organisms from use of chlorpyrifos in the United States. In J. P. Giesy & K. R. Solomon (Eds.), *Reviews of environmental contamination and toxicology: Ecological risk assessment of chlorpyrifos* (Vol. 231, pp. 119-162). Springer.
- Guilhermino, L., Diamantino, T., Silva, M. C., & Soares, A. M. V. M. (2000). Acute toxicity test with *Daphnia magna*: An alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46(3), 357-362. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1916>
- Gorzinski, S. J., Mayes, M. A., Ormand, J. R., Weinberg, J. T., & Richardson, C. H. (1991). 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol: Acute 96-hr toxicity to the water flea (*Daphnia magna* Straus). DowElanco.
- Gvozdenac, S., Indic, D., & Vukovic, S. (2013). Phytotoxicity of chlorpyrifos to white mustard (*Sinapis alba* L.) and maize (*Zea mays* L.): Potential indicators of insecticide presence in water. *Pesticidi i Fitomedicina*, 28(4), 265-271. <https://doi.org/10.2298/PIF1304265G>
- Han, Y. T., Li, W. M., Dong, F. S., Xu, J., Liu, X. G., Li, Y. B., Kong, Z. Q., Liang, X. Y., & Zheng, Y. Q. (2013). The behavior of chlorpyrifos and its metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in tomatoes during home canning. *Food Control*, 31(2), 560-565. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.050>
- International Organization for Standardization (ISO). (2007). *ISO 11348-3: Water quality—Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test)—Part 3: Method using freeze-dried bacteria*. ISO/TC 147/SC5.
- International Organization for Standardization (ISO). (2012a). *ISO 8692: Water quality—Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae*.

- International Organization for Standardization (ISO). (2012b). *ISO 6341: Water quality—Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)—Acute toxicity test*.
- Jin, Y. X., Liu, Z. Z., Peng, T., & Fu, Z. W. (2015). The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: A survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress, and immunotoxicity. *Fish & Shellfish Immunology*, 43, 405-414. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.010>
- John, E. M., & Shaike, J. M. (2015). Chlorpyrifos: Pollution and remediation. *Environmental Chemistry Letters*, 13(2), 269-291. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0513-7>
- Katagi, T. (2010). Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms. In D. Whitacre (Ed.). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 204, pp. 1-132). Springer.
- Li, X., Liu, L., Zhang, Y., Fang, Q., Li, Y., & Li, Y. (2013). Toxic effects of chlorpyrifos on lysozyme activities, the contents of complement C3 and IgM, and IgM and complement C3 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Chemosphere*, 93, 428-433. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.023>
- Majumder, R., & Kaviraj, A. (2019). Acute and sublethal effects of organophosphate insecticide chlorpyrifos on freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Drug and Chemical Toxicology*, 42(4), 487-495. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1425425>
- Mazanti, L., Rice, C., Bialek, K., Sparling, D., Stevenson, C., Johnson, W. E., Kangas, P., & Rheinstein, J. (2003). Aqueous-phase disappearance of atrazine, metolachlor, and chlorpyrifos in laboratory aquaria and outdoor macrocosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44(1), 67-76. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-1259-3>
- Minagh, E., Hernan, R., O'Rourke, K., Lyng, F. M., & Davoren, M. (2009). Aquatic ecotoxicity of the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride in a battery of freshwater test species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2), 434-440. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.05.002>

- Moore, D. R. J., Teed, R. S., Greer, C. D., Solomon, K. R., & Giesy, J. P. (2014). Refined avian risk assessment for chlorpyrifos in the United States. In J. P. Giesy & K. R. Solomon (Eds.). *Ecological risk assessment for chlorpyrifos in terrestrial and aquatic systems in the United States* (pp. 163–217). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0_6
- Moore, M. T., Huggett, D. B., Gillespie, W. D., Rodgers, J. H., & Cooper, C. M. (1998). Comparative toxicity of chlordane, chlorpyrifos, and aldicarb to four aquatic testing organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34(2), 152–157. <https://doi.org/10.1007/s002449900299>
- Moore, M. T., Schulz, R., Cooper, C. M., Smith Jr, S., & Rodgers Jr, J. H. (2002). Mitigation of chlorpyrifos runoff using constructed wetlands. *Chemosphere*, 46(6), 827–835. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00189-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00189-8)
- Morgan, M., Sheldon, L., Croghan, C., Jones, P. A., Robertson, G. L., Chuang, J. C., Wilson, N. K., & Lyu, C. W. (2005). Exposures of preschool children to chlorpyrifos and its degradation product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in their everyday environments. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 15(5), 297–309. <https://doi.org/10.1038/sj.jea.7500406>
- Nikolenko, A. G., & Amirkhanov, D. V. (1993). Comparative hazardousness of various types of insecticides to soil algae. *Eurasian Soil Science*, 25(1), 103–110.
- National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals. (2000). *Review of Chlorpyrifos – Environmental Assessment (Section 6)*. National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals.
- Özcan Oruç, E. (2010). Oxidative stress, steroid hormone concentrations, and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. *Pest Biochemistry and Physiology*, 96(2), 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.11.005>
- Palma, P., Palma, V. L., Fernandes, R. M., Soares, A. M. V. M., & Barbosa, I. R. (2008). Acute toxicity of atrazine, endosulfan sulfate, and chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus*, and *Daphnia magna*, relative to their concentrations in surface waters from the Alentejo Region of Portugal. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(5), 485–489. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9517-3>

- PubChem Database. (n.d.). *Chlorpyrifos*, CID=2730. National Center for Biotechnology Information. Retrieved May 10, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorpyrifos>
- Racke, K. D. (1993). Environmental fate of chlorpyrifos. In G. W. Ware (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 131, pp. 1–150). Springer.
- Roberts, D. M., & Aaron, C. K. (2007). Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *BMJ*, 334(7594), 629–634. <https://doi.org/10.1136/bmj.39134.566979.BE>
- Schulz, R., & Liess, M. (1999). A field study of the effects of agriculturally derived input on stream macroinvertebrate dynamics. *Aquatic Toxicology*, 46(2), 155–176. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00002-8](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00002-8)
- Sherrard, R. M., Murray-Gulde, C. L., Rodgers, J. H., & Shah, Y. T. (2002). Comparative toxicity of chlorothalonil and chlorpyrifos: *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas*. *Environmental Toxicology*, 17(5), 503–512. <https://doi.org/10.1002/tox.10091>
- Solomon, K. R., Giesy, J. P., Kendall, R. J., Best, L. B., Coats, J. R., Dixon, K. R., Hooper, M. J., Kenaga, E. E., & McMurry, S. T. (2001). Chlorpyrifos: Ecotoxicological risk assessment for birds and mammals in corn agroecosystems. *Human and Ecological Risk Assessment*, 7(2), 497–632. <https://doi.org/10.1080/20018091094510>
- Somasundaram, L., Coats, J. R., Racke, K. D., & Stahr, H. M. (1990). Application of the Microtox system to assess the toxicity and their hydrolysis metabolites. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 44(2), 254–259. <https://doi.org/10.1007/BF01700144>
- Tomlin, C. (2000). *The Pesticide Manual: A World Compendium* (12th ed.). British Crop Protection Council.
- Thomas, C. N., & Mansingh, A. (2002). Bioaccumulation, elimination, and tissue distribution of chlorpyrifos by Red Hybrid Tilapia in fresh and brackish waters. *Environmental Technology*, 23(11), 1313–1323. <https://doi.org/10.1080/09593332308618324>
- United Nations. (2011). *Globally Harmonized System of classification and labelling of chemicals (GHS)* (4th ed.). United Nations.

