

The background features a large, faint watermark of the UNED seal. It is a circular emblem with a central sunburst design in yellow, blue, and red. The sunburst is surrounded by a circular border containing the Latin motto 'MOBILIBVS' at the top and 'SAPIENTIA' at the bottom. The text 'TESIS DOCTORAL' and '2017' is overlaid on the upper part of the seal.

TESIS DOCTORAL

2017

**Análisis de supervivencia de
Chironomus riparius expuesto a sustancias
que contaminan el medio ambiente**

Miren Josune Urien Crespo

Máster en Física Médica

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FÍSICA MÉDICA
Departamento de Física Matemática y de Fluidos.
Facultad de Ciencias

D. Daniel Rodríguez Pérez
Dña. Mónica Morales Camarzana

TESIS DOCTORAL

2017

**Análisis de supervivencia de
Chironomus riparius expuesto a sustancias que
contaminan el medio ambiente**

Miren Josune Urien Crespo

Máster en Física Médica

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FÍSICA MÉDICA
Departamento de Física Matemática y de Fluidos.
Facultad de Ciencias

D. Daniel Rodríguez Pérez
Dña. Mónica Morales Camarzana

ÍNDICE

ÍNDICE:

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	5
1. CONTAMINACIÓN DE LOS MEDIOS ACUÁTICOS.....	5
2. BIOINDICADORES.....	7
3. <i>CHIRONOMUS RIPARIUS</i>	10
4. XENOBIÓTICOS DERIVADOS DEL FENOL.....	14
4.1 BISFENOL A (BPA).....	14
4.2. TRICLOSÁN (TCS).....	16
5. METALES.....	18
5.1. CADMIO.....	19
5.2. COBRE.....	22
6. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA.....	24
6.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS DATOS.....	24
6.2. FUNCIÓN DE RIESGO Y FUNCIÓN DE SUPERVIVENCIA.....	25
6.3. RELACIÓN ENTRE LAS FUNCIONES DE RIESGO Y SUPERVIVENCIA.....	27
6.4. MODELOS PARAMÉTRICOS CLÁSICOS: PROBIT.....	28
6.5. MODELOS BIOLÓGICOS.....	31
6.5.1. <i>GUTS</i>	34
6.5.1.1. <i>Muerte estocástica (SD)</i>	38
6.5.1.2. <i>Tolerancia Individual (IT)</i>	39
6.6. AJUSTE DE LOS MODELOS.....	41
6.6.1. <i>Función de verosimilitud</i>	41
6.6.2. <i>Estimación de los parámetros e intervalos de confianza</i>	42
6.6.3. <i>Elección de modelo y bondad de ajuste</i>	43
OBJETIVOS	49
MATERIALES Y MÉTODOS	53
1. MATERIALES.....	53
1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	53
1.2. COMPUESTOS QUÍMICOS.....	53
1.3. SOFTWARE.....	55
2. MÉTODOS.....	55
2.1. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES DE SUPERVIVENCIA.....	55
2.2. ESTIMACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS LARVAS DURANTE EL ENSAYO.....	56
2.3. AJUSTE DEL MODELO.....	57
2.3.1. <i>Aplicación del modelo GUTS</i>	57
2.3.1.1. <i>SD (SD)</i>	58
2.3.1.2. <i>Tolerancia individual (IT)</i>	59
2.3.2. <i>Función de verosimilitud</i>	60
2.3.3. <i>Optimización de la función de log-verosimilitud</i>	61
2.3.4. <i>Elección de modelo y bondad de ajuste</i>	61
2.4. SIMULACIONES.....	62
2.4.1. <i>Vertidos por pulsos</i>	62
2.4.2. <i>Vertido puntual en río</i>	62
2.4.3. <i>Vertido continuo</i>	64
RESULTADOS	69
1. VALORACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS LARVAS DURANTE LOS ENSAYOS.....	69
2. PROBIT.....	69

3. TEORÍA GUTS.....	71
3.1. GUTS: BPA	71
3.1.1. BPA. Modelo IT: función de distribución exponencial.....	71
3.1.2. BPA. Modelo IT: función de distribución Normal.....	71
3.1.3. BPA. Modelo IT: función de distribución logística	72
3.1.4. BPA. Modelo IT: función de distribución de Weibull.....	72
3.1.4. BPA. Modelo IT: función de distribución Gamma.....	73
3.1.5. BPA. Modelo SD.....	73
3.1.6. BPA. Resumen de resultados.....	73
3.1.7. BPA. Elección de modelo	74
3.1.8. BPA. Concentraciones letales con el modelo elegido	75
3.2. GUTS: TCS.....	76
3.2.1. TCS. Modelo IT: función de distribución exponencial	76
3.2.2. TCS. Modelo IT: función de distribución Normal	76
3.2.3. TCS. Modelo IT: función de distribución logística	77
3.2.4. TCS. Modelo IT: función de distribución de Weibull	77
3.2.5. TCS. Modelo IT: función de distribución Gamma.....	78
3.2.6. TCS. Modelo SD	78
3.2.7. TCS. Resumen de resultados.....	78
3.2.8. TCS. Elección de modelo	79
3.2.9. TCS. Concentraciones letales con el modelo elegido	80
3.3. GUTS: Cu	81
3.3.1. Cu. Modelo IT: función de distribución exponencial.....	81
3.3.2. Cu. Modelo IT: función de distribución Normal	81
3.3.3. Cu. Modelo IT: función de distribución logística.....	82
3.3.4. Cu. Modelo IT: función de distribución de Weibull	82
3.3.5. Cu. Modelo IT: función de distribución Gamma	82
3.3.6. Cu. Modelo SD.....	83
3.3.7. Cu. Resumen de resultados	83
3.3.8. Cu. Elección de modelo.....	84
3.3.9. Cu. Concentraciones letales con el modelo elegido.....	85
3.4. GUTS: CADMIO	85
3.4.1. Cd. Modelo IT: función de distribución exponencial.....	85
3.4.2. Cd. Modelo IT: función de distribución Normal	86
3.4.3. Cd. Modelo IT: función de distribución logística.....	86
3.4.4. Cd. Modelo IT: función de distribución de Weibull	87
3.4.5. Cd. Modelo IT: función de distribución Gamma	87
3.4.6. Cd. Modelo SD	87
3.4.7. Cd. Resumen de resultados	88
3.4.8. Cd. Elección de modelo.....	88
3.4.9. Cd. Concentraciones letales con el modelo elegido.....	89
3.5. GUTS: CADMIO Y COBRE.....	90
3.5.1. Cu+Cd. Modelo IT: función de distribución exponencial.....	90
3.5.2. Cu+Cd. Modelo IT: función de distribución Normal	90
3.5.3. Cu+Cd. Modelo IT: función de distribución logística.....	91
3.5.4. Cu+Cd. Modelo IT: función de distribución de Weibull.....	91
3.5.5. Cu+Cd. Modelo IT: función de distribución Gamma	91
3.5.6. Cu+Cd. Modelo SD	92
3.5.7. Cu+Cd. Resumen de resultados	92
3.5.8. Cu+Cd. Elección de modelo.....	93
3.5.9. Cu+Cd. Concentraciones letales con el modelo elegido.....	94

3.6. COMPARACIÓN DE LAS LC50 DE CU, Cd Y MEZCLA DE AMBOS	95
3.7. SUPERFICIES DE SUPERVIVENCIA	95
4. SIMULACIONES	97
4.1. CONDICIONES DE LABORATORIO: PULSOS DE BPA EN CONDICIONES DE LABORATORIO	97
4.2. VERTIDO FLUVIAL PUNTUAL.....	99
4.3 VERTIDO FLUVIAL CONTINUO.....	100
DISCUSIÓN	105
1. SUPERVIVENCIA DE <i>C. RIPARIUS</i> ANTE BPA Y TCS.....	106
2. SUPERVIVENCIA DE <i>C. RIPARIUS</i> ANTE CU Y Cd POR SEPARADO.....	109
3. SUPERVIVENCIA DE <i>C. RIPARIUS</i> ANTE UNA MEZCLA DE CU+Cd.....	111
4. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA MEDIANTE LA TEORÍA GUTS	114
5. TOMA DE DATOS DE SUPERVIVENCIA	115
6. SIMULACIÓN EN CONDICIONES DE LABORATORIO	116
7. SIMULACIÓN DE ESCENARIO REAL	117
CONCLUSIONES	123
ESTUDIOS FUTUROS	127
BIBLIOGRAFÍA.....	131

ABREVIATURAS

AIC: Akaike Information Criterion.
BPA: bisfenol A.
°C: grado centígrado.
C: concentración.
 C^* : concentración escalada interna.
Cd: cadmio.
Cu: cobre.
 C_w : concentración externa.
GUTS: *General Unified Threshold Theory of Survival*.
 h_b : tasa de riesgo basal.
IT: *Individual Tolerance*.
 k_e : constante de eliminación.
 k_i : constante de absorción.
 k_k : *killing rate*.
L: litro.
LC: concentración letal.
LT: tiempo letal.
mg: miligramo.
mL: mililitro.
mM: milimolar.
M: molar.
 μ g: microgramo.
NOEC: *No Observed Effect Concentration*.
PBTK: *Physiology Based Toxicokinetic Models*.
QSAR: *Quantitative Structure Activity Relationship*.
SD: *Stochastic Death*.
TCS: triclosán.
TKTD: *Toxicokinetic Toxicodynamic Models*.
z: umbral de tolerancia.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Chironomus riparius</i> (Adaptada de Walker, 1987).	12
Figura 2. Ejemplo de ajuste probit. En el eje x se representa el logaritmo de las concentraciones, en el eje y la supervivencia.	30
Figura 3. Izqda. el modelo SD: cada pulso (representado como barra azul) elimina la mitad de individuos cada vez. A la dcha. el modelo IT: el primer pulso elimina los individuos más sensibles, un segundo pulso no produciría más muertes.	35
Figura 4. Modelo unicompartmental.....	36
Figura 5. Superficies de supervivencia.	96
Figura 6. De arriba a abajo: concentración externa de BPA, concentración interna escalada y supervivencia en función del tiempo.	98
Figura 7. Supervivencia a las 48 horas tras un vertido de BPA frente a la supervivencia basal, en un tramo de río de 500m de longitud.	99
Figura 8. Evolución de la concentración escalada interna en un punto a 10 m del vertido durante las primeras 96 horas.	100
Figura 9. Arriba: concentraciones externa (izqda.) y escalada interna (dcha.) tras 48 horas de exposición a un vertido continuo de 5 kg/s de BPA. Abajo: supervivencia.	101
Figura 10. Supervivencia de <i>C. riparius</i> expuesto al Cu (izqda.) y a Cd (dcha.) a las 24 y 48 horas.	114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del cadmio (Nordberg, 2007).....	20
Tabla 2. Propiedades físico-químicas del cobre (Nordberg, 2007).....	22
Tabla 3. .Estructura molecular y propiedades físico-químicas del BPA (Corrales y col., 2015).	15
Tabla 4. Propiedades físico-químicas del TCS (Dhillon y col., 2015)	17
Tabla 5. Propiedades de la función de supervivencia.	27
Tabla 6. Distribuciones comunes en el análisis de supervivencia.	29
Tabla 7. Equivalencia de concentraciones molares y mg/L del Cu, Cd, CuCl ₂ , CdCl ₂	54
Tabla 8. Distribuciones utilizadas en el modelo IT.	59
Tabla 9. Resultados de las concentraciones letales de BPA y TCS a 24 y 48h obtenidas por ajuste al modelo probit.	69
Tabla 10. Concentraciones letales de Cu y Cd a 48h obtenidas por ajuste al modelo probit. A 24 horas no se pudieron ajustar los datos a este modelo.	70
Tabla 11. Resultados del ajuste al modelo probit para el Cd y Cu a 48h. A 24 horas no se pudieron ajustar los datos a este modelo.	71
Tabla 12. . Estimación de los parámetros del modelo IT con distribución exponencial de la tolerancia individual, en el caso del BPA.	71
Tabla 13. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al BPA a una tolerancia individual normal e intervalos de confianza (IC) al 95%.....	72
Tabla 14. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al BPA un modelo IT logístico e intervalos de confianza (IC) al 95%.	72
Tabla 15. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al BPA a una tolerancia individual logística e intervalos de confianza (IC) al 95%.	72
Tabla 16. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al BPA a una tolerancia individual tipo gamma e intervalos de confianza (IC) al 90 y 95%.	73
Tabla 17. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al BPA al modelo SD e intervalos de confianza (IC) al 90 y 95%.....	73
Tabla 18. Resumen de resultados para el BPA. Los cinco modelos IT se presentan en orden creciente de log-verosimilitud	74
Tabla 19. Coeficientes de Akaike ajustados para el caso del BPA	74
Tabla 20. Diferencias y pesos de Akaike obtenidos para el BPA, ordenados de mayor a menor.	75
Tabla 21. Concentraciones letales de BPA según el modelo de tolerancia individual tipo Weibull.	76
Tabla 22. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia de <i>C. riparius</i> frente a TCS, a un modelo de IT y distribución exponencial. Intervalos de confianza al 95%.	76
Tabla 23. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al TCS a una tolerancia individual normal e intervalos de confianza (IC) al 90 y 95%.	77
Tabla 24. . Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al TCS a una tolerancia individual logística e intervalos de confianza (IC) al 95%.....	77
Tabla 25. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al TCS a un modelo IT de Weibull e intervalos de confianza (IC) al 95%.	77
Tabla 26. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al TCS a una tolerancia individual tipo gamma e intervalos de confianza (IC) al 95%.	78
Tabla 27. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al TCS al modelo de muerte estocástica e intervalos de confianza (IC) al 90 y 95%.	78

Tabla 28. Resumen de los ajustes a modelos IT y SD obtenidos para el TCS. Los modelos IT están ordenados según su valor de log-verosimilitud.....	79
Tabla 29. Coeficientes de Akaike ajustados para el caso del TCS.....	79
Tabla 30. Diferencias y pesos de Akaike para el caso del TCS.	80
Tabla 31. Concentraciones letales de TCS según el modelo de tolerancia individual tipo Weibull.	81
Tabla 32. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia de <i>C. riparius</i> frente a Cu, a un modelo de IT y distribución exponencial. Intervalos de confianza al 95%.	81
Tabla 33. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia del Cu a una tolerancia individual normal, e intervalos de confianza al 95%.....	82
Tabla 34. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al Cu a una IT logística e intervalos de confianza (IC) 95%.	82
Tabla 35. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al Cu a una IT de Weibull e intervalos de confianza (IC) al 95%.....	82
Tabla 36. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al Cu a una IT tipo gamma e intervalos de confianza (IC) al 95%.....	83
Tabla 37. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al Cu al modelo de muerte estocástica e intervalos de confianza (IC) al 95%.	83
Tabla 38. Resumen de los ajustes a modelos IT y SD obtenidos para el Cu.	83
Tabla 39. Coeficientes de Akaike ajustados de los seis modelos probados con el Cu.	84
Tabla 40. Diferencias y pesos de Akaike para el caso del cobre.....	84
Tabla 41. Concentraciones letales de Cu según el modelo de tolerancia individual tipo Gamma.	85
Tabla 42. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia de <i>C. riparius</i> frente al Cd a un modelo de IT y distribución exponencial. Intervalos de confianza al 90 y 95%.....	86
Tabla 43. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia del Cd a una tolerancia individual normal, e intervalos de confianza al 90 y 95%.	86
Tabla 44. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al Cd a una tolerancia individual logística e intervalos de confianza (IC) al 95%.....	86
Tabla 45. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al Cd a un modelo IT de Weibull e intervalos de confianza (IC) al 95%.....	87
Tabla 46. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al Cd a una tolerancia individual tipo gamma e intervalos de confianza (IC) al 95%.	87
Tabla 47. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al Cd al modelo de muerte estocástica e intervalos de confianza (IC) al 95%.	87
Tabla 48. Resumen de los ajustes a modelos IT y SD obtenidos para el Cd. Los cinco modelos IT están en orden decreciente del valor de la función de log-verosimilitud.....	88
Tabla 49. Coeficientes de Akaike ajustados, para el caso del Cd.	88
Tabla 50. Diferencias y pesos de Akaike para los seis modelos aplicados al Cd.	89
Tabla 51. Concentraciones letales de Cd según el modelo IT Weibull.	90
Tabla 52. Concentraciones letales de Cd según el modelo IT Weibull.	90
Tabla 53. Modelo de supervivencia IT normal ajustado para la exposición conjunta a Cd y Cu Intervalos de confianza al 95%.	91
Tabla 54. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia a Cu+Cd a una IT logística e intervalos de confianza (IC) al 95%.....	91
Tabla 55. Resultados del ajuste de los datos de Cu+Cd a un modelo IT Weibull. Intervalos de confianza al 95%.	91
Tabla 56. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia a Cu y CdCl ₂ a una tolerancia individual tipo gamma e intervalos de confianza (IC) al 95%	92

Tabla 57. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia a Cu+Cd al modelo de muerte estocástica e intervalos de confianza (IC) al 95%.....	92
Tabla 58. Resumen de los ajustes a modelos IT y SD obtenidos para la mezcla de Cu+Cd. Los cinco modelos IT están en orden decreciente del valor de la función de log-verosimilitud.	93
Tabla 59. Coeficientes de Akaike ajustados al tamaño muestral de los seis modelos estudiados para la mezcla de Cu+Cd.	93
Tabla 60. Diferencias y pesos de Akaike para los seis modelos aplicados a la mezcla de Cu+Cd.	94
Tabla 61. Concentraciones letales de Cu+Cd según el modelo IT logístico.	95
Tabla 62. LC50 del Cu, Cd y la mezcla de ambos a 24 y 48h.	95
Tabla 63. Resultados del modelo elegido para BPA.	97
Tabla 64. Modelo elegido y parámetros calculados para cada compuesto	106
Tabla 65. Constante de eliminación, tolerancia individual media de la población en términos de concentración interna escalada y LC50 a las 48 horas para todas las sustancias estudiadas.	112

RESUMEN

RESUMEN

El desarrollo industrial de las últimas décadas ha provocado un aumento de las sustancias químicas vertidas al medio ambiente, surgiendo la necesidad de evaluar su impacto en todos los niveles.

Chironomus riparius es un insecto díptero, organismo de referencia utilizado habitualmente en ensayos de toxicidad acuática. Entre estos ensayos el análisis de supervivencia constituye una de las pruebas fundamentales, ya sea como objetivo principal, o como paso previo a la elección de concentraciones subletales para otro tipo de estudios a nivel molecular, bioquímico o celular. En este segundo caso es habitual recurrir a técnicas estadísticas específicas y pruebas muy sencillas, siendo el probit el caso más conocido.

Por otro lado, durante las últimas décadas se han estudiado modelos matemáticos más complejos que intentan relacionar la supervivencia con parámetros como la concentración interna o las tasas de absorción y eliminación. Recientemente se ha tratado de integrar los distintos modelos en un único Modelo General Unificado de Umbral de Supervivencia, GUTS (*General Unified Threshold Model of Survival*) con resultados prometedores, aunque aún son necesarios más estudios.

En el presente trabajo se ha analizado la supervivencia de larvas de cuarto estadio de *C. riparius* frente al bisfenol A (BPA) y el triclosán (TCS) y dos metales como son el cadmio (Cd) y el cobre (Cu) por separado, así como a la mezcla de ambos metales. El estudio de los compuestos seleccionados se ha llevado a cabo mediante exposiciones a diferentes concentraciones de cada sustancia química a estudiar y a una mezcla de dos de ellas, y se ha medido la supervivencia a diferentes tiempos, con una duración máxima de los experimentos de 96 horas. Posteriormente con los datos obtenidos se ha aplicado la teoría GUTS a cada sustancia en sus dos versiones simplificadas:

- Muerte Estocástica (SD): hay una concentración de no efecto común a todas las larvas. Cuando se supera esta concentración aumenta la probabilidad de morir, pero en última instancia es un proceso aleatorio.
- Tolerancia Individual: cada individuo posee su propia concentración umbral de tolerancia, a partir de la cual muere irremediablemente. Este umbral de concentración se distribuye en la población según diferentes funciones conocidas en estadística, como la distribución normal o la exponencial, entre otras.

