



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



**EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN TOXICOLÓGICA DE LA
CIPERMETRINA EN AGUA TRATADA POR EL REACTOR CAVOXD
UTILIZANDO A *Daphnia pulicaria* COMO MONITOR BIOLÓGICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ITZEL MARGARITA VIVEROS SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ FERNANDO MÉNDEZ SÁNCHEZ

CO-DIRECTORA:

DRA. MÓNICA VANESSA GARDUÑO PAZ

Febrero, 2020

CONTENIDO

I. RESUMEN	5
II. INTRODUCCIÓN	6
III. ANTECEDENTES	7
3.1. Plaguicidas con énfasis en piretroides	7
3.2. Plaguicidas en cuerpos de agua.....	8
3.2.1. Cipermetrina y otros plaguicidas en el ecosistema	9
3.2.2. Efectos de la cipermetrina en sistemas biológicos.....	10
3.3. Sistemas de tratamiento de agua.....	11
3.3.1. Tratamientos convencionales de aguas residuales	13
3.3.1.1. Cavitación hidrodinámica	14
3.4. Indicadores biológicos	16
3.4.1. <i>Daphnia pulicaria</i> como indicador biológico	17
IV. JUSTIFICACIÓN	19
V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	21
VI. HIPÓTESIS	21
VII. OBJETIVO	21
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	21
8.1. Establecimiento del cultivo de <i>D. pulicaria</i>	21
8.2. Condiciones y preparación del medio de cultivo de <i>D. pulicaria</i>	21
8.3. Dieta de hembras grávidas de <i>D. pulicaria</i>	22
8.4. Condiciones de cultivo de hembras grávidas y neonatas de <i>D. pulicaria</i>	23
8.5. Determinación de la Dosis letal media (DL ₅₀) de cipermetrina para neonatas de <i>D. pulicaria</i>	24
8.6. Prueba de toxicidad aguda con <i>D. pulicaria</i>	24
8.7. Caracterización fisicoquímica del agua	25
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
9.1. Dosis letal 50 (DL ₅₀).....	26
9.2. Efecto de CAVOXD en la toxicidad de cipermetrina y en la sobrevivencia de <i>Daphnia pulicaria</i>	27
9.3. Efecto de CAVOXD en la reproducción de <i>Daphnia pulicaria</i>	31
9.4. Efecto de CAVOXD en la longevidad de <i>Daphnia pulicaria</i>	33
9.5. Efecto del tratamiento por el reactor CAVOXD en la calidad de agua	34
X. CONCLUSIONES	45
XI. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	47
XII. ANEXOS	57

Índice de Figuras

- Figura 1. Reactor CAVOXD que induce cavitación hidrodinámica, desarrollado por la empresa AC AND DC ENERGY para el tratamiento de aguas residuales..**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 2. Morfología de un espécimen de *Daphnia pulicaria*.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 3. Preparación del medio de agua dura reconstituida a partir de soluciones stock.....**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4. Cultivo de *Desmodesmus* sp. en condiciones de laboratorio.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 5. Mantenimiento en cámara bioclimática de los cultivos de madres grávidas y neonatas.....**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 6. Comportamiento del pH de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 7. Comportamiento del Zinc (Zn) de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 8. Comportamiento del Hierro (Fe) de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 9. Comportamiento de Nitratos de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 10. Comportamiento de la Dureza de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 11. Comportamiento de la Turbidez de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD.**¡Error! Marcador no definido.**

- Figura 12. Comportamiento de la Conductividad de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 13. Comportamiento de Sólidos Suspendidos (A) y Sólidos Totales Disueltos (B) de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 14. Comportamiento de Salinidad de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 15. Porcentaje de sobrevivencia de neonatos de *Daphnia pulicaria* expuestos a agua contaminada con diferentes concentraciones cipermetrina y tratada en reactor CAVOXD.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 16. Porcentaje de sobrevivencia de *Daphnia pulicaria* después de la exposición a agua contaminada con diferentes concentraciones cipermetrina y tratada en reactor CAVOXD.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 17. Número total de crías de *Daphnia pulicaria* sobrevivientes que lograron reproducirse después de la exposición a agua contaminada con diferentes concentraciones de cipermetrina y tratada en reactor CAVOXD.**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 18. Longevidad de *Daphnia pulicaria* sobrevivientes en días comparadas con *Daphnias* testigos sin exposición al piretroide.**¡Error! Marcador no definido.**

Cuadros

- Cuadro 1.** Sistemas convencionales de tratamiento terciario de aguas residuales **¡Error! Marcador no definido.**
- Cuadro 2.** Preparación de soluciones stock para medio agua dura (NMX AA-087-SCFI2010). **57**
- Cuadro 3.** Preparación de soluciones stock para medio Basal Bold para el cultivo de microalgas (NMX AA-087-SCFI2010). **57**
- Cuadro 4.** Análisis de agua tratada en diferentes tiempos con el reactor CAVOXD, a diferentes concentraciones. **58**

I. RESUMEN

Los plaguicidas en los cuerpos de agua constituyen una problemática toxicológica mundial; para ello, la empresa AC and DC Energy diseñó el reactor CAVOXD que por medio de cavitación hidrodinámica genera radicales altamente oxidantes con la intención de así degradar plaguicidas y disminuir su efecto toxicológico en el agua tratada. El objetivo de este trabajo fue determinar la disminución de la toxicidad del agua con cipermetrina tratada mediante CAVOXD en la sobrevivencia, reproducción y longevidad de *Daphnia pulicaria* y en apego a la NMX-AA-087-SCFI-2010. Se utilizaron diferentes concentraciones de cipermetrina en agua (0 ng L^{-1} , 10 ng L^{-1} , 20 ng L^{-1} y 4 g L^{-1}) que recircularon en el reactor CAVOXD durante distintos tiempos (0, 4, 15, 30 y 60 min). Los resultados muestran la dosis letal 50 a las 48 horas de cipermetrina para este cladóceros es de 2 ng L^{-1} , que la sobrevivencia fue independiente del tiempo de tratamiento excepto para la concentración de 10 ng L^{-1} donde se encontró un incremento en la sobrevivencia (10 individuos) a los 60 min, la reproducción en 20 ng L^{-1} (única concentración con resultados no descartables para reproducción y longevidad) se recuperó sólo al 45-50 % y longevidad 48% comparada con el control de *Daphnia pulicaria*. Aunque estas variables incrementan con el tiempo de tratamiento por CAVOXD, no alcanzan los valores que presentó el grupo control sin cipermetrina. Al parecer las concentraciones de cipermetrina de más de 20 ng L^{-1} superan la capacidad del reactor CAVOXD para tratar los efectos del piretroide en los tiempos máximos evaluados (60 min). Adicionalmente se caracterizaron los cambios fisicoquímicos del agua al suplementar cipermetrina y ser tratada con el reactor (pH, Zinc, Hierro, Nitratos, Dureza, Turbidez, Conductividad, Sólidos Suspendidos, Sólidos Totales Disueltos y Salinidad). Estas características del tratamiento con el reactor mostraron para la concentración de 0 g L^{-1} un incremento en la turbidez (De 0 a 12 FAU) y conductividad (35.45 %) y Fe (de 0 a 0.6). Mientras que en la concentración de 10 ng L^{-1} se observó disminución del contenido de nitratos (61.62 %) y de hierro (45.35 %). Finalmente, en la concentración de 4 g L^{-1} se encontró un aumento de los sólidos suspendidos (66 %) y la turbidez (58 %), así como una disminución de la conductividad (9.2 %). Se concluye, que la cavitación hidrodinámica originada en el reactor CAVOXD bajo los tiempos evaluados, disminuye en cierta medida el efecto toxicológico de las concentraciones evaluadas de cipermetrina en agua sobre *Daphnia pulicaria*, pero no elimina su efecto.

Palabras clave: *Daphnia pulicaria*, toxicidad, piretroide, bioindicador, cavitación hidrodinámica, cipermetrina.

II. INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas, el sector agropecuario presentó una tendencia al incremento en el empleo de plaguicidas (Stiling et al., 2012; Ramírez-López et al., 2012). En el 2013, se reportó un incremento del 7 % en la demanda de estos productos a nivel nacional (Garza y Cervantes, 2015). Por su bajo costo, los insecticidas resultan ser los plaguicidas más utilizados del sector agropecuario. Según Garza y Cervantes (2015), dentro de los insecticidas los piretroides sintéticos son extensamente empleados debido a la aparente baja permanencia en el ambiente, alta efectividad y gran espectro de acción. Sin embargo, la producción, el manejo y la aplicación de los plaguicidas pueden generar químicos tóxicos, conocidos como "contaminantes emergentes", que si no llevan un manejo adecuado pueden representar un riesgo potencial al ambiente y la salud pública (Pajares et al., 1997).

Existen diferentes sistemas de tratamiento de aguas residuales que son utilizados para la limpieza de aguas residuales, por ejemplo, la adsorción/bioadsorción en carbón activado, ozonización, fotooxidación, radiolisis y electrooxidación sin y con generación activa de cloro (Rivera-Utrilla et al., 2013). La cloración de agua sigue siendo la forma más común de desinfección de agua (Pinkston y Sedlak, 2004). Sin embargo, los estudios demuestran que los tratamientos convencionales, principalmente basados en el uso de microorganismos, son inadecuados para destruir estos compuestos orgánicos con una estructura molecular compleja y bajas concentraciones (Rivera-Utrilla et al., 2013). Basado en esta problemática la empresa AC and DC Energy desarrolló el reactor CAVOXD, esta novedosa tecnología por medio cavitación hidrodinámica permite dar tratamiento a las aguas residuales. Por lo que existe la necesidad de conocer la eficiencia de este sistema de tratamiento del agua para denotar el grado de calidad del vital líquido. Anteriormente, la determinación de la calidad del ambiente en las comunidades acuáticas se basó únicamente en el análisis de los parámetros fisicoquímicos. Hoy en día, se han desarrollado diferentes instrumentos de análisis y evaluación de compuestos que permiten prever los riesgos ecológicos, ambientales y de salud humana (Castillo-Morales et al., 2004). Destaca el uso de indicadores biológicos que aunado a la determinación de las características físico-químicas de los cuerpos de agua, permiten determinar las repercusiones y monitorear la integridad de los sistemas biológicos (Hernández-Albiter et al., 2005). Igualmente, es deseable incorporar a organismos como

indicadores biológicos en conjunto con los análisis físicoquímicos del agua en los nuevos métodos de tratamiento de aguas residuales, como la cavitación hidrodinámica, que permita evidenciar la presencia de contaminantes tóxicos, entre ellos los plaguicidas o sus derivados y evitar un daño en las comunidades biológicas (Castillo-Morales et al., 2004).

III. ANTECEDENTES

3.1. Plaguicidas con énfasis en piretroides

El término plaguicida se aplica a cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, también para aquellos que pueden administrarse a los animales para combatir insectos arácnidos u otras plagas (OMS, 2001; Benítez-Díaz, 2013; del Puerto et al., 2014). El desarrollo y aplicación de los plaguicidas tuvo auge en la revolución verde (decenio de 1950), y se han visto acompañadas de prácticas agropecuarias inadecuadas e irresponsables (González et al., 2001; Madeley, 2002). En América Latina, México es el principal importador de plaguicidas (Cortés-Genchi et al., 2008). Sin embargo, los beneficios aportados han ido acompañados de una serie de perjuicios ambientales, que en los casos más drásticos amenazan la supervivencia de los ecosistemas (Bautista et al., 2008).

Los plaguicidas se pueden clasificar por su constitución química en: arsenicales, carbamatos, tiocarbamatos, triazinas, dinitrocompuestos, organoclorados, organofosforados, organometálicos y piretroides (United Nations Industrial Development Organization, 1983). Estos últimos, son un grupo de moléculas con efecto insecticida, que se obtienen por síntesis química y son ampliamente utilizados por la reportada baja residualidad y alto efecto tóxico en organismos plaga (Aggarwal et al., 2015).

Generalmente, los piretroides son sustancias químicas con estructura semejante (estereoisómeros) a las piretrinas, compuestos orgánicos naturales que se encuentra en *Chrysanthemum coronarium* (Costa et al., 2001). El mecanismo de acción de los piretroides

es a nivel del sistema nervioso, al modificar el canal de sodio de la membrana nerviosa prolongan la corriente que fluye en los canales de sodio, haciéndolo más lento o impidiendo el cierre de los canales (Kamita et al., 2017).

La cipermetrina es un insecticida y acaricida dentro de la clasificación de los piretroides. La cipermetrina es una neurotoxina que actúa al entrar en contacto con los insectos, se absorbe en la superficie del integumento y se propaga por todo el cuerpo causando que los canales de sodio no cierren en las células nerviosas, dejando a los iones de sodio libres en la célula y provocando impulsos nerviosos incontrolables. Esto provoca estados de excitación con convulsiones, problemas de coordinación y finalmente parálisis (efecto de derribo), causando tiempo después la muerte (IPCS, 1989).

Según la información del Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (2014), aunque existe poca información sobre la biodegradación de la alfa cipermetrina en suelo, se espera que sea transformado y eliminado por acción de los microorganismos como ocurre en el caso de otros plaguicidas piretroides con estructura química similar. En los cuerpos de agua se puede adsorber a los sólidos suspendidos y a los sedimentos. Y los estudios de laboratorios han mostrado que es extremadamente tóxico para insectos (incluyendo a las abejas) y que su toxicidad en peces varía de alta a extremadamente alta. No se conocen exactamente las concentraciones de cipermetrina en ecosistemas acuáticos naturales, normalmente los plaguicidas se encuentran a niveles traza tanto en muestras biológicas, como ambientales, haciendo necesaria metodologías cada vez más sensibles y de bajo costo para su análisis (Rivera-Utrilla et al., 2013).

3.2. Plaguicidas en cuerpos de agua

En la actualidad la diversificación de los cultivos aunado a las grandes extensiones de tierra ha hecho necesaria la aplicación sistemática de plaguicidas en cantidades considerables, en niveles agrícola, industrial, doméstico, jardinería y veterinario (Kolaczinski y Curtis, 2004). Aunque sus beneficios son numerosos, es común encontrar que las plagas desarrollen resistencia, obligando a los agricultores a incrementar las concentraciones y frecuencias de aplicación de los plaguicidas, o la realización de mezclas de principios activos y a demandar la disponibilidad de nuevos y más potentes biocidas sintéticos (Benítez-Díaz y

Miranda-Contreras, 2013). Estas prácticas dan origen a diversas problemáticas medio ambientales y de salud pública, especialmente debido a que las altas concentraciones y nuevas mezclas con otros compuestos como los organofosforados, potencializa su acción e incrementa su permanencia en el ambiente (CICOPLAFEST, 2004). Estos agroquímicos se utilizan en granos almacenados (Aldana-Madrid et al., 2008) y en el cultivo de algunas hortalizas (Aldana et al. 2008b).

Gran parte de los plaguicidas que son utilizados en el campo que llegan a los ecosistemas acuáticos por escorrentía, lixiviación o durante su aplicación, tienen afectaciones a la fisiología y la supervivencia de los organismos, llegando incluso a producir mutaciones (Henaó et al., 2005). Para establecer medidas de control sobre la contaminación de los ecosistemas acuáticos es necesario una evaluación biológica de los efectos tóxicos que producen los contaminantes sobre los organismos acuáticos (Martínez-Jerónimo et al., 2008).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la contaminación de los recursos hídricos es una problemática importante que requiere particular atención en los países en desarrollo, ya que el ser humano, la fauna acuática y terrestre están sometidos a bajas dosis de plaguicidas a través de la contaminación del agua; adicionalmente, es una de las vías a través de las cuales se transportan los plaguicidas clasificados como compuestos orgánicos persistentes (COP) aguas abajo de los lugares donde fueron aplicados (Benítez-Díaz y Miranda-Contreras, 2013).

3.2.1. Cipermetrina y otros plaguicidas en el ecosistema

Actualmente el uso de plaguicidas denominados como de “riesgo reducido” ha aumentado en comparación con los plaguicidas tradicionales, sin embargo mantienen un 50% de la cuota del mercado internacional (Meza et al., 2012). En el 2001, la Oficina General de Fiscalización (GAO, por sus siglas en inglés) concluyó que a pesar de que el uso general de pesticidas agrícolas no había disminuido en los Estados Unidos, entre 1992 y el 2000, el uso de los “pesticidas de mayor riesgo” había disminuido en 14% por peso del ingrediente activo. Cambios similares se están dando en países en vías de desarrollo gradualmente. Sin embargo, son pocos los insecticidas que no representan un riesgo ecológico. Aunque los piretroides se consideran menos dañinos para el ambiente que el uso de ciclodienos, carbamatos y

organofosforados más antiguos, pueden ser extremadamente tóxicos para los peces y tienen efectos de espectro amplio en los invertebrados (Smith y Stratton, 1986; Mian y Mulla, 1992).

La cipermetrina tiene normalmente una vida media en el suelo de 30 días (USEPA, 1989; Knisel, 1993), aunque puede variar entre dos a ocho semanas, se sabe que los microorganismos en el suelo pueden descomponerla, y en el follaje su vida media es de 5 días (USEPA, 1989a). La principal problemática con el ecosistema es cuando este plaguicida entra en contacto con cuerpos de agua, por lo que su aplicación se recomienda limitar a personal certificado (USEPA, 1989b).

Aunque no se conocen muchos estudios acerca de la cipermetrina y sus efectos en el ecosistema y se ha reportado a la cipermetrina como un compuesto con poca permanencia en el ecosistema, se han encontrado efectos adversos debido a las malas prácticas en la agricultura. Acorde a Mugni (2008), la cipermetrina y clorpirifos son compuestos hidrofóbicos que se adsorben al suelo e ingresan a los arroyos asociados a la fracción particulada de la escorrentía superficial, este trabajo muestra cómo un adecuado manejo evita efectos adversos. Este escenario se observó en una parcela trabajada con el difundido sistema de labranza de siembra directa, en coincidencia con la presencia de abundante rastrojo en superficie.

Dentro de estos efectos en el ecosistema causados por las malas prácticas de uso, se encuentra la resistencia de varias especies al plaguicida por su uso indiscriminado. En Tamaulipas, un estudio reveló que de 36 ranchos infestados con la mosca del cuerno (*Haematobia irritans*) (11 ubicados en el norte, 14 en el centro y 11 en el sur del estado) se encontró resistencia a la cipermetrina por la mosca, en todos los ranchos excepto en el ubicado en el centro (Almazán García et al., 2004). Otra de las más grandes problemáticas en el ecosistema es su afectación a organismos no blancos como peces, aves, mamíferos y anfibios (Devine et al., 2008).