- United States Environmental Protection Agency. (1999). *Registration eligibility science chapter for chlorpyrifos: Fate and environmental risk assessment chapter*. United States Environmental Protection Agency.
- United States Environmental Protection Agency. (2002). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. United States Environmental Protection Agency.
- United States Environmental Protection Agency. (2008). *Registration review-preliminary problem formulation for ecological risk and environmental fate, endangered species and drinking water assessments for chlorpyrifos*. United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs.
- United States Environmental Protection Agency. (2011). *Revised chlorpyrifos preliminary registration review drinking water assessment*. United States Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention.
- Van Wijngaarden, R. P. A., & Leeuwangh, P. (1989). Relationship between toxicity in laboratory and pond: An ecotoxicological study with chlorpyrifos. In *Proceedings of the International Symposium on Crop Protection* (Vol. 54, pp. 1061–1069). Rijksuniversiteit Gent.
- Van Wijngaarden, R., Leeuwangh, P., Lucassen, W. G. H., Romjin, K., Ronda, R., Van der Velde, R., & Willengenburg, W. (1993). Acute toxicity of chlorpyrifos to fish, a newt, and aquatic invertebrates. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(6), 716–723. <https://doi.org/10.1007/BF00201650>
- Varó, I., Navarro, J. C., Amat, F., & Guilhermino, L. (2002). Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*, 48(5), 563–569. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00075-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00075-9)
- Ventura, C., Ramos Nieto, M. R., Bourguignon, N., Lux-Lantos, V., Rodriguez, H., Cao, G., Randi, A., Cocca, C., & Núñez, M. (2016). Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 156, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.10.010>

- Wang, J., Wang, J., Zhu, L., Xie, H., Shao, B., & Houet, X. (2014). The enzyme toxicity and genotoxicity of chlorpyrifos and its toxic metabolite TCP to zebrafish *Danio rerio*. *Ecotoxicology*, 23(9), 1858–1869. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1321-8>
- Wightwick, A., & Allinson, G. (2007). Pesticide residues in Victorian waterways: A review. *Australian Journal of Ecotoxicology*, 13(2), 91–112.
- Wood, B., & Stark, J. D. (2002). Acute toxicity of drainage ditch water from a Washington State cranberry-growing region to *Daphnia pulex* in laboratory bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53(2), 273–280. <https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2210>
- Xu, G., Zheng, W., Li, Y., Wang, S., Zhang, J., & Yan, Y. (2008). Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.12.001>
- Yadav, I. C., Devi, N. L., Zhong, G., Li, J., Zhang, G., & Covaci, A. (2017). Occurrence and fate of organophosphate ester flame retardants and plasticizers in indoor air and dust of Nepal: Implication for human exposure. *Environmental Pollution*, 229, 668–678. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.089>
- Yang, G., Chen, C., Wang, Y., Peng, Q., Zhao, H., Guo, D., Wang, Q., & Qian, Y. (2017). Mixture toxicity of four commonly used pesticides at different effect levels to the epigeic earthworm, *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.037>
- Zalizniak, L., & Nuggeoda, D. (2006). Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of *Daphnia carinata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.015>
- Zhang, X., Shen, Y., Yu, X., & Liu, X. (2012). Dissipation of chlorpyrifos and residue analysis in rice, soil, and water under paddy field conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 276–280. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.036>

Referencias del Capítulo 4

- Aamri, L., Scordino, F., Barresi, C., Romeo, O., Criseo, G., & Hafidi, M. (2019). Esterase profiling and molecular identification of yeasts isolated from different environmental samples from Morocco. *Journal of Biological Research*, 92(7935), 56–60. <https://doi.org/10.4081/jbr.2019.7935>
- Akbar, S., Sultan, S., & Kertesz, M. A. (2014). Bacterial community analysis in chlorpyrifos enrichment cultures via DGGE and use of bacterial consortium for CP biodegradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(April 2015), 2755–2766. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1699-8>
- Alperstein, L., Gardner, J., Sundstrom, J., Sumby, K., & Jiranek, V. (2020). Yeast bioprospecting versus synthetic biology — which is better for innovative beverage fermentation? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 1939–1953. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10463-9>
- Alvarenga, N., Birolli, W., Nitschke, M., Rezende, M., Seleglim, M., & Porto, A. (2015). Biodegradation of chlorpyrifos by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Trichoderma* sp. *Journal of Microbial Biochemical Technology*, 7(3), 133–139. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000194>
- Alvarenga, N., Birolli, W. G., Helena, M., & Seleglim, R. (2013). Biodegradation of the organophosphate pesticide profenofos by marine fungi. In *Applied Bioremediation—Active and Passive Approaches* (p. 32).
- Asselborn, V., Fernández, C., Zalocar, Y., & Parodi, E. R. (2015). Effects of chlorpyrifos on the growth and ultrastructure of green algae, *Ankistrodesmus gracilis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.015>
- Ballester, L., Prieto, J., Gil, J., Baeza, M., & Randezi, F. (2017). The Antarctic yeast *Candida sake*: Understanding cold metabolism impact on wine. *International Journal of Food Microbiology*, 245, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.009>
- Bass, D., Brown, N., Howe, A., Barton, H., & Brown, N. (2008). Yeast forms dominate fungal diversity in the deep oceans. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274, 3069–3077. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1067>

- Bempelou, E., Vontas, J., Liapis, K., & Ziogas, V. (2013). Herbicidal effects of *Satureja hortensis* L. and *Melissa officinalis* L. essential oils on germination and root length of *Lolium rigidum* L. and *Phalaris brachystachys* L. grass weeds. *Hellenic Plant Protection Journal*, 6(2), 49–54.
- Berg, N., Wever, B., De Fuchs, H. W., Gaca, M., Krul, C., & Roggen, E. L. (2011). Toxicology in vitro: Toxicology in the 21st century – Working our way towards a visionary reality. *Toxicology in Vitro*, 25, 874–881. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.02.008>
- Botstein, D., & Fink, G. R. (2011). Yeast: An experimental organism for 21st century biology. *Genetics*, 189, 695–704. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.130765>
- Braconi, D., Bernardini, G., & Santucci, A. (2015). *Saccharomyces cerevisiae* as a model in ecotoxicological studies: A post-genomics perspective. *Journal of Proteomics*. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.001>
- Butinar, L., Santos, S., Spencer, I., & Oren, A. (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, 244, 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.043>
- Buzzini, P., & Martini, A. (2002). Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 1020–1025.
- Debbab, A., Aly, A., Lin, W., & Proksch, P. (2010). Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. *Microbial Biotechnology*, 3(5), 544–563. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00179.x>
- Demera, L., Barahona, P., & Carvajal, E. (2019). Production, extraction and characterization of lipases from the Antarctic yeast *Guehomyces pullulans*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 15(2), 78–82. <https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2019.75.82>
- Deshmukh, R., Khardenavis, A., & Purohit, H. (2016). Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, 56(3), 247–264. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0584-6>
- Devine, G. J., Eza, D., Ogosuku, E., & Furlong, M. J. (2008). Uso de insecticidas: Contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25(1), 74–100. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2008.251.1241>