Se ha estudiado el modelo que mejor ajustaba a los datos de cada sustancia química, comparando e interpretando los resultados. En todos los casos el mejor ajuste se ha obtenido con modelos de cuatro parámetros de la hipótesis de tolerancia individual. Así mismo se ha podido comprobar que la toxicidad del Cd y del cobre es menor cuando se utilizan de forma conjunta, revelando algún tipo de interacción o competición entre ellos, pero se requieren estudios más detallados para analizar estos efectos.

Por medio de los modelos escogidos para cada sustancia química se han hallado las concentraciones letales a 24 y 48 horas y se han comparado con los resultados obtenidos por el método probit, poniendo de manifiesto las limitaciones de este último.

Por último, se han estudiado las posibilidades de la simulación en el campo de la ecotoxicología, aplicando los resultados obtenidos con la teoría GUTS para el BPA, a una exposición en condiciones de laboratorio y a dos vertidos en río. La simulación de la exposición por pulsos ha demostrado la utilidad de esta técnica en el análisis de ensayos en condiciones de laboratorio. Sin embargo se ha podido comprobar la dificultad de extrapolar los resultados de laboratorio a escenario real. Se ha constatado que la simulación es un área con un gran potencial, aunque todavía se están dando los primeros pasos, necesitando una amplia investigación interdisciplinar .

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. CONTAMINACIÓN DE LOS MEDIOS ACUÁTICOS

En las últimas décadas el desarrollo industrial y el aumento demográfico han producido un gran incremento en la producción, utilización y posterior eliminación de compuestos químicos. La lista de estos compuestos es cada vez mayor, lo que dificulta el estudio de sus consecuencias por su creciente presencia en el medio ambiente y el consiguiente establecimiento de normas adecuadas para la protección de los ecosistemas acuáticos.

Los medios acuáticos son especialmente sensibles, ya que suponen el destino final de la mayoría de estas sustancias, que llegan al mar y a los ríos tanto directamente, a través de vertidos industriales y aguas residuales, como indirectamente, a través de filtrados de aguas de regadío tratadas con pesticidas o lixiviados procedentes de vertederos.

Estos compuestos químicos inciden en la calidad del agua mediante la alteración de parámetros físicos (turbidez, color, temperatura, conductividad, etc.), químicos (pH, oxígeno disuelto, etc.) o biológicos, esto es, afectando a la fauna y/o la flora del medio acuático.

Una vez los contaminantes entran en los ecosistemas acuáticos, se integran en un ciclo que implica el agua, los sedimentos y los organismos, sobre los que pueden tener un efecto tóxico directo y/o bioacumularse a través de la cadena trófica. Una vez que estas sustancias llegan al agua su destino va a depender tanto de las características del propio medio (velocidad de la corriente, profundidad, composición del lecho, etc.) como de las del compuesto (Palmer, 2001). De esta manera algunas sustancias como los iones metálicos tienden a acumularse en los sedimentos de los ríos aumentando su persistencia, lo que hace que permanezcan presentes durante más tiempo en los ecosistemas acuáticos. Los productos químicos asociados con los

sedimentos frecuentemente ingresan en la cadena alimentaria a través de los organismos bénticos, que constituyen el alimento para los organismos superiores. En último término se acumulan en los predadores superiores, incluido el hombre. Otros, aunque no se acumulen en el lecho del río pasan rápidamente a la cadena trófica pudiendo afectar también en última instancia al ser humano.

Los contaminantes acuáticos pueden clasificarse en los siguientes grupos (Escolástico León y col., 2013):

- Contaminantes inorgánicos: sales metálicas solubles y los desechos de ácidos, bases y gases tóxicos solubles como el amoníaco o el dióxido de azufre. Los metales pesados son de especial relevancia por su persistencia, bioacumulación y nocividad para la vida acuática.
- Contaminantes orgánicos: procedentes de desechos de seres humanos y de animales, procesado de alimentos, compuestos químicos industriales y disolventes, aceites, breas, tintes y compuestos químicos sintéticos como los plásticos o los pesticidas.
- Contaminantes radiactivos: entran en este grupo tanto los isótopos de elementos radiactivos existentes en la naturaleza (ej. cobalto, uranio) como los sintetizados en las centrales nucleares (ej. tecnecio o plutonio).
- Contaminantes biológicos: de especial relevancia en el caso de agua destinada a consumo humano, este grupo lo conforman entre otros bacterias causantes de enfermedades como el tifus o el cólera, virus causantes de enfermedades como la hepatitis o la gastroenteritis, amebas, etc.

Algunas de estas sustancias aparecen disueltas, mientras que otras suelen estar en suspensión. Un ejemplo de este caso son los sedimentos arrancados en condición de turbulencia tras una tormenta y que provocan turbidez en los ecosistemas acuáticos, lo que

dificulta la vida de los organismos y produce problemas derivados de la acumulación de los sedimentos, llegando a destruir sitios donde se alimentan y desovan los peces e incluso obstruyendo canales y puertos (Echarri L, 2016).

2. BIOINDICADORES

Lo comentado en el apartado anterior muestra la necesidad de una legislación eficaz que minimice el impacto ocasionado por la presencia de compuestos químicos en los ecosistemas acuáticos. Esta legislación además debe ser revisada con regularidad, en la medida en que nuevos productos salen al mercado o aparecen nuevas evidencias científicas que ponen en entredicho la inocuidad y seguridad de muchos compuestos utilizados hasta el momento.

En la Unión Europea el marco legal que sustenta toda la normativa necesaria es el denominado REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) aprobado el 18 de diciembre de 2006. Tal y como su nombre indica establece la forma de registrar, evaluar, autorizar y en su caso restringir el uso de los compuestos químicos producidos y/o utilizados en la Comunidad Europea (Reglamento (CE) No 1907/2006). Por lo tanto su finalidad es doble: por un lado proteger el medio ambiente y la salud humana de los riesgos que pudieran ocasionar los productos químicos, y por otro promover la evaluación de dichos riesgos.

Todo este proceso de evaluación y control de riesgos conlleva la necesidad de analizar el estado de los medios acuáticos. Para ello son de gran utilidad los análisis físico-químicos estandarizados, que nos ofrecen una fotografía imprescindible del estado del agua y de la ausencia o presencia de los compuestos que las autoridades consideren necesarios. A pesar de su incuestionable valor, este tipo de análisis presenta algunas carencias que obligan a completar la información por otros medios (Alba-Tercedor, 1996):

- La lista de compuestos químicos a analizar es forzosamente limitada, de modo que siempre cabe la posibilidad de que un nuevo producto haya alterado gravemente la calidad del agua sin que tenga ningún reflejo en los resultados del análisis.
- La mayoría de estos controles son periódicos, debido en parte a su elevado coste. Como consecuencia nos ofrecen una descripción de la calidad del agua en un instante determinado. Si se realiza un vertido con la suficiente antelación su rastro químico habrá desaparecido y pasará desapercibido en los análisis, a pesar del daño ocasionado al ecosistema acuático.

Por otro lado, los organismos vivos que habitan en los medios acuáticos se ven en la necesidad de adaptarse a los cambios originados por la aparición de compuestos químicos. El grado de tolerancia a cada sustancia varía entre las diferentes especies de forma que ante el vertido de un único compuesto, la presencia de las especies más sensibles disminuirá, ya sea porque la dosis es letal o porque abandonan la zona, mientras que otras más resistentes aprovecharán esta circunstancia para ocupar su lugar. De este modo variaciones inesperadas en la composición y organización de las poblaciones de los seres vivos que habitan en el medio acuático indicarán algún tipo de contaminación (Alba-Tercedor, 1996).

Determinados organismos vivos (o parte de una comunidad de organismos) poseen la capacidad de reflejar los cambios del medio ambiente, proporcionando información valiosa sobre su calidad, lo que los convierte en buenos indicadores biológicos o bioindicadores (Market y col., 2014). Esta capacidad de reflejar los cambios en el ambiente, unido al bajo coste de su utilización (ya que en general no se precisan sofisticados instrumentos tecnológicos) convierte a los bioindicadores en una herramienta muy importante en la toma de decisiones por parte de gestores y administraciones. Su utilización como indicadores medioambientales ha promovido en los últimos años la necesidad de su estandarización por parte de diversas organizaciones internacionales como la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico),

ONU (Organización de Naciones Unidas), EEA (*European Environmental Agency*), EUROSTAT (Instituto de Estadística de la Comunidad Europea), Comisión Europea y Consejo Europeo, entre otras (Markert y col., 2004).

La información básica permitirá a las autoridades determinar parámetros tan relevantes como la concentración de efecto no observado o NOEC (*No Observed Effect Concentration*), esto es, aquella concentración bajo la cual no se aprecia ningún efecto en la magnitud sujeta a estudio (supervivencia, alteraciones genéticas, deformidades, etc.) o el EC10, la concentración que causa dicho efecto en el 10% de la población. Este tipo de información se obtiene en su mayoría mediante ensayos de laboratorio. A pesar de la inmensa cantidad de datos obtenidos de esta forma en las últimas décadas la ingente producción de nuevos productos químicos, así como la posible interrelación no sólo entre estos compuestos, sino entre las distintas especies de un mismo ecosistema, tienen como consecuencia una gran falta de información sobre la presencia y las consecuencias de estos productos (Vighi y Villa, 2013).

De hecho uno de los aspectos más controvertidos de los test de laboratorio es la dificultad de extrapolar los resultados a escenarios reales (European Commission 2013; Vighi y Villa, 2013):

- Las condiciones estándar usadas en los ensayos de laboratorio no recogen la complejidad física, química y biológica de los escenarios reales.
- La sensibilidad de ciertas especies elegidas para realizar los ensayos no siempre constituye una buena representación de la sensibilidad a nivel de comunidades más complejas y sus interrelaciones.
- Existen muy pocos estudios que tengan en cuenta el efecto conjunto de varios compuestos químicos, y aún son más escasos los que analizan la interrelación de factores de distinto tipo (por ejemplo un factor de tipo físico como la temperatura junto a una sustancia química).

- Aunque han aumentado en la última década, aún hay pocos estudios de laboratorio que contemplen exposiciones variables, similares a los máximos que puntualmente pueden encontrarse en el medio ambiente.

A pesar de estos inconvenientes los ensayos con bioindicadores siguen proporcionando una información fácil de obtener y de gran valor en el control de riesgos, pero es necesario recabar información y procesar muchos más datos de todo tipo (compuestos químicos, especies, escenarios...), tarea en la que los modelos matemáticos y la simulación empiezan a jugar un papel importante (Devillers, 2009; Dixon, 2012; Newman, 2012). Destacan, por un lado, los denominados modelos de relación cuantitativa actividad-estructura o QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*), que se basan en la idea de que compuestos con estructura molecular semejante tendrán propiedades toxicológicas parecidas (OCDE, 2007; Benfenati, 2007). A partir de los grandes bancos de datos existentes y con la ayuda de la nueva tecnología son capaces de llenar los huecos de información de muchos compuestos químicos. Por otro lado, los modelos matemáticos, en especial los basados en modelos o hipótesis toxicocinéticas y toxicodinámicas, están cobrando una gran relevancia por su versatilidad y potencial para describir los efectos de nuevas exposiciones y escenarios sin necesidad de utilizar ensayos con seres vivos (Jagger y col., 2006; OCDE, 2006; Devillers, 2009; Ashauer y Escher, 2010).

3. *CHIRONOMUS RIPARIUS*

Los macroinvertebrados bentónicos (que habitan en el lecho del río) constituyen uno de los grupos de organismos más utilizados en el monitoreo de los ecosistemas acuáticos. Entre las características que los hacen especialmente indicados para esta tarea se encuentran las siguientes (Alba-Tercedor, 1996; Fenoglio y col., 2001; Gamboa y col., 2008):

- Ciclos de vida cortos en relación a los peces, por lo que reflejan las alteraciones del medio con mayor rapidez. Al mismo tiempo la recolonización de un espacio precisa tiempos del orden del mes, lo que permite observar las alteraciones en la población mucho después de producido el vertido.
- Naturaleza sedentaria, que permite el estudio localizado de las perturbaciones.
- Amplia distribución y tamaño adecuado para una recolección relativamente sencilla.
- Permanencia en los sedimentos, lugar de acumulación de compuestos químicos.
- Amplio espectro de sensibilidades a los diferentes factores contaminantes.

Entre los macroinvertebrados bentónicos utilizados como bioindicadores los quironómidos (Diptera, Chironomidae), insectos dípteros, son organismos de referencia por su amplia distribución y por constituir un elemento clave en la cadena trófica de los ecosistemas acuáticos (Berg y Hellenthal, 1992). Constituyen un importante componente de la dieta de numerosas especies acuáticas y terrestres, principalmente en peces y aves acuáticas (Rieradevall y col., 1995).

Estos dípteros son ampliamente utilizados en ensayos de ecotoxicidad y como indicadores biológicos de la calidad del agua al ser considerados organismos de referencia. Existen protocolos detallados publicados en guías específicas por organismos internacionales como la OCDE, la Agencia de Protección Medioambiental de los EEUU (USEPA, *United States Environmental Protection Agency*) o la Sociedad Americana para el Ensayo de Materiales (ASTM, *American Society for Testing Materials*) (USEPA, 1996, 2000; OCDE, 2004, 2011; ASTM, 2006).

Chironomus riparius es uno de los quironómidos más utilizados en ensayos de ecotoxicidad acuática. Se trata de un mosquito con un ciclo de vida compuesto por cuatro etapas (Figura 1) (Weltje y Bruns, 2009):

1. Huevo: las hembras depositan masas de huevos en la superficie del agua, cada una de las cuales puede contener más de 600 huevos que eclosionan en pocos días.
2. Larva: la fase larvaria comprende 4 estadios, los tres últimos son los que el animal silvestre pasa en sedimento, donde construyen pequeños tubos con algas, partículas de sedimentos y fibras de proteínas gigantes del tipo de la seda secretadas por sus glándulas salivales. Esta circunstancia es de particular interés en ecotoxicología, ya que los sedimentos constituyen un lugar de acumulación de los compuestos químicos. El cuarto estadio es el elegido habitualmente para realizar los ensayos de ecotoxicidad, su duración es aproximadamente de una semana (Taenzler y col., 2007).
3. Pupa: es el estadio intermedio entre larva y adulto, y dura apenas unas horas.
4. Adulto: es el único estadio aéreo de los cuatro.

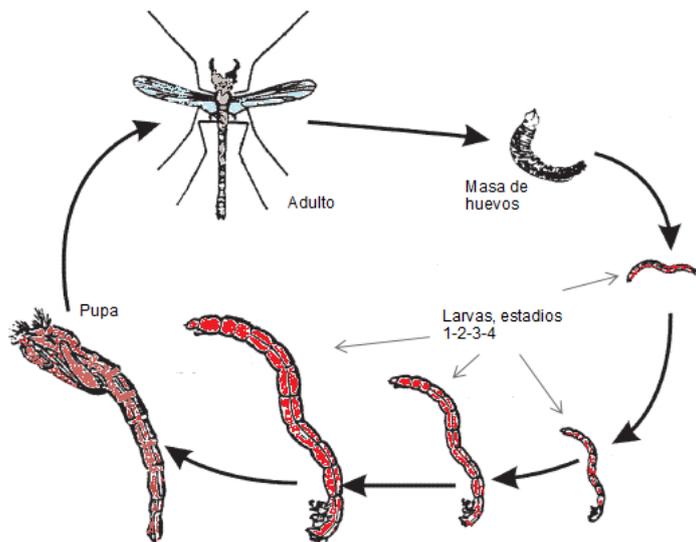


Figura 1. Ciclo de vida de *Chironomus riparius* (Adaptada de Walker, 1987).

La duración del ciclo vital de *C. riparius* depende de condiciones externas como temperatura o disponibilidad de alimento, siendo de unas tres o cuatro semanas en condiciones de laboratorio. En su medio natural se caracterizan por su alta tolerancia a la contaminación orgánica, habiéndose registrado densidades anormalmente altas en estas condiciones por el retroceso de

las especies competidoras, llegando a máximos de hasta 132715 larvas /m² (Moller Pillot, 2009).

C. riparius presenta además otras particularidades, como la facilidad de cultivo de varias generaciones seguidas en laboratorio o la presencia de hemoglobina en su estadio larvario, que al actuar como buffer le permite sobrevivir en medios ácidos, habiéndose encontrado incluso en aguas de pH<5 (Palawski y col, 1989). Además de su tolerancia a un amplio rango de pH destaca su capacidad de adaptación a medios con déficit de oxígeno o salinidad moderada (Bervoets y col., 1996; Moller Pillot, 2009).

Estas características de tolerancia y facilidad de cultivo convierten a *C. riparius* en una especie idónea para los ensayos de toxicidad. En la actualidad se utiliza en estudios de índole muy diversa, como los análisis de malformaciones y asimetrías en las piezas bucales tras exposiciones a metales pesados (de Bisthoven y col., 1998; Martínez y col. 2003 y 2004; Planelló y col., 2015), fenbenzadol (Park y col., 2009), di (2-etilhexil) ftalato (Park y Kwak, 2008) y 17- α -etinilestradiol (Meregalli y Ollevier, 2001), y deformidades en las antenas de las larvas tras ser expuestas a metales pesados (Bhattacharyay y col., 2005). No obstante se ha descrito que la endogamia propia de los cultivos de laboratorio puede aumentar el número de estas deformidades en las larvas de quironómidos, por lo que es un factor a tener en cuenta en los estudios de toxicología con esta especie (Vogt y col., 2013).

Sin embargo, los estudios a nivel molecular, bioquímico y celular en quironómidos son escasos. Entre los marcadores de los que se dispone en la actualidad se encuentran las hemoglobinas (Anderson y col., 2008; Ha y Choi, 2008a, 2008b) y genes que codifican para proteínas de choque térmico (Park y Kwak, 2008; Yoshimi y col., 2009; Morales y col., 2011). A nivel enzimático existen estudios sobre diferentes enzimas implicadas en la eliminación de especies reactivas del oxígeno (Datkhile y col., 2009; Nair y col., 2011a, 2013a; Park y col., 2012; Wiseman y col., 2013), y de la actividad enzimática de la acetil colinesterasa (AChE) y de la

glutación S-transferasa (GST) (Fisher y col., 2000; Domingues y col., 2009; Nair y Choi, 2011; Pérez y col., 2013)

Al igual que con otros bioindicadores los ensayos de supervivencia con *C. riparius*, llevan realizándose décadas, a veces como paso previo a estudios más complejos, con el objetivo de determinar una dosis subletal, bajo la que no obstante se pueden observar efectos en los parámetros biológicos antes mencionados (Péry y col., 2003; Agra y Soares, 2009; Mogren y col., 2012). Sin embargo no es ésta su única utilidad: la complejidad de los mecanismos involucrados en la supervivencia hacen de su estudio un objetivo en sí mismo. Durante las últimas décadas se ha pasado de realizar estudios preliminares de supervivencia con técnicas estadísticas básicas a la investigación en el desarrollo de estrategias y técnicas matemáticas específicas, que permitan comprender mejor la letalidad de las especies ante cada compuesto químico en regímenes de exposición (continua, variable, por pulsos...) así como su repercusión en los diferentes eslabones de los ecosistemas acuáticos (OCDE, 2006; Krishnan y Peyret, 2009; Kooijman, 2010). En este sentido la labor es ingente, y a pesar de los avances aún son escasos los estudios con *C. riparius* que apliquen las nuevas metodologías en análisis de supervivencia.