3.2.2. Efectos de la cipermetrina en sistemas biológicos

Según la United States Environmental Protection Agency se sabe que la cipermetrina es altamente tóxica para los peces y abejas, es muy tóxica para los insectos de agua y tiene una baja toxicidad para las aves (USEPA, 1989).

La exposición a cipermetrina de animales e insectos puede causar signos de intoxicación como hipersensibilidad, salivación profusa, coreoatetosis o contracciones involuntarias, temblor y parálisis (Edwards et al., 1986; Yilmaz et al., 2008). Se ha determinado que la cipermetrina puede afectar peces, anfibios, algunos artrópodos y en menor medida aves y mamíferos (Edwards et al., 1986; Greulich y Pflugmacher, 2003; Yilmaz et al., 2008; Sarikaya, 2009; Biga y Blaustein, 2013).

Algunos valores reportados de concentración letal media (CL_{50}) de cipermetrina reportados en algunas especies son: $9,43 \mu\text{g L}^{-1}$ en *Poecilia reticulata* (Yilmaz et al., 2004), $5,99 \mu\text{g L}^{-1}$ en *Oreochromis niloticus* (Sarikaya, 2009), $0,24 \text{ g ml}^{-1}$ en *Lutzomyia longipalpis* (Santamaria y Marceló-Díaz, 2019), en lo general se han reportado en peces ($5 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), algas ($> 0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y daphnias ($3 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (IPCS, 1989).

Se ha encontrado también que en el platelminto *Dugesia gonocephala*, una especie bioindicadora del río Guacollo, en el Altiplano chileno, modifica la morfología de los seminíferos túbulos que aumentan significativamente el área y el perímetro de los túbulos, además de causar cambios celulares, con un aumento significativo en las células madre (CD133+) (Espinoza-Navarro, et al., 2014). En conejos blancos de Nueva Zelanda, se ha encontrado que la exposición de largo plazo a la cipermetrina y butóxido de piperonilo causa inflamación hepática e induce genotoxicidad (Vardavas et al., 2016), igualmente se ha observado genotoxicidad por la cipermetrina y clorpirifos en cultivos de mezclas de linfocitos bovinos (Ferré, et al., 2020).

A nivel del sistema nervioso se sabe que una dosis única intraperitoneal de cipermetrina sobre la morfología neuronal de corteza somatosensorial (láminas superficiales y profundas) de ratones CF-1. 35 muestra alteraciones morfológicas correspondientes a muerte neuronal (Venegas, et al., 2008).

Además de los efectos directos de la cipermetrina en los sistemas biológicos se ha mostrado que provoca también la mortalidad de aves (como los pollos) que se atribuye a los efectos indirectos (vía cadena trófica) producidos por la aplicación del plaguicida, cuya alta efectividad contra los artrópodos priva a los adultos de los recursos tróficos necesarios para alimentar a sus crías (Pascual, et al, 1991).

3.3 Sistemas de tratamiento de agua

El inicio del tratamiento de las aguas residuales es relativamente reciente, data de fines de 1800. Se desarrolló debido a las enfermedades de origen hídrico y la contaminación del agua. En un principio, mediante el vertido de las aguas al suelo, pero el volumen cada vez mayor de agua requirió de grandes superficies y se volvió insostenible para la cantidad de terrenos disponibles (Rojas, 2002).

Según Rojas (2002), en Latinoamérica y el Caribe, las etapas de tratamiento para el agua residual utilizadas generalmente son tratamiento preliminar, primario, secundario, terciario, desinfección y disposición de lodos.

Tratamiento preliminar: Acondicionamiento de las aguas residuales para la protección y funcionamiento de las instalaciones, para lo cual se utilizan rejas o tamices, trituradores, desarenadores, desengrasadores y preaireación.

Tratamiento primario: Remoción de una parte sustancial del material sedimentable o flotante, para lo cual se puede utilizar un proceso de sedimentación primaria, flotación, precipitación química, filtros gruesos, oxidación química, coagulación, floculación, sedimentación y filtración.

Tratamiento secundario: Reduce o convierte la materia orgánica finamente dividida y/o disuelta, en sólidos sedimentables floculentos que puedan ser separados por sedimentación en tanques de decantación. Entre los procesos utilizados en esta etapa se puede mencionar:

- Filtración biológica: De baja capacidad, como son los filtros clásicos y de alta capacidad que son los filtros comunes, los biofiltros, aero-filtros y accelo-filtros;
- Lodos activados: Convencional, de alta capacidad, de contacto, estabilización y de aeración prolongada;
- Lagunas: Estabilización y Aireada. Dentro de las de estabilización se encuentran la aerobia, facultativa y maduración. Dentro de las aireadas están las de mezcla completa, aireada facultativa, facultativa con aeración mecánica y de difusión de aire;
- Además, se puede encontrar otros tipos de tratamiento secundario como anaeróbicos. De contacto, filtro anaerobio o el reactor anaeróbico de flujo ascendente), de oxígeno puro (Unox / linde) o los discos rotatorios. De estos, los procesos más utilizados son los lodos activados y filtros percoladores.

Tratamiento avanzado o terciario: Tiene como objetivo complementar los procesos anteriormente indicados para lograr efluentes más puros. Los procesos de tratamiento de esta categoría están conformados por procesos físicos, químicos y biológicos.

Desinfección: reducir principalmente el contenido de bacterias, virus y quistes amebianos, el más utilizado es la desinfección química con cloro.

Disposición de lodos: Después del tratamiento se producen subproductos como los residuos de las rejillas, desarenadores y sedimentadores, en este caso, se refiere a los productos retenidos en los sedimentadores (primario y secundario). Por su alto contenido de materia orgánica antes de disponer de estos lodos se requiere de acondicionarlos. Típicamente se tratan los lodos con los procesos: concentración, espesamiento, digestión, acondicionamiento, deshidratación o secado, incineración y oxidación.

Este trabajo se centrará en los tratamientos terciarios ya que aquí puede participar el reactor CAVOXD diseñado por la empresa AC and DC Energy, en el tratamiento de aguas residuales.

3.3.1. Tratamientos convencionales de aguas residuales

Los procesos de tratamiento de esta categoría están conformados por procesos físicos, químicos y biológicos. En el siguiente cuadro extraído de Rojas et al, (2002) se enlistan los tratamientos terciarios convencionales principales y grado de eficacia (Cuadro 1). Como se observa en el cuadro el método con una mayor eficiencia de remoción y capacidad para tratar mayor cantidad de variables es la ósmosis inversa (o hiperfiltración), es el paso a presión de agua a través de una membrana densa de permeabilidad selectiva, desde una zona de mayor a otra de menor concentración (Potter y Hotchkiss, 1995). La filtración (que no provee remoción de las variables que se muestran) y la separación fase gas tienen los porcentajes más bajos de remoción.

Cuadro 1. Sistemas convencionales de tratamiento terciario de aguas residuales

PROCESO	EFICIENCIA REMOCIONAL							
	SS	DBO	DQO	NH ₃	Norg	NO ₃	PO ₄	STD
Arrastre de amoniaco				85-98				
Filtración								
Separación fase gas				50-70				
Aplicación en suelo	95-98	90-98	80-90	60-80	80-95	5-15	60-90	
Ósmosis inversa	95-98	95-99	90-95	95-99	95-99	95-99	95-99	95-99
Porción		50	40				99	10
Carbón activado	80-90	70-90	60-75		50-90			
Precipitación química	60-80	75-90	60-70	5-15	60-50		90-95	20
Precip. química en lodo activado	80-95	90-95	85-90	30-40	30-40	30-40	30-40	10
Intercambio iónico		40-60	30-50	85-98	80-95	80-90	85-98	
Electroquímico	80-90	50-60	40-50	80-85	80-85		80-85	
Electrodialisis				30-50		30-50	30-50	40
Oxidación química		80-90	65-70	50-80				
Reducción						NO ₃ -NH ₃		
Asimilación bacteriana	80-5	75-95	60-80	30-40	30-40	30-40	10-20	
Desnitrificación						60-95		
Lagunas		50-75	40-60	50-90	50-90	50-90	50	
Nitrificación – desnitrificación						60-95		

Los tratamientos de aguas residuales empleando métodos convencionales no son del todo satisfactorios, al punto que se ha detectado que muchos compuestos persisten sin alteración alguna aún después de aplicar tratamientos terciarios (Teijon, et al., 2010). Por tal razón, es importante identificar y evaluar la eficiencia de otras tecnologías para el tratamiento de aguas, con el fin de proponer alternativas que permitan minimizar efectos toxicológicos que podrían producir los contaminantes presentes en las aguas residuales (como clastogénicos, mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos), que se pueden generar como consecuencia de la exposición a bajas concentraciones y por períodos prolongados.

3.3.1.1. Cavitación hidrodinámica

Actualmente existen tecnologías alternativas como la cavitación hidrodinámica (Benito y Arrojo, 2005). Este método es un proceso donde hay oscilaciones de presión en un líquido, si la presión mínima es suficiente para alcanzar la presión de vapor del líquido se induce el crecimiento de burbujas que colapsan cuando la presión vuelve a crecer. En ciertas condiciones el colapso es implosivo, dando picos de temperatura y presiones de 104 K y 103

atm, respectivamente, lo que lleva a la producción de radicales hidroxilos que son sumamente oxidantes y provocan una serie de reacciones que puede destruir químicamente la materia y sustancias en estas burbujas. Este proceso tiene un gran potencial para ser utilizado en el tratamiento de agua ya que no requiere reactivos y representa una alternativa de bajo costo y alta eficiencia. Sin embargo, esta tecnología en una escala industrial aún está en fase de desarrollo y requiere de estudios que comprueben la aplicabilidad para distintos contaminantes.

CAVOXD es un reactor que induce la cavitación hidrodinámica y genera radicales altamente reactivos, pero efímeros, como proceso de oxidación avanzada, ha sido desarrollado por la empresa AC AND DC ENERGY para el tratamiento de aguas residuales (Figura 1). Este reactor causa cambios en los equilibrios químicos del agua, degradando elementos contaminantes orgánicos como los insecticidas de uso agropecuario; es una solución integral que elimina contaminantes emergentes altamente tóxicos y mejora la biodegradabilidad de las aguas residuales sin el uso de químicos adicionales (cavoxd.com.mx). Es una tecnología en proceso de patentamiento y los detalles del diseño son confidenciales. Actualmente se propone el uso para el tratamiento de contaminantes emergentes dentro de los cuales están los piretroides como la cipermetrina (Benito y Arrojo, 2005).



Figura 1. Reactor CAVOXD que induce cavitación hidrodinámica, desarrollado por la empresa AC AND DC ENERGY para el tratamiento de aguas residuales. (Imagen con permiso de AC and DC Energy).

3.4. Indicadores biológicos

El efecto que causan los diferentes plaguicidas tanto físicos como químicos sobre el ambiente se puede determinar con ensayos biológicos, una herramienta de diagnóstico adecuada, que además permite mantener las pruebas bajo condiciones experimentales específicas y controladas (Ronco et al., 2004). Estos ensayos por lo general conllevan a la utilización de indicadores biológicos (bioindicadores), que son organismos vivos, tales como plantas, plancton, animales o microbios que se usan para detectar la salud del | natural en el medio ambiente. Estos organismos evalúan la salud ambiental y los cambios biogeográficos que tienen lugar en el medio ambiente (Parmar et al., 2016). Los efectos de estos plaguicidas pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos (Castillo et al., 2004). Las especies bioindicadoras tienen como características ser abundantes, muy sensibles al medio de vida, fáciles y rápidas de identificar, bien estudiadas en su ecología y ciclo biológico, y con poca movilidad. Cuanto más estrechos sean sus límites de tolerancia, mayor será su utilidad como indicador ecológico

(Ronco et al., 2004). Los bioindicadores han ganado recientemente popularidad, ya que proveen de información valiosa acerca de la calidad del ambiente donde se encuentran. Se sabe que toda especie tiene un margen de tolerancia a los factores medioambientales a los que pueden estar expuestos, lo que se utiliza para medir la calidad del mismo (Lijteroff et al., 2009).

De igual forma, los organismos bioindicadores tienen el beneficio de indicar los efectos bióticos indirectos de los contaminantes cuando no pueden ser aplicadas muchas determinaciones físicas o químicas (Bhan-Singh et al., 2013). Para evaluar los efectos tóxicos de los contaminantes químicos, se debe seleccionar adecuadamente el organismo de prueba, ya que es necesario poder inferir a partir de los resultados, los posibles daños a la comunidad acuática en los sistemas (Ronco et al., 2004). Normalmente se utilizan como modelos los organismos con una sensibilidad conocida que permita extrapolar los resultados para otras especies (Markert et al., 2003). Singh et al. (2013), establecen que las características necesarias para que un organismo sea considerado un buen indicador son:

- i) Que proporcione una respuesta medible (sensible a la perturbación o el estrés),
- ii) Que esté taxonómicamente bien documentado,
- iii) Que sea fácil y barato inspeccionar con el modelo y que pueda identificarse de manera confiable,
- iv) Presentar una amplia distribución temporal y espacial.

3.4.1. *Daphnia pulicaria* como indicador biológico

Los dhaphnidos frecuentemente son empleados como organismos modelo estandarizados para la valoración de toxicidad en el ambiente. Dentro de los ensayos de toxicidad el uso de los cladóceros es ampliamente extendido por la amplia distribución geográfica, que permite disponer de ellos fácilmente, buena aclimatación a las condiciones de laboratorio, ciclo de vida corto, poco requerimiento de espacio para cultivarse y frecuentemente son uno de los grupos más sensibles a los compuestos químicos (Vargas y Mosqueda, 2011). Algunos ejemplos son: *Daphnia magna*, *Daphnia axilis*, *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia dubia* y *Moina macrocopa*, empleados para medir la concentración media letal (CL50) para diferentes productos tóxicos de uso agropecuario e industrial (Martínez-Jerónimo et al., 2000).

A nivel mundial, *Daphnia magna* es el cladóceros más utilizado en las pruebas toxicológicas y de epigenética (Martínez-Jerónimo et al., 1997). Sin embargo, pertenece a climas naturalmente fríos por lo que es cuestionada su utilidad en ambientes tropicales (Pérez-Legaspi, et al., 2017), y no se han realizado estudios que profundicen en el uso de esta especie en alta montaña o gran altitud (arriba de los 2000 msnm). Una opción viable para estos ambientes, debido a su disponibilidad en el área es *Daphnia pulicaria* (Figura 4), que pertenece al complejo pulex. Esta especie presenta como características generales un pecten medio de la garra postabdominal mucho más desarrollado que el anterior y el proximal, un margen interno del caparazón con setas relativamente largas sobre todo hacia la parte media ventral (Zaldivar et al., 2018). En las características específicas, se reconoce a *Daphnia pulicaria* por tener los ocelos presentes y la punta de los estetascos de la anténula no sobrepasan la punta del rostro; además de tener montículo antenular poco desarrollado, la espina del caparazón corta menor a un tercio de la longitud del mismo (Figura 2) (Castillo-Morales et al., 2004; Elías-Gutiérrez et al., 2008). *Daphnia pulicaria* como los demás cladóceros es llamada comúnmente pulga de agua, por el tamaño pequeño y la forma de nadar (como saltando), pertenece al Phylum: Artropoda, Subphylum: Crustacea, Clase: Brachiopoda, Suborden: Cladocera, Familia: Daphniidae que comprende alrededor de 150 especies (Castillo-Morales et al., 2004).

Las daphnias son organismos que habitan de forma natural los cuerpos de agua del Alto Lerma, ya que el complejo pulex se ha registrado en las localidades de la Presa José Antonio Álzate, Jilotepec-Ixtlahuaca km 28 y 41, y en la Laguna los Baños en el Estado de México (Elías-Gutiérrez et al., 2008). Al ser un habitante endémico de la zona donde se realiza el presente estudio, *Daphnia pulicaria* permite incluir directamente datos del ecosistema donde se utilizaría el reactor CAVOXD, proponiendo así un modelo más ajustado al área de impacto.

Se ha reportado a esta especie como un organismo modelo por su sensibilidad, su alta capacidad de reproducción y sobrevivencia (Zaldivar et al., 2018). *Daphnia pulicaria* ha sido utilizada como un organismo modelo para investigar el genotipo desde la influencia fenotípica de la variación de la historia de vida (Olijnyk, 2011). Además, se han realizado estudios en esta especie para medir los efectos de la calidad nutricional en la historia de vida (Carotenuto et al., 2005).

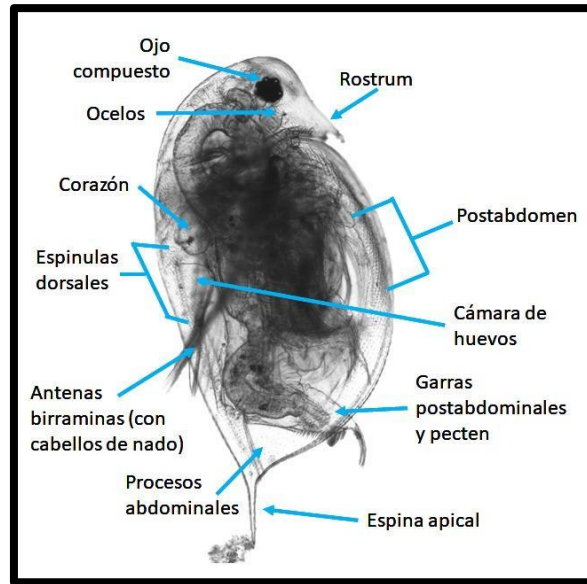


Figura 2. Morfología de un espécimen de *Daphnia pulicaria*.