- Esteve, K., Poupot, C., Dabert, P., Miettton, M., & Milistic, V. (2009). A *Saccharomyces cerevisiae* -based bioassay for assessing pesticide toxicity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 1529–1534. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0649-1>
- Fell, J. (2001). Collection and identification of marine yeasts. *Methods in Microbiology*, 30, 347–356.
- García, P., García, L., Ruiz, J., & Saldarreaga, A. (2004). Asimilación de carbohidratos por cepas de *Rhodotorula glutinis* de origen clínico y ambiental. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21, 90–92.
- Ghiglione, J., Martin, F., & Pesce, S. (2016). Microbial ecotoxicology: An emerging discipline facing contemporary environmental threats. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 3981–3983. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5763-1>
- Gilham, D., & Lehner, R. (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*, 36(2), 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.11.003>
- González, J. C., & Peña, A. (2002). Halófilos y *Debaryomyces hansenii* (levadura halófila). *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44(3–4).
- Harshwardhan, K., & Nandkar, P. (2016). Evaluation of algal bioassay for pesticide toxicity by agar well diffusion method. *International Journal of Life Sciences, Special Issue*, 86–88. <https://pdfs.semanticscholar.org/7efe/2396dad9671ad8894980e9d3ca4d44c69188.pdf>
- Hassan, N., Rafiq, M., Hayat, M., Ali, A., & Hasan, F. (2016). Psychrophilic and psychrotrophic fungi: A comprehensive review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1–27. <https://doi.org/10.1007/s1157-016-9395-9>
- Hassan, N., Rafiq, M., Hayat, M., & Nadeem, S. (2017). Potential of psychrotrophic fungi isolated from Siachen glacier, Pakistan, to produce antimicrobial metabolites. *Applied Ecology and Environmental Research*, 15(3), 1157–1171. <https://doi.org/10.15666/aeer/1503>
- Hassen, A., Saidi, N., & Boudabous, A. (1998). Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology*, 64, 7–15. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00161-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00161-2)

- Hayyan, M., Ali, M., Al, M. A., Hayyan, A., Alnashef, I. M., & Mirghani, M. (2013). Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere*, 93, 455–459.
- Hong, C., Loke, P., Wei, C., et al., (2015). Novel lipase purification methods – A review of the latest developments. *Biotechnology Journal*, 10, 31–44. <https://doi.org/10.1002/biot.201400301>
- Imfeld, G., & Vuilleumier, S. (2012). Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review. *European Journal of Soil Biology*, 49, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.11.010>
- Iqbal, Z., Aslam, M., Ahmad, S., Iftikhar, Y., Yasin, M., Nawaz, A., et al., (2010). Determination of minimum inhibitory concentrations of fungicides against fungus *Fusarium mangiferae*. *Pakistan Journal of Botany*, 42(5), 3525–3532.
- Jacques, N., Zenouche, A., Gunde, N., & Caseregola, S. (2014). Increased diversity in the genus *Debaryomyces* from Arctic glacier samples. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0345-7>
- Jape, A., Sapre, V., & Harsulkar, A. (2016). Marine yeasts from coastal waters of Kokan (India), as a promising source of polyunsaturated fatty acids. *Asian Journal of Multidisciplinary Studies*, 4(3), 122–126.
- Kossuga, M., Romminger, S., Xavier, C., Milanetto, M., Valle, M., Pimenta, E., et al., (2011). Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(2), 257–267.
- Kumar, C., Menom, T., Sundararajan, T., Nalini, S., Thirunarayan, M., Rajasekaram, S., & Venkatadesikal, M. (2006). Esterase activity of *Candida* species isolated from immunocompromised hosts. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23, 101–103.
- Kutty, S., Philip, R., & Damodaran, R. (2013). Marine yeasts in the slope sediments of Arabian Sea and Bay of Bengal. *European Journal of Experimental Biology*, 3(3), 311–327.
- Kutty, S., & Philip, R. (2008). Marine yeasts – A review. *Yeast*, 25, 465–483. <https://doi.org/10.1002/yea>

- Lara, G., Sidabutar, F., Felina, H., Wira, D., & Lobo, R. (2019). The utilization of fruit and vegetable wastes for bioethanol production with the inoculation of indigenous yeasts consortium. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 25(2), 264–270.
- Luo, H., Luo, K., Alex, D., Hu, X., Li, Á., & Cao, Á. (2019). In vitro susceptibility of berberine combined with antifungal agents against the yeast form of *Talaromyces marneffe*. *Mycopathologia*, 184(2), 295–301. <https://doi.org/10.1007/s11046-019-00325-y>
- Ma, X., Wang, X., Ngo, H., & Guo, W. (2012). Application of *Vibrio qinghaiensis* sp. Q67 for ecotoxic assessment of environmental waters: A mini review. *Journal of Water Sustainability*, 2(4), 209–220.
- Mabrouk, A., Kheiralla, Z., Hamed, E., Youssry, A., & El Aty, A. (2010). Screening of some marine-derived fungal isolates for lignin degrading enzymes (LDEs) production. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(4), 591–599.
- Maldonado, R., Panciera, A., Macedo, G., Mazutti, M., Maugeri, F., & Rodrigues, M. (2012). Improvement of lipase production from *Geotrichum* sp in shaken flasks. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 18(3), 459–464. <https://doi.org/10.2298/CICEQ120124022M>
- Mansour, S., Abdel-Hamid, A., Ibrahim, A., Mahmoud, N., & Moselhy, W. (2015). Toxicity of some pesticides, heavy metals and their mixtures to *Vibrio fischeri* bacteria and *Daphnia magna*: Comparative study. *Journal of Biology and Life Science*, 6(2), 221. <https://doi.org/10.5296/jbbs.v6i2.8174>
- Martínez, R., Cortes, C., Luis, M., & Gonzalez, J. (2019). Hongos y levaduras: Fábricas de lipasas. *Interciencia*, 44(7), 378–385.
- Martínez, R., Vázquez, G., Carlos, M., Penagos, C., Alberto, L., & Carlos, M. (2020). Bioinformatic characterization of the extracellular lipases from *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, 37, 149–162. <https://doi.org/10.1002/yea.3449>
- Matei, F., Brinduse, E., Getuta, N., Tudorache, A., & Razvan, T. (2011). Yeast biodiversity evolution over decades in Dealu Mare-Valea Calugareasca vineyard. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(1), 113–120.
- Mendoza, M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 103–117.