4. XENOBIÓTICOS DERIVADOS DEL FENOL

4.1 Bisfenol A (BPA)

El bisfenol A o BPA (2,2-bis-4'-hidroxifenil propano) es un compuesto xenobiótico (Tabla 3) que se obtiene combinando acetona y fenol, con afinidad media por los tejidos grasos animales (Corrales y col., 2015).

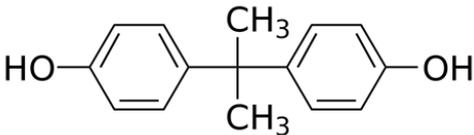
Estructura química	Propiedades físico-químicas	
	Fórmula química	2,2-bis-4'-hidroxifenil propano
	Fórmula empírica	$(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$
	Nº C.A.S.	80-05-7
	Masa molar	228.29 g/mol
	Solubilidad en agua	300 mg/L a 25°C
	log k_{ow}	3.64

Tabla 1. Estructura molecular y propiedades físico-químicas del BPA (Corrales y col., 2015).

El BPA se utiliza principalmente en la producción de resinas epoxi y plásticos policarbonatados. Las resinas epoxi forman parte de adhesivos y diversos acabados de la industria automovilística y aeroespacial, así como del recubrimiento interior de las latas de conserva y las tapas de los botes de cristal, en contacto con los alimentos. El policarbonato es un polímero del BPA muy ligero y resistente utilizado en CDs y DVDs, y en diversos plásticos de la industria alimentaria, como envoltorios y botellas de plástico, así como en lentes de contacto y sellados dentales. El BPA se utiliza también en el papel de impresión térmica de los tickets de supermercado, parkings, etc. (Corrales y col., 2015).

Dado que es un xenobiótico no existe ninguna fuente de contaminación natural, sino que el BPA llega al medio ambiente a través de vertidos y lixiviados procedentes de las industrias. Una vez alcanzadas las aguas fluviales la vida media del BPA antes de su degradación es corta, de entre 2 y 5 días, sin embargo es suficiente para afectar a los organismos acuáticos, dado que su presencia es continua. Se han realizado numerosas medidas de la concentración media del BPA en ríos de Europa, Asia y América, encontrando que los valores raramente pasan de 2 $\mu\text{g/L}$, aunque se han llegado a registrar valores medios de 56 $\mu\text{g/L}$ e incluso 370 $\mu\text{g/L}$ en aguas procedentes de plantas de tratamiento (Careghini y col 2015.; Corrales y col., 2015). Además tiene tendencia a acumularse en sedimentos, afectando a los organismos que pasan en este medio parte de su ciclo vital. La concentración en sedimentos depende tanto del tipo de efluente

recibido como de las características del suelo, habiendo llegado a medirse concentraciones del orden de los 1000 µg/kg (Corrales y col., 2015).

El BPA presente en plásticos de la industria alimentaria puede llegar al ser humano a través de los alimentos, ya que se ha demostrado su capacidad de migración desde el envase al propio alimento (Nam y col., 2010; Careghini., 2015), llegando al punto de ser prohibido por algunos países en biberones y otros recipientes destinados a la alimentación infantil. En la Unión Europea se prohibió su uso en el año 2011 (Directiva 2011/8/UE). Se encuentra clasificado en la lista europea como uno de los 564 potenciales disruptores endocrinos con el máximo nivel de riesgo (nivel III) y más recientemente se ha incluido en la lista prioritaria de los 66 compuestos de mayor riesgo. Se han realizado numerosos estudios para valorar el potencial disruptor endocrino del BPA en humanos y vertebrados, esto es, su capacidad de alterar el sistema endocrino, encontrando que el BPA produce actividad estrogénica por debajo de concentraciones de 1 µg/L (Rykowska y Wasiak, 2006) así como cambios en otros receptores hormonales, en la síntesis y metabolismo hormonal, alteración de las concentraciones hormonales en sangre e interacción con el sistema tiroideo (Whelsons y col., 2006; US EPA, 2010).

Aunque los estudios en invertebrados son escasos se ha documentado disrupción endocrina en moluscos, crustáceos, nematodos e insectos (Oehlmann y col., 2000, 2006; Kang, 2007; Mihaich y col., 2009). En *C. riparius* se han descrito también malformaciones morfológicas (Watts y col, 2003) y genotoxicidad (Planelló y col., 2008; Park y Choi., 2009; Martínez-Paz y col., 2012).

4.2. Triclosán (TCS)

El triclosán o TCS (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol) es un compuesto aromático clorado (Tabla 4), conocido por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas, afín a los tejidos grasos (Dann y Hontela, 2006).

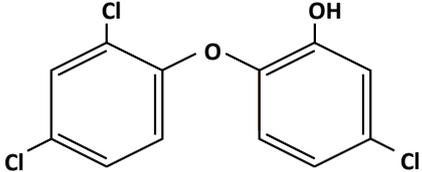
Estructura química	Propiedades físico-químicas	
	Fórmula química	5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol
	Fórmula empírica	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂
	Nº C.A.S.	3380-34-5
	Masa molar	289.5 g/mol
	Solubilidad en agua	10 mg/L a 20°C
	log <i>k</i> _{ow}	4.76

Tabla 2. Propiedades físico-químicas del TCS (Dhillon y col., 2015)

Por sus propiedades antimicrobianas es un componente habitual tanto en el ámbito sanitario como en productos domésticos de higiene personal (jabones para las manos, cremas, pastas dentífricas, etc.), artículos de limpieza del hogar e incluso en tejidos (ropa de deporte, sábanas, alfombras, etc.). La incorporación del TCS a una amplia variedad de productos de la vida cotidiana ha ocasionado un gran aumento de su presencia en el medio ambiente a donde pasa directamente a través de las aguas residuales urbanas, ya que las plantas de tratamiento de aguas no lo eliminan en su totalidad (Dann y col., 2011). Una vez alcanzado el medio acuático, la vida media del TCS es aproximadamente de 8 días en sistemas fluviales y 4 días en aguas marinas (Aranami y Readman, 2006). Se han documentado concentraciones de hasta 1.6 µg/L en el agua de ríos estadounidenses y de hasta 2.7 µg/L en agua procedente de plantas de tratamiento (Dann y Hontela, 2006).

En humanos se ha detectado TCS en orina, leche materna y sangre (Sandborgh-Englund y col., 2006.; Toms y col., 2011) y se ha descrito su comportamiento como disruptor endocrino en diversos estudios (Chen y col., 2007; Gee y col., 2008). En roedores se han reportado daños hepáticos y renales (Rodricks y col., 2010), alteraciones del sistema tiroideo en anfibios (Helbing y col., 2010), y efectos teratogénicos en peces (Oliveira y col., 2009) entre otros.

Aunque los estudios en invertebrados son menos abundantes, se ha reportado genotoxicidad en varias especies (Lin y col., 2012; Xu y col., 2015; Martínez-Paz y col., 2017)

5. METALES

Los metales son sustancias naturales presentes en el planeta desde su formación. No obstante la mayoría de las veces la contaminación debida a metales es originada por la actividad humana en la industria, la minería o la agricultura, en las que se utiliza tanto el elemento en estado puro como compuestos que lo contienen. El término *metales pesados* se ha utilizado en el pasado para referirse a aquellos cuya densidad es igual o mayor a cinco veces la del agua, esto es, igual o superior a 5 kg/L, como el plomo (Pb), cadmio (Cd), cinc (Zn), manganeso (Mn) o mercurio (Hg). Son motivo de especial preocupación desde hace décadas debido a su potencial tóxico (Tchounwou y col., 2012).

Sin embargo hoy en día la tendencia es clasificar los metales según otras características, como sus propiedades químicas o la necesidad que tienen de ellos los organismos. De este modo, se denominan *metales esenciales* a aquellos imprescindibles para el funcionamiento de los seres vivos por formar parte de compuestos estructurales y esenciales en el balance iónico. Entre estos se encuentran, por ejemplo, el sodio (Na), el potasio (K) o el calcio (Ca). Otros metales también necesarios para el correcto funcionamiento del organismo, aunque en menor cantidad, son llamados *metales traza*, como el cobre (Cu), manganeso (Mn), cromo (Cr), cinc (Zn), etc. (Walker y col., 1997). Por último, existen metales como el mercurio (Hg) o el cadmio (Cd) que no siendo necesarios, son doblemente perjudiciales, ya que además de su propia toxicidad inducen deficiencias en metales esenciales con los que compiten (dado que su afinidad química es similar), ocupando su lugar en moléculas clave e impidiendo su normal absorción (Nordberg, 2007). Los metales habitualmente alcanzan el organismo como parte de otros compuestos y

una vez se encuentran en forma iónica no pueden biodegradarse, son elementos puros y por tanto no pueden romperse en compuestos más pequeños, sino que deben excretarse directamente o unirse a moléculas quelantes de forma que el compuesto resultante no sea dañino.

Estudiar la repercusión de la presencia de estos elementos en los diferentes ecosistemas es extremadamente complicado: por un lado, los efectos de una misma dosis de metal difieren enormemente de una especie a otra incluso dentro de una misma comunidad, como la de invertebrados acuáticos. Por otro lado también los metales esenciales y traza resultan potencialmente tóxicos a partir de un límite (Walker y col., 1997).

Una vez excedida la cantidad necesaria de un metal traza, (o en el caso de los metales no necesarios como el Cd desde las primeras concentraciones) el organismo debe excretar la cantidad restante o neutralizarla. El metal presente en el organismo puede dividirse de forma simplificada en dos grupos (Rainbow, 2002), por un lado la parte disponible metabólicamente, que al pasar de cierto umbral provocará daños en el individuo, pudiendo llegar a ser letal, y por otro el metal ya neutralizado, que puede acumularse sin ocasionar más daños. Es decir, la toxicidad es consecuencia de la superación de la capacidad de excreción y detoxificación del organismo, y tanto ésta como la bioacumulación están ligadas al patrón toxiconético y toxicodinámico de cada especie, esto es, a la forma concreta en que cada especie absorbe y elimina el compuesto químico y los efectos de éste. El conocimiento de estas características es esencial para una buena selección de bioindicadores, que podría cubrir las diferentes fuentes de bioacumulación del sistema acuático a estudio (Phillips y Rainbow, 1994).

5.1. Cadmio

El Cd es un elemento metálico, prácticamente insoluble en agua, aunque soluble cuando forma parte de compuestos como cloruros o sulfatos (Nordberg, 2007). Puede acceder al medio

ambiente por filtración natural, aunque la contaminación por Cd se debe en su mayoría a actividades humanas relacionadas con la industria, la agricultura o la minería (Sparling, 2016).

Propiedades físico-químicas	
Símbolo	Cd
Masa molar	112.4
Nº C.A.S.	7440-43-9
Solubilidad en agua	Insoluble

Tabla 3. Propiedades físico-químicas del cadmio (Nordberg, 2007).

Está considerado uno de los contaminantes prioritarios por la USEPA (USEPA, 2014). La EEA (*Environmental European Agency*), también lo considera un producto especialmente peligroso, habiéndose marcado como objetivo la desaparición progresiva de las emisiones por parte de los países europeos (EEA, 2010). En la directiva 2008/105/EC relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de agua de la Comisión Europea incluye el Cd entre las sustancias de control prioritario y establece un máximo de 0.08 a 0.025 µg/L (según dureza del agua) para los ríos europeos (Comisión Europea, 2008). Sin embargo la presencia real en los ríos europeos varía entre valores medios menores de 0.002 µg/L para algunos países a valores mayores de 1.25 µg/L en algunos ríos de Alemania y Eslovaquia (Pan y col., 2010).

Aproximadamente el 84% del Cd extraído en las minas es utilizado en pilas y baterías, mientras que el porcentaje restante corresponde a su uso como pigmento en pinturas, estabilizador de plásticos como el PVC, aleaciones metálicas y otros usos industriales (EEA, 2010; Sparling, 2016).

En los humanos, el Cd es un carcinógeno reconocido, que resulta nefrotóxico e interfiere con los procesos óseos (Ramírez, 2002; Pan, 2010). El Cd puede acceder al cuerpo humano a través de la dieta, ya que se fija tanto en plantas como en animales, y en menor medida a través del agua. La concentración de cadmio en algunos alimentos europeos como la leche puede llegar a ser hasta quince veces mayor que la permitida en los ríos (Pan y col., 2010). La

inhalación del humo del tabaco es también una fuente relevante de este metal y los fumadores habituales pueden llegar a tener el doble de Cd en su organismo que los no fumadores (Ramírez, 2002; Ruiz y col., 2010).

El Cd alcanza los ecosistemas acuáticos mayoritariamente a través de vertidos industriales, aunque en algunos casos llega a través de aguas procedentes de la agricultura, por ser un elemento utilizado ocasionalmente en la manufacturación de algunos fertilizantes (EEA, 2010). Al igual que otros metales tiende a acumularse en los sedimentos de los ríos, afectando especialmente a los organismos que los habitan, como es el caso de las larvas de *C. riparius*. Esta afectación de los sedimentos constituye, indirectamente, una de las vías de entrada más importante en humanos, ya que a través de la cadena trófica termina pasando a la dieta (Oskarsson y col., 2004).

Se han realizado numerosos estudios con quironómidos que ponen en evidencia la toxicidad aguda y crónica del Cd, describiéndose disminución de la supervivencia, del crecimiento y de la reproducción (Timmermans y col., 1992; Sildanchandra y Crane, 2000; Tousouva y col., 2016) y deformidades morfológicas (Janssens de Bisthoven y col., 2001; Martínez, y col., 2004), aunque los insectos parecen presentar una inusual tolerancia a este metal en comparación con otros invertebrados (Gills y col., 2008; Leonard y col., 2009). Así mismo se han investigado las metalotioneínas (MT), una familia de proteínas ubicuas, de pequeño tamaño y ricas en cisteína, capaces de secuestrar iones como el Cd^{2+} con una alta afinidad química. Se ha demostrado un incremento en los niveles de estas proteínas y de su transcripción, en diferentes sistemas celulares de vertebrados e invertebrados (Amiard y col., 2006) y de enzimas como la catalasa (CAT) y la *Glutación S-transferasa* (GST) (Nair y col., 2011), o biomarcadores de daño celular (Planelló y col., 2010; Martín-Folgar y col., 2017).

5.2. Cobre

El cobre (Cu) es insoluble en agua en estado puro, es soluble como parte de cloruros o sulfatos (Nordberg, 2007).

Propiedades físico-químicas	
Símbolo	Cu
Masa molar	63.5 g
Nº C.A.S.	7440-50-8
Solubilidad en agua	Insoluble

Tabla 4. Propiedades físico-químicas del cobre (Nordberg, 2007).

Es un metal buen conductor del calor y la electricidad, con infinidad de usos y aplicaciones (maquinaria industrial, monedas, fontanería, cableado, etc.) por lo que al año se extraen más de 175 millones de toneladas, a pesar de que gran parte del Cu utilizado en la industria es reciclado. El sulfato de cobre se usa en fungicidas, insecticidas y repelentes, y como suplemento nutricional tanto en humanos (véanse más abajo sus funciones biológicas) como para el ganado (Sparling, 2016). También el óxido cuproso se utiliza como pesticida, en especial en las pinturas de los cascos de las embarcaciones, para prevenir que se adhieran algas, hongos y moluscos (Kiaune y Singhasemanon, 2011).

El Cu procedente de la minería y de la agricultura puede alcanzar los sistemas acuáticos a través del filtrado. Las fuentes de contaminación directa del agua son tanto por los vertidos industriales como por las aguas residuales de las grandes poblaciones (Sparling, 2016). En la Comunidad Europea no es una de las 33 sustancias de control prioritario, pero está listado como sustancia que debe monitorizarse y cuyas emisiones deben ser reducidas progresivamente (European Commission, 2003b). Al no haber una normativa única suele tomarse como referencia el estándar de calidad del Reino Unido, que establece un máximo de 28 µg/L de Cu para aguas fluviales (aunque se recomienda modernizar estos parámetros en función de la biodisponibilidad) (UK Technical Advisory Group on the Water Framework Directive, 2015).

En un estudio realizado por encargo de la EEA se analizaron las concentraciones de Cu en

varios ríos de la Comunidad Europea, encontrando medias anuales por encima de 28 µg/L en ríos de Austria, Holanda y Gran Bretaña, y llegando incluso a superar los 50 µg/L en algunas estaciones de monitoreo de los dos últimos (European Environment Agency, EEA, 2001).

El Cu se une a las metalotioneínas (MT), proteínas de bajo peso molecular (6-7 kDa) y ricas en residuos cisteína, con capacidad para ligar metales pesados como el Zn y el Cu; que realizan funciones de protección celular frente al estrés oxidativo y de detoxificación almacenando metales y participa en procesos biológicos de oxidación-reducción. Las MTs participan en procesos como la formación de la hemoglobina, el metabolismo de los carbohidratos, y el normal funcionamiento de la queratina, del colágeno y de la elastina (Nordberg, 2007). La capacidad del Cu de alternar entre su estado Cu^{2+} y Cu^+ lo hace relevante en las reacciones redox necesarias para los organismos, pero al mismo tiempo en exceso puede producir radicales libres y daño celular (Tchounwou y col., 2012).

En anfibios se han documentado concentraciones letales al 50% (LC50), de entre 500-2700 µg/L a 48 horas (Eisler 2000; Soteropoulos y col., 2014), mientras que en peces el rango para LC50 a 96 horas varía entre 13.8 µg/L de la trucha arcoíris (US EPA, 1980) hasta los 8000 µg/L del resistente *Fundulus heteroclitus* (Eisler., 2000). En invertebrados entre otros se han documentado LC50 a 96 horas de 260 µg/L para nematodos, 1700 µg/L en caracoles, 560 µg/L en ostras (Eisler, 2000) y 28 µg/L en el crustáceo *Daphnia carinata* (US Department of Interior, 1997).

En estudios a tiempos más largos con macroinvertebrados benthicos se ha documentado que el Cu disminuye el crecimiento y la supervivencia, encontrando una LC50 a 28 días de 20 µg/L para el crustáceo *Gammarus pulex* y una LC50 a 14 días de 51 µg/L para *C. riparius* (Roman y col., 2007). En el caso de *C. riparius* se han reportado así mismo deformidades morfológicas (Janssens de Bisthoven., 1998; Martínez y col., 2003), alteraciones en el metabolismo energético (Servia y col., 2006), y daño en el ADN (Michailnova 2004; Bernabó, 2017).

6. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

El análisis de supervivencia consiste en el estudio de datos correspondientes al tiempo necesario para que se produzca un evento de interés. Dependiendo del contexto, este evento puede ser de diversa índole. De esta forma en ingeniería puede suponer el tiempo hasta que un componente mecánico o eléctrico falle (*failure time*), en economía el período hasta que una empresa entre en el mercado de un producto, en demografía la edad en que las mujeres tienen su primer hijo, mientras que en medicina a menudo representa literalmente el tiempo que el paciente permanece con vida una vez diagnosticada la enfermedad (Kleinbaum y Klein, 2005; Liu, 2012).

En ecotoxicología el análisis de supervivencia se centra en determinar el tiempo transcurrido hasta que el organismo de interés, sometido a diferentes concentraciones del xenobiótico estudiado, muere. Este período transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta que se produce el evento se denomina tiempo de supervivencia (*survival time*).