IV. JUSTIFICACIÓN

En América Latina, México es el principal importador de plaguicidas (Cortés-Genchi et al., 2008). Especialmente en zonas fundamentalmente agrícolas se requiere del uso masivo de plaguicidas para el control de plagas. En el Estado de México, la cipermetrina como insecticida ha sido ampliamente utilizada en la zona del Alto Lerma por la reportada baja residualidad y alto efecto tóxico en organismos plaga (Aggarwal et al., 2015). En la actualidad, gran parte de los plaguicidas que son utilizados en el campo que llegan a los ecosistemas acuáticos por escorrentía, lixiviación o durante su aplicación, tienen afectaciones a la fisiología y la supervivencia de los organismos, llegando incluso a producir mutaciones (Henaó et al., 2005). Estas aplicaciones directas e indirectas, por aportes de residuos que llegan a los cuerpos de agua provenientes de ambientes terrestres y de la atmósfera, dejan a los organismos acuáticos no blanco expuestos a estos plaguicidas. Por otro lado, las evaluaciones de calidad ambiental sólo suelen incluir la detección de niveles permisibles en el ambiente, pero no evalúan los efectos que las bajas concentraciones de estas sustancias pueden tener sobre organismos no blanco (Henaó et al., 2005).

El presente trabajo de investigación aborda dos aspectos de importancia ambiental para los cuerpos de agua de gran altitud, como los del Alto Lerma en el Estado de México. El primer aspecto corresponde a la generación de conocimiento, sobre *Daphnia pulicaria* como un modelo para los ensayos toxicológicos para sistemas en gran altitud en lugar de *Daphnia magna*, ambas miembros del complejo *pulex*. El género *Daphnia* es internacionalmente conocido como un excelente bioindicador en la medición y evaluación de ecosistemas acuáticos y en los experimentos de toxicidad como biomonitor debido a que presenta una alta sensibilidad a una amplia gama de compuestos tóxicos. Debido a que *Daphnia pulicaria* se ha registrado de forma natural en la Presa José Antonio Álzate, bordos permanentes y temporales de Jilotepec-Ixtlahuaca km 28 y 41, y en la Laguna los Baños en el Estado de México (Elías-Gutiérrez et al., 2008) se considera a *Daphnia pulicaria* una especie que habita de forma natural los cuerpos de agua del Alto Lerma, lo que la propone como un organismo modelo para la evaluación toxicológica en esta zona.

El segundo aspecto es la aplicación de los ensayos biológicos en la evaluación de los métodos de tratamiento de agua. La empresa de AC and DC Energy ha diseñado un reactor CAVOXD que, por medio de cavitación hidrodinámica (tecnología en proceso de patentamiento), crea especies altamente reactivas que oxidan la materia orgánica. Este reactor fue creado para hacer frente a la creciente contaminación de aguas residuales por contaminantes emergentes. De esta manera se propuso evaluar la capacidad del reactor para tratar agua con cipermetrina a través del uso de *Daphnia pulicaria* como organismo bioindicador, de acuerdo al protocolo de la Norma Mexicana (NMX-AA-087-SCFI-2010, 2010) desarrollada para *Daphnia magna*.

V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El tratamiento del agua con cipermetrina por CAVOXD disminuye el efecto toxicológico en los aspectos de historia de vida de *Daphnia pulex*?

VI. HIPÓTESIS

Los efectos toxicológicos del agua con cipermetrina sobre los aspectos de historia de vida de *Daphnia pulex* disminuyen al ser tratada por CAVOXD.

VII. OBJETIVO

Determinar la disminución de la toxicidad del agua con cipermetrina tratada mediante CAVOXD sobre los aspectos de historia de vida de *Daphnia pulex*.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Establecimiento del cultivo de *D. pulex*

Ejemplares de *Daphnia pulex* aclimatados bajo condiciones de laboratorio con estricto apego a la norma mexicana NMX AA-087-SCFI2010 “Análisis de agua - Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, Straus (Crustacea-Cladocera)- Método de prueba” fueron usados para la aclimatación en agua dura reconstituida a base de agua potable utilizada por el reactor. El cultivo fue iniciado con neonatos en buenas condiciones de menos de 24h de nacidas y mantenido en continua reproducción por partenogénesis, conduciendo a un lote controlado de clones femeninos de dáfnidos, no mayor a 15 organismos L⁻¹ en agua dura reconstituida (preparada con agua de la llave que abastece al reactor). Para todos los experimentos realizados se utilizaron sólo neonatas hembras, idénticas genéticamente.

8.2. Condiciones y preparación del medio de cultivo de *D. pulex*

El medio de cultivo de *D. pulex* estuvo integrado por agua dura reconstituida, se realizó a partir de soluciones stock de CaCl₂ • 2 H₂O, MgSO₄ • 5H₂O, NaHCO₃, KCl y

Na_2SeO_4 previamente preparadas de acuerdo con la NMX-AA-087-SCFI2010 (Anexo 1). Para cada litro de agua dura reconstituida a preparar se tomaron 25 mL de las soluciones stock de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 y KCl y adicionando 0.2 mL de la solución stock de Na_2SeO_4 . Se disolvieron en agua potable (de la llave) que abastece al reactor CAVOXD y se aforó a 1 L (Figura 3).

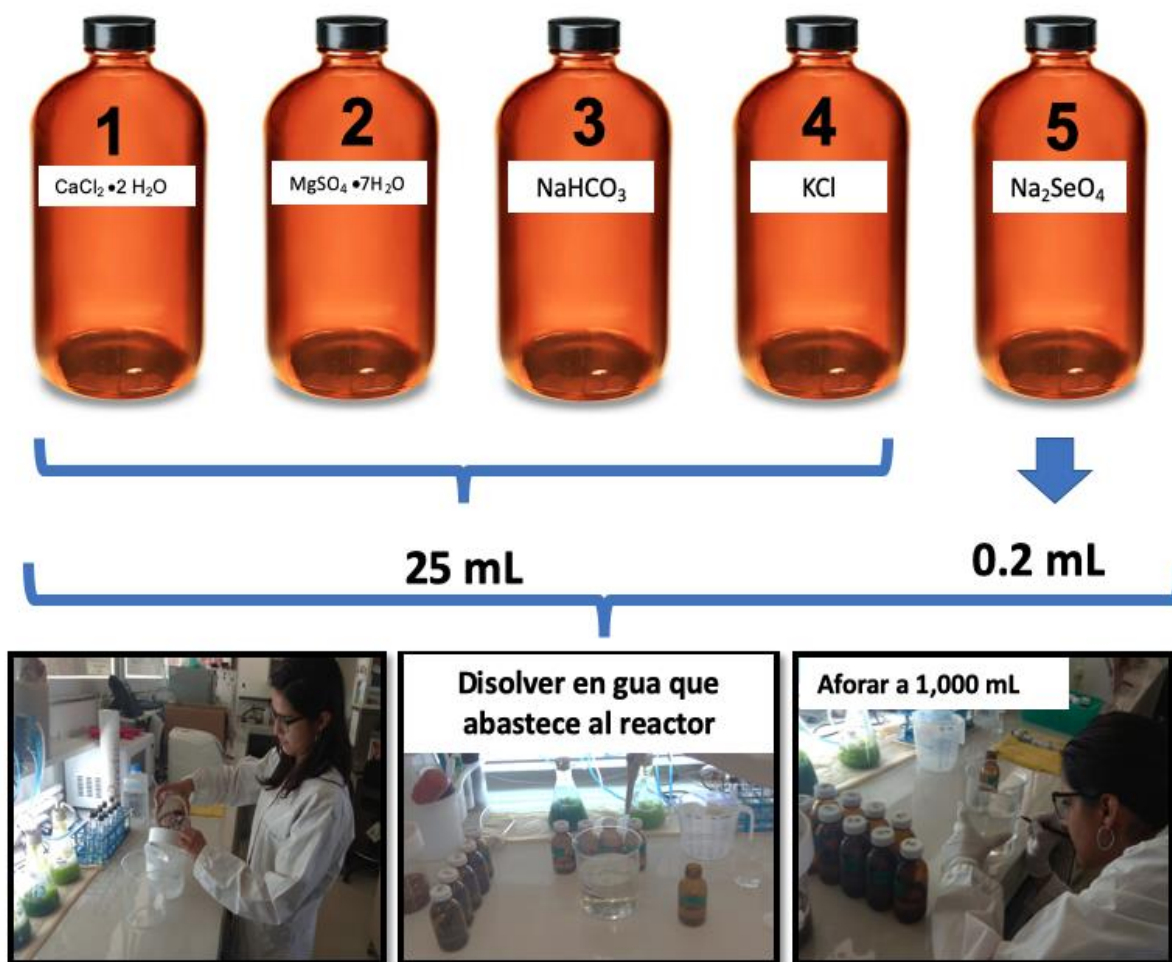


Figura 3. Preparación del medio de agua dura reconstituida a partir de soluciones stock.

8.3. Dieta de hembras grávidas de *D. pulicaria*

La dieta de las hembras grávidas se basó en células vivas en suspensión de *Desmodesmus* sp. cultivadas en medio basal Bold a partir de soluciones stocks de NaNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaCl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , EDTA KOH , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, MoO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Anexo 2). Por cada litro

de medio se agregó 1 mL de cada stock en 500 mL de agua de la llave del reactor CAVOXD y se aforó a 1L. Los cultivos de microalgas se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL bajo iluminación y aireación continua, a temperatura ambiente, con un inóculo precedente de una densidad conocida para alcanzar una concentración inicial aproximada de 1×10^6 células mL^{-1} , según la NMX AA-087-SCFI2010 (Figura 4).

Para preparar la dosis de alimento vivo se obtuvo una curva de crecimiento por espectrofotometría (DR-2010, HACH, USA) a 460 nm, con la finalidad de cuantificar el número aproximado de células por mL. La alimentación de los dáfnidos se realizó tres veces por semana a una concentración de 750,000 a 800,000 células de *Desmodesmus* sp. mL^{-1} de medio de cultivo de *D. pulicaria*.



Figura 4. Cultivo de *Desmodesmus* sp. en condiciones de laboratorio.

8.4. Condiciones de cultivo de hembras grávidas y neonatas de *D. pulicaria*

Las hembras grávidas y las neonatas se mantuvieron en cultivo en una cámara bioclimática (Figura 5) El sistema se encontraba libre de sustancias tóxicas, usando como medio de cultivo agua dura reconstituida con sales de acuerdo a la subsección 8.2, con una iluminación de 600-1000 lx con fotoperiodo de 16 h de luz, con luz blanca, temperatura de 20 ± 2 °C, oxígeno disuelto en el medio ≥ 2 mg L^{-1} , dureza de 250 mg L^{-1} de $\text{CaCO}_3 \pm 25$ mg L^{-1} , pH de 8.0 ± 0.2 y recambio de medio de cultivo tres veces por semana (NMX AA-087-SCFI2010).

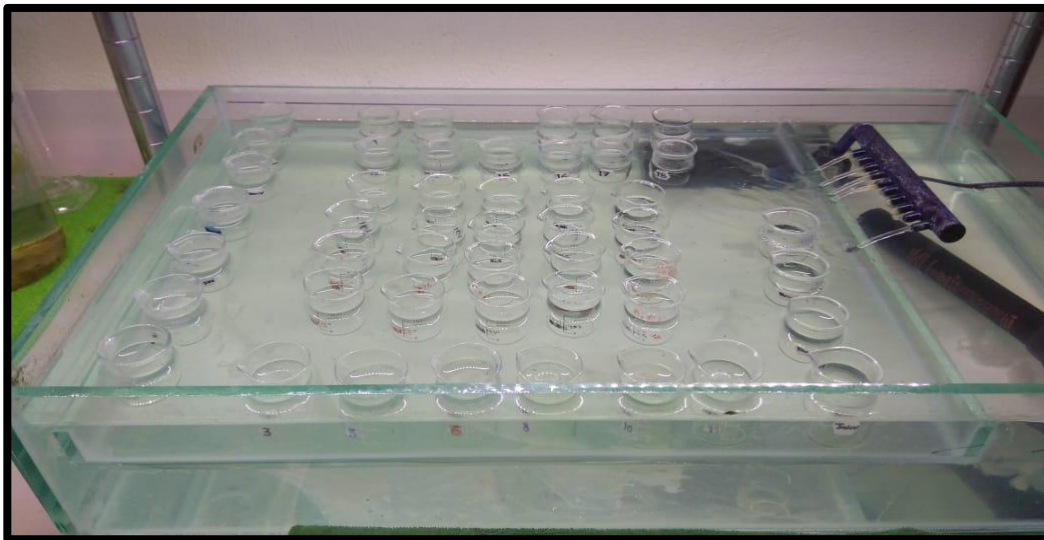


Figura 5. Mantenimiento en cámara bioclimática de los cultivos de madres grávidas y neonatas.

8.5. Determinación de la Dosis letal media (DL₅₀) de cipermetrina para neonatas de *D. pulex*

Con el objetivo de determinar la DL₅₀ de cipermetrina para *D. pulex*, neonatas de menos de 24h de nacidas fueron expuestas a diferentes concentraciones del piretroide (2, 4, 5, 8, 10, 16 y 32 ng L⁻¹), y para corroborar la letalidad del piretroide en los dáfnidos, se emplearon concentraciones de 4, 20 y 100 g L⁻¹. Se utilizaron 20 individuos por concentración, los cuales fueron colocados individualmente en vasos de precipitado de 10 mL con agua dura reconstituida (subsección 8.2.) con las diferentes concentraciones de cipermetrina, durante 48h. Al término de la exposición aguda, se registró el número de individuos muertos, los datos fueron empleados en la determinación del porcentaje de mortalidad y (DL₅₀). Las daphnias muertas fueron retiradas.

8.6. Prueba de toxicidad aguda con *D. pulex*

La evaluación de la toxicidad de cipermetrina sobre las neonatas de *D. pulex* se realizó con base en la información previamente determinada, se establecieron concentraciones de cipermetrina muy por encima de la DL₅₀ (0, 10 y 20 ngL⁻¹ y 4 gL⁻¹), asegurando así que sólo si el reactor elimina por lo menos un 80 % de la cipermetrina en el agua con cipermetrina exista sobrevivencia significativa.

Se consideraron varios tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD basados en el número de ciclos que el reactor realiza sobre el agua reconstituida conteniendo la cipermetrina. El tiempo que el reactor requiere para tratar 500 L de agua es de cuatro minutos, por tanto, los tiempos de tratamiento del agua fueron 0 (control), 4, 15, 30 y 60 minutos, adicionalmente por la cantidad excesiva de tóxico para la concentración más alta evaluada (4 gL^{-1}), éste último tratamiento fue recirculado por el reactor durante 120 min.

Todas las soluciones de cipermetrina tratadas en el reactor CAVOXD se mantuvieron a la misma presión y temperatura del reactor (dato confidencial, en proceso de patente). El agua generada a los diferentes tiempos de tratamiento con el reactor se utilizó para generar el medio de cultivo de *D. pulicaria* que consistió en agua dura reconstituida, como se indica en la NMX AA-087-SCFI-2010. La toxicidad de cipermetrina se evaluó en neonatas con 24 h de nacidos, de la tercera generación en adelante de hembras grávidas de menos de 40 días de vida, las cuales fueron previamente aclimatadas al agua que abastece al reactor. Las neonatas fueron expuestas durante 48 horas al agua generada por cada tiempo de tratamiento con el reactor. Neonatas individuales se colocaron en vasos de precipitado con 10 mL de agua dura reconstituida. Cada tratamiento contó con 10 neonatas, y el experimento se realizó por duplicado.

Las variables evaluadas fueron:

- Supervivencia: proporción de sobrevivientes con respecto al tiempo.
- Reproducción: Número de camadas y número total de crías por camada.
- Longevidad: días totales que el ejemplar se mantuvo vivo.

8.7. Caracterización fisicoquímica del agua

El agua utilizada, fue caracterizada fisicoquímicamente antes y después de ser tratada por el reactor (al salir de la llave de agua, sin cipermetrina (0 ng L^{-1}), y después de la adición de esta (10 ngL^{-1} y 4 gL^{-1}) en cada uno de los tiempos evaluados (0, 4, 15, 30 y 60min)), se midió el pH, conductividad, temperatura, sólidos totales disueltos (TDS), salinidad (Potenciómetro Hach 9532800 Pocket Pro+ Tester, 2019, USA) así como contenido de zinc (Zincon Method: USEPA, 1980a), hierro (FerroVer Method: USEPA, 1980b), nitratos (Cadmium Reduction Method: HACH, 2010a), dureza (HACH: Utilización del titulador digital con EDTA, 2010b), turbidez (Attenuated Radiation Method: HACH, 2010c) y sólidos

suspendidos (HACH: Photometric Method, 2010d). No se caracterizó la concentración de 20 ng L^{-1} , ya que este tratamiento se añadió después de esta fase experimental para asegurar la mortalidad de las neonatas al no encontrar diferencias significativas en las otras dos concentraciones.

Se realizaron tres repeticiones por cada medición de los parámetros fisicoquímicos determinados y se les realizó un análisis de varianza multifactorial. Para discriminar entre las medias se determinó la diferencia máxima significativa (HSD) de Tukey ($p \leq 0.05$). Estos análisis fueron realizados empleando el software estadístico STATGRAPHICS Centurion, versión XVI.I

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Dosis letal 50 (DL₅₀)

La dosis letal 50 (DL₅₀) de cipermetrina para las neonatas de *Daphnia pulicaria* fue de 2 ng L^{-1} , después de 48 h de exposición al agua contaminada con diferentes concentraciones del piretroide y, tratada en el reactor CAVOXD (Figura 6). Concentraciones superiores a la DL₅₀ tuvieron una sobrevivencia del 33 % (4 ng L^{-1}), 20 % (5 ng L^{-1}) y 0 % en concentraciones superiores, del total de la población de neonatas. La muerte se reconoció, por la carencia de movilidad de las neonatas. La determinación de la DL₅₀ se utiliza para medir la toxicidad aguda de algún compuesto en el 50% de la población. La DL₅₀ de cipermetrina en *Daphnia pulicaria* se determinó en 2 ng L^{-1} . Esta DL₅₀ es menor a la reportada para *Daphnia magna* en ensayos de toxicidad realizados por Zaldivar et al. (2018) con dicromato de potasio ($0,6\text{ mg L}^{-1}$ a $2,1\text{ mg L}^{-1}$), así como la DL₅₀ ($0,00068\text{ mg L}^{-1}$) reportada para cipermetrina por la Dow AgroSciences (2014) y 0.2 mg L^{-1} que determinó la United Phosphorus of Colombia Limited (2015). Estos resultados muestran que *D. pulicaria* es más sensible al piretroide que *D. magna*, además es probable que la variación en las características fisicoquímicas del agua que abastece al reactor esté afectando la sobrevivencia de las neonatas.