- Messias, J., Zucoloto, B., Marta, V., & Lima, G. (2011). Microbial lipases: Production, properties and biotechnological applications. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, 32(2), 213–234. <https://doi.org/10.5433/1679-0375.2011v32n2p213>
- Moubasher, A., Abdel, M., & Soliman, Z. (2018). Diversity of yeasts and filamentous fungi in mud from hypersaline and freshwater bodies in Egypt. *Czech Mycology*, 70(1), 1–32.
- Moubasher, A., Abdel, M., & Soliman, Z. (2018). Diversity of yeasts and filamentous fungi in mud from hypersaline and freshwater bodies in Egypt. *Czech Mycology*, 70(1), 1–32.
- Ortega, M. (2016). Healthy lifestyles. Applications fields: Red or healthcare biotechnology/Green or vegetal biotechnology. *Annals of Behavioural Science*, 2(1), 1–3.
- Palma, P., Palma, V., Fernandes, R., Soares, A., & Barbosa, I. (2008). Acute toxicity of atrazine, endosulfan sulphate and chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus*, and *Daphnia magna*, relative to their concentrations in surface waters from the Alentejo region of Portugal. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(5), 485–489. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9517-3>
- Pinto, L., Malfeito, M., Quintieri, L., Silva, A., & Baruzzi, F. (2019). Growth and metabolite production of a grape sour rot yeast-bacterium consortium on different carbon sources. *International Journal of Food Microbiology*, 296, 65–74.
- Ramirez, J., & Lacasaña, Y. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales*, 4(2), 67–75.
- Ramirez, L., & Marin, D. (2009). Methodologies for evaluating the in vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica*, 15(42), 263–268.
- Rohban, R., Amoozegar, A., & Ventosa, A. (2009). Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36, 333–340. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0500-0>

- Ruiz, R., & Rubio, L. (2009). Lyophilisation improves the extraction of PCR-quality community DNA from pig faecal samples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(1), 723–727. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3465>
- Sahay, S., & Chouhan, D. (2018). Study on the potential of cold-active lipases from psychrotrophic fungi for detergent formulation. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.04.006>
- Saleh, A., Tucke, G., Yehia, Z., & Du, C. (2014). Marine yeast isolation and industrial application. *FEMS Yeast Research*, 14, 813–825. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12158>
- Sansone, C., Massardo, D., Pontieri, P., Stefano, M., Tredici, S., Talà, A., et al., (2007). Isolation of a psychrotolerant *Debaryomyces hansenii* strain from fermented tea plant (*Camellia sinensis*) leaves. *Journal of Plant Interactions*, 2(3), 169–174. <https://doi.org/10.1080/17429140701585169>
- Santos, H., Cury, J., Carmo, F., Rosado, A., & Peixoto, R. (2010). 18S rDNA sequences from microeukaryotes reveal oil indicators in mangrove sediment. *PLoS ONE*, 5(8), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012437>
- Scheerer, S., Gomez, F., & Lloyd, D. (2006). Bioluminescence of *Vibrio fischeri* in continuous culture: Optimal conditions for stability and intensity of photoemission. *Journal of Microbiological Methods*, 67(2), 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.04.010>
- Shariq, M., & Sohail, M. (2019). *Citrus limetta* peels: A promising substrate for the production of multienzyme preparation from a yeast consortium. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(43), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0278-0>
- Shoaib, N., Siddiqui, P., & Khalid, H. (2012). Toxicity of chlorpyrifos on some marine cyanobacteria species. *Pakistan Journal of Botany*, 44(3), 1131–1133.
- Silva, L., Ramirez, M., & Osorio, E. (2014). Yeast diversity associated to sediments and water from two Colombian artificial lakes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 135–142.

- Soares, C., Maury, M., Pagnocca, F., Araujo, F., Mendonra, L., & Hagler, A. (1997). Ascomycetous yeasts southeast from tropical intertidal dark mud of southeast Brazilian estuaries. *Journal of General and Applied Microbiology*, 43, 265–272.
- Sogorb, M., & Vilanova, E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate, and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, 128(1–3), 215–228. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00543-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00543-4)
- Somasundaram, L., Coats, J., Racke, K., & Stahr, H. (1990). Application of the Microtox system to assess the toxicity of pesticides and their hydrolysis metabolites. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 44(2), 254–259. <https://doi.org/10.1007/BF01700144>
- Suastes, J., Hernández, R., Mena, V., & Valdez, R. (2019). Efficient production of fatty acid methyl esters by a wastewater-isolated microalgae-yeast co-culture. *Environmental Science and Pollution Research*, 1–10.
- Tedersoo, L., Anslan, S., Bahram, M., Põlme, S., Riit, T., Liiv, I., Kõljalg, U., et al., (2015). Shotgun metagenomes and multiple primer pair-based metabarcoding analyses of fungi. *MycKeys*, 43, 1–43. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.10.4852>
- Trioui, L., Bouchra, D., Faouzi, E., & Mohammed, B. (2019). Study of chromium uptake by three yeasts: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, and *Yarrowia lipolytica*. *Advances in Environmental Biology*, 13(3), 14–20. <https://doi.org/10.22587/aeb.2019.13.3.2>
- Välimaa, A., Kivistö, A., Virta, M., & Karp, M. (2008). Real-time monitoring of non-specific toxicity using a *Saccharomyces cerevisiae* reporter system. *Sensors*, 8, 6433–6447. <https://doi.org/10.3390/s8106433>
- Vidotti, E., & Rollemberg, M. (2004). Algas: Da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Química Nova*, 27(1), 139–145. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422004000100024>
- Vighi, M., & Villa, S. (2013). Ecotoxicology: The challenges for the 21st century. *Toxics*, 1, 18–35. <https://doi.org/10.3390/toxics1010018>

- Wang, F., Yao, J., Chen, H., Chen, K., Treb, P., & Zaray, G. (2010). Comparative toxicity of chlorpyrifos and its oxon derivatives to soil microbial activity by combined methods. *Chemosphere*, 78, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.030>
- Wang, S., Zhang, C., Lv, Z., Huang, H., Cao, X., Song, Z., & Shao, M. (2019). Degradation of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a microbial consortium in dryland soil with anaerobic incubation. *Biodegradation*, 30(2), 161–171. <https://doi.org/10.1007/s10532-019-09873-y>
- Wever, B., Fuchs, H., Gaca, M., Krul, C., Mikulowski, S., Poth, A., Roggen, E., & Vilà, M. (2012). Implementation challenges for designing integrated in vitro testing strategies (ITS) aiming at reducing and replacing animal experimentation. *Toxicology in Vitro*, 26, 526–534. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.01.009>
- Yadav, R., Saxena, R., Gupta, R., & Davidson, S. (1998). Lipase production by *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Folia Microbiologica*, 43(4), 373–378.
- Zuccaro, G., Steyer, J., & Lis, R. (2018). The algal trophic mode affects the interaction and oil production of a synergistic microalga-yeast consortium. *Bioresource Technology*, 273, 608–617. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.063>

Referencias Capítulo 5

- Acevedo, R., Sabater, C., & Olivero, J. (2018). Ecotoxicological assessment of perchlorate using in vitro and in vivo assays. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(13), 13697–13708. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1565-6>
- Alavanja, M. C., Dosemeci, M., Samanic, C., Lubin, J., Lynch, C. F., Knott, C., Barker, J., Hoppin, J. A., Sandler, D. P., Coble, J., Thomas, K., & Blair, A. (2004). Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort. *American Journal of Epidemiology*, 160(9), 876–885. <https://doi.org/10.1093/aje/kwh290>
- Álvarez, C. (2017). Evaluación de los riesgos ambientales de contaminantes de preocupación emergente en la Unión Europea (TFG). Universitat Politècnica de València. Valencia, España. <https://riunet.upv.es>