6.1. Características de los datos

Los datos de supervivencia presentan características particulares, como la no negatividad. O su carácter continuo o discreto según el caso. Si se analiza el número de ciclos que puede ejecutar una máquina antes de fallar la variable “tiempo” vendrá determinada por dicho número de ciclos y será por tanto de carácter discreto. Por el contrario en ecotoxicología un individuo puede morir en un instante cualquiera y por consiguiente el tiempo es una variable de carácter continuo, aunque las mediciones se hacen a intervalos regulares que aportan datos discretos.

Sin embargo el aspecto más característico de este tipo de datos es la posible existencia de *censura* (Kleinbaum y Klein, 2005). La censura se da cuando se conoce el instante exacto en que comienza la observación o en el que ocurre el evento, pero no ambos. En función del tipo de información perdida se dice que existe censura por la derecha o por la izquierda:

- *Censura por la izquierda*: se desconoce el origen del tiempo, el instante en que se debería haber empezado a registrar. Este tipo de censura se da habitualmente en el ámbito de la medicina y la psicología cuando se incorpora un nuevo sujeto al estudio para el que ya se ha producido el evento de interés pero se desconoce cuándo exactamente. Por ejemplo, si el evento a estudiar es la adquisición de una determinada habilidad infantil, como leer, un niño precoz de cuatro años que domina la lectura cuando es incluido en el estudio presentaría censura por la izquierda, ya que se desconoce el momento preciso de la adquisición de dicha habilidad, y sólo puede determinarse que es menor de cuatro años.
- *Censura por la derecha*: es la más común, y habitual en ecotoxicología. Ocurre cuando al término del estudio no se ha producido el evento de interés para algunos individuos. Los ensayos de supervivencia en presencia de xenobióticos suelen tener una duración determinada y es habitual que a su término queden algunos individuos con vida. Para estos individuos sólo puede determinarse que su supervivencia es mayor a la duración del ensayo, y los datos correspondientes deberán tener un tratamiento específico.

6.2. Función de riesgo y función de supervivencia

Si se desea establecer la relación entre la variable tiempo y la supervivencia en ese tiempo t se deberá hallar la probabilidad de no morir antes de ese instante.

Denominando $F(t)$ a la probabilidad de que un individuo no llegue vivo al instante t (*Failure function*):

$$P(T \leq t) = F(t) \quad (\text{Ec. 1})$$

La función de supervivencia vendrá dada por lo contrario, esto es, la probabilidad de que dicho individuo llegue con vida a dicho instante o, dicho de otra manera, la probabilidad de que la muerte se produzca después del instante t :

$$S(t) = P(T > t) = 1 - F(t) \quad ; \quad t \geq 0 \quad (\text{Ec. 2})$$

Tal y como se ha definido $F(t)$ se corresponde con una función de distribución de probabilidad, cuya función de densidad de probabilidad es:

$$f(t) = \frac{\partial F(t)}{\partial t} \quad (\text{Ec. 3})$$

Que a su vez puede relacionarse con la función de supervivencia:

$$f(t) = -\frac{\partial S(t)}{\partial t} \quad (\text{Ec. 4})$$

La función de supervivencia $S(t)$ representa una probabilidad y como tal, tendrá valores comprendidos entre 0 y 1. Además ha de ser decreciente, igual a la unidad en el origen de tiempos (puesto que aún no se ha producido ninguna muerte) y debe tener límite nulo cuando el tiempo tiende a infinito. Sus propiedades se resumen en la Tabla 5.

Propiedades de la función de supervivencia $S(t)$
$0 \leq S(t) \leq 1$
$S(0) = 1$
$\frac{\partial S(t)}{\partial t} < 0$
$\lim_{t \rightarrow \infty} S(t) = 0$

Tabla 5. Propiedades de la función de supervivencia.

La *función de riesgo* o tasa de riesgo (*hazard rate*) representa la probabilidad (por unidad de tiempo) de morir para un individuo que ha sobrevivido hasta el instante t :

$$h(t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{P(t < T \leq t + \Delta t)}{\Delta t} = \frac{f(t)}{S(t)} = \frac{f(t)}{1-F(t)} \quad (\text{Ec. 5})$$

Por último, la función:

$$H(t) = \int_0^t h(T) dT \quad (\text{Ec. 6})$$

recibe el nombre de *función de riesgo acumulado* $H(t)$.

6.3. Relación entre las funciones de riesgo y supervivencia

Las funciones de supervivencia, riesgo y riesgo acumulado pueden relacionarse a través de sus definiciones,

$$h(t) = \frac{f(t)}{1-F(t)} = \frac{-\partial[1-F(t)]/\partial t}{1-F(t)} = \frac{\partial\{-\ln[1-F(t)]\}}{\partial t} = \frac{\partial\{-\ln[S(t)]\}}{\partial t} \quad (\text{Ec. 7})$$

Integrando a ambos lados:

$$S(t) = \exp\left(-\int_0^t h(u) du\right) \rightarrow S(t) = \exp(-H(t)) \quad (\text{Ec. 8})$$

Y en consecuencia:

$$H(t) = -\ln(S(t)) \quad (\text{Ec. 9})$$

$$h(t) = \frac{\partial H(t)}{\partial t} \quad (\text{Ec. 10})$$

De esta forma basta conocer una de las tres funciones para poder obtener con facilidad las otras dos.

6.4. Modelos paramétricos clásicos: probit

Un modelo de supervivencia paramétrico es aquel en el que se asume que el tiempo de supervivencia sigue una distribución conocida. La forma de esta distribución puede determinarse a partir de razonamientos biológicos, utilizando argumentos de toxicocinética y toxicodinámica, o simplemente comparando los datos obtenidos con distribuciones que históricamente han resultado idóneas para este fin. Ejemplos de las distribuciones más frecuentes: exponencial, Weibull, log-logística, log-normal y gamma generalizada (Kleinbaum y Klein, 2005).

La aproximación, dependiendo del interés del estudio, se hará a través de la función de riesgo o se buscará directamente la función de supervivencia. El objetivo es estimar los parámetros de la distribución elegida utilizando los datos de tiempo de supervivencia obtenidos en las pruebas de laboratorio.

La función de supervivencia del modelo exponencial toma la expresión más sencilla de todas, con un único parámetro a estimar. Este parámetro es el inverso del tiempo de supervivencia medio:

$$S(t) = e^{-at} \quad (\text{Ec. 11})$$

El riesgo resulta ser constante en el tiempo:

$$h(t) = \frac{\partial\{-\ln[S(t)]\}}{\partial t} = a \quad (\text{Ec. 12})$$

Esto constituye su principal característica: la probabilidad de morir una vez llegado con vida a un instante determinado es la misma al principio del experimento que al final, e independiente de la duración de éste.

Otras distribuciones utilizadas en el análisis de supervivencia incorporan un segundo parámetro que les proporciona mayor flexibilidad (Tabla 6).

Modelo	Función de riesgo h(t)	Función de supervivencia S(t)
Exponencial	$h(t) = \lambda$	$S(t) = \exp(-\lambda t)$
Weibull	$h(t) = \lambda \gamma t^{\gamma-1}$ $\ln h(t) = \ln(\lambda \gamma) + (\gamma - 1) \ln t$	$S(t) = \exp(-(\lambda t)^\gamma)$
Gompertz	$h(t) = \gamma \cdot \exp(\lambda t)$ $\ln(h(t)) = \ln(\gamma) + \lambda t$	$S(t) = \exp\left(-\left(\frac{\gamma}{\lambda}\right)(\exp(\lambda t) - 1)\right)$
Log-logística	$h(t) = \frac{\gamma \lambda^\gamma t^{\gamma-1}}{1 + (\lambda t)^\gamma}$	$S(t) = \frac{1}{1 + (\lambda t)^\gamma}$

Tabla 6. Distribuciones comunes en el análisis de supervivencia.

En todo caso, la utilidad de estas funciones de supervivencia es meramente descriptiva, ya que sus parámetros carecen de significado biológico, aunque facilitan el cálculo de los diferentes LTx. Además, al no estar incluida la concentración el ajuste debe hacerse individualmente, esto es, una curva y ajuste por cada concentración de xenobiótico. Son modelos meramente descriptivos, sin capacidad predictiva.

Entre todos los modelos utilizados para aproximar las concentraciones letales (LC) para el x% de la población, LCx, sin duda el modelo probit es el más conocido en ecotoxicología. La OCDE lo incluye en su guía de análisis estadístico de datos de ecotoxicidad (OCDE, 2006).

Hoy en día son muchos los paquetes estadísticos (SPSS, Stata, etc.) que lo ofrecen en su software, por lo que es un modo sencillo de obtener una estimación rápida de las LCx a tiempos fijos (24, 48 y 96 horas son los más usuales), siendo ésta su mayor utilidad.

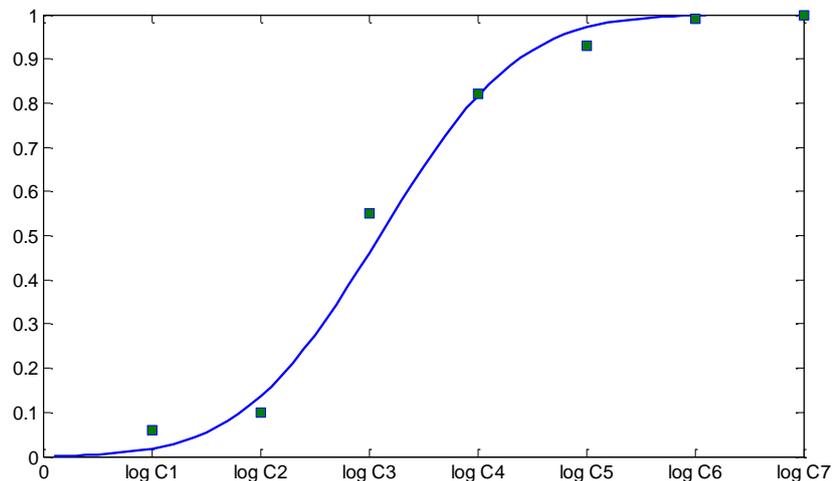


Figura 2. Ejemplo de ajuste probit. En el eje x se representa el logaritmo de las concentraciones, en el eje y la supervivencia.

Se basa en la distribución normal de probabilidad: la curva del logaritmo de la concentración *versus* mortalidad a un tiempo fijo se aproxima a la curva sigmoidea de una función de distribución (probabilidad acumulada) normal. Aunque la introducción de este método en ecotoxicología en los años 40 del siglo XX se hizo pensando en una tolerancia individual al tóxico puede también explicarse por una muerte aleatoria, cuya probabilidad aumenta con la dosis (Newman y McCloskey, 2000).

De este modo la supervivencia en función de la concentración, a un tiempo dado, viene dada por:

$$S(c) = 1 - F\left(a \cdot \log \frac{c}{LC50}\right) \quad (\text{Ec. 13})$$

Donde a y $LC50$ son los parámetros a estimar, c la concentración del compuesto utilizado y F la función de distribución normal.

Este modelo posee la ventaja de dar una estimación rápida y sencilla de los LCx correspondientes a un tiempo escogido. En estudios de genotoxicidad es habitual realizar un experimento previo de supervivencia con varias concentraciones para obtener un panorama general de la toxicidad del xenobiótico en cuanto a supervivencia. Con frecuencia estas concentraciones se eligen con un factor 10, por la forma funcional del modelo probit, de modo que la distribución de los logaritmos de esas concentraciones sea uniforme. Con los datos obtenidos se hallan las LCx mediante el modelo probit, que facilitan una adecuada elección de concentraciones en el posterior estudio de genotoxicidad (Morales y col., 2014; Martínez- Paz y col., 2017).

Como contrapartida, es un modelo muy simple, de utilidad limitada, ya que además de que los resultados que proporciona están fijados en el tiempo de elección (LCx a 24, 48, 96 horas...) no se obtiene información sobre ningún parámetro toxicocinético (sección 6.5).

6.5. Modelos biológicos

Durante décadas a pesar de su sencillez los modelos descriptivos proporcionaron información suficiente para comenzar a regular a través de organismos internacionales los xenobióticos vertidos al medio ambiente. Con el paso de los años estos modelos se han ido mostrando insuficientes para responder a cuestiones más complejas que la simple relación dosis-respuesta.

Hoy en día se considera esencial mejorar la capacidad predictiva de la ecotoxicología siendo necesario modelar y describir mejor los efectos de la incorporación de xenobióticos al medio ambiente, tanto en estudios de una única especie, como al analizar las consecuencias reales para los ecosistemas al completo (European Commission, 2013; Vighi y Villa, 2013).

Los *modelos biológicos* no se limitan a describir el proceso estudiado (supervivencia, crecimiento, reproducción, etc.) sino que persiguen encontrar los factores implicados, ya sea a nivel de especie o de ecosistema: bioacumulación, población afectada, etc.

Dentro de los modelos utilizados con ensayos de una única especie los denominados PBTK (*Physiology Based Toxicokinetic Models*) o TKTD (*Toxicokinetic Toxicodynamic Models*) toman especial relevancia por tener en cuenta el metabolismo del compuesto en el organismo. Para ello se plantea un modelo de absorción, eliminación y metabolismo del xenobiótico (toxicocinética) y las consecuencias de estos procesos a nivel de supervivencia, crecimiento, reproducción. Cuando se incluye el efecto del compuesto a nivel fisiológico o celular se habla de toxicodinámica. Este planteamiento lleva asociadas unas ecuaciones diferenciales cuya resolución proporciona las expresiones finales del proceso estudiado. Los parámetros que aparezcan en dichas expresiones, cuyo valor se estima a partir de los datos experimentales, tendrán un significado biológico establecido *a priori*: tasa de absorción, mortalidad base, etc.

El modelo de metabolismo elegido puede constar de diferentes grados de complejidad, atendiendo principalmente a dos razones: el objetivo perseguido y el conocimiento que se tenga en la comunidad científica sobre la especie estudiada. Estos dos aspectos están estrechamente relacionados: el amplio conocimiento de la fisiología y metabolismo de una especie permite describir modelos más complejos y detallados que a su vez proporcionan nuevos datos que ampliarán dicho conocimiento, como ocurre con los modelos de mamíferos utilizados en farmacología (Hickie y col., 1999; Andes y Craig, 2002; Hernández, 2006). Por el contrario, en el caso de especies menos estudiadas como los invertebrados es importante investigar y realizar numerosos ensayos, que inicialmente deberán utilizar planteamientos sencillos precisamente por la falta de datos (OCDE, 2004).

Otra ventaja de los modelos biológicos es su flexibilidad. A diferencia de los métodos clásicos, que exigen condiciones estrictas en los test (por ejemplo, concentración constante del

xenobiótico durante todo el experimento), un modelo biológico puede adaptarse a cambios en las condiciones (concentración, crecimiento, etc.), incluir estos cambios en sus ecuaciones y estudiar sus efectos. No sólo esto, sino que pueden incluirse varias respuestas en el mismo modelo como supervivencia y crecimiento, supervivencia y reproducción, etc.

Además no es necesario analizar cada concentración por separado: las curvas de supervivencia en el tiempo a concentración constante, utilizadas en los métodos descriptivos, dan paso a una superficie de supervivencia en función tanto del tiempo como de la concentración, pudiendo analizar de forma conjunta la influencia de ambos factores en la mortalidad u otra respuesta estudiada.

Uno de los retos más prometedores hoy en día es reunir en el mismo modelo parámetros de supervivencia, toxicocinética y biomarcadores, que permitan encontrar relación entre la respuesta macroscópica y lo que ocurre a nivel genético. Es un campo en el que los estudios son aún muy escasos y es necesaria más investigación (Jager y Hansen, 2013).

Otra de las grandes ventajas de los modelos biológicos es la posibilidad de simulación. Una vez que los parámetros del modelo han sido establecidos éste puede utilizarse para predecir los efectos de exposiciones muy diversas. La mayoría de los xenobióticos no son vertidos al medio ambiente de forma continua, sino que habitualmente aparecen picos y fluctuaciones en la concentración. Se conoce muy poco de las consecuencias de tales exposiciones, incluidos el efecto acumulativo o, en su caso, la recuperación entre pulsos (Ashauer y Escher, 2010).

En principio todos estos escenarios pueden simularse mediante los modelos TKTD. Aunque los trabajos son aún muy escasos (Ashauer y col., 2012), los modelos TKTD incluso pueden utilizarse en combinación con programas informáticos de modelado y simulación del comportamiento de xenobióticos en cauces fluviales, constituyendo un campo incipiente (Ashauer y col., 2013).

6.5.1. GUTS

La mayoría de los modelos TKTD de las últimas décadas pueden reunirse bajo una teoría general denominada Modelo General Unificado de Umbral de Supervivencia, GUTS (*General Unified Threshold Model of Survival*) (Jager y col, 2011). La teoría GUTS tiene en cuenta la muerte debida al azar así como la idea de diferencias individuales de tolerancia.

Los dos casos extremos de esta teoría son la Muerte Estocástica (*Stochastic Death*, SD) y la Tolerancia Individual (*Individual Tolerance*, IT), ambos con supuestos biológicos diferentes, aunque parten de una idea común: la existencia de una concentración interna umbral por debajo de la cual el organismo puede sobrevivir a la exposición al compuesto.

La diferencia estriba en la distribución de este umbral en la población y la forma en que afectan a la supervivencia concentraciones por encima de este valor. Así, en el marco de la SD el umbral de tolerancia al xenobiótico es el mismo para todos los individuos de la especie, y una vez sobrepasada esta concentración aumenta el riesgo de morir, pero la muerte en sí se debe a un proceso estocástico, probabilístico. Es decir, los individuos que sobreviven no tienen por qué ser especialmente fuertes o resistentes al compuesto, sino que simplemente han sido “más afortunados”.

Por el contrario, la IT, como su nombre indica, contempla la existencia de diferentes umbrales en la población, esto es, no todos los individuos poseen la misma tolerancia al xenobiótico, sino que ésta se distribuirá en la población según una distribución normal, logística u otra de las habituales en ecotoxicología. De esta forma tras una exposición a cierta concentración de compuesto los individuos que hayan sobrevivido serán los menos sensibles al producto, mientras que los que hayan muerto es porque poseían un umbral individual por debajo de la concentración a la que han sido sometidos.

Las diferencias entre ambos planteamiento se evidencian en una exposición por pulsos. Según el planteamiento de SD, si tras el primer pulso mueren, por ejemplo, la mitad de los individuos,

un segundo pulso de iguales características (tras el correspondiente período de recuperación) acabaría de nuevo con la mitad de los restantes (aproximadamente), y de la misma forma morirían la mitad cada vez si hubiera pulsos sucesivos. Sin embargo, bajo la hipótesis de IT, si el primer pulso ha terminado con la mitad de los individuos es porque éstos constituían la fracción más sensible de la población. El resto es capaz de sobrevivir a concentraciones de esas características y por lo tanto pulsos sucesivos no variarían la supervivencia: todos los que han soportado el primer pulso soportarían igualmente los demás (Figura 3).