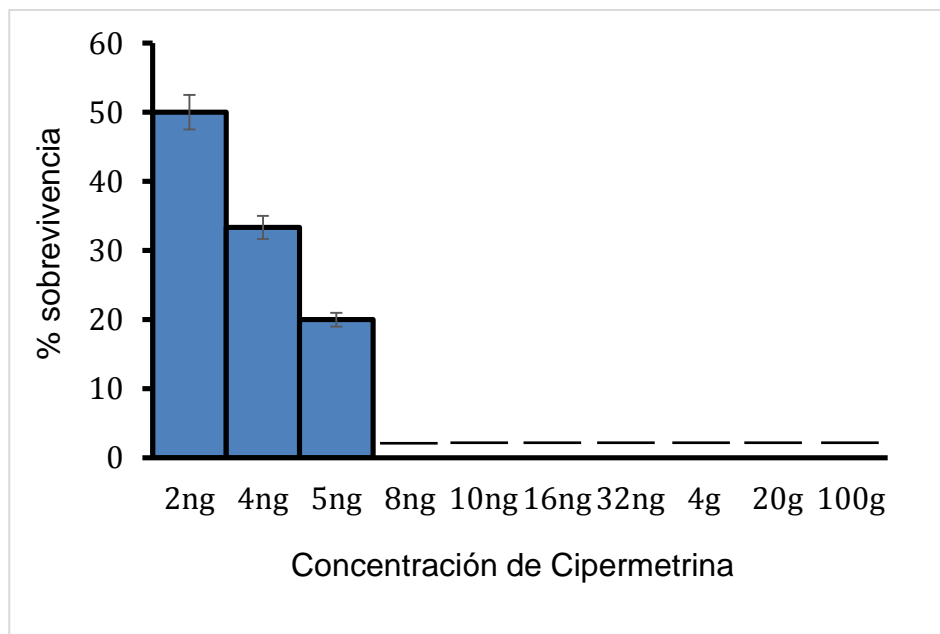


Figura 6. Porcentaje de sobrevivencia de neonatos de *Daphnia pulicaria* expuestos a agua contaminada con diferentes concentraciones Cipermetrina y tratada en reactor CAVOXD.

9.2 Efecto de CAVOXD en la toxicidad de cipermetrina y en la sobrevivencia de *Daphnia pulicaria*

Para determinar la disminución de la toxicidad del agua con cipermetrina en la sobrevivencia de *Daphnia pulicaria*, el tiempo cero se descartó debido que el reactor no cuenta con un sistema de homogenización previo al pase de la cavitación hidrodinámica. La primera lectura de sobrevivencia se registró a los 4 min, tiempo que el reactor homogenizó el agua. Los resultados muestran que al incrementar la concentración de cipermetrina en el agua que pasa por el reactor se incrementó la mortalidad de *Daphnia pulicaria* (Figura 16). A 10 ng L⁻¹ de cipermetrina la sobrevivencia en el cladóceros es dependiente del tiempo de tratamiento del agua en el reactor ($X^2=49.062$, gl=8 y p=0.000), a mayor tiempo en el reactor menos mortalidad (Figura 16.B). En el tiempo de 4 min en el reactor sobrevive el 80% y muere 20%, a los 15 y 30min la sobrevivencia es del 20% y a los 60min la sobrevivencia es del 100%. Ante 20 ng L⁻¹ del piretroide se encontró que la tasa de mortalidad fue constante e independiente del tiempo ($X^2=0.952$, gl=3 y p=0.8128; Figura 16.C). La mortalidad se encontró entre el 60 % y el 80 %. En la concentración más alta de cipermetrina (4 gL⁻¹) se

presentó una tasa de mortalidad del 100 % ($X^2=0.000$, $gl=4$ y $p=1.000$) en todos los tiempos (Figura 16.D).

La toxicidad de cipermetrina en *Daphnia pulicaria* se observó como un incremento en la mortandad ante el piretroide, estrechamente relacionada con el tiempo de tratamiento del agua en el reactor. Ante 10 ng L^{-1} se registró un incremento en la sobrevivencia, proporcional al tiempo de tratamiento en el reactor. Mientras que para 20 ng L^{-1} no se encontró un cambio significativo, pero se registró sobrevivencia en los diferentes tiempos de tratamiento del agua en el reactor. Al parecer la concentración de 4 gL^{-1} de cipermetrina supera la capacidad del reactor CAVOXD para tratar el agua. Se puede considerar que el mejor funcionamiento del reactor fue en las concentraciones $< 20 \text{ ng L}^{-1}$ donde la sobrevivencia de *Daphnia pulicaria* es superior al 60 % en algunos tiempos de tratamiento del agua, pero nunca del 100 % como en el control sin cipermetrina. Aun cuando las *Daphnias* fueron aclimatadas con el agua potable que abastece al reactor, es probable que el incremento en mortandad de los dáfidos durante su ciclo de vida se deba a los cambios de las propiedades fisicoquímicas del agua y las posibles concentraciones traza del piretroide.

La baja sobrevivencia registrada en los primeros tratamientos de agua con menor tiempo en el reactor puede atribuirse a que la homogenización y disolución de la cipermetrina es difícil de completar en el reactor con una gran cantidad de agua, por tanto, el sistema no presentó una concentración constante del plaguicida. Además, la disminución de sobrevivencia de los cladóceros parece estar estrechamente relacionada con la madurez reproductiva; lo que sugiere una estrategia evasiva a las limitaciones fisicoquímicas del agua para lograr reproducirse.

Por otro lado, los resultados en esta investigación coinciden a los reportados por Martínez-López (2006), que expusieron a *Daphnia magna* a concentraciones crecientes de cipermetrina (0.70 a 5.10 ugL^{-1}), y encontraron una sobrevivencia máxima de 20 %, ante la concentración más alta del piretroide. No se encontró bibliografía que relacione la eficiencia de los métodos de tratamiento de agua y el efecto de piretroides sobre Daphnidos, lo que indica la necesidad de investigaciones que incorporen los cladóceros como indicadores biológicos de la eficiencia de los métodos de tratamiento de cuerpos de agua para descartar la posible presencia del plaguicida o su posible transformación a sustancias contaminantes emergente (químico o material que se presenta como un amenaza potencial o real para la

salud humana y/o medioambiental o para los que existe una falta de normas vigentes de salud (USEPA, 2008).

Las pruebas de sobrevivencia de *Daphnia pulex* a las 48 horas de exposición a la cipermetrina muestra que es un indicador biológico sensible y útil en la evaluación de procesos de tratamiento de agua.

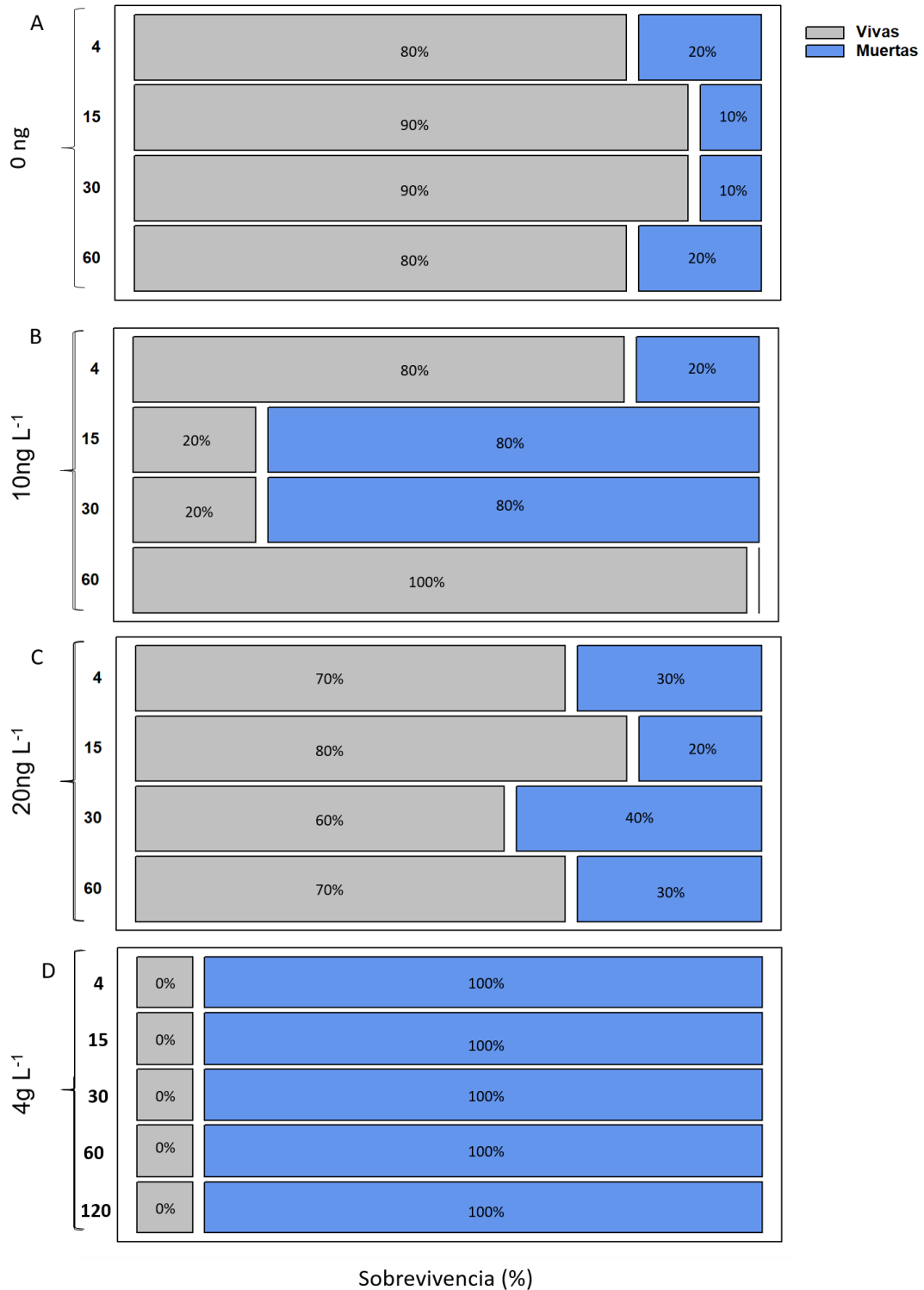


Figura 16. Porcentaje de sobrevivencia de *Daphnia pulicaria* después de la exposición a agua contaminada con diferentes concentraciones Cipermetrina y tratada en reactor CAVOXD. La barra horizontal equivale al 100 % de la población de cada tratamiento (n=10). A; Corresponde al control sin cipermetrina. B; Sobrevivencia de los individuos al tratamiento de 10 ng L⁻¹. C; Concentración inicial de 20ng L⁻¹. D; Corresponde a 4 g L⁻¹.

9.3 Efecto de CAVOXD en la reproducción de *Daphnia pulicaria*

Sólo se evaluó 20 ngL⁻¹ ya que las demás concentraciones iniciales de cipermetrina no fueron concluyentes para esta variable. La concentración de 10 ngL⁻¹ no tuvo diferencias entre el control con cipermetrina (sin tratamiento en el reactor) y el control sin cipermetrina, probablemente debido a que el mínimo de agua para el funcionamiento del reactor (500 L) con una cantidad tan pequeña del piretroide diluyó su efecto hasta volverlo imperceptible. Con la concentración de 4 g L⁻¹ no se halló reproducción alguna debido a la mortandad de los individuos expuestos.

El control negativo mostró reproducción igual a cero en todos los tiempos evaluados. Los resultados de los parámetros de reproducción del control sin cipermetrina muestran que cada hembra tuvo en promedio un total de cinco camadas, el número de hijas varió entre 11 y 21 por camada (15 neonatos en promedio). El tamaño de muestra de dónde se obtuvo el promedio de reproducción en los tratamientos disminuyó enormemente debido a que varias de las hembras sobrevivientes morían antes de llegar a la etapa de reproducción. La Figura 17, muestra la toxicidad del piretroide sobre el número total de hijas al tiempo cero que, comparadas con su análogo tratamiento sin cipermetrina, disminuyó hasta un 75.5 % la capacidad de reproducción de *Daphnia pulicaria* (n>3). Suponiendo al número de hijas del control como la capacidad de reproducción al 100 %, conforme incrementó el tiempo de tratamiento del agua por el reactor CAVOXD, las *Daphnias* que lograron sobrevivir a la exposición de cipermetrina recuperaron la capacidad de reproducirse hasta un 45 y 50 % a los 4 y 30 minutos de exposición, respectivamente; con respecto al tiempo cero. Aun cuando los individuos expuestos a cipermetrina aumentan la reproducción al incrementarse el tiempo de tratamiento del agua en CAVOXD, no alcanzan a tener la fertilidad del control.

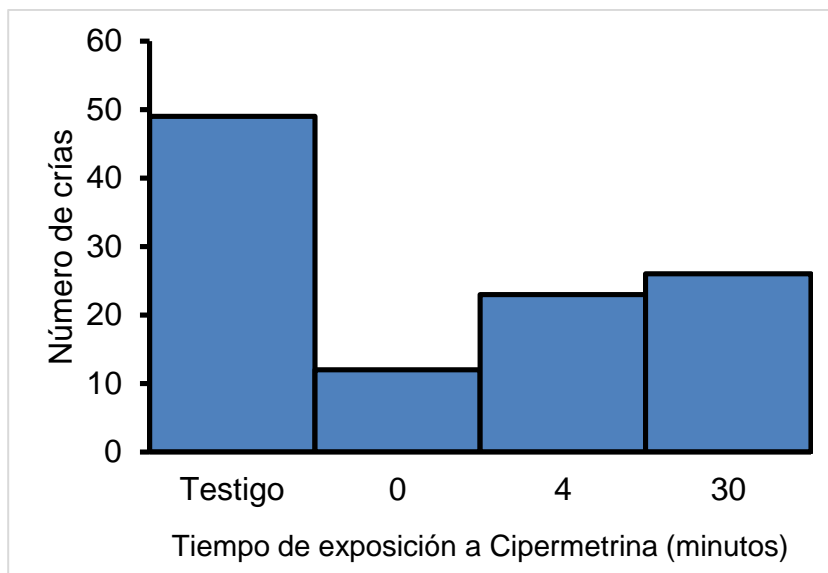


Figura 17. Número total de crías de *Daphnia pulicaria* sobrevivientes que lograron reproducirse después de la exposición a agua contaminada con diferentes concentraciones de Cipermetrina y tratada en reactor CAVOXD.

La toxicidad de Cipermetrina en agua tratada con CAVOXD disminuyó significativamente (75.5 %) la capacidad de reproducción de *D. pulicaria* en comparación con el control. Los individuos que lograron sobrevivir y tener éxito reproductivo representó menos del 10 %. Al incrementar el tiempo de tratamiento del agua en el reactor, la capacidad de reproducción se vio favorecida. Aun cuando no se obtuvo nuevamente un número de crías similar al control, se logró duplicar el número de hijas en el tiempo 60 del que se tuvo en tiempo 0 de tratamiento. Estos resultados muestran que el efecto toxicológico de la cipermetrina fue limitar la capacidad de reproducción de los cladóceros. También se puede afirmar que hay un ligero incremento en la variable por el tratamiento del agua en el reactor CAVOXD comparado con los testigos de exposición completa a cipermetrina, sin embargo, aún falta mejorar el proceso para eliminar el efecto toxicológico sobre la reproducción. Ronco et al. (2004), indican que los ensayos biológicos diagnostican bajo condiciones específicas y controladas los efectos físicos y químicos de los plaguicidas sobre los organismos prueba.

Vasela y Vijverberg (2007), reporta que el Zn induce especímenes de Daphnidos más pequeños, y como se observó en las pruebas fisicoquímicas, la presencia de cipermetrina indujo un incremento en los niveles de Zn, lo que pudo haber retrasado que los Daphnidos

alcanzarán la etapa de reproducción. Esto puede estar relacionado a que el sistema nervioso de los Daphnidos es muy especializado, por tanto, fue muy sensible al mecanismo de acción del piretroide sobre la transmisión del impulso nervioso, ya sea por inhibición de la acetilcolinesterasa o por la interrupción del impulso a través del axón (Stenersen, 2004). Por lo que sería recomendable que para medir los efectos de piretroides en la reproducción de daphnidos se contemplen diferentes dosis a las evaluadas, incluyendo *Daphnia pulicaria* como espécimen sensible.

9.4 Efecto de CAVOXD en la longevidad de *Daphnia pulicaria*

De la misma forma que en la reproducción se logró evaluar solamente la concentración de 20 ng L⁻¹. La longevidad de los individuos sobrevivientes de los diferentes tratamientos se comparó con el promedio de los controles sin cipermetrina que tuvieron una vida media de 47 días. La Figura 18, muestra que *Daphnia pulicaria* disminuyó la longevidad en un 50 % en los tiempos de 30 y 60 min de tratamiento del agua en el reactor CAVOD; y hasta un 74 % en los tiempos más cortos (0 y 4 min), con respecto al control. Aun cuando el cladócero no presentó valores de longevidad igual al control (47 días), en ninguno de los tiempos de evaluación; sí presentó una longevidad más alta (23 días) en los tiempos más largos (30 y 60 min), en comparación al tiempo 0 y 4 min de tratamiento del agua en el reactor CAVOXD.

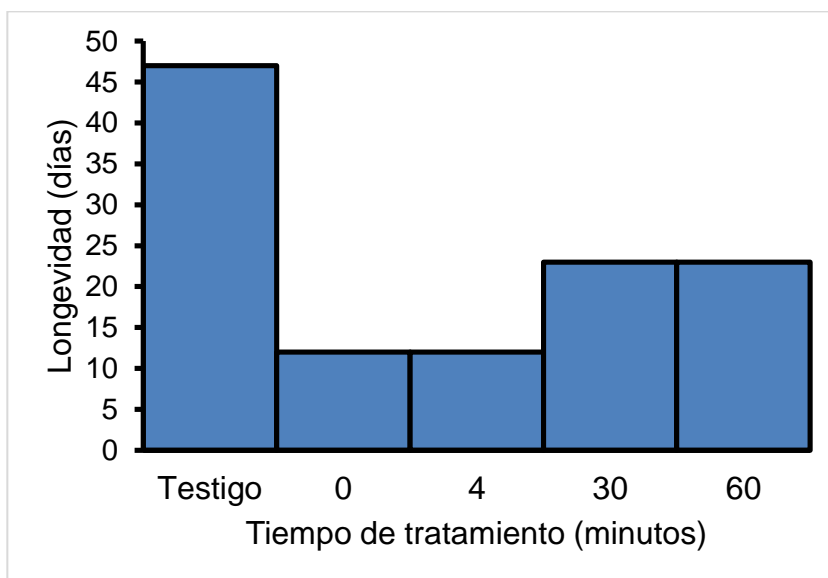


Figura 18. Longevidad de *Daphnia pulicaria* sobrevivientes en días comparadas con *Daphnias* testigos sin exposición al piretroide.