- Andersen, H. R., Andersen, A. M., Arnold, S. F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N. A., Bjerregaard, P., Christiansen, L. B., Gissel, B., Hummel, R., Bonefeld, E., Korsgaard, B., Le Guevel, R., Leffers, H., McLachlan, J., Møller, A., Nielsen, J. B., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K. L., Perez, P., Skakkebæk, N. E., Sonnenschein, C., Soto, A. M., Sumpter, J. P., Thorpe, S. M., & Grandjean, P. (1999). Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 107(2), 89–108. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s189>
- Aslantürk, O. S. (2017). In vitro cytotoxicity and cell viability assays: Principles, advantages, and disadvantages. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>
- Backstrom, T. D., & Garson, K. N. (2020). European Union to ban chlorpyrifos after January 31, 2020. *The National Law Review*, 10(4). <https://www.natlawreview.com/article/european-union-to-ban-chlorpyrifos-after-january-31-2020>
- Balsiger, H. A., De la Torre, R., Lee, W. Y., & Cox, M. B. (2010). A four-hour yeast bioassay for the direct measure of estrogenic activity in wastewater without sample extraction, concentration, or sterilization. *Science of the Total Environment*, 408(6), 1422–1429. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.12.027>
- Baronian, K. H. R. (2004). The use of yeast and moulds as sensing elements in biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(8), 953–962. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2003.09.010>
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godfrey, C. R. A., Godwin, J. R., Hall, A. A., Heaney, S. P., Maund, S. J. (2001). Understanding the strobilurin fungicides. *Pesticide Outlook*, 12(4), 143–148. <https://doi.org/10.1039/B106300F>
- Barron, M. G., & Woodburn, K. B. (1995). Ecotoxicology of chlorpyrifos. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 144, 1–93. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2550-8_1
- Baskaran, S., Kookana, R. S., & Naidu, R. (2003). Contrasting behaviour of chlorpyrifos and its primary metabolite, TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol), with depth in soil profiles. *Australian Journal of Soil Research*, 41(5), 749–760. <https://doi.org/10.1071/SR02062>

- Bernabò, I., Gallo, L., Sperone, E., Triperi, S., & Brunelli, E. (2011). Survival, development, and gonadal differentiation in *Rana dalmatina* chronically exposed to chlorpyrifos. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 315(5), 324–327. <https://doi.org/10.1002/jez.678>
- Bishop, P. I., & Willett, C. E. (2014). The use of Other Scientifically Relevant Information (OSRI) in the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Endocrine Disruptor Screening Program. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 101(1), 3–22. <https://doi.org/10.1002/bdrb.21077>
- Bonifacio, A. F., Ballesteros, M. L., Bonansea, R. I., Filippi, I., Amé, M. V., & Hued, A. C. (2017). Environmental relevant concentrations of a chlorpyrifos commercial formulation affect two neotropical fish species, *Cheirodon interruptus* and *Cnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere*, 188, 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.156>
- Braconi, D., Bernardini, G., Millucci, L., Jacomelli, G., Micheli, V., Santucci, A., Kortekamp, A. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a tool to evaluate the effects of herbicides on Eukaryotic life. En A. Kortekamp (Ed.), *Herbicides and Environment* (capítulo 24). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/13237>
- Braconi, D., Bernardini, G., & Santucci, A. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* as a model in ecotoxicological studies: A post-genomics perspective. *Journal of Proteomics*, 137, 19–34. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.001>
- Brix, R., Noguerol, T. N., Piña, B., Balaam, J., Nilsen, A. J., Tollefsen, K. E., Levy, W., Schramm, K. E., & Barceló, D. (2010). Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. *Environmental International*, 36(4), 361–367. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.02.004>
- Cabral, M. G., Viegas, C. A., Teixeira, M. C., & Sá, I. (2003). Toxicity of chlorinated phenoxyacetic acid herbicides in the experimental eukaryotic model *Saccharomyces cerevisiae*: Role of pH and of growth phase and size of the yeast cell population. *Chemosphere*, 51(1), 47–54. [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(02\)00614-8](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(02)00614-8)

- Cai, Z., Zheng, F., Ding, Y., Zhan, Y., Gong, R., Li, J., Aschner, M., Zhang, Q., Wu, S., & Li, H. (2019). Nrf2-regulated miR-380-3p blocks the translation of Sp3 protein and its mediation of paraquat-induced toxicity in mouse neuroblastoma N2a cells. *Toxicological Sciences*, 171(2), 515–529. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz162>
- Czekanska, E. M. (2011). Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 740, pp. 27–32). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_5
- Dam, K., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2000). Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. *Developmental Brain Research*, 121(2), 179–187. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(00\)00044-4](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(00)00044-4)
- Das, K. P., & Barone, S. (1999). Neuronal differentiation in PC12 cells is inhibited by chlorpyrifos and its metabolites: Is acetylcholinesterase inhibition the site of action? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 160(3), 217–230. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8767>
- De Angelis, S., Tassinari, R., Maranghi, F., Eusepi, A., Di Virgilio, A., Chiarotti, F., Ricceri, L., Venerosi, A., Gilardi, E., Moracci, G., Calamandrei, G., Olivieri, A., Mantovani, A. (2007). Developmental exposure to chlorpyrifos induces alterations in thyroid and thyroid hormone levels without other toxicity signs in Cd1 mice. *Toxicological Sciences*, 108(2), 311–319. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp017>
- European Commission. (2002). Final Report: Endocrine disrupters: Study on gathering information on 435 substances with insufficient data. *European Commission, Directorate-General for Environment*. <https://ec.europa.eu>
- Echeverri, G., Jaramillo, B., Sabater, C., & Castillo, M. Á. (2020). Acute toxicity of chlorpyrifos and its metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol alone and in combination using a battery of bioassays. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 32770–32778. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09392-x>
- EFSA. (2019). Statement on the available outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance chlorpyrifos. *EFSA Journal*, 17(8), 5809. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5809>

- EPA. (2007). Draft list of initial pesticide active ingredients and pesticide inert ingredients to be considered for screening under the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act. *Federal Register: US*, 72(116), 31542–31547. http://www.epa.gov/endo/pubs/draft_list_frn_061807.pdf
- EPA. (2008). Evidence on the developmental and reproductive toxicity of chlorpyrifos. Draft. *California Environmental Protection Agency*. http://oehha.ca.gov/prop65/hazard_ident/pdf_zip/ChlorpyrifosHID0908.pdf
- EPA. (2015). EDSP Weight of Evidence Conclusions on the Tier 1 Screening Assays for the List 1 Chemicals. Chemical: Chlorpyrifos. *U.S. Environmental Protection Agency*. <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/status-endocrine-disruptor-screening-program-tier-1-screening-results-and-data>
- Esteban, S., Gorga, M., Petrovic, M., González-Alonso, S., Barceló, D., & Valcárcel, Y. (2014). Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. *Science of the Total Environment*, 466-467, 939–951. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.066>
- Esteve, K., Poupot, C., Dabert, P., Mietton, M., & Milistic, V. (2009). A *Saccharomyces cerevisiae* -based bioassay for assessing pesticide toxicity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(11), 1529–1534. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0649-1>
- European Commission. (2020). Commission implementing Regulation (EU) 2020/18. *Official Journal of the European Union*, 13.1.2020, L7/14-L7/16.
- Ezzi, L., Belhadj, I., Haouas, Z., Sakly, A., Grissa, I., Chakroun, S., Kerkeni, E., Hassine, M., Mehdi, M., & Ben Cheikh, H. (2016). Histopathological and genotoxic effects of chlorpyrifos in rats. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(5), 4859–4867. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5722-x>
- Fai, B., & Grant, A. (2009a). A comparative study of *Saccharomyces cerevisiae* sensitivity against eight yeast species sensitivities to a range of toxicants. *Chemosphere*, 75(2), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.059>