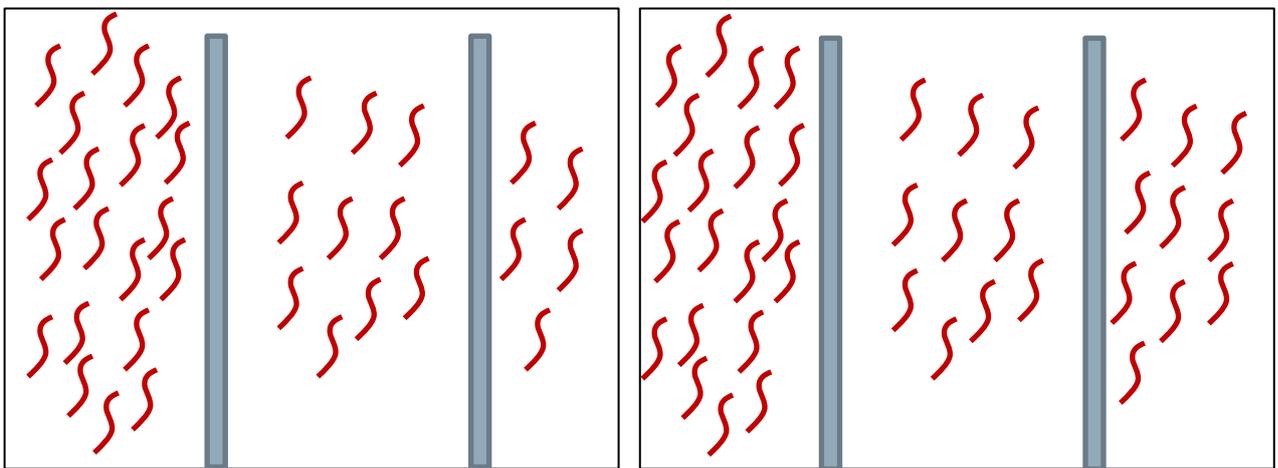


Figura 3. Izqda. el modelo SD: cada pulso (representado como barra azul) elimina la mitad de individuos cada vez. Dcha. el modelo IT: el primer pulso elimina los individuos más sensibles, un segundo pulso no produciría más muertes.

Por otro lado, no todos los ensayos de supervivencia se realizan del mismo modo ni con iguales medios. Mientras que en ocasiones se utilizan trazadores radiactivos para realizar un seguimiento del xenobiótico en el interior del organismo, pudiendo disponer de la concentración interna del producto, otras veces sólo se dispone de la supervivencia como único efecto medible. El primer caso permite el estudio toxicodinámico del proceso mientras que el segundo conduce a un estudio limitado de la toxicocinética.

En todo caso, el estudio toxicocinético constituye siempre el primer paso, relacionando la concentración externa del compuesto evaluado con la concentración en el interior del individuo.

Una forma sencilla de hacerlo, ampliamente utilizada por sus buenos resultados, es el denominado modelo unicompartimental de primer orden (Ashauer y Brown., 2008; Jager y col., 2010).

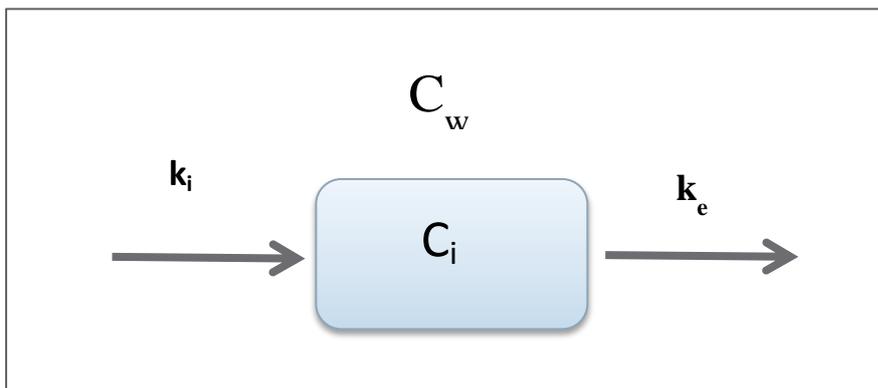


Figura 4. Modelo unicompartimental: C_w es la concentración de xenobiótico en el medio, que penetra en el organismo con una tasa de absorción k_i y lo abandona con una tasa de eliminación k_e .

El compuesto químico situado en el exterior del organismo con una *concentración externa* C_w accede al interior con una tasa de absorción, k_i , denominada *constante de absorción*. Al mismo tiempo la *concentración interna*, C_i , disminuye a través de diferentes mecanismos, proporcionalmente a la *constante de eliminación*, k_e (Figura 4).

En este modelo unicompartimental de primer orden la dinámica de la concentración interna viene dada por la siguiente expresión:

$$\frac{dC_i(t)}{dt} = k_i C_w(t) - k_e C_i(t) \quad (\text{Ec. 14})$$

En la mayoría de los ensayos de supervivencia no se poseen los datos de concentración interna, sino que simplemente se persigue relacionar la concentración externa del compuesto con la mortalidad. Y aunque en ocasiones se dispone de las constantes de absorción y eliminación ya sea por ensayos anteriores o mediante *software* de modelado tipo QSAR (Cherkasov y col., 2014), lo más habitual es carecer de esta información. En estos casos es

conveniente utilizar la *concentración interna escalada*, que aparece al dividir la Ec. 14 por el *factor de bioacumulación* k_i/k_e :

$$\frac{dC_i^*(t)}{dt} = k_e(C_w(t) - C_i^*(t)) \quad (\text{Ec. 15})$$

La relación entre concentración interna y concentración interna escalada es por lo tanto:

$$C_i^*(t) = \frac{k_e}{k_i} C_i(t) \quad (\text{Ec. 16})$$

Introducir la concentración escalada reduce el número de parámetros a estimar (en vez de k_i y k_e solamente k_e). Sin embargo el significado que adquiere ahora la constante k_e , aunque conserve su símbolo, es distinto y habitualmente se la denomina *constante de tasa dominante* (Jager y col., 2011, Kulkarni y col., 2013), pues representa el proceso compensatorio dominante, el más lento, ya sea la propia eliminación o el proceso de recuperación del daño ocasionado por el compuesto.

Una vez establecida la concentración escalada como métrica de elección debe relacionarse con la función de riesgo. En la teoría GUTS se define una *función de riesgo individual* relacionada con la concentración interna y el riesgo basal (la tasa de riesgo sin xenobiótico, del control) de la siguiente forma:

$$h_z(t) = k_k \max(0, C_i^*(t) - z) + h_b(t) \quad (\text{Ec. 17})$$

Donde:

- k_k es la tasa de muerte o *killing rate* y constituye la relación entre la concentración interna y el riesgo a morir por unidad de tiempo debido a la concentración interna de compuesto.
- $h_b(t)$ es el riesgo basal, representa la función de riesgo del control.
- z es el umbral de tolerancia, la máxima concentración de xenobiótico sin efecto en la supervivencia.

El riesgo basal será considerado parte de un proceso estocástico en todos los casos, e independiente de la concentración del compuesto utilizado. Al menos que los ensayos sean de muy larga duración y/o los especímenes no sean alimentados en ningún momento el riesgo basal se considera constante.

De acuerdo con la teoría general de análisis de supervivencia presentada en los apartados 8.3 y 8.4, se puede definir la supervivencia de un individuo con umbral z de la siguiente forma:

$$S_z(t) = \exp\left(-\int_0^t h_z(T)dT\right) \quad (\text{Ec. 18})$$

La diferencia con el análisis de supervivencia ordinario es que, al haber definido la función de riesgo en relación al umbral de tolerancia individual, la extensión a la supervivencia de toda la población viene dada por:

$$S(t) = \int_0^\infty S_z(t) f(z)dz \quad (\text{Ec. 19})$$

Donde $f(z)$ representa la función de densidad de probabilidad del umbral de tolerancia en la población. En términos sencillos, $f(z)$ representa la forma en que el umbral se distribuye en la población, pudiendo ser por ejemplo una distribución normal, log-logística, etc.

6.5.1.1. Muerte estocástica (SD)

Las expresiones del apartado anterior no diferencian el planteamiento de SD del IT, de hecho, puede considerarse un planteamiento mixto. Para llevarlo al extremo de SD, en el que el umbral de tolerancia es único para toda la población, sólo es preciso considerar que la función de densidad $f(z)$ es una delta de Dirac, lo que hace que la Ec. 19 sea trivial y las funciones $S_z(t)$ y $S(t)$ sean equivalentes.

En resumen, en este modelo de SD, asumiendo modelo unicompartmental de primer orden y riesgo basal constante la supervivencia viene dada por:

$$S(t) = \exp\left(-\int_0^t h_z(T) dT\right) \quad \text{siendo}$$

$$h_z(t) = k_k \max(0, C_i^*(t) - z) + h_b$$

$$\frac{dC_i^*(t)}{dt} = k_e(C_w(t) - C_i^*(t))$$

(Ec. 20)

De forma que los parámetros a estimar en este caso son:

- k_k , la tasa de muerte.
- z , el umbral de tolerancia compartido por todos los individuos.
- h_b , la tasa de riesgo basal.
- k_e , constante de tasa dominante.

6.5.1.2. Tolerancia Individual (IT)

Para considerar el modelo de IT es necesario que la constante de tasa de muerte o *killing rate*, k_k , se haga infinitamente grande en la Ec. 17. De esta forma sólo se presentan dos casos (obviando la tasa basal por simplicidad):

- Si la concentración escalada interna no alcanza el umbral individual z (ya no es constante):
 - $\max(0, C_i^*(T) - z) = 0$, lo que deviene en $h_z(T) = 0$ y $S_z(T) = 1$, el individuo vive.
- Si la concentración escalada interna excede el umbral de tolerancia individual:
 - $\max(0, C_i^*(T) - z) = C_i^*(T) - z$ lo que deriva en $h_z(T) = \infty$ y $S_z(T) = 0$, el individuo muere.

De este modo, ahora la cuestión principal pasa a ser la forma en que se distribuye el umbral de tolerancia en la población, y el momento en que la concentración escalada interna pasará a superar este umbral en cada individuo:

$$S(t) = \int_{\max_{0 < T < t} C_i^*(T)}^{\infty} f(z) dz = \left(1 - F(\max_{0 < T < t} C_i^*(T)) \right) \quad (\text{Ec. 21})$$

Donde $F(\max_{0 < T < t} C_i^*(T))$ es la función de distribución de probabilidad elegida, aplicada en el máximo de concentración interna escalada.

La razón de utilizar este máximo, $\max_{0 < T < t} C_i^*(T)$, es evitar que cuando la concentración externa no es constante los individuos ya muertos puedan “resucitar”. En efecto, en ese caso puede ocurrir que la concentración escalada interna aumente en los primeros instantes y disminuya después. La supervivencia en el instante t no vendrá dada por la concentración en ese último instante sino por su máximo.

En los ensayos de laboratorio la concentración externa del xenobiótico suele ser constante, lo que repercute en una concentración interna creciente, y la expresión de la supervivencia se simplifica:

$$S(t) = \int_{C_i^*(T)}^{\infty} f(z) dz = \left(1 - F(C_i^*(T)) \right) \quad (\text{Ec. 22})$$

$$C_i^*(t) = C_w(1 - \exp(-k_e \cdot t))$$

De forma que los parámetros a estimar en este caso son:

- h_b , la tasa de riesgo basal.
- k_e , constante de tasa dominante.
- los parámetros que caracterizan a la función de densidad $f(z)$ elegida.

Aunque se han descrito los dos casos extremos de la teoría GUTS, muerte estocástica y tolerancia individual, sería posible desarrollar modelos mixtos a partir de las ecuaciones generales descritas en el apartado 6.5.1.

6.6. Ajuste de los modelos

6.6.1. Función de verosimilitud

En el análisis de supervivencia se registran datos de tipo discreto, correspondientes al número de individuos que responde a un determinado tratamiento a lo largo del tiempo. Por esta razón la suposición de errores de tipo normal e independientes en el tiempo, necesaria en mínimos cuadrados, es inadecuada (Jager y col., 2011). Los casos con censura por la derecha tampoco se ven contemplados en la regresión por mínimos cuadrados. Para estimar los parámetros del modelo a partir de los datos es necesaria una función de verosimilitud (*likelihood function*) basada en una distribución multinomial (Bedaux y Kooijman, 1994; Jager y col., 2011).

Se desea estimar un vector de parámetros θ correspondientes a la función de supervivencia $S(t)$ relativa al modelo biológico escogido, utilizando los datos de tiempo y supervivientes obtenidos en n observaciones. En cada instante t_0, t_1, \dots, t_n se ha observado el correspondiente número de individuos vivos y_0, y_1, \dots, y_n (por tanto y_0 son los individuos vivos al inicio del experimento). La probabilidad de que un individuo escogido al azar muera entre los instantes t_{i-1} y t_i viene dada por $S_{i-1}(\theta) - S_i(\theta)$, esto es, la diferencia entre las funciones de supervivencia en ambos instantes, halladas sustituyendo t_{i-1} y t_i respectivamente. Por otro lado en el ensayo se ha observado que $y_{i-1} - y_i$ individuos han muerto en ese intervalo de tiempo. Por lo tanto la función de verosimilitud viene dada por la siguiente expresión (Jager y col., 2011):

$$l(\mathbf{y}|\theta) = y_0! \prod_{i=1}^{n+1} \frac{(S_{i-1}(\theta) - S_i(\theta))^{y_{i-1} - y_i}}{(y_{i-1} - y_i)!} \quad (\text{Ec. 23})$$

La razón de introducir la observación $n+1$ estriba en los datos con censura por la derecha, esto es, en los individuos que permanecen con vida cuando finaliza el ensayo. Puesto que n es la última observación, $n+1$ corresponde a un tiempo "infinito", es decir, aquel en el que morirían

todos los individuos, de modo que se establece $y_{n+1} = 0$, $S_{n+1}(\boldsymbol{\theta}) = 0$ y los datos con censura pueden introducirse de forma similar al resto (Jager y col., 2011; Ashauer y col., 2015).

Es habitual utilizar el logaritmo de la función de verosimilitud para facilitar los cálculos posteriores:

$$\ln l(\mathbf{y}|\boldsymbol{\theta}) = \sum_{i=1}^{n+1} (y_{i-1} - y_i) \ln(S_{i-1}(\boldsymbol{\theta}) - S_i(\boldsymbol{\theta})) + \ln\left(\frac{y_0!}{\prod_{i=1}^{n+1} (y_{i-1} - y_i)!}\right) \quad (\text{Ec. 24})$$

Dado que el último término no depende del vector de parámetros $\boldsymbol{\theta}$, no interviene en la búsqueda de los valores de éste que maximicen la función de log-verosimilitud, y puede ser ignorado, de forma que la función de log-verosimilitud pasa a ser:

$$\ln l(\mathbf{y}|\boldsymbol{\theta}) = \sum_{i=1}^{n+1} (y_{i-1} - y_i) \ln(S_{i-1}(\boldsymbol{\theta}) - S_i(\boldsymbol{\theta})) \quad (\text{Ec. 25})$$

6.6.2. Estimación de los parámetros e intervalos de confianza

Para hallar una estimación del vector de parámetros $\boldsymbol{\theta}$ se plantea la máxima verosimilitud, es decir, se maximiza la función de log-verosimilitud. Esto constituye un problema de optimización no lineal que suele resolverse con la ayuda de *software* matemático especializado.

Un estimador máximo verosímil $\hat{\boldsymbol{\theta}}$ obtenido de esta forma cumple las siguientes propiedades asintóticas (Green, 2003):

1. Consistencia: según aumenta el tamaño de la muestra, n , el valor del estimador máximo verosímil $\hat{\boldsymbol{\theta}}$ tiende al valor real $\boldsymbol{\theta}$.
2. Normalidad: se dice que $\hat{\boldsymbol{\theta}}$ es asintóticamente normal, esto es

$$\sqrt{n}(\hat{\boldsymbol{\theta}} - \boldsymbol{\theta}) \sim N(0, i(\boldsymbol{\theta})^{-1})$$

Donde $i(\theta) = -E \left[\frac{\partial^2}{\partial \theta^2} \ln l(y|\theta) \right]$ es la cantidad de información de Fisher esperada correspondiente a una observación.

3. Eficiencia: los estimadores máximo-verosímiles poseen menor varianza que otros estimadores.

Para hallar los intervalos de confianza el método más habitual en ecotoxicología es utilizar la denominada *razón de verosimilitud* (Meeker y Escobar, 1995; Kooijman, 2011). Consiste en fijar uno a uno cada parámetro y optimizar para el resto la función de verosimilitud resultante, denominada *función de verosimilitud restringida*. La razón de verosimilitud es el cociente entre la función de verosimilitud con todos los parámetros optimizados a la vez y la función de verosimilitud restringida al parámetro deseado.

El negativo del doble del logaritmo de este cociente sigue una distribución chi-cuadrado de un grado de libertad (por haber fijado un solo parámetro). Suponiendo un modelo de cuatro parámetros, la razón de verosimilitud para el primero de ellos cumpliría (para los demás la expresión sería análoga):

$$L = \ln(y|\hat{\theta}_1, \hat{\theta}_2, \hat{\theta}_3, \hat{\theta}_4); \quad L_r = \ln(y|\theta_1^*, \hat{\theta}_2, \hat{\theta}_3, \hat{\theta}_4)$$

$$-2\ln(L_r/L) \sim \chi_1^2 \quad (\text{Ec. 26})$$

A partir de la expresión de la Ec. 26 pueden hallarse los intervalos de confianza para $\hat{\theta}_1$ con el nivel de significación deseado.

6.6.3. Elección de modelo y bondad de ajuste

Cuando se realiza el ajuste de varios modelos para describir una misma realidad es deseable contar con algún tipo de criterio que permita elegir el más adecuado.

El ajuste de diferentes modelos estimados por máxima verosimilitud en ecología suele compararse de dos formas: el criterio de *Akaike* y el radio de verosimilitud (Jhonson y Omland, 2004), aunque este último se reserva a la elección entre modelos anidados, esto es, cuando el modelo más sencillo puede considerarse un caso especial de otro modelo con más parámetros. El criterio de Akaike (Akaike, 1974; Symonds y Moussalli, 2011) utiliza tanto el valor de la función de verosimilitud con los parámetros estimados como el número de dichos parámetros, k , favoreciendo a modelos con el menor número de ellos:

$$AIC = -2 \cdot \ln l(\mathbf{y}|\hat{\boldsymbol{\theta}}) + 2k \quad (\text{Ec. 27})$$

En el caso en el que el tamaño de la muestra (n) y el número de parámetros (k) no cumplan la relación $\frac{n}{k} > 40$ es preferible utilizar la corrección para muestras pequeñas (Symonds y Moussalli, 2011):

$$AIC_c = AIC + \frac{2k(k+1)}{n-k-1} \quad (\text{Ec. 28})$$

El modelo con menor valor de AIC o, en su caso, AIC_c será el que mejor ajuste según el criterio de Akaike.

No obstante, los valores netos de AIC dependen fuertemente del tamaño de la muestra, y su utilidad se basa en la comparación entre los valores obtenidos con los distintos modelos, por lo que es habitual complementar esta información con las denominadas *diferencias y pesos de Akaike* (Burnham y Anderson, 2002).

Las diferencias de Akaike se calculan restando al valor de cada modelo el valor mínimo obtenido (ya sea AIC o AIC_c):

$$\Delta_i = AIC_i - AIC_{min} \quad (\text{Ec. 29})$$

Por otro lado, los pesos relativos de Akaike se utilizan para una mejor interpretación de la plausibilidad de los R modelos comparados:

$$w_i = \frac{\exp\left(-\frac{1}{2} \Delta_i\right)}{\sum_{j=1}^R \exp\left(-\frac{1}{2} \Delta_j\right)} \quad 0 \leq w_i \leq 1 \quad (\text{Ec. 30})$$

Pueden interpretarse como la probabilidad de que el modelo i sea el mejor entre los posibles modelos estudiados (Burnham y col., 2011).