La longevidad de *Daphnia pulicaria* fue mayor a la reportada por Gandará et al. (2013), para *Daphnia magna* (12 días) alimentada con seston de tilapia roja (*Oreochromis* sp) y 0.2 g de fertilizante (15-15-15). Comparado con el trabajo de Zaldivar et al. (2018), donde no se encontraron diferencias significativas en la longevidad al tratar a *Daphnia pulicaria* con un láser de baja energía, el 30 % alcanzaron 42 días de vida (igualando al grupo control), se puede decir que esta *Daphnia* tiene mayor sensibilidad a la cipermetrina que al láser utilizado en este estudio.

Martínez-Jerónimo et al. (2013), expusieron a *Daphnia schoedleri* a α -Cipermetrina y encontraron como tendencia general que los parámetros (longevidad, sobrevivencia y reproducción) de la población se redujeron significativamente ($p < 0.05$). Además de que el promedio de vida se vio estadísticamente reducido ante concentraciones de 5.4 y 54 ng L⁻¹ de α -Cipermetrina. Los autores sugieren que los dáfidos estresados utilizan como estrategia la asignación de más reservas de energía a los descendientes, de forma similar puede ser la estrategia que describa la reducción de la longevidad de *Daphnia pulicaria* encontrada en esta investigación.

Los resultados de longevidad, reproducción y sobrevivencia de *Daphnia pulicaria* ante las concentraciones crecientes de Cipermetrina muestran que los tiempos de tratamiento del agua por el reactor CAVOXD no son completamente eficaces para disminuir el efecto toxicológico de la cipermetrina, pero si tienen una influencia en las variables. Es notoria la necesidad de evaluar el proceso de tratamiento del agua por el reactor para obtener agua con características recomendables para el uso humano o su descarga en efluentes naturales.

9.5 Efecto del tratamiento por el reactor CAVOXD en la calidad de agua

La calidad de agua reconstituida mostró cambios significativos con las diferentes concentraciones de cipermetrina y por el tiempo de tratamiento con el reactor CAVOXD (Tabla x). Se compararon los valores de cada variable con los de la “MODIFICACION a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización” así como con la NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, para determinar si el reactor mejoró la calidad en comparación a los límites

permisibles. En general, la evaluación del agua potable antes de ser tratada en el reactor CAVOXD mostró valores dentro del límite permisible para pH, zinc, dureza, nitratos y sólidos totales disueltos (dichos valores se mencionen en cada subsección por variable). Sin embargo, la calidad del agua cambió al ser tratada por el reactor en presencia de cipermetrina (10 ngL^{-1} y 4 gL^{-1}) y los tiempos de recirculación en el reactor. Los cambios en general mostraron que el contenido de Zn, dureza, sólidos suspendidos y turbidez del agua tuvo una tendencia de incremento proporcional al tiempo de tratamiento del agua, al pasar por el reactor CAVOXD en circuito cerrado.

pH: Se encontró que el tiempo de tratamiento en el reactor ($F=3.32$, $gl=4$, 44 y $p=0.0228$), la concentración ($F=146.55$, $gl=2$, 44 y $p=0.0000$) y la interacción de ambos factores ($F=11.84$, $gl=8,44$ y $p=0.0000$) tuvieron un efecto significativo en el pH (Fig. 11). En ausencia de cipermetrina se observa que al incrementar el tiempo de tratamiento del agua con el reactor el pH inicia en de 8 y finaliza en 8.2, probablemente debido a los radicales reactivos generados por el reactor; contrariamente, al agregar cipermetrina (10 ng L^{-1}) se presentó una ligera disminución de pH al en el tiempo de 15min de tratamiento de agua en el reactor. Esto puede significar que las reacciones de oxidación avanzada tienen efecto aumentando (ligeramente) el pH, pero la interacción con la cipermetrina lo disminuye, probablemente debido a que las piretrinas son ésteres ácidos. El pH es un parámetro que influye directamente en la supervivencia de los organismos acuáticos pudiendo causar la muerte (Guerrero-Jiménez et al., 2017). Aun cuando los valores de pH estuvieron dentro de los límites permisibles, que son de 6.5 a 8.5 para agua de uso y consumo humano y de 5 a 10 como agua residual tratada, el agua luego de pasar por el reactor presentó siempre valores dentro de los permisibles. Thorp y Covich (2010), reportan que el cladóceros (*D. magna*) puede soportar rangos de pH 4 a 10.

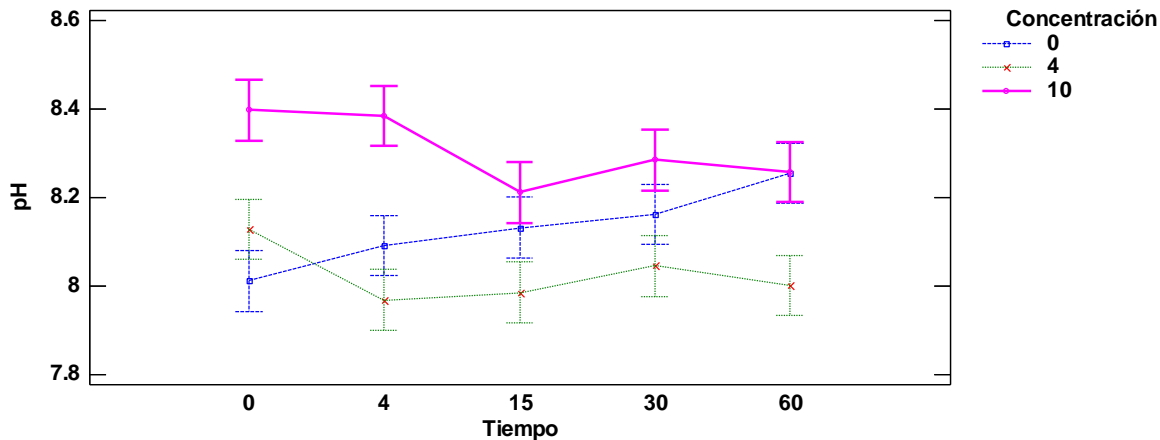


Figura 6. Comportamiento del pH de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD. (-□-) 0 (control); (-○) 10 ng L⁻¹; (-x-) 4 g L⁻¹.

Zinc: Se encontró que la concentración de cipermetrina ($F=70.29$, $gl=2$, 44 y $p=0.0000$) y la interacción con el factor tiempo ($F=5.90$, $gl=8$, 44 y $p=0.0001$) tuvieron un efecto estadísticamente significativo en el contenido del elemento. El tiempo de tratamiento ($F=1.81$, $gl=4$, 44 y $p=0.1536$) no tuvo un efecto significativo sobre el contenido de Zn. Conforme transcurre el tiempo de tratamiento del agua, no se modifica el contenido de Zn dentro de cada concentración (Figura 12). Las concentraciones de Zinc en el agua antes (0.01 mgL^{-1}) y después (0.03 mgL^{-1}) de pasar por el reactor estuvieron por debajo del límite permisible (5.0 mgL^{-1} y 10 mgL^{-1} respectivamente a cada norma). Estas concentraciones de Zn coinciden con la recomendada ($\leq 3 \text{ mL}^{-1}$) por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para agua con fines de consumo humano (Who, 2008). La SRHNA (2004) indica que la solubilidad de Zn en agua está en función del pH y de otras especies químicas presentes, y que el agua con pH cercano a 7 (como es el caso) el Zn es principalmente encontrado como ion libre y con bajas concentraciones como hidróxido o carbonato. El pH y el contenido de Zn en el agua tratada en el reactor CAVOXD pueden haber influido en las funciones del elemento en los neonatos de *Daphnia*, se conoce que el Zn interviene en la síntesis de aminoácidos y participa como catalizador enzimático. Además de ser fundamental en la síntesis de proteínas, sistemas de defensa y carácter estructural en las membranas, manteniendo la integridad de las mismas (Raimondo, 2007; Pechin, 2012).

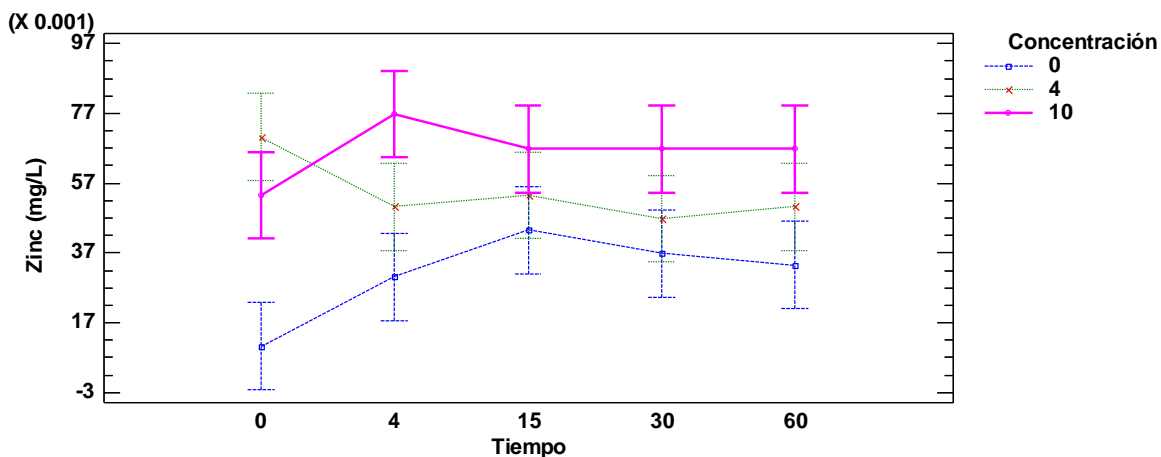


Figura 7. Comportamiento del Zinc (Zn) de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD. (-□-) 0 (control); (-○-) 10 ng L⁻¹; (-x-) 4 g L⁻¹.

Hierro (Fe): El contenido de Fe no mostró cambios significativos por el tiempo de tratamiento del agua ($F=1.43$, $gl=4$, 44 y $p=0.2488$) ni al interaccionar con la concentración ($F= 2.04$, $gl=8$, 44 y $p=0.0747$). Sin embargo, la presencia de la Cipermetrina ($F= 478.8$, $gl=2$, 44 y $p=0.000$) provocó cambios significativos sobre el Fe. La prueba de rangos múltiples mostró que el Fe se eleva significativamente con cipermetrina (10 ng L⁻¹), aunque es probable que sea debido también por las variaciones fisicoquímicas del agua de tubería. Mientras que con 4 g L⁻¹ y sin cipermetrina no hay diferencias en el contenido de Fe (Fig. 13). El contenido de Fe en el agua sin y con 4g L⁻¹ del piretroide al relacionarse con el tiempo en el reactor presentó valores por encima de los límites permitidos (0.3 mg L⁻¹) y del contenido de Zn. Estos resultados probablemente están relacionados con la interacción antagonista entre el Fe y el Zn cuando el sistema tiende ligeramente a la alcalinidad. El efecto antagonista Fe:Zn se ve reflejado cuando ambos elementos están en forma simultánea (Pechin, 2012).

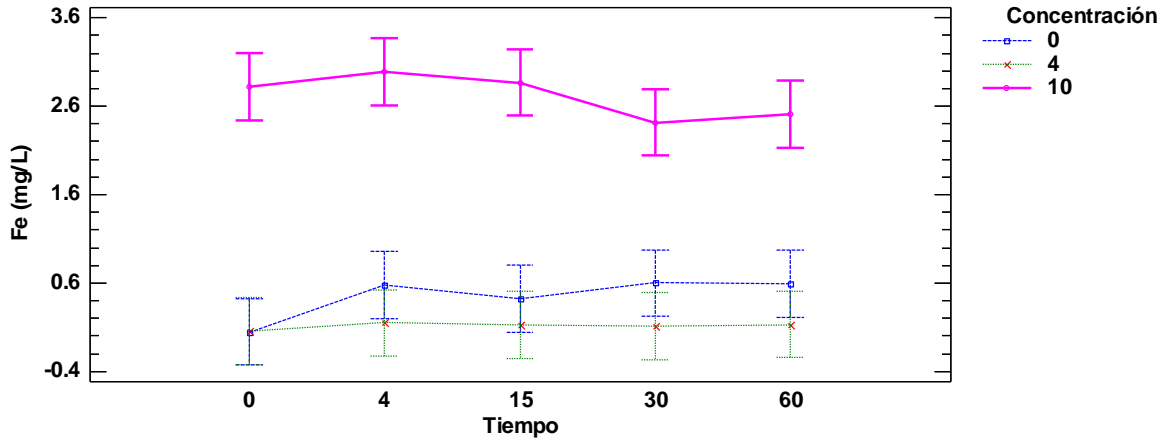


Figura 8. Comportamiento del Hierro (Fe) de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD. (-□-) 0 (control); (-○-) 10 ng L⁻¹; (-x-) 4 g L⁻¹.

Nitratos: El contenido de nitratos se modificó al agregar cipermetrina (Figura 14). Ante 10 ng L⁻¹ del piretroide se tuvo una disminución significativa de los nitratos. El tiempo ($F=41.25$, $gl=4$, 44 y $p=0.000$) y la concentración ($F=329.86$, $gl=2$, 44 y $p=0.000$) como factores individuales tuvieron un efecto significativo sobre la variable al igual que la interacción entre ellos ($F=33.58$, $gl=8$, 44 y $p=0.000$). Al agregar cipermetrina (10 ngL⁻¹) al agua se presentó un incremento en la concentración de nitratos, sin embargo, el tiempo de tratamiento del agua en el reactor disminuyó los nitratos significativamente (Figura 8). El contenido de nitratos (NO₃⁻) no sobrepasaron los niveles señalados por las normas, sin embargo, ante 10 ngL⁻¹ de cipermetrina en los tiempos más cortos estuvieron cercanos al límite permisible (50 mgL⁻¹), probablemente el reactor aún no generaba radicales suficientes para su oxidación. Mientras que, al aumentar el tiempo de tratamiento del agua en el reactor los nitratos disminuyeron. La OMS indica que el alto contenido de nitratos en agua puede generar problemas de salud. La concentración de cipermetrina total para agua residual para la protección de la vida acuática no debe exceder de 25 mgL⁻¹ partes por millón. El nivel máximo tolerable de nitratos en las aguas para consumo humano es de 50 mgL⁻¹ y el nivel orientador de calidad es de 25 mgL⁻¹. La mayoría de las aguas envasadas tienen menos de 15 mgL⁻¹ y ninguna supera los 30 mgL⁻¹ (Vitoria et al., 1991; Caballero-Mesa et al., 2003).

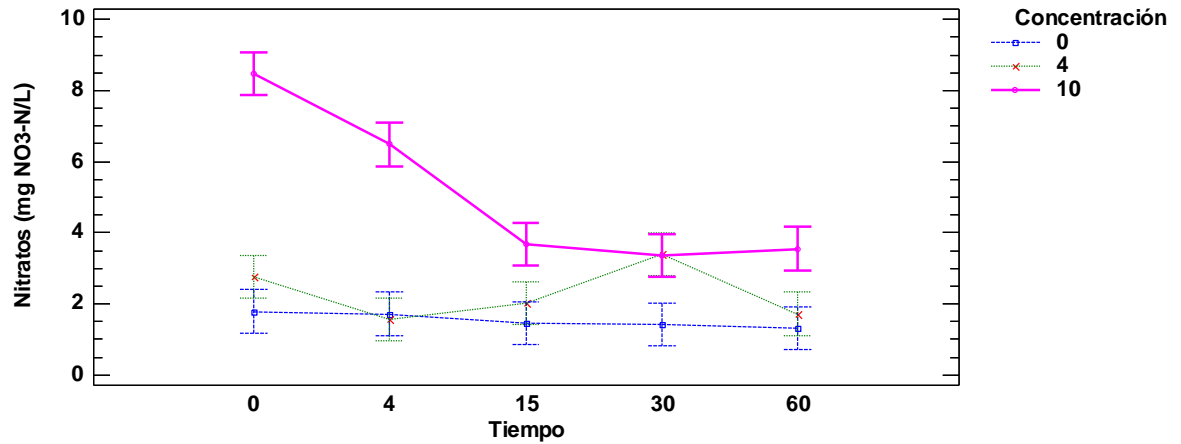


Figura 9. Comportamiento de Nitratos de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD. (-□-) 0 (control); (-○-) 10 ng L⁻¹; (-x-) 4 g L⁻¹.

Dureza: Los resultados muestran que la concentración de cipermetrina ($F=150.43$, $gl=2$, 44 y $p=0.0000$) y la interacción con el tiempo de tratamiento ($F=2.55$, $gl=8$, 44 y $p=0.0302$) tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre la dureza del agua tratada con el reactor CAVOXD. El tiempo de tratamiento ($F=2.08$, $gl=4$, 44 y $p=0.1079$) no tuvo un efecto significativo en la dureza del agua. La Figura 15, muestra que cuando hay cipermetrina disuelta en el agua disminuye la dureza desde el primer ciclo de recirculación en el reactor. Mientras que, el tiempo de tratamiento en el reactor no parece afectar la dureza del agua dentro de cada concentración. Los valores de la Dureza del agua no superaron los límites permisibles (160 a 180 mg CaCO₃ L⁻¹). Sin embargo, mostraron una ligera tendencia al incremento antes y después de pasar por el reactor (94 y 79 mg CaCO₃ L⁻¹, respectivamente), así como con el incremento en concentración de cipermetrina. Estos resultados muestran que el agua corresponde a un agua denominada “blanda”, que indica una baja concentración de compuestos minerales (Bicarbonato de Calcio, Magnesio o Hierro) que hay en una determinada cantidad de agua, en particular sales de magnesio y calcio. El agua blanda tiene la calidad para ser utilizada en actividades humanas como el uso en electrodomésticos (Julian-Soto, 2010).