- Fai, B., & Grant, A. (2009b). A rapid resazurin bioassay for assessing the toxicity of fungicides. *Chemosphere*, 74(8), 1165–1170. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.078>
- Fang, H., Tong, W., Perkins, R., Soto, A. M., Prechtel, N. V., & Sheehan, D. M. (2000). Quantitative comparisons of in vitro assays for estrogenic activities. *Environmental Health Perspectives*, 108(8), 723–729. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108723>
- Farag, A. T., El Okazy, A. M., & El-Aswed, A. F. (2003). Developmental toxicity study of chlorpyrifos in rats. *Reproductive Toxicology*, 17(2), 203–208. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(02\)00121-1](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(02)00121-1)
- Farag, A. T., Radwan, A. H., Sorour, F., El Okazy, A., El-Agamy, E. S., & El-Sebae, A. E. K. (2010). Chlorpyrifos-induced reproductive toxicity in male mice. *Reproductive Toxicology*, 29(1), 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.10.003>
- Ferrando, M. D., Andreu, E., & Fernández, A. (1992). Relative sensitivity of *Daphnia magna* and *Brachionus calyciflorus* to 5 pesticides. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 27(5), 511–522. <https://doi.org/10.1080/03601239209372798>
- Freeman, S., & Nizani, Y. (1997). Control of *Colletotrichum acutatum* in strawberry under laboratory, greenhouse, and field conditions. *Plant Disease*, 81(7), 749–752. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.7.749>
- Gilbert, D. F., & Friedrich, O. (2017). *Cell Viability Assays: Methods and Protocols* (1st ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9>
- García, A., Rodríguez, C., Restrepo, E., & Sánchez, A. (2017). Residuos de plaguicidas en tomate (*Solanum lycopersicum*) comercializado en Armenia, Colombia. *Vitae*, 24(2), 68–79. [https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v24n2\(2\)a08](https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v24n2(2)a08)
- García-Reyero, N., Grau, E., Castillo, M., López de Alda, M. J., Barceló, D., & Piña, B. (2001). Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(5), 1152–1158. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(2001\)020<1152>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(2001)020<1152>2.0.CO;2)

- García-Reyero, N., Piña, B., Grimalt, J., Fernández, P., Fonts, R., Polvillo, O., & Martrat, B. (2005). Estrogenic activity in sediments from European mountain lakes. *Environmental Science & Technology*, 39(5), 1427–1435. <https://doi.org/10.1021/es0400685>
- Gebremariam, S. Y., Beutel, M. W., Yonge, D. R., Flury, M., & Harsh, J. B. (2012). Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments. In D. M. Whitacre (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 231, pp. 123–175). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1463-6_3
- Ghisari, M., & Bonefeld, E. C. (2005). Impact of environmental chemicals on thyroid hormone function in pituitary rat GH3 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 244(1-2), 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.01.013>
- Giddings, J. M., Williams, W. M., Solomon, K. R., & Giesy, J. P. (2014). Risks to aquatic organisms from use of chlorpyrifos in the United States. In J. P. Giesy & K. R. Solomon (Eds.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Ecological Risk Assessment of Chlorpyrifos* (Vol. 231, pp. 119–162). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1685-2_7
- Giesy, J. P., Solomon, K. R., Coates, J. R., Dixon, K. R., Giddings, J. M., & Kenaga, E. E. (1999). Chlorpyrifos: Ecological risk assessment in North American aquatic environments. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 160, 1–129. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1498-4_1
- Gotoh, M., Saito, I., Huang, J., Fukaya, Y., Matsumoto, T., Hosanaga, N., Shibata, E., Ichihara, G., Kamujima, M., & Takeuchi, Y. (2001). Changes in cholinesterase activity, nerve conduction velocity, and clinical signs and symptoms in termite control operators exposed to chlorpyrifos. *Journal of Occupational Health*, 43(3), 157–164. <https://doi.org/10.1539/joh.43.157>
- Grela, E., Koz, J., & Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria: A review. *Acta Histochemica*, 120(4), 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>
- Guerrero, A. J. (2003). Estudio de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas en áreas específicas de Colombia. *Agronomía Colombiana*, 21(2), 198–209. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180317974009>

- Gupta, S. C., Mishra, M., Sharma, A., Deepak, T. G. R., Kumar, B. R., Mishra, R. K., & Chowdhuri, D. K. (2010). Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in *Drosophila* through generation of reactive oxygen species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7), 1415–1423. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.05.013>
- Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., et al., (2004). Comparison of Alamar Blue and MTT assays for high-throughput screening. *Toxicology in Vitro*, 18(6), 703–710. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2004.03.012>
- Haviland, J. A., Butz, D. E., & Porter, W. P. (2010). Long-term sex selective hormonal and behavior alterations in mice exposed to low doses of chlorpyrifos in utero. *Reproductive Toxicology*, 29(1), 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.10.008>
- Heinonen, T., & Tähti, H. (2013). Eläinkokeeton toksikologia kemikaalien turvallisuuustestauksessa [Non-animal toxicology in the safety testing of chemicals]. *Duodecim*, 129, 1686–1694.
- Howard, M. D., & Pope, C. N. (2002). In vitro effects of chlorpyrifos, parathion, methyl parathion and their oxons on cardiac muscarinic receptor binding in neonatal and adult rats. *Toxicology*, 170(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(01\)00498-x](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(01)00498-x)
- Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Okhura, Y., & Ueno, K. A. (1996). Combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19(10), 1518–1520. <https://doi.org/10.1248/bpb.19.1518>
- John, E. M., & Shaik, J. M. (2015). Chlorpyrifos: Pollution and remediation. *Environmental Chemistry Letters*, 13(2), 269–291. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0513-7>
- Joshi, S. C., Mathur, R., & Gulati, N. (2007). Testicular toxicity of chlorpyrifos (an organophosphate pesticide) in albino rat. *Toxicology and Industrial Health*, 23(6), 439–444. <https://doi.org/10.1177/0748233707080908>
- Kinnberg, K. (2003). Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity in the environment. *Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of the Environment*.