Una vez escogido el mejor modelo de entre los candidatos puede realizarse un estudio posterior del coeficiente de determinación ajustado (*adjusted R square*) que, si bien no es adecuado en la etapa de elección de modelos basada en la función de verosimilitud, nos ofrece una medida de la proporción de los datos que puede explicarse por el modelo elegido (Burnham y Anderson, 2002):

$$\text{Adjusted } R \text{ square} = 1 - \frac{(n-1) \cdot \sum_i (\hat{y}_i - y_i)^2}{v \cdot \sum_i (y_i - \bar{y})^2} \quad (\text{Ec. 31})$$

Siendo \hat{y}_i los datos estimados por el modelo, y_i los datos experimentales y \bar{y} su media. Tiene en cuenta los grados de libertad dados por la diferencia entre el número de datos (n) y el número de parámetros a estimar (m) y toma valores entre 0 y 1, siendo los valores cercanos a la unidad los que indican un mejor ajuste.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es analizar la supervivencia de *C. riparius* expuesto a diferentes sustancias contaminantes presentes en los ecosistemas acuáticos mediante modelos matemáticos basados en la teoría GUTS. Con este análisis se quiere contribuir al conocimiento de esta especie de referencia como bioindicador, de la que no hay estudios de supervivencia de este tipo.

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Encontrar los modelos GUTS con una toxicocinética monocompartimental que mejor se adecuan a la respuesta experimental de *C. riparius* ante dos tipos de xenobióticos: fenoles y metales.
- Estudiar las ventajas que presentan estos modelos toxicocinéticos respecto a métodos tradicionales del estudio de la supervivencia, tanto desde el punto de su capacidad para ajustar los datos experimentales, como de extrapolarlos a escenarios de análisis de riesgo ambiental.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Material biológico

Se emplearon larvas de cuarto estadio de *Chironomus riparius* Meigen (Diptera), criadas en laboratorio. La población tiene su origen en larvas silvestres recolectadas en Valencia (España), cultivadas posteriormente en el laboratorio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED) siguiendo los protocolos estandarizados para los test de toxicidad (USEPA, 2000; OCDE, 2004).

El medio de cultivo utilizado estaba compuesto por CaCl_2 0,5 mM, NaCl 1 mM, MgSO_4 1 mM, NaHCO_3 0,1 mM, KH_2PO_4 0,025 mM y FeCl_3 0,01 mM suplementado con comida comercial para peces (TetraMin, Tetra) y hojas de ortiga trituradas. Los cultivos se mantuvieron a 18°- 20°C, con ciclos de luz/oscuridad de 16/8 horas y aireación constante.

1.2. Compuestos químicos

Los xenobióticos utilizados son triclosán (TCS) (Sigma), bisfenol A (BPA) (Aldrich), cloruro de cadmio (CdCl_2) (Fluka) y cloruro cúprico (CuCl_2) (Sigma Aldrich).

Como disolvente se utilizó etanol (VWR) para el TCS y el BPA mientras que para CdCl_2 y el CuCl_2 no fue necesario disolvente por ser ambos solubles en agua.

Se utilizaron las siguientes concentraciones de cada compuesto:

- BPA: 3-4-5-6-7 mg/L.
- TCS: 1-1.5-1.75-2-2.5-3 mg/L.
- CuCl_2 : 10^{-7} - 10^{-6} - 10^{-5} - 10^{-4} - $5 \cdot 10^{-4}$ - 10^{-3} mol/L.

- CdCl_2 : 10^{-7} - 10^{-6} - 10^{-5} - 10^{-4} - $5 \cdot 10^{-4}$ - 10^{-3} mol/L.
- Además de los anteriores, se realizó un ensayo en el que se administraron conjuntamente CuCl_2 y CdCl_2 en las mismas concentraciones que por separado. A la hora de ajustar los modelos matemáticos a este caso se utilizaron las concentraciones molares por ser iguales para ambos compuestos, es decir: 10^{-7} - 10^{-6} - 10^{-5} - 10^{-4} - $5 \cdot 10^{-4}$ - 10^{-3} mol/L.

En la tabla 7 se muestran las equivalencias entre las concentraciones molares y en mg/L utilizadas con CuCl_2 , CdCl_2 y la mezcla de ambos, así como la concentración equivalente en Cd y Cu.

M (mol/L)	mg/L (CuCl_2)	mg/L (Cu)
10^{-7}	0.0134	0.00646
10^{-6}	0.134	0.0646
10^{-5}	1.34	0.646
10^{-4}	13.4	6.46
$5 \cdot 10^{-4}$	67.2	32.3
10^{-3}	134	64.6
M (mol/L)	mg/L (CdCl_2)	mg/L (Cd)
10^{-7}	0.0183	0.0112
10^{-6}	0.183	0.112
10^{-5}	1.83	1.12
10^{-4}	18.3	11.2
$5 \cdot 10^{-4}$	91.7	56.205
10^{-3}	183	112

Tabla 7. Equivalencia de concentraciones molares y mg/L del Cu, Cd, CuCl_2 , CdCl_2 .

Las réplicas de control de BPA y TCS se sometieron a la misma concentración de solvente (etanol) que los tratamientos.

1.3. Software

En el ajuste a modelos probit así como en los test de normalidad y el análisis de varianza de la prueba de crecimiento se utilizó IBM SPSS Statistics 22.

El estudio de imagen para análisis del crecimiento fue realizado con ImageJ (1.46r).

Los cálculos y estimación de parámetros de las funciones de supervivencia de la teoría GUTS, así como la supervivencia simulada en diferentes escenarios se realizaron con Matlab (R2010b).

2. MÉTODOS

2.1. Tratamientos experimentales de supervivencia

Para llevar a cabo los tratamientos de los experimentos, larvas de cuarto estadio de *Chironomus riparius* se expusieron en vasos de cristal con medio de cultivo a concentraciones de 1-1.5-1.75-2-2.5-3 mg/L de TCS, 3-4-5-6-7 mg/L de BPA y 10^{-7} - 10^{-6} - 10^{-5} - 10^{-4} - $5 \cdot 10^{-4}$ - 10^{-3} mol/L de CuCl_2 , CdCl_2 y la mezcla de ambos, durante diferentes tiempos. El BPA y el TCS precisan de disolvente (etanol) para su disolución, por lo que los grupos de larvas control en estos dos casos se expusieron al mismo porcentaje de solvente (etanol: 0.04% en volumen). Los tratamientos consistieron en tres experimentos independientes, en los que las larvas provenían de diferentes masas de huevos. En los tratamientos de 96 horas el medio de cultivo se renovó cada 24 horas y en los tratamientos a 90 horas a las 48 horas, añadiendo en ambos casos 3 mg de comida comercial.

En cada réplica (vaso de cristal) se colocaron 30-50 larvas (según disponibilidad) de cuarto estadio de *C. riparius*, elegidas de este estadio por el tamaño de la cápsula cefálica. El traslado del recipiente de cultivo al vaso de cada réplica se realizó de forma individual, manipulando

cada larva suavemente con unas pinzas. Los vasos fueron cubiertos con papel de aluminio para evitar la fotodegradación, realizando orificios que permitieran una aireación adecuada.

El análisis de la supervivencia de cada uno de los compuestos químicos se llevó a cabo exponiendo larvas de cuarto estadio de *C. riparius* durante 90-96 horas y contando el número de larvas vivas a intervalos de tiempo mínimos de 3 horas, máximo 24 horas. Sólo en el caso del BPA se midió la supervivencia en algunos intervalos de 3 horas para las concentraciones más altas. En concreto las medidas se realizaron en los tiempos siguientes:

- BPA: 0-12-24-36-48-72-84-96 horas para 3 y 4mg/L; 0-12-15-18-24-36-42-48-60-66-72-84-90 horas para 5,6 y 7 mg/L.
- TCS: 0-6-12-18-24-36-42-48-60-66-72-84-90 horas.
- Cu y Cd: 0-24-48-72-96 horas.

La duración de los ensayos fue por consiguiente de 90 horas en el caso del BPA y el TCS, 96 horas para el Cu y el Cd. Las larvas fueron consideradas muertas cuando no reaccionaron al contacto suave con las pinzas. Los individuos muertos fueron retirados.

Las pupas fueron retiradas y descontadas del número de larvas inicial por no cumplir la condición de ser larvas de cuarto estadio. El suministro regular de comida evitó casi totalmente el canibalismo entre las larvas, al estar suficientemente alimentadas. Las escasas larvas desaparecidas por esta razón fueron contadas como muertas, ya que se observó que la tendencia era devorar los restos de las larvas ya muertas.

2.2. Estimación del crecimiento de las larvas durante el ensayo

Previamente al ensayo de supervivencia con xenobiótico se realizó un estudio con larvas para determinar si existía crecimiento de éstas durante las 96 horas de tratamiento, máxima duración de los ensayos.

Se depositaron 50 larvas en un recipiente de cristal de base rectangular ancha con 50 cm³ de medio de cultivo, siguiendo el mismo protocolo de intervalos de luz, temperatura y alimento que en los ensayos con xenobiótico. La razón de usar un recipiente mayor que los vasos utilizados en los ensayos de supervivencia fue conseguir la separación suficiente entre las larvas para poder medir las longitudes individuales. Esta medición se realizó situando el recipiente sobre papel milimetrado y tomando fotografías a las 0, 48 y 96 horas mediante una cámara reflex fijada a la mesa con una mariposa y un brazo. Debido a la tendencia de las larvas de *C. riparius* a aglutinarse formando grupos de varios individuos fue necesaria la toma de numerosas fotografías hasta conseguir la nitidez deseada. En algunos casos fue necesario empujar suavemente la masa de larvas con unas pinzas para separar los individuos. Se escogió la mejor fotografía de cada tiempo. Las imágenes elegidas se analizaron posteriormente con el programa Image J, obteniendo la longitud de todas las larvas en dichos tiempos.

El conjunto de datos de cada tiempo fue analizado, obteniendo su media y desviación típica y sometido a un test de normalidad de Saphiro Wilk. Las medias y desviaciones típicas de la longitud de las larvas a las 0, 48 y 96 horas se compararon mediante un test ANOVA de un factor precedido por un test de Levéne de igualdad de varianzas.

2.3. Ajuste del modelo

2.3.1. Aplicación del modelo GUTS

La métrica de dosis escogida fue la concentración escalada, debido a la falta de datos toxicocinéticos (constantes de eliminación o absorción de cada compuesto para *C. riparius*) que permitieran la estimación de la concentración interna (Introducción, apartado 6.5.1).

El modelo toxicocinético escogido fue un modelo unicompartmental con cinética de primer orden, asumiendo que no hay crecimiento de las larvas durante el ensayo de toxicidad. Se reescribe aquí la Ec. 15 por claridad:

$$\frac{dC_i^*(t)}{dt} = k_e(C_w - C_i^*(t))$$

C_w representa la concentración de xenobiótico en el medio exterior, $C_i^*(t)$ es la concentración interna escalada y k_e la constante de la tasa dominante (Introducción, apartado 6.5.1).

Considerando constante la concentración en el medio resulta:

$$C_i^*(t) = C_w(1 - \exp(-k_e \cdot t)) \quad (\text{Ec. 32})$$

A pesar de su sencillez el modelo unicompartmental con cinética de primer orden es ampliamente utilizado en ecotoxicología por ser en general una buena representación de la cinética del compuesto (Introducción, apartado 6.5.1).

Se asumió así mismo que la mortalidad del control es un proceso estocástico independiente de la mortalidad causada por el compuesto, y la tasa de riesgo basal asociada al control, h_b , fue considerada constante.

En cuanto al efecto en la supervivencia de los xenobióticos, se estudió mediante la teoría GUTS, tanto con modelos IT como SD. En este último caso se consideraron varias densidades de probabilidad como representantes de la tolerancia individual en la población de larvas, comparando después los resultados obtenidos en cada caso.

2.3.1.1. SD (SD)

En el modelo de muerte estocástica el umbral de tolerancia z es el mismo para todos los individuos, y por lo tanto un parámetro a estimar, junto con el *killing rate* o tasa de muerte y la tasa de riesgo basal. De la Ec. 20 (Introducción, apartado 6.5.1) se deriva la expresión para la supervivencia:

$$S(t) = \begin{cases} \exp(-h_b t) & \text{mientras } C_i^*(t) < z \\ \exp\left[-k_k C_w \left(t + \frac{1}{k_e} \exp(-k_e t) - \frac{1}{k_e}\right) + (k_k z - h_b)t\right] & \text{si } C_i^*(t) \geq z \end{cases} \quad (\text{Ec. 33})$$

Donde h_b es la tasa de riesgo basal, k_e la constante de eliminación, k_k la tasa de muerte, C_w la concentración de xenobiótico en el medio, $C_i^*(t)$ la concentración interior y z el umbral de tolerancia, común para toda la población y dependiente sólo del compuesto utilizado.

2.3.1.2 Tolerancia individual (IT)

En el modelo de tolerancia individual cada individuo posee un umbral de tolerancia al xenobiótico. Ese umbral individual z se distribuye en la población con una distribución de probabilidad desconocida *a priori*.

Se estudió una distribución uniparamétrica, la distribución exponencial, y cuatro distribuciones biparamétricas: logística, normal, de Weibull y gamma. En la Tabla 8 se recogen estas distribuciones y sus parámetros.

Distribución	Función de densidad de probabilidad $f(x)$	Función de distribución $F(x)$	Parámetros
Exponencial	$\gamma \cdot e^{-\beta\gamma z}$	$1 - e^{-\gamma z}$	γ
Logística	$\frac{(\beta/\alpha)(z/\alpha)^{\beta-1}}{1 + \left(\frac{z}{\alpha}\right)^{-\beta}}$	$\frac{1}{1 + \left(\frac{z}{\alpha}\right)^{-\beta}} = \frac{\left(\frac{z}{\alpha}\right)^{\beta}}{1 + \left(\frac{z}{\alpha}\right)^{\beta}}$	α, β
Normal	$\frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{z-\mu}{\sigma}\right)^2}$	$\frac{1}{2} \left[1 + \operatorname{erf} \left(\frac{z-\mu}{\sigma\sqrt{2}} \right) \right]$	μ, σ
Weibull	$\frac{\beta}{\alpha^{\beta}} z^{\beta-1} \exp(-(z/\alpha)^{\beta})$	$1 - \exp[-(z/\alpha)^{\beta}]$	α, β
Gamma	$\frac{1}{\beta^{\alpha}\Gamma(\alpha)} z^{\alpha-1} e^{-z/\beta}$	$\frac{1}{\beta^{\alpha}\Gamma(\alpha)} \int_0^z t^{\alpha-1} e^{-t/\beta} dt$	α, β

Tabla 8. Distribuciones utilizadas en el modelo IT.

Añadiendo el riesgo basal a la suposición de tolerancia individual de la Ec. 22 (Introducción, apartado 6.5.1.2) se llega a la siguiente función de supervivencia:

$$S(t) = (1 - F(t)) \cdot e^{-h_b t} \quad (\text{Ec. 34})$$

Siendo h_b la tasa de riesgo basal y $F(t)$ la función de distribución de probabilidad escogida para el umbral de tolerancia, sustituyendo la variable z por la concentración interna escalada $C_i^*(t)$.

2.3.2. Función de verosimilitud

Los parámetros de los modelos GUTS-SD y GUTS-IT fueron estimados maximizando la función de log-verosimilitud, que para cada concentración resulta en la Ec. 25 (Introducción, apartado 6.6.1):

$$\ln(\theta|y) = \sum_{i=1}^{n+1} (y_{i-1} - y_i) \ln(S_{i-1}(\theta) - S_i(\theta)) \quad (\text{Ec. 35})$$

Siendo θ el vector de parámetros a estimar, y_i las larvas supervivientes en la medida número i , $S_i(\theta)$ el valor de la función de supervivencia (en función de los parámetros) para el tiempo y la concentración de la medida i , y n el número de medidas realizadas.

El valor $n + 1$ se refiere a una medida en tiempo infinito en la que no habría supervivientes (Ashauer y col., 2015). Esto permite introducir el término de censura (supervivientes en la última medida realizada), ya que la contribución de este término resulta:

$$S_{n+1}(\theta) = 0 = y_{n+1} \rightarrow (y_n - y_{n+1}) \ln(S_n(\theta) - S_{n+1}(\theta)) = y_n \ln(S_n(\theta)) \quad (\text{Ec. 36})$$

Las funciones de log-verosimilitud calculadas de esta forma para las diferentes concentraciones de un mismo xenobiótico se sumaron para obtener la función de log-verosimilitud final.

2.3.3. Optimización de la función de log-verosimilitud

Para ajustar los parámetros de cada modelo, se escribieron sendos programas en Matlab, codificando las funciones de log-verosimilitud de cada modelo, que se ejecutaron con los datos de concentración, tiempo y supervivencia obtenidos de forma experimental para cada sustancia.

Dado que los algoritmos utilizados por Matlab buscan el mínimo de la función, se utilizó como función objetivo la función de log-verosimilitud multiplicada por menos uno, de forma que el mínimo de esta función coincidiera con el máximo de la función log-verosimilitud:

$$\max\{\ln(\boldsymbol{\theta}|y)\} = \min\{-\ln(\boldsymbol{\theta}|y)\} \quad (\text{Ec. 38})$$

Se buscaron los máximos de las respectivas funciones mediante la herramienta *optimtool* de Matlab, a través de la función *fmincon* (Constrained Nonlinear Minimization), utilizando como única restricción la no negatividad de los parámetros (Pérez López, 2002; MathWorks, 2017):

Una vez obtenidos los valores de los estimadores que maximizaron la función de log-verosimilitud se hallaron los intervalos de confianza correspondientes, mediante la razón de verosimilitud (Introducción, apdo. 6.5.2), utilizando un nivel de significación de $\alpha=0.05$:

$$-2\ln(L_r/L) = -2(\ln L_r - \ln L) \sim \chi_1^2(1 - \alpha)$$

$$\ln L - \ln L_r \sim \frac{1}{2}\chi_1^2(1 - 0.05) = 1.92 \quad (\text{Ec. 39})$$

2.3.4. Elección de modelo y bondad de ajuste

Los diferentes modelos de IT así como el de SD fueron comparados para cada compuesto mediante el criterio de información de Akaike (AIC), tal y como se describe en la sección 6.8.1 de la introducción. Se halló el coeficiente de Akaike, así como las diferencias y pesos de Akaike, lo que permitió ordenar los modelos de mayor a menor ajuste a los datos. El modelo elegido

para cada compuesto fue el que obtuvo menor coeficiente y correspondientemente mayor peso de Akaike.

La bondad de ajuste del modelo escogido por cada compuesto se valoró a posteriormente mediante el coeficiente de determinación ajustado por grados de libertad (*adjusted R-square*).

2.4. Simulaciones

Para ilustrar la utilidad de los modelos empleados en la prevención de riesgos ambientales, se efectuó una simulación de vertido por pulsos de BPA en condiciones de laboratorio, así como la de dos vertidos de BPA en río: un vertido puntual y un vertido constante. Las características de los ríos reales presentan gran variación (Rutherford, 1994), por lo que en todos los casos se eligieron valores que permitieran mostrar la aplicabilidad de las simulaciones. La población de *C. riparius* utilizada en las simulaciones se supuso poseedora de las características del modelo escogido en la fase de análisis de supervivencia.

2.4.1. Vertidos por pulsos

Se realizó la simulación de un vertido por pulsos de BPA en condiciones de laboratorio: dos pulsos de 5 y 6 mg/L aplicados durante 5 horas y separados 24 horas. Para realizar la simulación se consideró una población de 1000 larvas, cuyas características de tolerancia al BPA se eligieron según el modelo elegido en la fase de optimización.

2.4.2. Vertido puntual en río

Se consideró un vertido puntual de BPA en un modelo simple de río, de sección constante y sin fuentes ni sumidero. Por la misma razón se escogió un vertido de gran masa, que permitiera comprobar si incluso en estas condiciones, más cerca de las utilizadas en laboratorio que de las existentes en ríos reales, la supervivencia quedaba afectada.