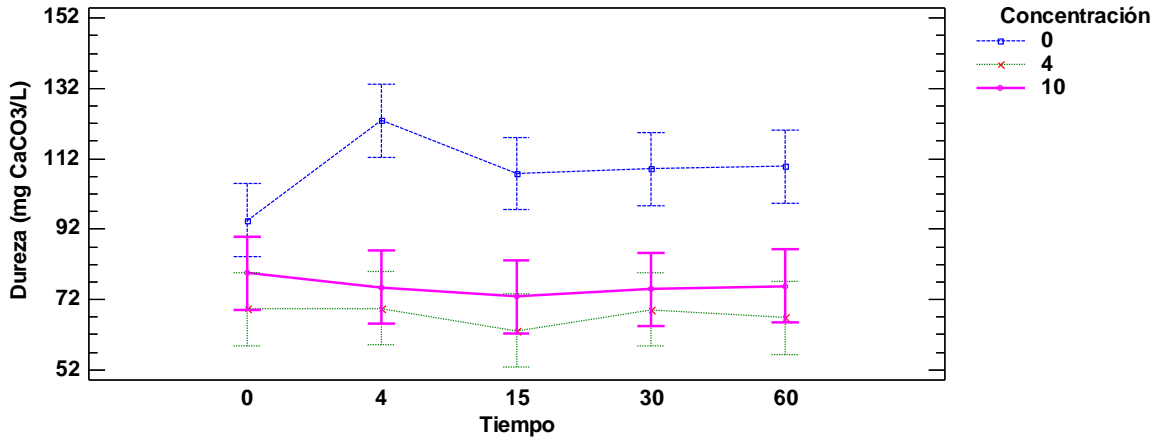


Figura 10. Comportamiento de la Dureza de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD. (-□-) 0 (control); (-○-) 10 ng L⁻¹; (-x-) 4 g L⁻¹.

Turbidez: La concentración inicial de cipermetrina ($F=59.16$, $gl=2$, 44 y $p=0.000$), el tiempo ($F=15.47$, $gl=4$, 44 y $p=0.000$) y la interacción con el tiempo de tratamiento del agua ($F\text{-Radio}=7.04$, $gl=8$, 44 y $p=0.000$) tuvieron un efecto significativo sobre la Turbidez. La Figura 16, muestra que el incremento de la Turbidez del agua es directamente proporcional en el tiempo 0 hasta los 30 minutos en el reactor y el aumento de concentración de cipermetrina (0 y 4 g L⁻¹). Aunque las variables de Turbidez y Sólidos Suspendidos no se evalúan dentro de los parámetros de la OMS ni de los estándares europeos, estos no mostraron cambios que pudieran ser perjudiciales para el consumo o para la reincorporación en efluentes naturales. Parecen tener pocas diferencias dentro de los tratamientos.

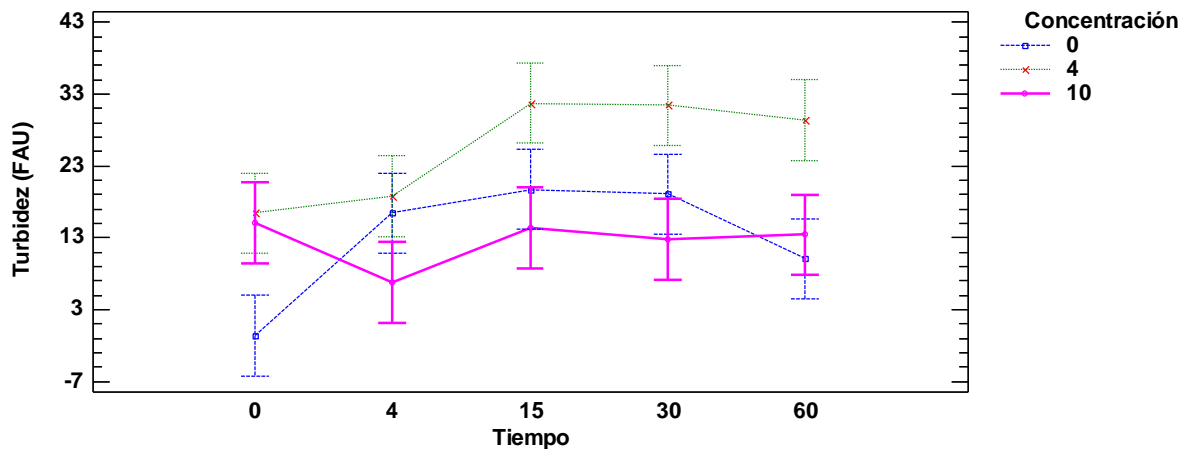


Figura 11. Comportamiento de la Turbidez de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD. (-□-) 0 (control); (-○-) 10 ng L⁻¹; (-x-) 4 g L⁻¹.

Conductividad: Se encontró que la concentración de cipermetrina ($F=1497.14$, $gl=2$, 44 y $p=0.0000$), el tiempo de tratamiento del agua ($F=31.04$, $gl=4$, 44 y $p=0.0000$) y la interacción de ambos factores ($F=19.75$, $gl=8,44$ y $p=0.0000$) tuvieron un efecto significativo sobre la conductividad. Como se observa en la Figura 17, la conductividad es significativamente menor al agregar cualquier concentración de cipermetrina evaluada. La conductividad mostró ser inversamente proporcional a la adición de cipermetrina, esto puede ser debido a las características químicas de la cipermetrina, bajando la capacidad electrolítica del agua. Aun cuando el reactor también tiende a disminuir la conductividad esta variable se encontró por encima de la recomendada por la OMS ($250 \mu S/cm$) incluso luego de los 60min de tratamiento. Quizá el material altamente conductivo del reactor esté repercutiendo en la variable durante el proceso.

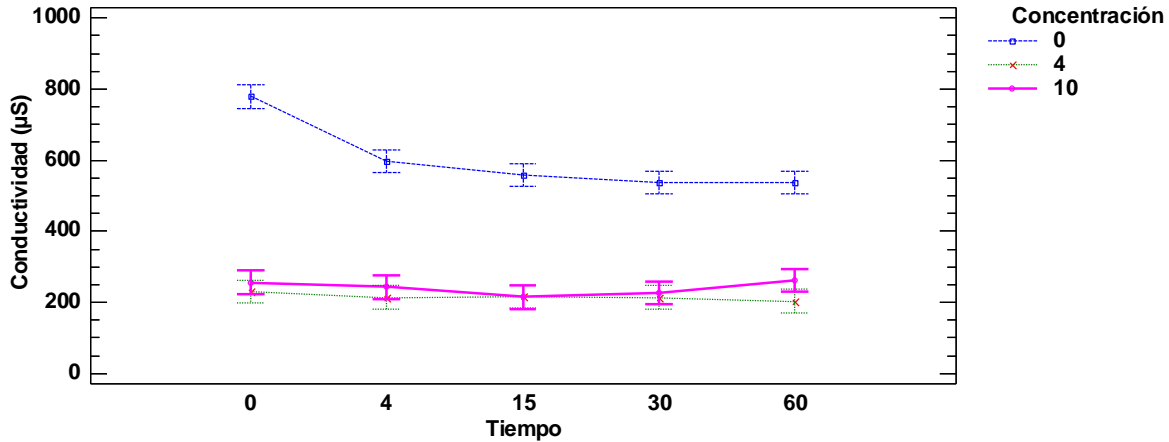


Figura 12. Comportamiento de la Conductividad de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD. (-□-) 0 (control); (-○-) 10 ng L⁻¹; (-x-) 4 g L⁻¹.

Sólidos Suspendidos: No hubo un efecto significativo del tiempo ($F=0.49$, $gl=4$, 44 y $p=0.7396$) y la concentración del piretroide ($F=1.40$, $gl=2$, 44 y $p=0.2634$), pero sí en la interacción de ambos ($F=6.21$, $gl=8$, 44 y $p=0.0001$). La prueba de rangos múltiples mostró que los Sólidos Suspendidos presentaron un contenido constante en las pruebas con cipermetrina, excepto a los 30 min y concentración de 4g L⁻¹ no significativo (Figura 18A).

Sólidos Totales Disueltos (TDS): La concentración de cipermetrina tuvo un efecto significativo sobre los TDS ($F=385.60$, $gl=2$, 44 y $p=0.0000$). El tiempo ($F=2.14$, $gl=4$, 44 y $p=0.1$) y la interacción del piretroide - tiempo de tratamiento ($F=1.38$, $gl=8,44$ y $p=0.2447$) no mostraron efecto significante para los TDS. La adición de cipermetrina al agua disminuyó significativamente la concentración de TDS en comparación al control (Figura 18B). Los Sólidos Totales Disueltos (TDS) presentaron niveles por debajo de los permisibles por las normas mexicanas, sin embargo, al agregar la cipermetrina al agua hay una tendencia a bajar aún más los niveles registrados. Estos resultados muestran la cipermetrina disminuye los TDS, que incluyen las sales, los minerales, los metales y el material particulado orgánico o inorgánico menor a 1,5 micras o que se disuelve en agua; además son una de las causas de turbidez y sedimentos en el agua, así como también pueden ser la causa de varias enfermedades (NMX-AA-034-SCFI-2015; Loayza, 2017).

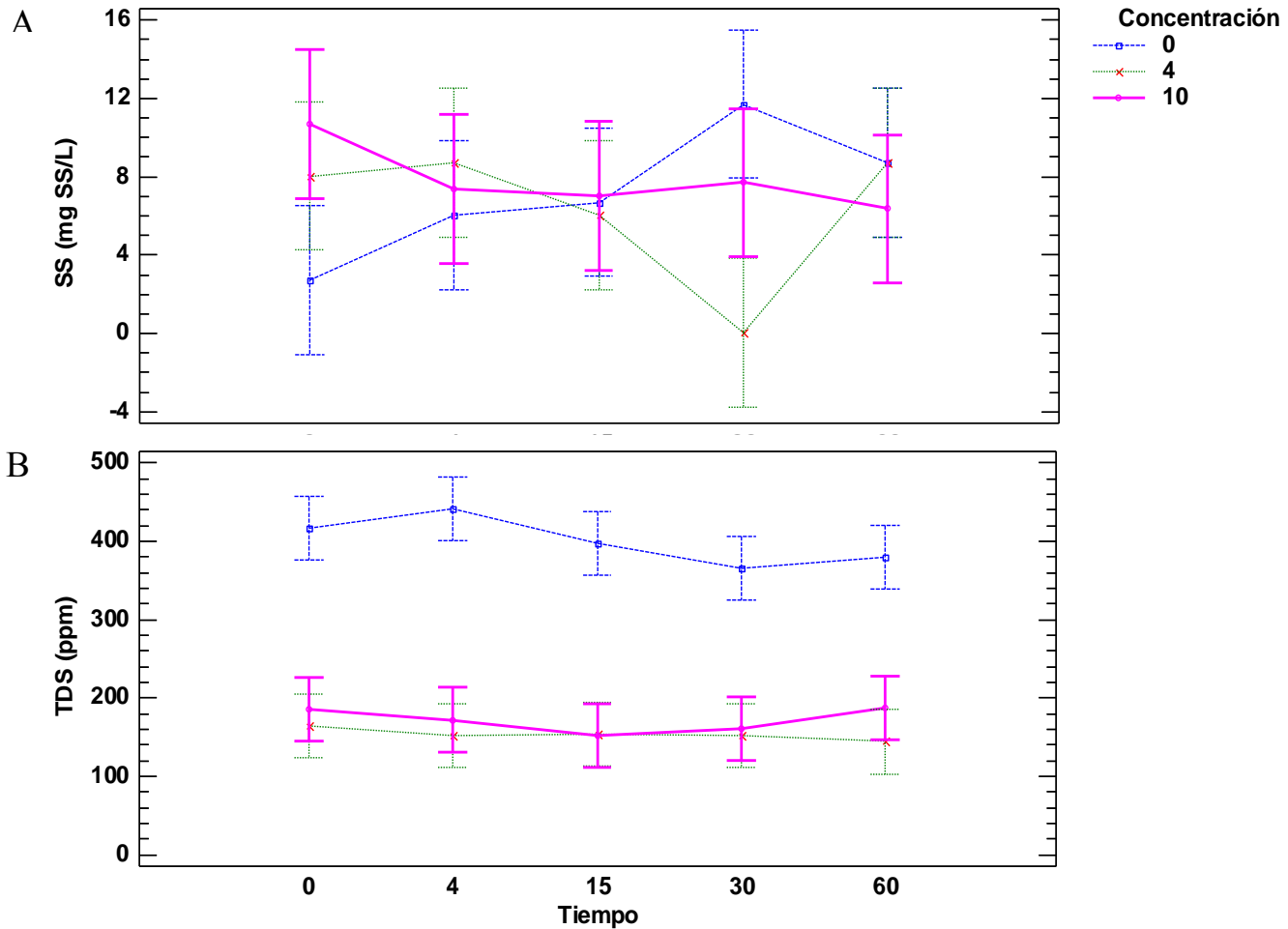


Figura 13. Comportamiento de Sólidos Suspendidos (A) y Sólidos Totales Disueltos (B) de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD. (-□-) 0 (control); (-○-) 10 ng L⁻¹; (-x-) 4 g L⁻¹.

Salinidad: La salinidad fue modificada significativamente por la concentración de la cipermetrina ($F=2404.1$, $gl=2$, 44 y $p=0.0000$), el tiempo de tratamiento del agua en el reactor CAVOXD ($F=47.79$, $gl=4$, 44 y $p=0.0000$) y la interacción de ambos factores ($F=33.49$, $gl=8$, 44 y $p=0.0000$). La Figura 19, muestra que las concentraciones de 10 ng L⁻¹ y 4 gL⁻¹ son significativamente menores al tratamiento control que no contiene cipermetrina. El reactor CAVOXD sin cipermetrina mostró ser efectivo reduciendo la salinidad de las aguas residuales.

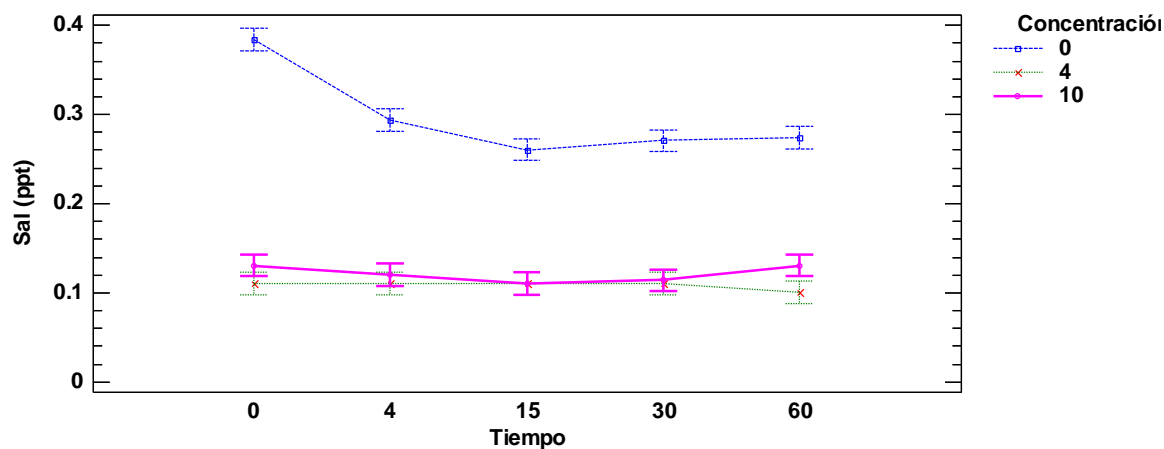


Figura 14. Comportamiento de Salinidad de las diferentes soluciones con cipermetrina expuestas a diferentes tiempos de tratamiento con el reactor CAVOXD. (-□-) 0 (control); (-○-) 10 ng L⁻¹; (-x-) 4 g L⁻¹.

La calidad del agua tratada por el reactor CAVOXD cambió al adicionar la cipermetrina y también se modificaron las características fisicoquímicas durante el tiempo de tratamiento en el reactor CAVOXD. El contenido de cloro en el agua se determinó únicamente en el agua dura reconstituida como referencia, y no mostró variación en contenido (0.0 mg Cl₂ L⁻¹) en ninguno de los tiempos de tratamiento por el reactor CAVOXD evaluados. De manera general, se observó que la turbidez mostró una tendencia al incremento conforme se incrementó el tiempo de tratamiento y el agua pasó por el reactor CAVOXD, en un circuito cerrado. De esta misma manera, los nitratos y la Salinidad disminuyeron conforme el tiempo de tratamiento en el reactor, estas variables son de importancia en la evaluación del agua y su cambio refleja un adecuado proceso de desinfección y una mejora en la calidad de la misma. Se encontraron valores por encima de los permisibles solo para conductividad.

En general, se puede considerar que el tratamiento del agua por el reactor CAVOXD tuvo buenos resultados sobre las variables fisicoquímicas de calidad del agua. Sin embargo, no se debe descartar el análisis de la interacción de los componentes físicos y químicos del agua con la cipermetrina. Así como la posible transformación del piretroide en algún compuesto contaminante persistente, que pudiera generar toxicidad en los organismos. Los piretroides sufren transformaciones al entrar en contacto con el agua que pueden ser químicas (isomerización, hidrólisis, fotólisis) o biológicas (por acción de microorganismos), que pueden llevar a metabolitos más o menos tóxicos que el compuesto original, estas

transformaciones dependen del pH, temperatura y salinidad del medio (Ferrero et al., 2001). Se podría descartar que el piretroide actúe como un agente coagulante, por ser una sal metálica, pero existe la posibilidad que actúe como agente floculante, ya que ejerció influencia en el pH, aunque el tamaño de la molécula contradice esta especulación. Por otro lado, los datos de los análisis fisicoquímicos determinados muestran que la calidad del agua es adecuada para el uso doméstico y/o su liberación en aguas y bienes nacionales, cayendo dentro de los indicados en las Normas Mexicanas. Además, ayudan para corroborar que la mortandad de los cladóceros se debió a la posible presencia de residuos de la cipermetrina disuelta en el agua, aún después de haber sido tratada por el reactor CAVOXD y no por valores extremos de pH, conductividad, Total de sólidos disueltos. De acuerdo con Samboni et al. (2007) y Torres et al. (2009), determinar la calidad de agua permite conocer: 1) la variación espacial y temporal de la calidad del agua, 2) expresa la importancia de los datos generados en el laboratorio, 3) favorece una fácil interpretación de los datos, 4) pueden identificarse tendencias de calidad del agua y áreas problemáticas y, 5) permiten priorizar evaluaciones de calidad del agua más detalladas. Finalmente, se debe considerar que posteriores estudios deben considerar mejorar el sistema y funcionamiento del reactor para eliminar y validar la cavitación hidrodinámica como un método de eliminación de la cipermetrina, así como la formación de los llamados contaminantes emergentes.