- Kitagawa, E., Momose, Y., & Iwahashi, H. (2003). Correlation of the structures of agricultural fungicides to gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* upon exposure to toxic doses. *Environmental Science & Technology*, 37(13), 2788–2793. <https://doi.org/10.1021/es026156b>
- Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niyama, K., & Kobayashi, K. (2004). Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental Health Perspectives*, 112(5), 524–531. <https://doi.org/10.1289/ehp.6649>
- Koppikar, S. J., Choudhari, A. S., Suryavanshi, S. A., Kumari, S., Chattopadhyay, S., & Kaul, R. (2010). Aqueous cinnamon extract (ACE-c) from the bark of *Cinnamomum cassia* causes apoptosis in human cervical cancer cell line (SiHa) through loss of mitochondrial membrane potential. *BMC Cancer*, 10, 210. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-210>
- Lee, W. J., Sandler, D. P., Blair, A., Samanic, C., Cross, A. J., & Alavanja, M. C. R. (2007). Pesticide use and colorectal cancer risk in the agricultural health study. *International Journal of Cancer*, 121(2), 339–346. <https://doi.org/10.1002/ijc.22635>
- LePage, K. T., Dickey, R. W., Gerwick, W. H., Jester, E. L., & Murray, T. F. (2005). On the use of neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies. *Critical Reviews in Neurobiology*, 17(1), 27–50. <https://doi.org/10.1615/CritRevNeurobiol.v17.i1.20>
- López, B., Veyrat, A., Perez, E., Gonzalez, L., & Marcos, J. F. (2003). Comparison of the activity of antifungal hexapeptides and the fungicides thiabendazole and imazalil against postharvest fungal pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2), 163–170. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00118-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00118-1)
- Lovecka, P., Thimova, M., Grznarova, P., Lipov, J., Knejzlik, Z., Stiborova, H., Nindhia, T. G. T., Demnerova, K., & Ruml, T. (2015). Study of cytotoxic effects of benzonitrile pesticides. *BioMed Research International*, 2015, Article ID 381264. <https://doi.org/10.1155/2015/381264>
- Mangas, I., Vilanova, E., Estévez, J., & França, T. C. C. (2016). Neurotoxic effects associated with current uses of organophosphorus compounds. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(5), 809–825. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160084>

- Mazanti, L., Rice, C., Bialek, K., Sparling, D., Stevenson, C., Johnson, W. E., Kangas, P., Rheinstein, J. (2003). Aqueous-phase disappearance of atrazine, metolachlor, and chlorpyrifos in laboratory aquaria and outdoor macrocosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44(1), 67–76. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-1259-3>
- Meneau, R. (2014). Métodos alternativos en toxicología. *Revista CENIC: Ciencias Biológicas*, 45, 11–21.
- Muller, M., Hess, L., Tardivo, A., Lajmanovich, R., Attademo, A., Poletta, G., Simoniello, M. F., Yodice, A., Lavarello, S., Chialvo, D., & Scremin, O. (2014). Neurologic dysfunction and genotoxicity induced by low levels of chlorpyrifos. *Neurotoxicology*, 45, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.08.012>
- Mushtaq, S., Kursad, Y., & Aksoy, A. (2018). Alternative methods to animal experiments. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 38(2), 161–170. <https://doi.org/10.5336/medsci.2018-59993>
- Nandi, S., Gupta, P. S. P., Roy, S. C., Selvaraju, S., & Ravindra, J. P. (2009). Chlorpyrifos and endosulfan affect buffalo oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro directly and through cumulus cells. *Environmental Toxicology*, 26(1), 57–67. <https://doi.org/10.1002/tox.20529>
- Navarro, H. A., Basta, P. V., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2001). Neonatal chlorpyrifos administration elicits deficits in immune function in adulthood: A neural effect. *Brain Research Developmental Brain Research*, 130(2), 249–252. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(01\)00254-1](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(01)00254-1)
- Nishi, K., & Hundal, S. S. (2013). Chlorpyrifos induced toxicity in reproductive organs of female Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 732–738. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.006>
- Nogueroles, T., Boronat, S., & Jarque, S. (2006). Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta*, 69(2), 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.09.044>
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, E. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(16), 5421–5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>

- Ojha, A., & Gupta, Y. K. (2015). Evaluation of genotoxic potential of commonly used organophosphate pesticides in peripheral blood lymphocytes of rats. *Human & Experimental Toxicology*, 34(3), 390-400. <https://doi.org/10.1177/0960327114537534>
- Papaefthimiou, C., Cabral, M., Mixailidou, C., Viegas, C. A., Sá-Correia, I., & Theophilidis, G. (2004). Comparison of two screening bioassays, based on the frog sciatic nerve and yeast cells, for the assessment of herbicide toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(5), 1211-1218. <https://doi.org/10.1897/03-48>
- Pawlowicz, R., Darius, H. T., Cruchet, P., Rossi, F., Caillaud, A., Laurent, D., & Chinain, M. (2013). Evaluation of seafood toxicity in the Australes archipelago (French Polynesia) using the neuroblastoma cell-based assay. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(4), 567-586. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.755644>
- Perreault, F., Matias, M. S., Melegari, S. P., Silva de Carvalho, C. R., Creppy, E. E., Popovic, R., & Matias, W. G. (2011). Investigation of animal and algal bioassays for reliable saxitoxin ecotoxicity and cytotoxicity risk evaluation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 1021-1026. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.01.016>
- Piña, B., Boronat, S., Casado, M., & Olivares, A. (2009). Recombinant yeast assays and gene expression assays for the analysis of endocrine disruption. In D. Barceló & P. D. Hansen (Eds.), *Biosensors for Environmental Monitoring of Aquatic Systems* (pp. 69-113). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-36253-1_4
- Pisapia, F., Holland, W. C., Hardison, D. R., Litaker, R. W., Fraga, S., Nishimura, T., Adachi, M., Nguyen-Ngoce, L., Sécheta, V., Amzila, Z., Herrenknecht, C., & Hess, P. (2017). Toxicity screening of 13 *Gambierdiscus* strains using neuro-2a and erythrocyte lysis bioassays. *Harmful Algae*, 63, 173-183. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.02.005>
- Provost, P. (2010). Interpretation and applicability of microRNA data to the context of Alzheimer's and age-related diseases. *Aging*, 2(3), 166-169. <https://doi.org/10.18632/aging.100131>

- Puy-Azurmendi, E., Olivares, A., Vallejo, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Piña, B., Zuloaga, O., & Cajaraville, M. P. (2014). Estrogenic effects of nonylphenol and octylphenol isomers in vitro by recombinant yeast assay (RYA) and in vivo with early life stages of zebrafish. *Science of the Total Environment*, 466-467, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.060>
- Qiao, D., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2001). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos modeled in vitro: comparative effects of metabolites and other cholinesterase inhibitors on DNA synthesis in PC12 and C6 cells. *Environmental Health Perspectives*, 109(9), 909-913. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109909>
- Qiu, X. Y., Li, K., Li, X. Q., & Li, X. T. (2016). The inhibitory effects of nifedipine on outward voltage-gated potassium currents in mouse neuroblastoma N2A cells. *Pharmacological Reports*, 68(4), 631-637. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.12.006>
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, 12(9), 12347-12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>
- Rey, J., Otalvaro, A., Chaparro, M., Prieto, L., & López, A. (2018). Residuos de plaguicidas organofosforados en la cadena productiva del brócoli (*Brassica oleracea* L. var. italica) y coliflor (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) en Colombia: Aproximación a un perfil de riesgo. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 12(1), 156-165. <https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i1.7352>
- Ribeiro, I. C., Verissimo, I., Moniz, L., Cardoso, H., Sousa, M. J., Soares, A. M. V. M., & Leao, C. (2000). Yeasts as a model for assessing the toxicity of the fungicides Penconazol, Cymoxanil, and Dichlofluanid. *Chemosphere*, 41(11), 1637-1642. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00039-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00039-4)
- Routledge, E. J., & Sumpter, J. P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(3), 241-248. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150303>