- Profundidad de 1m.

- Velocidad de corriente de 1 cm/s
- Coeficiente de difusión longitudinal 0.5 m²/s.
- Longitud del tramo de río: 500 m.
- Masa del vertido de BPA: 500 kg.
- Sección del cauce: 100 m².
- Degradación del BPA (vida media): 4 días.

La concentración de BPA en función de la distancia al punto de vertido y el tiempo puede obtenerse a través de la ecuación de transporte, añadiendo la fotodegradación del BPA (Nepf, 2008; Menéndez, 2010):

$$C(x, t) = \frac{M}{A\sqrt{4\pi D_L t}} \exp\left(-\frac{(x - ut)^2}{4D_L t} - Kt\right) \quad (\text{Ec. 40})$$

Donde:

C(x,t): concentración de BPA (g/L).

x: distancia longitudinal al punto del vertido (m).

t: tiempo (s).

M: masa del vertido (kg).

A: sección constante del cauce (m²).

u: velocidad de la corriente (m/s).

D_L: constante de difusión longitudinal (m²/s).

K: constante de degradación del BPA (1/s).

Esta concentración variable se utilizó como concentración externa en la ecuación diferencial de la concentración interna escalada (Ec. 32), que se resolvió numéricamente mediante el método de Runge-Kutta a través de la función *ode45* de Matlab, (Pérez López, 2002).

La concentración interna escalada calculada de este modo para cada tiempo y distancia al foco del vertido se comparó con la tolerancia de las larvas, descontando como muertas aquellas cuya tolerancia era menor a la concentración escalada interna.

De esta forma se obtuvo el patrón de supervivencia tanto a lo largo del tramo de río como en función del tiempo.

2.4.3. Vertido continuo

Se realizó la simulación de un vertido continuo de BPA en un río de sección constante sin fuentes ni sumideros, utilizando los siguientes datos:

- Velocidad de la corriente: 0.5 m/s.
- Sección del río observada: de 5 m de largo por 5 m de ancho.
- Coeficiente de difusión transversal 10 m²/s.
- Masa del vertido continuo: 0.5 kg/s y 5 kg/s.
- Vida media del BPA: 4 días.
- Densidad de larvas: 200 larvas/dm².

Al ser un vertido continuo la concentración en cada punto es constante en el tiempo, dependiendo sólo de sus coordenadas. Esta distribución espacial de la concentración se halló mediante la Ec. 40 (Nepf, 2008; Menéndez, 2010).

$$C(x, y) = \frac{\dot{m}}{h\sqrt{\pi u D_T x}} \exp\left(-\frac{y^2 u}{4 D_T x} - K \frac{x}{u}\right) \quad (\text{Ec. 40})$$

Donde:

C(x,y) es la concentración de BPA (g/L).

x,y: distancia longitudinal y transversal respectivamente al punto de vertido (m).

h: profundidad (m).

u: velocidad de la corriente (m/s).

D_T : coeficiente de difusión transversal (m^2/s).

K: constante de degradación del BPA (1/s).

Puesto que en este caso se consideraba también el ancho del río éste se dividió en cuadrados de $1dm \times 1dm$ y se generó para cada uno de ellos una población de 200 larvas con una tolerancia al BPA según el modelo GUTS elegido.

En estas condiciones la concentración externa varía con la posición pero no con el tiempo, y puede ser utilizada directamente en la ecuación de la concentración escalada interna (Ec. 32).

Se obtuvieron las concentraciones escaladas internas en función de la posición, que fueron comparadas con las tolerancias simuladas. Las larvas cuya tolerancia fuera inferior a la concentración escalada interna de su posición fueron consideradas muertas.

Se obtuvo así un patrón de concentración externa, concentración escalada interna y supervivencia a lo largo y ancho del tramo de río escogido.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Valoración del crecimiento de las larvas durante los ensayos

Los datos de longitud de las larvas registrados a las 0, 48 y 96 horas fueron sometidos a la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y a la de Levéne de igualdad de varianzas. Con un nivel de confianza del 95% se aceptaron las hipótesis nulas de normalidad e igualdad de varianza.

En el análisis de varianza (ANOVA) efectuado con un nivel de confianza del 95% no pudo rechazarse la hipótesis nula de igualdad de longitudes medias en los tres tiempos, por lo que en los modelos biológicos basados en la teoría GUTS se consideró que las larvas no crecían durante los ensayos de supervivencia.

2. Probit

La aplicación del modelo Probit a través del software SPSS arrojó las concentraciones letales para cada compuesto (Tabla 9).

BPA	24h		48h	
	LCx (mg/L)	95% C.I.	LCx (mg/L)	95% C.I.
LC10	3.269	(0, 4.557)	1.428	(0, 2.893)
LC25	4.862	(2.528, 6.325)	3.100	(0.469, 4.196)
LC50	6.631	(5.425, 11.530)	4.958	(3.784, 6.459)
LC75	8.401	(6.739, 18.317)	6.815	(5.608, 10.212)
LC95	10.947	(8.319, 28.392)	9.488	(7.511, 16.333)
TCS	24h		48h	
	LCx (mg/L)	95% C.I.	LCx (mg/L)	95% C.I.
LC10	1.428	(0, 2.230)	1.189	(0.200, 1.652)
LC25	2.480	(0.131, 3.110)	1.843	(1.240, 2.166)
LC50	3.648	(3.034, 7.657)	2.571	(2.267, 2.865)
LC75	4.816	(3.825, 14.315)	3.298	(2.984, 3.874)
LC95	6.496	(4.794, 24.063)	4.344	(3.795, 5.546)

Tabla 9. Resultados de las concentraciones letales de BPA y TCS a 24 y 48h obtenidas por ajuste al modelo probit.

En los datos del Cu y Cd a 24 horas la mortalidad no aumentaba con la concentración, sino que presentaba gran variabilidad, por lo que no se pudo realizar un ajuste al modelo probit a ese

tiempo. Los datos a 48 horas si permitieron dicho ajuste, que se pudo realizar con normalidad a través del *software* aunque en general se obtuvieron unos intervalos de confianza muy amplios. Los resultados se recogen en la Tabla 10.

Cu	48h	
	LCx (mg/L)	95% C.I.
LC10	0.188	(0.035, 0.515)
LC25	0.724	(0.212, 1.533)
LC50	3.24	(1.53, 5.38)
LC75	14.52	(9.35, 22.30)
LC95	125.5	(70.1, 311.0)
Cd	48h	
	LCx (mg/L)	95% C.I.
LC10	27.01	(0.13, 51.08)
LC25	77.33	(25.36, 138.90)
LC50	248	(138, 27944)
LC75	800	(280, 15178375)
LC95	4301	(726.2237, $1.67 \cdot 10^{11}$)

Tabla 10. Concentraciones letales de Cu y Cd a 48h obtenidas por ajuste al modelo probit. A 24h no se pudieron ajustar los datos a este modelo.

Cd y Cu conjuntamente

Los datos a 24 horas para Cd y Cu y suministrados conjuntamente mostraban una gran variabilidad y la mortalidad no aumentaba con la concentración, por lo que no pudo efectuarse el análisis probit a ese tiempo. Los intervalos de confianza para las LC75 y LC95 resultaron extremadamente altos.

En la tabla de la Figura 14 se presenta dicho análisis para los datos a 48 horas.

Cu+Cd	48h	
	LCx (mM)	95% C.I.
LC10	0.003	(0.000, 0.038)
LC25	0.013	(0.000, 0.094)
LC50	0.060	(0.000, 0.413)
LC75	0.268	(0.005, 18967.97)
LC95	2.335	(0.353, $8.5 \cdot 10^{27}$)

Tabla 11. Resultados del ajuste al modelo probit para el Cd y Cu a 48h. A 24h no se pudieron ajustar los datos a este modelo.

3. Teoría GUTS

3.1. GUTS: BPA

3.1.1. BPA. Modelo IT: función de distribución exponencial

Se ajustaron los datos de supervivencia de *C. riparius* frente al BPA bajo el supuesto de tolerancia individual, suponiendo que la tolerancia individual posee una distribución exponencial. Se obtuvieron las estimaciones de los parámetros mostradas en la Tabla 12.

BPA	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\gamma (l/mg)$
IT exponencial	0.0018	0.0010	3.04
I.C. 95 %	(0.0011, 0.0026)	(0.0009, 0.0011)	(2.73, 3.42)

Tabla 12. Estimación de los parámetros del modelo IT con distribución exponencial de la tolerancia individual, en el caso del BPA.

3.1.2. BPA. Modelo IT: función de distribución Normal

El ajuste de la función de supervivencia del modelo GUTS de Tolerancia Individual correspondiente a una distribución normal del umbral de tolerancia al BPA de la población llevó a los resultados mostrados en la Tabla 13.

BPA	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\mu (mg/L)$	$\sigma (mg/L)$
IT Normal	0.0021	0.0234	3.33	1.17
I.C. 95 %	(0.0015,0.0029)	(0.0218,0.0252)	(3.21,3.46)	(1.08,1.27)

Tabla 13. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al BPA a una IT normal e intervalos de confianza (IC) al 95%.

3.1.3. BPA. Modelo IT: función de distribución logística

El ajuste de la función de supervivencia correspondiente a una función de distribución del umbral de tolerancia al BPA de la población a una distribución logística de factor de escala α y de forma β llevó a los resultados mostrados en la Tabla 14.

BPA	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mg/L)$	$\beta (-)$
IT logística	0.0023	0.0224	3.17	4.09
I.C. 95 %	(0.0016,0.0031)	(0.0208,0.0241)	(3.03,3.32)	(3.68,4.54)

Tabla 14. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al BPA un modelo IT logístico e intervalos de confianza (IC) al 95%.

3.1.4. BPA. Modelo IT: función de distribución de Weibull

El ajuste de la función de supervivencia correspondiente a una función de distribución del umbral de tolerancia al BPA de la población a una distribución de Weibull de parámetro de forma α y de escala β llevó a los siguientes resultados mostrados en la Tabla 15.

BPA	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mg/L)$	$\beta (-)$
IT Weibull	0.0020	0.021	2.97	3.53
I.C. 95 %	(0.0013,0.0027)	(0.020,0.023)	(2.69,3.27)	(3.40,3.67)

Tabla 15. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al BPA a una IT logística e intervalos de confianza (IC) al 95%.

3.1.4. BPA. Modelo IT: función de distribución Gamma

El ajuste de la función de distribución del umbral de tolerancia al BPA de la población a una distribución Gamma de parámetro de forma a y de escala b llevó a los resultados de la Tabla 16.

BPA	h_b (h^{-1})	k_e (h^{-1})	α (mg/L)	β
IT gamma	0.0021	0.021	6.40	0.506
I.C. 95 %	(0.0015,0.0029)	(0.020,0.023)	(6.15,6.66)	(0.485,0.529)

Tabla 16. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al BPA a una IT tipo gamma e intervalos de confianza (IC) al 90 y 95%.

3.1.5. BPA. Modelo SD

En el modelo SD se estima un parámetro de tolerancia máxima común a toda la población, z , así como el riesgo basal h_b , la tasa de muerte k_k y la constante de eliminación k_e .

BPA	h_b (h^{-1})	z (mg/L)	k_k (L/mg·h)	k_e (h^{-1})
SD	0.0045	3.59	0.0947	0.018
I.C. 95 %	(0.0037,0.0054)	(3.49,3.5)	(0.0947,0.110)	(0.015,0.020)

Tabla 17. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al BPA al modelo SD e intervalos de confianza (IC) al 90 y 95%.

3.1.6. BPA. Resumen de resultados

Se resumen en la Tabla 18 los resultados obtenidos con todos los modelos, tanto el valor de la estimación de los parámetros como el de la función de log-verosimilitud (Log F):

IT	Log F	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\mu, \alpha (mg/L);$ $v (l /mg)$	σ, β
Weibull	-1162.5	0.0020	0.021	2.97	3.53
Gamma	-1166.4	0.0021	0.021	6,40	0,506
Normal	-1166.8	0.0021	0.0234	3.33	1.17
Logística	-1174.7	0.0023	0.0224	3.17	4.09
Exponencia	-1245.8	0.0018	0.0010	3.04	-----
SD	log F	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$z (mg/L)$	k_k
SD	-1170.0	0.0045	3.59	0.0947	0.018

Tabla 18. Resumen de resultados para el BPA. Los cinco modelos IT se presentan en orden creciente de log-verosimilitud

3.1.7. BPA. Elección de modelo

Los coeficientes de Akaike ajustados para muestras de tamaño medio fueron calculados para todos los modelos planteados:

Modelo:	Normal	Logístico	Weibull	Gamma	Exponencial	SD
AIC_c	2342.3	2358.1	2333.6	2341.5	2498.0	2348.7

Tabla 19. Coeficientes de Akaike ajustados para el caso del BPA

El menor resultado obtenido correspondió al modelo IT con función de distribución de la tolerancia de tipo Weibull, que se utilizó para calcular las diferencias y pesos de Akaike. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Modelo	Diferencia	Peso $w_i = \frac{\exp\left(-\frac{1}{2} \Delta_i\right)}{\sum_{j=1}^R \exp\left(-\frac{1}{2} \Delta_j\right)} \quad 0 \leq w_i \leq 1$
Weibull (mínimo)	$\Delta_W = \Delta_{min} = 0$	$w_W = 0.9683$
Gamma	$\Delta_G = AIC_c(G) - AIC_c(W) = 7.9$	$w_G = 0.0189$
Normal	$\Delta_N = AIC_c(N) - AIC_c(W) = 8.7$	$w_N = 0.0125$
SD (Stochastic Death)	$\Delta_{SD} = AIC_c(SD) - AIC_c(W) = 15.1$	$w_{SD} = 4.8 \cdot 10^{-4}$
Log-logística	$\Delta_L = AIC_c(L) - AIC_c(W) = 24.5$	$w_L = 4.6 \cdot 10^{-6}$
Exponencial	$\Delta_E = AIC_c(E) - AIC_c(W) = 164.4$	$w_E = 1.9 \cdot 10^{-36}$

Tabla 20. Diferencias y pesos de Akaike obtenidos para el BPA, ordenados de mayor a menor.

El mejor modelo según el criterio de información de Akaike es el de IT de tipo Weibull, cuyo peso de 0.9683 indica una probabilidad de explicación de los datos experimentales de casi el 97%. La bondad de ajuste de este modelo se analizó también a través del *adjusted R square* :

$$\text{Adjusted R square} = 1 - \frac{(n-1) \cdot \sum_i (\hat{y}_i - y_i)^2}{v \cdot \sum_i (y_i - \bar{y})^2} = 0.94$$

Los pesos de Akaike de los modelos IT gamma y normal corresponden a una probabilidad de explicación de los datos menor del 2%, mientras que para el resto de modelos esta probabilidad es insignificante.

3.1.8. BPA. Concentraciones letales con el modelo elegido

A partir de las estimaciones de los parámetros según el modelo de IT tipo Weibull se calcularon algunas concentraciones letales. El objetivo de las LCx es establecer el efecto exclusivo del xenobiótico en la supervivencia, por lo que en los cálculos se prescindió del término de riesgo basal h_b . Se encontró que los valores estimados de esta manera son menores que los hallados mediante el método clásico probit (Resultados, apartado 2).

I.T. Weibull LCx	24h		48h	
	LCx (mg/L)	95% C.I.	LCx (mg/L)	95% C.I.
LC10	3.98	(3.33,4.74)	2.48	(2.10,2.91)
LC25	5.29	(4.48,6.23)	3.29	(2.83,3.83)
LC50	6.78	(5.80,7.92)	4.22	(3.66,4.87)
LC75	8.25	(7.11,9.56)	5.14	(4.49,5.88)
LC95	10.27	(8.92,11.80)	6.40	(5.63,7.25)

Tabla 21. Concentraciones letales de BPA según el modelo de IT tipo Weibull.

3.2. GUTS: TCS

3.2.1. TCS. Modelo IT: función de distribución exponencial

Se ajustaron los datos de supervivencia de *C. riparius* frente al TCS bajo el supuesto de IT, suponiendo que la IT posee una distribución exponencial. Se obtuvieron las siguientes estimaciones de los parámetros:

TCS	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\gamma (L/mg)$
IT exponencial	0.0012	101.4	$6.46 \cdot 10^{-5}$
IC 95 %	(0.0008,0.0017)	(93.4,109.8)	$(5.95 \cdot 10^{-5}, 6.99 \cdot 10^{-5})$

Tabla 22. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia de *C. riparius* frente a TCS, a un modelo de IT y distribución exponencial. Intervalos de confianza al 95%.

3.2.2. TCS. Modelo IT: función de distribución Normal

El ajuste de la función de supervivencia del modelo GUTS de IT correspondiente a una distribución del umbral de tolerancia al TCS de la población a una distribución normal llevó a los resultados mostrados en la Tabla 23.

TCS	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\mu (mg/L)$	σ
IT Normal	0.0032	0.0267	1.84	0.70
I.C. 95 %	(0.0026,0.0039)	(0.0251,0.0283)	(1.78,1.90)	(0.66,0.75)

Tabla 23. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al TCS a una IT normal e intervalos de confianza (IC) al 90 y 95%.

3.2.3. TCS. Modelo IT: función de distribución logística

El ajuste de la función de supervivencia correspondiente a una función de distribución del umbral de tolerancia al BPA de la población a una distribución logística de factor de escala α y de forma β llevó a los resultados de la Tabla 24:

TCS	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mg/L)$	$\beta(-)$
IT logística	0.0040	0.0263	1.83	4.15
I.C. 95 %	(0.0034,0.0047)	(0.0247,0.0281)	(1.77,1.91)	(3.73,4.61)

Tabla 24. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al TCS a una IT logística e intervalos de confianza (IC) al 95%.

3.2.4. TCS. Modelo IT: función de distribución de Weibull

El ajuste de la función de supervivencia correspondiente a una función de distribución del umbral de tolerancia al BPA de la población a una distribución de Weibull llevó a los resultados mostrados en la Tabla 25:

TCS	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mg/L)$	$\beta(-)$
Weibull	0.0031	0.0245	2.70	1.98
I.C. 95 %	(0.0025,0.0037)	(0.0230,0.0261)	(2.47,2.94)	(1.91,2.05)

Tabla 25. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al TCS a un modelo IT de Weibull e intervalos de confianza (IC) al 95%.

3.2.5. TCS. Modelo IT: función de distribución Gamma

El ajuste de la función de distribución del umbral de tolerancia al BPA de la población a una distribución Gamma llevó a los resultados mostrados en la Tabla 26:

TCS	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mg/L)$	$\beta (-)$
IT gamma	0.0037	0.0251	5.99	0.31
I.C. 95 %	(0.0031,0.0043)	(0.0236,0.0268)	(5.78,6.22)	(0.30, 0.32)

Tabla 26. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al TCS a una IT tipo gamma e intervalos de confianza (IC) al 95%.

3.2.6. TCS. Modelo SD

En el modelo SD se estima un parámetro de tolerancia máxima común a toda la población, z. El resultado se muestra en la Tabla 27.

TCS	$h_b (h^{-1})$	$z (mg/L)$	$k_k (L/mg \cdot h)$	$k_e (h^{-1})$
SD	0.0063	1.84	0.0789	0.0307
IC 95 %	(0.0059,0.0076)	(1.77,1.84)	(0.0771,0.0831)	(0.0281,0.0362)

Tabla 27. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al TCS al modelo de SD e intervalos de confianza (IC) al 90 y 95%.