X. CONCLUSIONES

La dosis letal 50 (DL₅₀) de cipermetrina para las neonatas de *Daphnia pulicaria* fue de 2 ng L⁻¹. Las pruebas de toxicidad y la DL₅₀ del piretroide sugieren que la muerte de las neonatas en los bioensayos puede ser causa de restos de cipermetrina. Lo anterior, evidencia a *Daphnia pulicaria* como un buen bioindicador de la calidad del agua tratada en el reactor CAVOXD, porque cumple con todos los atributos como especie bioindicadora e idónea para utilizarse en ambientes tropicales, subtropicales y de alta montaña. Entre las características descritas por Ronco et al. (2004) para especies bioindicadoras idóneas, *D. pulicaria* presenta las de ser abundante, muy sensible al medio de vida, fácil y rápida de identificar, bien estudiada en su ecología y ciclo biológico, y con poca movilidad.

Se concluye que la cavitación hidrodinámica originada en el reactor CAVOXD no es suficiente para eliminar completamente el efecto toxicológico de las moléculas de

cipermetrina sobre *Daphnia pulicaria* en las concentraciones y tiempos de operación utilizados en el diseño experimental de este trabajo. No se encontró diferencias significativas en la sobrevivencia de los *Daphnidos* en los tratamientos con el reactor.

La hipótesis planteada “Los efectos toxicológicos de la cipermetrina sobre *Daphnia pulicaria* disminuyen en función del tiempo al tratar el agua por un método de cavitación hidrodinámica”, se ACEPTA para las variables de longevidad, mortalidad y reproducción. Aun cuando la F_0 de cladóceros expuestos durante 48 horas a Cipermetrina no recuperaron los valores de los *Daphnidos* no expuestos al piretroide (control).

En específico A 10 ng L^{-1} de cipermetrina la sobrevivencia en el cladóceros es dependiente del tiempo de tratamiento del agua en el reactor, a mayor tiempo en el reactor menos mortalidad. Esta hipótesis se rechaza para las concentraciones de cipermetrina superiores a 20 ng L^{-1} .

De manera general, se observó, que el pH, contenido de Zn y turbidez mostraron una tendencia al incremento conforme se incrementó el tiempo de tratamiento y el agua pasó por el reactor CAVOXD, en un circuito cerrado. De esta misma manera, la Dureza, los Nitratos, la Conductividad, TDS y la Salinidad disminuyeron conforme el tiempo de tratamiento en el reactor

La calidad Físicoquímica del agua después del tratamiento con CAVOXD es adecuada para el uso doméstico y/o su liberación en aguas y bienes nacionales, cayendo dentro de los indicados en las Normas Mexicanas.

Existe un gran campo de estudio en el desarrollo de tecnologías de cavitación hidrodinámica para la limpieza de aguas residuales, como su eficiencia con otros contaminantes y su empleo a grandes escalas.

XI. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) (2003). Toxicological Review of Pyrethrins and Pyrethroids. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.
- Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) acerca de los contaminantes emergentes tales como éteres de difenilo polibromados (PBDEs) y bifenilos polibromados (PBBs), 2008.
- Aggarwal, P., Jamshed, N., Ekka, M., Imran, A. (2015). Suicidal poisoning with cypermethrin: A clinical dilemma in the emergency department. *Journal of emergencies, trauma, and shock*, 8(2), 123–125. doi:10.4103/0974-2700.145424
- Aldana-Madrid, M. L., Valdez-Hurtado, S., Vargas-Valdez, N. D., Salazar-Lopez, N. J., Silveira-Gramont, M. I., Loarca-Piña, F. G., ... Burgos-Hernández, A. (2008). Insecticide residues in stored grains in Sonora, Mexico: Quantification and toxicity testing. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80(2), 93–96. <https://doi.org/10.1007/s00128-007-9302-8>
- Aldana-Madrid M.L., Miller-Sears M. y Valenzuela-Quintanar A.I. (2008b). Preliminary research for the establishment of a monitoring program for pesticide residues of Mexico's foods focusing on those with irreversible chronic effects. UC MEXUS-CONACyT. Grant number: CN-07-55.
- Almazán García, C., Cantú Covarrubias, A., Vega Flores, A., Vázquez, G., Zeferino, Kunz, S., & Medellín Ledezma, A. (2004). Situación de la resistencia a la cipermetrina y diazinon en mosca del cuerno (*Haematobia irritans*) en Tamaulipas, México. *Veterinaria Mexico*, 35(3), 237–244.
- Bautista Cruz, A., Barra, J. E., Castillo, R. F. del, & Gutiérrez, C. (2008). La calidad del suelo y sus indicadores. *Revista Internacional del Trabajo*, 127(1), 1–221. <https://doi.org/10.1111/j.1564-9148.2008.00030.x>
- Benítez-Díaz, P., & Miranda-Contreras, L. (2013). Contaminación de aguas superficiales por residuos de plaguicidas en Venezuela y otros países de latinoamérica. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 29(SPEC.ISSUE), 7–23.
- Benito, Y.; Arrojo, S. (2005). Hydrodynamic cavitation as a low-cost AOP wastewater

- treatment. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, vol. 80, pag. 495-503. UK.
- Bhan Singh, U., Singh Ahluwalia, A., & Jindal, R. (2013). Planktonic indicators: A promising tool for monitoring water quality (early-warning signals) Benthic fauna in relation to limnological factors of Chandigarh waters View project Impact of highrise building on natural resources View project. *Ecology, Environment and Conservatio*, (January), 793–800. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/261983329>
- Biga L. M., Blaustein A.R. (2013). Variations in lethal and sublethal effects of cypermethrin among aquatic stages and species of anuran amphibians. *Environ Toxicol Chem.* 32(12);2855-2860. Doi:10.1002/etc.2379
- Caballero-Mesa J. M., Rubio A. C., Hardisson A. (2003). Nitrate intake from drinking water on Tenerife Island (Spain). *Sci Total Environ.* 2003;302:85–92
- Carotenuto, Y., Wichard, T., Pohnert, G., Lampert, W. (2005) Life-history responses of *Daphnia pulex* to diets containing freshwater diatoms: Effects of nutritional quality versus polyunsaturated aldehydes. *Limnology and Oceanography*, 50(2), 449–454.
- Castillo Morales, G., Pica Granados, Y., Feola, G., Sánchez-Bain, A. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. Universidad de C. Castillo Morales, Ed. (Primera ed). México. <https://doi.org/10.15713/ins.mmj.3>
- CICOPLAFEST (2004). Catálogo Oficial de Plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. México, D.F. I-XI pp.
- Cortés-Genchi, A., G., V.-A., Aguilar-Madrid, M., Paz-Roman, M., Reducido, M., & Juárez-Pérez, C. A. (2008). Síntomas ocasionados por plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 46(2), 145–152.
- Costa, B. M., Guía, P., & Varas, G. B. (2001). *Desarrollo de formulaciones de pesticidas botánicos derivados de plantas endémicas de la V región*. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Del Puerto, A. M; Suarez Tamayo, S., Palacio, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Rev Cubana Hig Epidemiol* [online], vol.52, n.3, pp.372-387. ISSN 1561-3003.

- Devine G. J., Eza D., Ogusuku E., Furlong M. J. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 25(1);74-100.
- Dow AgroSciences de Colombia S.A. (2014). Hoja de Manejo Seguro: Cipermetrina.
- Edwards R., Millburn P., Hutson D. H. (1986). Comparative toxicity of cis-cypermethrin in Rainbow Trout, Frog, Mouse and Quail. *Toxicol Appl Pharm*. 84;512-522.
- Elías-Gutiérrez, M., Suárez-Morales, E., Gutiérrez-Aguirre, M. A., Silva-Briano, M., Ramírez, J., & Garfias-Espejo, T. (2008). *Cladocera y copepoda de las aguas continentales de México. Guía ilustrada*. (C. UNAM, ECOSUR, SEMARNAT-CONACYT, Ed.). DF, México. Recuperado de <http://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000046952>
- Espinoza-Navarro, O., Arriaza, C., Cereceda, C., & Bustos, H. R. (2014). Cypermethrin induced alterations on seminiferous tubules of dugesia gonocephala, macroinvertebrate from the Chilean Altiplano. *Interciencia*, 39(10), 718–722. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33943362005>
- Ferré, D. M., Ludueña, H. R., Romano, R. R., & Gorla, N. B. M. (2020). Evaluation of the genotoxic potential of cypermethrin, chlorpyrifos and their subsequent mixture, on cultured bovine lymphocytes. *Chemosphere*, 243. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125341>
- Ferrero, A., Gutiérrez, M., Cervellini P. (2001). Evaluación en laboratorio de la toxicidad aguda de los insecticidas malatión y deltametrina en *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). *Investigaciones marinas*. 29(1) p: 107-111 Published by Escuela de Ciencias del Mar. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
- Gándara, M., Leite, R., Caraballo, P. (2013). HISTORIA DE VIDA DE *Daphnia magna* Y *Ceriodaphnia reticulata* EN CONDICIONES DE LABORATORIO: USO POTENCIAL COMO ALIMENTO PARA PECES. *Rev. Colombiana cienc. Anim*. 5(2):340-357,2013
- Garza, I., & Cervantes, P. (2015). Información Científica y Tecnológica Tendencia histórica del uso de plaguicidas en la producción agrícola de México. *Ciencia y mar*, 9, 67–74.
- González, V. M., Capote, & Rodríguez. (2001). Mortalidad por intoxicaciones agudas causadas por plaguicidas. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 39, 136–143.

- Greulich K., Pflugmacher S. (2003). Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquat Toxicol.* 65;329-336. Doi:10.1016/S0166-445X(03)00153-X
- Guerrero-Jiménez G., R. Rico-Martínez y M. Silva-Briano. 2017. Monitoreo de una planta tratadora de aguas residuales mediante pruebas de toxicidad aguda con el cladóceros *Daphnia magna* y el rotífero de agua dulce *Lecane quadridentata*. *Hidrobiológica* 27 (1): 87-92
- Guevara, S., Arallano, O., & Fricke, J. (2014). Ríos tóxicos: Lerma y Atoyac. *Greenpeace*, 13.
- HACH MANUAL DE ANALISIS DE AGUA (2010a). Método 8204: Dureza de Calcio. Utilización del titulador digital con EDTA (10 a 4000 mg/l como CaCO₃). 123-127.
- HACH MANUAL DE ANALISIS DE AGUA (2010b). Método 8192: Cadmium Reduction Method: For water, wastewater, and seawater. 443-448.
- HACH MANUAL DE ANALISIS DE AGUA (2010c). Método 8237: Attenuated Radiation Method (direct reading). Adapted from ISO Method 7027.853-855.
- HACH MANUAL DE ANALISIS DE AGUA (2010d). Método 8006: Photometric Method (Also called Nonfilterable Residue). Adapted from Sewage and Industrial Wastes, 31, 1159 (1959).
- Henao, B., Palacio, J. A., & Camargo, M. (2005). EVALUACIÓN GENOTÓXICA DE LOS PLAGUICIDAS CIPERMETRINA Y DIAZINÓN EN TILAPIA ROJA (*Oreochromis sp.*) GENOTOXIC EVALUATION OF PESTICIDES CYPERMETHRIN AND DIAZINON IN RED TILAPIA (*Oreochromis sp.*). *Actual Biol* (Vol. 27). Medellín (Antioquia), Colombia. Recuperado de <http://matematicas.udea.edu.co/~actubiol/actualidadesbiologicas/raba2005v27n82art5.pdf>
- Hernández-albiter, R. C., Bravo-luna, L., Corona-rangel, I. L., Villa-ayala, P., Bautista, S., Leticia, L.M. (2005). Caracterización Morfocultural y Sintomatológica de Dos Aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. de Papayo (*Carica papaya* L).
- IPCS. International Programme on Chemical Safety (1989). Cypermethrin. Environmental Health Criteria 82. Ginebra, Suiza. WHO.

- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). Gonzalez, C. A., Vallarino A., Perez, J. C., Low A. M. (2014). *Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental*. ISBN 978-607-8429-05-9.
- Julián-Soto F. (2010). La dureza del agua como indicador básico de la presencia de incrustaciones en instalaciones domésticas sanitarias. *Ingeniería Investigación y Tecnología*. 11(2). 2010 167-177, ISSN1405-7743
- Kamita, S. G., Kang, K. D., Inceoglu, B., Hammock, B. D. (2017). Genetically Modified Baculoviruses for Pest Insect Control. *Comprehensive Molecular Insect Science.*, 6.
- Kolaczinski, J. H., Curtis, C. F. (2004). Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: A review of the debate. *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.12.008>
- Knisel, W.G. (Ed.). (1993). *Groundwater Loading Effects of Agricultural Management Systems*. (Version 2.10). [Online]. Tifton, Georgia: United States Department of Agriculture Agricultural Research Service. [Online]. <http://www.arsusda.gov/rsml/ppdb.html>
- Lijteroff, R., Lima, L., & Prieri, B. (2009). Uso de líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica en la ciudad de San Luis, Argentina, 25(2), 111–120.
- Loayza, A. (2017). Análisis de la dosificación de coagulantes por efectos de la turbidez en el tratamiento de agua potable de la Planta de Sedam Huancayo. Tesis para optar el título de Ingeniero Ambiental, Escuela Académico Profesional de Ingeniería Ambiental, Universidad Continental, Huancayo, Perú.
- Madeley, J. (2002). *Paraquat el controvertido herbicida de Sygenta. Informe para Berne Declaration. Foro Amaús*. San José, Costa Rica.
- Markert, B. A., Breure, A. M., & Zechmeister, H. G. (2003). *Bioindicators and Biomonitors* (6ta ed.). Langford: Elsevier.
- Martínez-Jerónimo F, Arzate-Cárdenas M, Ortiz-Butrón R. (2013). Linking sub-individual and population level toxicity effects in *Daphnia schoedleri* (Cladocera: Anomopoda) exposed to sublethal concentrations of the pesticide α -cypermethrin. *Ecotoxicology*. 22(6):985-95. doi: 10.1007/s10646-013-1077-6. Epub 2013 May 10.
- Martínez-Jerónimo, F., Espinosa-Chávez, F., & Villaseñor, R. (2000). Effect of culture

- volume and adult density on the neonate production of *Daphnia magna*, as a test organism for aquatic toxicity tests. *Environmental Toxicology*, 15(3), 155–159. [https://doi.org/10.1002/1522-7278\(2000\)15:3<155::AID-TOX1>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1522-7278(2000)15:3<155::AID-TOX1>3.0.CO;2-X)
- Martínez-Jerónimo, F., Rodríguez-Estrada, J., & Martínez-Jerónimo, L. (2008). *Daphnia exilis* HERRICK, 1895 (CRUSTACEA: CLADOCERA). Una especie zooplanctónica potencialmente utilizable como organismo de prueba en bioensayos de toxicidad aguda en ambientes tropicales y subtropicales. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 9(4), 39–51. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992008000400001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Martínez-Jerónimo, F., Villaseñor, R., Espinosa-Chávez, F., Ríos, G., Ramirez, R. (1997). Zoología Informa: Metodología para producción de neonatos de *Daphnia magna*. *Revista del departamento de Zoología*. p. 127 ISSN: 01882147
- Martínez-Lopez E., Romero, D., García-Fernández A. J., Hernández-García, A. (2006). Valoración de las alteraciones provocadas por diferentes agentes tóxicos sobre *Daphnia magna* a través de un ensayo "on line". *Revista de Toxicología* 23(2-3) p. 113-117
- Mendez Sanchez, J. F., Zaldivar Ortiz, F., Mandujano Rosas, L. Alejandra, Mulia Rodriguez, J., Paulin Fuentes, J. M., & Osorio Gonzalez, D. (2018). In vitro study of the Survival, Reproduction and Morphology of *Daphnia pulex* irradiated with a Low Energy Laser. *Journal of nuclear physics, material sciences, radiation and applications*. Recuperado de <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/98831>
- Meza, M., Moreno, E., Aldana, M., Silveira, M., Rodriguez, G., & Valenzuela, A. (2012). Pyrethroid analysis in soil and water of agricultural and urban areas of the valleys of Yaqui and Mayo. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 28(4), 303–310.
- Mian LS, Mulla MS. (1992). Effects of pyrethroid insecticides on nontarget invertebrates in aquatic ecosystems. *J Agric Entomol*. 9(2): 73-98.
- Mugni, H. D. (2008). *Concentración de nutrientes y toxicidad de pesticidas en aguas superficiales de cuencas rurales*. Universidad Nacional de La Plata. <https://doi.org/10.35537/10915/4410>
- NMX-AA-087-SCFI-2010 (2010). ANÁLISIS DE AGUA - EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA CON *Daphnia magna*, Straus (Crustacea - Cladocera).