- Sandal, S., & Yilmaz, B. (2011). Genotoxic effects of chlorpyrifos, cypermethrin, endosulfan, and 2,4-D on human peripheral lymphocytes cultured from smokers and nonsmokers. *Environmental Toxicology*, 26(5), 433-442. <https://doi.org/10.1002/tox.20569>
- Sindi, R. A., Harris, W., Arnott, G., Flaskos, J., Lloyd, C., & Hargreaves, A. J. (2016). Chlorpyrifos- and chlorpyrifos oxon-induced neurite retraction in pre-differentiated N2a cells is associated with transient hyperphosphorylation of neurofilament heavy chain and ERK 1/2. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 308, 20-31. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.08.008>
- Slotkin, T. A. (2004). Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198(2), 132-151. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.06.001>
- Slotkin, T. A. (2005). Developmental neurotoxicity of organophosphates: A case study of chlorpyrifos. In R. C. Gupta (Ed.), *Toxicity of Organophosphate and Carbamate Pesticides* (pp. 293-314). Elsevier Academic Press.
- Slotkin, T. A., Seidler, F. J., Ryde, I. T., & Yanai, J. (2008). Developmental neurotoxic effects of chlorpyrifos on acetylcholine and serotonin pathways in an avian model. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4), 433-439. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2008.02.005>
- Solomon, K. R., Williams, W. M., Mackay, D., Purdy, J., Giddings, J. M., & Giesy, J. P. (2014). Properties and uses of chlorpyrifos in the United States. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 231, 13-34. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0_2
- Tian, Y., Ishikawa, H., Yamaguchi, T., & Yokoyama, K. (2005). Teratogenicity and developmental toxicity of chlorpyrifos maternal exposure during organogenesis in mice. *Reproductive Toxicology*, 20(2), 267-271. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.01.012>
- Tobón-Marulanda, F. A., López-Giraldo, L. A., & Paniagua-Suárez, R. E. (2012). Contaminación del agua por plaguicidas en un área de Antioquia. *Revista de Salud Pública*, 12, 300-307. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642010000200013>

- Uchendu, C., Ambali, S. F., Ayo, J. O., Lasisi, I. O., & Umosen, A. J. (2013). Subacute chlorpyrifos-induced alterations in serum lipids and some oxidative stress biomarkers in male Wistar rats: Beneficial effect of acetyl-L-carnitine. *Toxicology and Environmental Chemistry*, 95(3), 483–494. <https://doi.org/10.1080/02772248.2013.782029>
- Usmani, K. A., Rose, R. L., & Hodgson, E. (2003). Inhibition and activation of the human liver and human cytochrome P450 3A4 metabolism of testosterone by deployment-related chemicals. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(4), 384–391. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.4.384>
- Vadkertiová, R., & Slavikova, E. (2011). Influence of pesticides on yeasts colonizing leaves. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 66(11-12), 588–594. <https://doi.org/10.5560/ZNC.2011.66c0588>
- Van Emon, J. M., Pan, P., & van Breukelen, F. (2018). Effects of chlorpyrifos and trichloropyridinol on HEK 293 human embryonic kidney cells. *Chemosphere*, 191, 537–547. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.039>
- Ventura, C., Núñez, M., Miret, N., Martinel, D., Randi, A., Venturino, A., Rivera, E., & Cocca, C. (2012). Differential mechanisms of action are involved in chlorpyrifos effects in estrogen-dependent or -independent breast cancer cells exposed to low or high concentrations of the pesticide. *Toxicology Letters*, 213(2), 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.06.017>
- Ventura, C., Ramos, M. R., Bourguignon, N., Lux-Lantos, V., Rodriguez, H., Cao, G., Randi, A., Cocca, C., & Núñez, M. (2016). Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 156, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.10.010>
- Ventura, C., Zappia, C. D., Lasagna, M., Pavicic, W., Richard, S., Bolzan, A. D., Monczor, F., Núñez, M., & Cocca, C. (2019). Effects of the pesticide chlorpyrifos on breast cancer disease. Implication of epigenetic mechanisms. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 186, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.09.021>
- Veronesi, B. (1992). In vitro screening batteries for neurotoxicants. *Neurotoxicology*, 13(2), 185–196.

- Viswanath, G., Chatterjee, S., Dabral, S., Nanguneri, S. R., Divya, G., & Roy, P. (2010). Anti-androgenic endocrine disrupting activities of chlorpyrifos and piperophos. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 120(1-2), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.02.032>
- Waly, M. I., Ali, B. H., & Nemmar, A. (2013). Acute effects of diesel exhaust particles and cisplatin on oxidative stress in cultured human kidney (HEK 293) cells, and the influence of curcumin thereon. *Toxicology in Vitro*, 27(6), 2299–2304. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.09.023>
- Wang, X., Jiang, L., Ge, L., Chen, M., Yang, G., Ji, F., Zhong, L., Guan, Y., & Liu, X. (2015). Oxidative DNA damage induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate in HEK-293 cell line. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39, 1099–1106. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.03.016>
- Wang, Y., Kim, B., Walker, A., Williams, S., Meeks, A., Lee, Y. J., & Seo, S. S. (2019). Cytotoxic effects of parathion, paraoxon, and their methylated derivatives on a mouse neuroblastoma cell line NB41A3. *Fundamental Toxicological Sciences*, 6, 45–56. <https://doi.org/10.2131/fts.6.45>
- Xu, G., Zheng, W., Li, Y., Wang, S., Zhang, J., & Yan, Y. (2008). Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.12.001>
- Yu, K., Li, G., Feng, W., Liu, L., Zhang, J., Wu, W., Xu, L., & Yan, Y. (2015). Chlorpyrifos is estrogenic and alters embryonic hatching, cell proliferation, and apoptosis in zebrafish. *Chemico-Biological Interactions*, 239, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.06.010>
- Yun, X., Huang, Q., Rao, W., Xiao, C., Zhang, T., Mao, Z., & Wan, Z. (2017). A comparative assessment of cytotoxicity of commonly used agricultural insecticides to human and insect cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.12.002>

- Zacharewski, T. (1998). Identification and assessment of endocrine disruptors: Limitations of in vivo and in vitro assays. *Environmental Health Perspectives*, 106(10), 577–582. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106577>
- Zerva, L., Hollis, R. J., & Pfaller, M. A. (1996). In vitro susceptibility testing and DNA typing of *Saccharomyces cerevisiae* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(12), 3031–3034. <https://doi.org/10.1128/JCM.34.12.3031-3034.1996>