Secretaría de Economía. p. 44

- Olijnyk, A. M. (2011). Genotypic differences and life-history trade-offs in the freshwater zooplankton, *Daphnia pulicaria*, under natural levels of food limitation. Tesis de Maestría, Queen's University, Ontario, Canada.
- Organización Mundial de la Salud. División Salud y Ambiente. Plaguicidas y salud en las Américas. Washington: OMS/OPS, 2001.
- Pajares Ortiz, M. S., Díaz Jiménez, J., Montero Rubio, J. C., Alberdi Odriozola, J. C., & Mirón Pérez, I. J. (1997). Daily mortality in the autonomous community of Madrid during the period 1986-1991 in the 45-64 age group: its relationship with temperature. *Revista Española de Salud Pública*, 71(2). <https://doi.org/10.1590/s1135-57271997000200006>
- Parmar, T. K., Rawtani, D., & Agrawal, Y. K. (2016). Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Science*, 9(2), 110–118. <https://doi.org/10.1080/21553769.2016.1162753>
- Pascual, J. A., Peris, S., Robredo, F. (1991). EFECTOS DE TRATAMIENTOS FORESTALES CON CIPERMETRINA y MALATION SOBRE EL EXITO DE CRIA DEL HERRERILLO COMUN (PARUS CAERULEUS). *Ecología*, 5, 359–374.
- Pechin, G. H. (2012). Absorción, metabolismo y homeostasis del zinc en los animales y el hombre. *Ciencia Veterinaria*. 14(1). ISSN: 1515-1883
- Pérez-Legaspi, I., Garatachia-Vargas, M., García-Villar, A., Rubio-Franchini, I., (2017). Evaluación de la sensibilidad del cladócero tropical *Ceriodaphnia cornuta* a metales pesados. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 33 (1) 49-56. DOI: 10.20937/RICA.2017.33.01.04
- Pinkston, K.E., Sedlak, D.L., (2004). Transformation of aromatic ether- and aminecontaining pharmaceuticals during chlorine disinfection. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4019–4025.
- Potter N, Hotchkiss J. (1995). *Ciencia de los alimentos*. 5 ed. Estados Unidos de América: Acribia.
- Raimondo, S., Montague, B. J., & Barron, M. G. (2007). DETERMINANTS OF VARIABILITY IN ACUTE TO CHRONIC TOXICITY RATIOS FOR AQUATIC INVERTEBRATES AND FISH. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(9), 2019. <https://doi.org/10.1897/07-069R.1>
- Ramírez-López, J. M., Ramírez-Marcial, N., Cortina-Villar, H. S., & Castillo-Santiago, M.

- Á. (2012). Ra Ximhai. *Ra Ximhai*, 8(4), 27–39.
- Robert M. Rice, & Robert J. Tierney. (2017). MOBILE ON-WING ENGINE WASHING AND WATER RECLAMATION SYSTEM.
- Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M. Á., Prados-Joya, G., & Ocampo-Pérez, R. (2013). Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.059>
- Rojas R. (2002). Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales. “GESTIÓN INTEGRAL DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES” (pp. 8–15). LIMA: OPS
- Ronco, A., Consuelo, M., Baez, D., & Granados, Y. P. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. (G. (Universidad de C. Castillo Morales, Ed.) (1ra ed.). Mexico: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- Samboni, N. E., Carvajal, Y., Escobar, J. C. (2007) Revisión de parámetros fisicoquímicos como indicadores de calidad y contaminación del agua. *Ing. Investig.* [online], 27(3), p.172-181. ISSN 0120-5609.
- Santamaria, E., & Marceló-Díaz, C. (2019). Toxic Activity of Pyrethroids in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Magdalena River Basin, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 24(2), 391–396. <https://doi.org/10.15446/abc.v24n2.74570>
- Sarıkaya R. (2009). Investigation of acute toxicity of alphacypermethrin on adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Turk J Fish Aquat Sci*;9:85-89.
- Smith T. M, Stratton G. W. (1986). Effects of synthetic pyrethroid insecticides on nontarget organisms. *Residue Rev.* 1986; 97: 93-120. 55.
- SRHNA (2004). Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a zinc. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, Argentina [en línea]. http://www.produccion-animal.com.ar/agua_bebida/26-zinc.pdf 02/01/2016.
- Stenersen, J., 2004. *Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology*, CRC Press, Boca Raton, 276 pp.
- Stiling, P., Guarracino, F., Cabrini, L., Baldassarri, R., Petronio, S., De Carlo, M., ... Ambrosino, N. (2012). *Ecology. Global Insights and Investigations. Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* (3ra ed., Vol. 294). New York.

<https://doi.org/10.1053/j.jvca.2010.06.032>

- Teijon, G., Candela, L., Tamoh, K., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A.R. (2010) Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain), *Science of The Total Environment*, 408(17), p. 3584-3595, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.041>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969710004377>)
- Thorp, J. H., & Covich, A. P. (2010). Ecology and classification of North American freshwater invertebrates. Academic Press. eBook ISBN: 9780080889818
- Torres-Vega, F. J. (2009). Desarrollo y aplicación de un índice de calidad de agua para ríos en Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüe. Department of Civil Engineering. <https://hdl.handle.net/20.500.11801/1753>
- UNIDO. Industrial Development Board (17th sess: 1983: Vienna) Report of the Industrial Development Board General Assembly. Official Records. Supplement. v, 52 p.
- United Phosphorus Cayman Limited and its Colombian Branch
- United States Environmental Protection Agency. USEPA. (1989). Cypermethrin Pesticide Fact Sheet. Washington, D.C.
- US General Accounting Office (GAO). (2001). Agricultural pesticides. Management improvements needed to further promote integrated pest management. Washington DC: GAO; 2001. GAO-01-815. Disponible en: <http://www.gao.gov/new.items/d01815.pdf>
- USEPA (1980a). Zincon Method Adapted from Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Federal Register, 45 (105) 36166 (May 29, 1980).
- USEPA (1980b). FerroVer Method (Powder Pillows or AccuVac Ampuls) wastewater analysis. Adapted from Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Federal Register, 45 (126) 43459 (June 27, 1980).
- USEPA. EPA's Report On The Environment (ROE) (2008 Final Report). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/R-07/045F (NTIS PB2008-112484), 2008.
- Vardavas, A. I., Stivaktakis, P. D., Tzatzarakis, M. N., Fragkiadaki, P., Vasilaki, F., Tzardi, M., ... Tsatsakis, A. M. (2016). Long-term exposure to cypermethrin and piperonyl butoxide cause liver and kidney inflammation and induce genotoxicity in New Zealand white male rabbits. *Food and Chemical Toxicology*, 94, 250–259.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.016>

- Vargas, A., Perea, YA. (2011). Determinación de la concentración letal media CL50-48 de bario e hidróxido de sodio, mediante bioensayos de toxicidad en un ecosistema, sobre *Daphnia magna*. Tesis de Licenciatura. Universidad de la Salle. Bogotá D.C.
- Vesela S. y Vijverberg J. (2007). Effect of body size on toxicity of zinc in neonates of four differently sized *Daphnia* specie. *Aquat Ecol* (2007) 41:67–73. DOI 10.1007/s10452-006-9050-6
- Venegas, L. J., Peredo, J. Q., Olivares, J. P. M., & Bustos, H. R. (2008). Effect of a Single Doses Intraperitoneal of Cypermethrin in Brain Somatosensory Area of Mice CF-1. *International Journal of Morphology*, 26(1), 19–26.
- Vitoria I, Brines J, Morales M, (1991). Nitratos en aguas de consumo público de la Comunidad Valenciana. Riesgo indirecto de metahemoglobinemia en lactantes. *An Esp Pediatr*. 1991;34:43–50.
- WHO (2008). Guidelines for drinking water quality. World Health Organization, Geneva.
- Yilmaz Ş., Çömelekoğlu Ü., Coşkun B., Balli E., Özge A. (2008). Effects of cypermethrin on isolated frog sciatic nerve: An ultrastructural study. *Turk J Med Sci*. 38(2);121- 125.
- Zaldivar, F., Montoya, J., Gonzalez, S., Mandujano, L., Mendez Sanchez, J., Romero, L., ... Gonzalez Osorio, D. (2018). In vitro Study of the Survival, Reproduction and Morphology of *Daphnia pulex* irradiated with a Low Energy Laser. *Journal of Nuclear Physics, Material Sciences, Radiation and Applications*. 6(1): 109-113. DOI: 10.15415/jnp.2018.61019

XII. ANEXOS

Cuadro 2. Preparación de soluciones stock para medio agua dura (NMX AA-087-SCFI2010).

Solución Stock	Reactivo	Preparación (g L ⁻¹)
1	Cloruro de calcio dihidratado (CaCl ₂ • 2 H ₂ O)	Disolver 11.76 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L
2	Sulfato de magnesio pentahidratado (MgSO ₄ • 5H ₂ O)	Disolver 4.93 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L
3	Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	Disolver 2.59 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L
4	Cloruro de potasio (KCl)	Disolver 0.23 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L
5	Selenito de sodio (Na ₂ SeO ₄)	Disolver 0.001 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 100 mL

Cuadro 3. Preparación de soluciones stock para medio Basal Bold para el cultivo de microalgas (NMX AA-087-SCFI2010).

Solución Stock	Reactivo	Peso (g)
1	Nitrato de sodio (NaNO ₃)	25,0
2	Cloruro de calcio di hidratado (CaCl ₂ • 2H ₂ O)	2,5
3	Sulfato de magnesio hepta hidratado (MgSO ₄ • 7H ₂ O)	7,5
4	Fosfato mono básico de potasio (KH ₂ PO ₄)	17;5
5	Fosfato di básico de potasio (K ₂ HPO ₄)	7,5
6	Cloruro de sodio (NaCl)	2,5
7	Sulfato ferroso hepta hidratado (FeSO ₄ • 7H ₂ O) + 100 µL de H ₂ SO ₄	0,498
8	Acido bórico (H ₃ BO ₃)	1,142

9	EDTA 5,0 Hidróxido de potasio (KOH)	3,1
10*	Sulfato de zinc hepta hidratado (ZnSO ₄ •7H ₂ O)	0,882
	Cloruro de manganeso tetra hidratado (MnCl ₂ •4H ₂ O)	0,144
	Oxido de molibdeno (MoO ₃)	0,071
	Sulfato de cobre penta hidratado (CuSO ₄ •5H ₂ O)	0,157
	Nitrato de cobalto hexa hidratado [Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O]	0,049

*Colocar uno por uno los reactivos en el orden señalado y aforar a 100 mL.

Cuadro 4. Análisis de agua tratada en diferentes tiempos (0, 4, 15, 30, 60 y 120 min) con el reactor CAVOXD, a diferentes concentraciones (0, 10 ng L⁻¹ y 4g L⁻¹) de cipermetrina. Se representa como C= Concentración de cipermetrina y T=Tiempo.

C	T	pH	Zinc (mg L ⁻¹)	Dureza (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	Nitratos (mg NO ₃ -N L ⁻¹)	SS (mg SS L ⁻¹)
0	0	8.01	0.01	94.3333	1.76667	2.66667
0	4	8.09	0.03	122.667	1.7	6
0	15	8.13	0.0433333	107.667	1.43333	6.66667
0	30	8.16	0.0366667	109	1.4	11.6667
0	60	8.25333	0.0333333	109.667	1.3	8.66667
Error estándar C₀		± 0.03994	± 0.002582	± 6.3421	± 0.15634	± 0.3944
10	0	8.39667	0.0533333	79.3333	8.46667	10.6667
10	4	8.38333	0.0766667	75.3333	6.46667	7.33333
10	15	8.21	0.0666667	72.6667	3.66667	7
10	30	8.28333	0.0666667	74.6667	3.33333	7.66667
10	60	8.25667	0.0666667	75.6667	3.53333	6.33333
Error estándar C₁₀		± 0.01598	± 0.003333	± 2.290	± 0.25905	± 2.07096
4	0	8.12667	0.07	69	2.73333	8
4	4	7.96667	0.05	69.3333	1.53333	8.66667
4	15	7.98333	0.0533333	63	2	6
4	30	8.04333	0.0466667	69	3.36667	-10.3333
4	60	8	0.05	66.6667	1.7	8.66667
4	120	8.22	0.0366667	66.6667	2.33333	13.3333
Error estándar C₄		± 0.01515	± 0.006667	± 1.5456	± 0.33939	± 2.24021
C	T					
0	0	Turbidez (FAU)	Fe (mg L⁻¹)	Conductividad (µS)	TDS (ppm)	Sal (ppt)

0	4	0	0.04	416.333	0.383333	777.667
0	15	16.3333	0.57	440.333	0.293333	595.333
0	30	19.6667	0.416667	396.333	0.26	555.667
0	60	19	0.593333	364.333	0.27	535.333
Error estándar C₀	± 0.881917	10	0.58 ±	378.333	0.273333	534.667
10		0	± 0.0542627	± 26.9167	± 0.007303	± 20.9947
10	4	15	2.81333	185	0.13	254.667
10	15	6.66667	2.98	171.333	0.12	240.667
10	30	14.3333	2.86333	151.333	0.11	212.667
10	60	12.6667	2.41	159.667	0.113333	224.333
Error estándar C₁₀	± 2.72438	13.3333	2.50667	187	0.13	260.667
4		0	± 0.245126	± 3.35659	± 0.003944	± 5.20683
4	4	16.3333	0.0433333	163	0.11	228.667
4	15	18.6667	0.14	150.667	0.11	211.667
4	30	31.6667	0.116667	152.667	0.11	214.333
4	60	31.3333	0.106667	150.667	0.11	211.667
4	120	29.3333	0.123333	143.333	0.1	201
Error estándar C₄	± 2.26078	27.3333	0.106667	148	0.1	207.333
C	T	pH	Zinc (mg L⁻¹)	Dureza (mg CaCO₃ L⁻¹)	Nitratos (mg NO₃-N L⁻¹)	SS (mg SS L⁻¹)
0	0	8.01	0.01	94.3333	1.76667	2.66667
0	4	8.09	0.03	122.667	1.7	6
0	15	8.13	0.0433333	107.667	1.43333	6.66667
0	30	8.16	0.0366667	109	1.4	11.6667
0	60	8.25333	0.0333333	109.667	1.3	8.66667
Error estándar C₀		± 0.03994	± 0.002582	± 6.3421	± 0.15634	± 0.3944
10	0	8.39667	0.0533333	79.3333	8.46667	10.6667
10	4	8.38333	0.0766667	75.3333	6.46667	7.33333
10	15	8.21	0.0666667	72.6667	3.66667	7
10	30	8.28333	0.0666667	74.6667	3.33333	7.66667
10	60	8.25667	0.0666667	75.6667	3.53333	6.33333
Error estándar C₁₀		± 0.01598	± 0.003333	± 2.290	± 0.25905	± 2.07096
4	0	8.12667	0.07	69	2.73333	8
4	4	7.96667	0.05	69.3333	1.53333	8.66667

4	15	7.98333	0.0533333	63	2	6
4	30	8.04333	0.0466667	69	3.36667	-10.3333
4	60	8	0.05	66.6667	1.7	8.66667
4	120	8.22	0.0366667	66.6667	2.33333	13.3333
Error estándar C₄		± 0.01515	± 0.006667	± 1.5456	± 0.33939	± 2.24021
C	T					
0	0	Turbidez (FAU)	Fe (mg L⁻¹)	Conductividad (µS)	TDS (ppm)	Sal (ppt)
0	4	0	0.04	416.333	0.383333	777.667
0	15	16.3333	0.57	440.333	0.293333	595.333
0	30	19.6667	0.416667	396.333	0.26	555.667
0	60	19	0.593333	364.333	0.27	535.333
Error estándar C₀	± 0.881917	10	0.58 ±	378.333	0.273333	534.667
10		0	± 0.0542627	± 26.9167	± 0.007303	± 20.9947
10	4	15	2.81333	185	0.13	254.667
10	15	6.66667	2.98	171.333	0.12	240.667
10	30	14.3333	2.86333	151.333	0.11	212.667
10	60	12.6667	2.41	159.667	0.113333	224.333
Error estándar C₁₀	± 2.72438	13.3333	2.50667	187	0.13	260.667
4		0	± 0.245126	± 3.35659	± 0.003944	± 5.20683
4	4	16.3333	0.0433333	163	0.11	228.667
4	15	18.6667	0.14	150.667	0.11	211.667
4	30	31.6667	0.116667	152.667	0.11	214.333
4	60	31.3333	0.106667	150.667	0.11	211.667
4	120	29.3333	0.123333	143.333	0.1	201
Error estándar C₄	± 2.26078	27.3333	0.106667	148	0.1	207.333
C	T	pH	Zinc (mg L⁻¹)	Dureza (mg CaCO₃ L⁻¹)	Nitratos (mg NO₃-N L⁻¹)	SS (mg SS L⁻¹)
0	0	8.01	0.01	94.3333	1.76667	2.66667
0	4	8.09	0.03	122.667	1.7	6
0	15	8.13	0.0433333	107.667	1.43333	6.66667
0	30	8.16	0.0366667	109	1.4	11.6667
0	60	8.25333	0.0333333	109.667	1.3	8.66667

Error estándar C₀		± 0.03994	± 0.002582	± 6.3421	± 0.15634	± 0.3944
10	0	8.39667	0.0533333	79.3333	8.46667	10.6667
10	4	8.38333	0.0766667	75.3333	6.46667	7.33333
10	15	8.21	0.0666667	72.6667	3.66667	7
10	30	8.28333	0.0666667	74.6667	3.33333	7.66667
10	60	8.25667	0.0666667	75.6667	3.53333	6.33333
Error estándar C₁₀		± 0.01598	± 0.003333	± 2.290	± 0.25905	± 2.07096
4	0	8.12667	0.07	69	2.73333	8
4	4	7.96667	0.05	69.3333	1.53333	8.66667
4	15	7.98333	0.0533333	63	2	6
4	30	8.04333	0.0466667	69	3.36667	-10.3333
4	60	8	0.05	66.6667	1.7	8.66667
4	120	8.22	0.0366667	66.6667	2.33333	13.3333
Error estándar C₄		± 0.01515	± 0.006667	± 1.5456	± 0.33939	± 2.24021
C	T					
0	0	Turbidez (FAU)	Fe (mg L⁻¹)	Conductividad (µS)	TDS (ppm)	Sal (ppt)
0	4	0	0.04	416.333	0.383333	777.667
0	15	16.3333	0.57	440.333	0.293333	595.333
0	30	19.6667	0.416667	396.333	0.26	555.667
0	60	19	0.593333	364.333	0.27	535.333
Error estándar C₀	± 0.881917	10	0.58 ±	378.333	0.273333	534.667
10		0	± 0.0542627	± 26.9167	± 0.007303	± 20.9947
10	4	15	2.81333	185	0.13	254.667
10	15	6.66667	2.98	171.333	0.12	240.667
10	30	14.3333	2.86333	151.333	0.11	212.667
10	60	12.6667	2.41	159.667	0.113333	224.333
Error estándar C₁₀	± 2.72438	13.3333	2.50667	187	0.13	260.667
4		0	± 0.245126	± 3.35659	± 0.003944	± 5.20683
4	4	16.3333	0.0433333	163	0.11	228.667
4	15	18.6667	0.14	150.667	0.11	211.667
4	30	31.6667	0.116667	152.667	0.11	214.333
4	60	31.3333	0.106667	150.667	0.11	211.667
4	120	29.3333	0.123333	143.333	0.1	201

Error estándar C₄	± 2.26078	27.3333	0.106667	148	0.1	207.333
-------------------------------------	---------------	---------	----------	-----	-----	---------