3.2.7. TCS. Resumen de resultados

Se resumen en la Tabla 28 los resultados obtenidos con todos los modelos para el TCS. El mayor valor de log-verosimilitud obtenido corresponde a un modelo IT de Weibull, mientras que el peor valor es el del único modelo de tres parámetros, el IT exponencial.

IT	Log F	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\mu, \alpha (mg/L); \gamma (L/mg)$	σ, β
Weibull	-2031.9	0.0031	0.0245	2.70	1.98
Normal	-2033.4	0.0032	0.0267	1.84	0.70
Gamma	-2048,7	0.0037	0.0251	5.99	0.31
Logística	-2057.7	0.0040	0.0263	1.83	4.15
Exponencial	-2124.8	0.00122	6.4588	101.35	-----
SD	log F	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$z (mg/L)$	$k_k(L/mg \cdot h)$
SD	-2108.9	0.0063	0.0307	1.84	0.0789

Tabla 28. Resumen de los ajustes a modelos IT y SD obtenidos para el TCS. Los modelos IT están ordenados según su valor de log-verosimilitud.

3.2.8. TCS. Elección de modelo

Para elegir modelo en primer lugar se calcularon los coeficientes de Akaike ajustados para el tamaño de la muestra, que se muestran en la Tabla 29.

Modelo:	Normal	Logístico	Weibull	Gamma	Exponencial	SD
AIC_c	4075.1	4123.7	4072.1	4105.7	4255.8	4226.1

Tabla 29. Coeficientes de Akaike ajustados para el caso del TCS.

El menor resultado obtenido corresponde al modelo IT con función de distribución de la tolerancia de tipo Weibull, por lo que según este criterio éste sería el mejor modelo. A continuación se calcularon las diferencias y pesos de Akaike, valores que facilitan la comparación entre modelos. Los resultados se muestran en la Tabla 30.

Modelo	Diferencia	Pesos: $w_i = \frac{\exp\left(-\frac{1}{2} \Delta_i\right)}{\sum_{j=1}^R \exp\left(-\frac{1}{2} \Delta_j\right)}$ $0 \leq w_i \leq 1$
Weibull (mínimo)	$\Delta_W = \Delta_{\min} = 0$	0.8176
Normal	$\Delta_N = AIC_c(N) - AIC_c(W) = 3$	0.1824
Gamma	$\Delta_G = AIC_c(G) - AIC_c(W) = 33.6$	$4.5 \cdot 10^{-8}$
Log-logística	$\Delta_L = AIC_c(L) - AIC_c(W) = 51.6$	$5.1 \cdot 10^{-12}$
SD (Stochastic Death)	$\Delta_{SD} = AIC_c(SD) - AIC_c(W) = 154$	$2.9 \cdot 10^{-34}$
Exponencial	$\Delta_E = AIC_c(E) - AIC_c(W) = 183.7$	$1.4 \cdot 10^{-80}$

Tabla 30. Diferencias y pesos de Akaike para el caso del TCS.

El mejor modelo según el criterio de información de Akaike es por lo tanto el de IT con función de distribución de la tolerancia tipo Weibull, cuyo peso de 0.8176 significa una probabilidad de explicación de los datos experimentales de casi el 82%. Sólo la distribución normal tendría un peso del mismo orden de magnitud, siendo los del resto de distribuciones sustancialmente menores.

La bondad de ajuste para el modelo de Weibull se analizó posteriormente a través del *adjusted-R square* obteniendo un valor de 0.9461, que ratifica el buen ajuste de este modelo a los datos de supervivencia del TCS:

$$Adjusted\ R\ square = 1 - \frac{(n-1) \cdot \sum_i (\hat{y}_i - y_i)^2}{v \cdot \sum_i (y_i - \bar{y})^2} = 0.9461$$

3.2.9. TCS. Concentraciones letales con el modelo elegido

A partir de las estimaciones de los parámetros según el modelo de IT tipo Weibull se calcularon algunas concentraciones letales prescindiendo del término de riesgo basal h_b , para tener en cuenta sólo el efecto del TCS en la supervivencia (Tabla 31)

I.T. Weibull	24h		48h	
	LCx (mg/L)	IC 95%	LCx (mg/L)	IC 95%
LC10	1.95	(1.64,2.31)	1.25	(1.07,1.47)
LC25	3.24	(2.77,3.78)	2.08	(1.81,2.40)
LC50	5.05	(4.81,5.80)	3.24	(2.86,3.68)
LC75	7.16	(6.30,8.13)	4.60	(4.11,5.16)
LC95	10.57	(9.43,11.83)	6.80	(6.15,7.51)

Tabla 31. Concentraciones letales de TCS según el modelo de IT tipo Weibull.

Las LCx calculadas de este modo son mayores que las halladas por el modelo probit (Resultados, apartado 2), siendo mayor la diferencia a 24 horas.

3.3. GUTS: Cu

3.3.1. Cu. Modelo IT: función de distribución exponencial

Se ajustaron los datos de supervivencia de *C. riparius* frente al Cu a un modelo de IT de tres parámetros, correspondiente a una distribución exponencial. Se obtuvieron las estimaciones mostradas en la Tabla 32.

Cu	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\gamma (L/mg)$
IT exponencial	0.0059	$3.81 \cdot 10^{-5}$	20.80
IC 95 %	(0.0050,0.0067)	($3.23 \cdot 10^{-5}$, $4.43 \cdot 10^{-5}$)	(17.68,24.25)

Tabla 32. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia de *C. riparius* frente a Cu, a un modelo de IT y distribución exponencial. Intervalos de confianza al 95%.

3.3.2. Cu. Modelo IT: función de distribución Normal

El ajuste de la función de supervivencia del modelo GUTS de IT correspondiente a una distribución del umbral de tolerancia al Cu de la población a una distribución normal llevó a los resultados recogidos en la siguiente tabla:

Cu	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\mu (mg/L)$	σ
IT Normal	0.0077	0.0087	12.27	10.61
I.C. 95 %	(0.0026,0.0191)	(0.0078,0.0095)	(11.09,13.18)	(9.05,11.56)

Tabla 33. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia del Cu a una IT normal, e intervalos de confianza al 95%.

3.3.3. Cu. Modelo IT: función de distribución logística

El ajuste de los datos de supervivencia del Cu a un modelo IT con distribución logística del umbral de tolerancia llevó a los siguientes resultados de la Tabla 34.

Cu	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mg/L)$	$\beta (-)$
IT Logística	0.0065	$9.03 \cdot 10^{-6}$	$9.60 \cdot 10^{-3}$	2.00
I.C. 95 %	(0.0057,0.0075)	($7.69 \cdot 10^{-6}$, $1.06 \cdot 10^{-5}$)	($8.21 \cdot 10^{-3}$, $11.28 \cdot 10^{-3}$)	(1.67,2.38)

Tabla 34. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al Cu a una IT logística e intervalos de confianza (IC) 95%.

3.3.4. Cu. Modelo IT: función de distribución de Weibull

El ajuste de los datos de supervivencia del Cu al modelo IT con función de distribución de la tolerancia tipo Weibull llevó a los siguientes resultados:

Cu	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mg/L)$	$\beta (-)$
IT Weibull	0.0039	$5.17 \cdot 10^{-6}$	$6.14 \cdot 10^{-3}$	1.15
I.C. 95 %	(0.0038,0.0086)	($3.41 \cdot 10^{-6}$, $7.25 \cdot 10^{-6}$)	($4.37 \cdot 10^{-3}$, $9.27 \cdot 10^{-3}$)	(0.83,2.00)

Tabla 35. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al Cu a una IT de Weibull e intervalos de confianza (IC) al 95%.

3.3.5. Cu. Modelo IT: función de distribución Gamma

El ajuste de los datos de supervivencia al Cu al modelo de IT con función gamma de distribución de la tolerancia llevó a los siguientes resultados:

Cu	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mg/L)$	$\beta (-)$
IT gamma	0.0063	$1.25 \cdot 10^{-6}$	0.799	0.0021
I.C. 95%	(0.0053,0.0072)	$(1.09 \cdot 10^{-6}, 1.42 \cdot 10^{-6})$	(0.703,0.903)	(0.0018,0.0023)

Tabla 36. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al Cu a una IT tipo gamma e intervalos de confianza (IC) al 95%.

3.3.6. Cu. Modelo SD

El ajuste de los datos de supervivencia del cobre al modelo SD produjo el resultado recogido en la Tabla 37.

Cu	$h_b (h^{-1})$	$z (mg \cdot L^{-1})$	$k_k (L \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$
SD	0.0074	$2.45 \cdot 10^{-5}$	$1.74 \cdot 10^{-5}$	1.78
IC 95	(0.0066,0.0084)	$(6.92 \cdot 10^{-14}, 3.14 \cdot 10^{-4})$	$(1.43 \cdot 10^{-5}, 2.08 \cdot 10^{-5})$	(1.45,2.15)

Tabla 37. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al Cu al modelo de SD e intervalos de confianza (IC) al 95%.

3.3.7. Cu. Resumen de resultados

Se resumen en la Tabla 38 los resultados obtenidos para el Cu con todos los modelos.

IT (Cu)	Log F	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\mu, \alpha (mg \cdot L^{-1}); \gamma (L \cdot mg^{-1})$	σ, β
Gamma	-902.1	0.0063	$1.25 \cdot 10^{-6}$	0.799	0.0021
Exponencial	-908.2	0.0059	$3.81 \cdot 10^{-5}$	20.80	-----
Logística	-912.2	0.0065	$9.03 \cdot 10^{-6}$	$9.60 \cdot 10^{-3}$	2.00
Weibull	-917.2	0.0039	$5.17 \cdot 10^{-6}$	$6.14 \cdot 10^{-3}$	1.15
Normal	-931.0	0.0077	0.0087	12.27	10.61
SD (Cu)	Log F	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$z (mg/L)$	k_k
SD	-933.4	0.0074	1.78	$2.45 \cdot 10^{-5}$	$1.74 \cdot 10^{-5}$

Tabla 38. Resumen de los ajustes a modelos IT y SD obtenidos para el Cu.

3.3.8. Cu. Elección de modelo

Para elegir modelo en primer lugar se calcularon los coeficientes de Akaike ajustados para el tamaño muestral (Tabla 39).

Modelo:	Normal	Logístico	Weibull	Gamma	Exponencial	SD
AIC_c	1871.3	1833.7	1843.7	1813.5	1823.2	1876.1

Tabla 39. Coeficientes de Akaike ajustados de los seis modelos probados con el Cu.

El menor coeficiente de Akaike obtenido corresponde al modelo IT con distribución de tolerancia tipo Gamma. A partir de este resultado se calcularon las diferencias y pesos de Akaike para la comparación de modelos, que se recogen en la Tabla 40.

Modelo	Diferencia	Pesos: $w_i = \frac{\exp\left(-\frac{1}{2} \Delta_i\right)}{\sum_{j=1}^R \exp\left(-\frac{1}{2} \Delta_j\right)}$ $0 \leq w_i \leq 1$
Gamma	$\Delta_G = \Delta_{min} = 0$	0.9922
Exponencial	$\Delta_E = AIC_c(E) - AIC_c(G) = 9.7$	$7.84 \cdot 10^{-3}$
Log-logística	$\Delta_L = AIC_c(L) - AIC_c(G) = 20.2$	$4.07 \cdot 10^{-5}$
Weibull	$\Delta_W = AIC_c(W) - AIC_c(G) = 30.2$	$2.75 \cdot 10^{-7}$
Normal	$\Delta_N = AIC_c(N) - AIC_c(G) = 57.8$	$2.79 \cdot 10^{-13}$
SD	$\Delta_{SD} = AIC_c(SD) - AIC_c(G) = 62.6$	$2.53 \cdot 10^{-14}$

Tabla 40. Diferencias y pesos de Akaike para el caso del cobre.

El mejor modelo según el criterio de información de Akaike es por lo tanto el de IT con función de distribución de la tolerancia tipo Gamma, con un peso de 0.9922, que representa una probabilidad de explicación de los datos experimentales del 99.22%. Ninguna otro modelo posee un peso comparable, es más cercano es el modelo exponencial de 3 parámetros, con un valor de tan sólo 0.00784, esto es, explicaría los datos con una probabilidad de sólo el 0.784%.

La bondad de ajuste para el modelo de Gamma se analizó posteriormente a través del *adjusted-R square* obteniendo un valor de 0.7626:

$$Adjusted\ R\ square = 1 - \frac{(n-1) \cdot \sum_i (\hat{y}_i - y_i)^2}{v \cdot \sum_i (y_i - \bar{y})^2} = 0.7626$$

3.3.9. Cu. Concentraciones letales con el modelo elegido

Se calcularon las concentraciones letales (prescindiendo del riesgo basal) para *C. riparius* frente al Cu, utilizando el modelo de supervivencia de IT tipo Gamma, escogido en el apartado anterior. Los resultados se recogen en la Tabla 41.

I.T. Gamma LCx	24h		48h	
	LCx (mg·L ⁻¹)	IC 95%	LCx (mg·L ⁻¹)	IC 95%
LC10	12.0003	(7.0323, 20.1853)	6.0002	(3.5162, 10.0928)
LC25	23.5936	(14.7907, 37.4584)	11.7970	(7.3955, 18.7295)
LC50	44.1038	(29.1712, 66.8251)	22.0522	(14.5859, 33.4130)
LC75	74.3118	(51.0315, 108.8983)	37.1565	(25.5162, 54.4499)
LC95	137.3557	(97.7514, 194.8470)	68.6789	(48.8765, 97.4248)

Tabla 41. Concentraciones letales de Cu según el modelo de IT tipo Gamma.

Se observa que las concentraciones letales previstas por este modelo a 48 horas son mayores que las obtenidas por probit (Resultados, apartado 2).

3.4. GUTS: Cadmio

3.4.1. Cd. Modelo IT: función de distribución exponencial

Se ajustaron los datos de supervivencia de *C. riparius* frente al CdCl₂ bajo el supuesto de IT, suponiendo que la tolerancia individual posee una distribución exponencial. Se obtuvieron las estimaciones de los parámetros recogidas en la Tabla 42.

Cd	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\gamma (L/mg)$
IT exponencial	0.0030	16.70	$1.17 \cdot 10^{-5}$
IC 95 %	(0.0025,0.0036)	(13.54,20.14)	($9.51 \cdot 10^{-5}$, $1.41 \cdot 10^{-5}$)

Tabla 42. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia de *C. riparius* frente al Cd a un modelo de IT y distribución exponencial. Intervalos de confianza al 90 y 95%.

3.4.2. Cd. Modelo IT: función de distribución Normal

El ajuste de la función de supervivencia del modelo GUTS de IT correspondiente a una distribución del umbral de tolerancia al Cd de la población a una distribución normal llevó a los resultados recogidos en la Tabla 43.

Cd	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\mu (mg/L)$	σ
IT Normal	0.0037	$3.61 \cdot 10^{-5}$	0.192	0.124
I.C. 95 %	(0.0012,0.0098)	($3.31 \cdot 10^{-5}$, $2.74 \cdot 10^{-4}$)	(0.176,0.209)	(0.110,0.140)

Tabla 43. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia del Cd a una IT normal, e intervalos de confianza al 90 y 95%.

3.4.3. Cd. Modelo IT: función de distribución logística

El ajuste de los datos de supervivencia del Cd a un modelo IT con distribución logística del umbral de tolerancia llevó a resultados de la Tabla 44.

Cd	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mg/L)$	$\beta(-)$
IT logística	0.0036	$2.61 \cdot 10^{-7}$	0.0012	3.239
I.C. 95 %	(0.0033,0.0042)	($2.31 \cdot 10^{-7}$, $2.94 \cdot 10^{-7}$)	(0.0010,0.0013)	(2.6029,4.0436)

Tabla 44. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al Cd a una IT logística e intervalos de confianza (IC) al 95%.

3.4.4. Cd. Modelo IT: función de distribución de Weibull

El ajuste de los datos de supervivencia del Cd al modelo IT con función de distribución de la tolerancia tipo Weibull llevó a los siguientes resultados:

TCS	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mg/L)$	$\beta (-)$
IT Weibull	0.0034	$3.16 \cdot 10^{-6}$	0.0174	2.01
I.C. 95 %	(0.0029,0.0040)	$(2.83 \cdot 10^{-6}, 3.50 \cdot 10^{-6})$	(0.0167,0.0205)	(1.67,2.40)

Tabla 45. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al Cd a un modelo IT de Weibull e intervalos de confianza (IC) al 95%.

3.4.5. Cd. Modelo IT: función de distribución Gamma

El ajuste de los datos de supervivencia al Cd al modelo de IT con función gamma de distribución de la tolerancia llevó a los resultados que se muestran en la Tabla 46.

Cd	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mg/L)$	$\beta (-)$
IT gamma	0.0035	$8.72 \cdot 10^{-8}$	2.22	$1.95 \cdot 10^{-4}$
I.C. 95%	(0.0030,0.0041)	$(7.75 \cdot 10^{-8}, 9.76 \cdot 10^{-8})$	(1.97,2.50)	$(1.74 \cdot 10^{-4}, 2.19 \cdot 10^{-4})$

Tabla 46. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al Cd a una IT tipo gamma e intervalos de confianza (IC) al 95%.

3.4.6. Cd. Modelo SD

El ajuste de los datos de supervivencia del Cd al modelo de SD produjo el resultado recogido en la Tabla 47.

Cd	$h_b (h^{-1})$	$z (mg \cdot L^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$k_k (L \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1})$
SD	0.0037	0.0252	$1.90 \cdot 10^{-5}$	0.515
IC	(0.0027,0.0050)	(0.0102,0.0256)	$(1.52 \cdot 10^{-5}, 2.19 \cdot 10^{-5})$	(0.321,0.774)

Tabla 47. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia al Cd al modelo de SD e intervalos de confianza (IC) al 95%.

3.4.7. Cd. Resumen de resultados

Se resumen en la Tabla 48 los resultados obtenidos para el Cd con todos los modelos. La mayor log-verosimilitud corresponde al caso de IT Weibull, siendo el modelo de tres parámetros IT exponencial el de menor valor de función de log-verosimilitud.

IT	Log F	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\mu, \alpha (mg \cdot L^{-1}); \gamma$	σ, β
Weibull	-697.1	0.0034	$3.16 \cdot 10^{-6}$	0.0174	2.01
Gamma	-698.2	0.0035	$8.72 \cdot 10^{-8}$	2.22	$1.95 \cdot 10^{-4}$
Logística	-700.8	0.0036	$2.61 \cdot 10^{-7}$	0.0012	3.239
Normal	-706.7	0.0037	$3.61 \cdot 10^{-5}$	0.192	0.124
Exponencial	-720.8	0.0030	16.70	$1.17 \cdot 10^{-5}$	-----
SD	Log F	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$z (mg \cdot L^{-1})$	$k_k(L \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1})$
SD	-700.3	0.0037	$1.90 \cdot 10^{-5}$	0.0252	0.515

Tabla 48. Resumen de los ajustes a modelos IT y SD obtenidos para el Cd. Los cinco modelos IT están en orden decreciente del valor de la función de log-verosimilitud.

3.4.8. Cd. Elección de modelo

Para elegir modelo en primer lugar se calcularon los coeficientes de Akaike ajustados para el tamaño de la muestra, que se muestran en la Tabla 49.

Modelo:	Normal	Logístico	Weibull	Gamma	Exponencial	SD
AIC _c	1422.7	1410.9	1403.5	1405.7	1448.4	1409.9

Tabla 49. Coeficientes de Akaike ajustados, para el caso del Cd.

El menor coeficiente de Akaike resultó ser el del modelo IT de Weibull, siendo el mayor valor el correspondiente al modelo IT exponencial de 3 parámetros. Para facilitar la comparación entre los modelos se hallaron también las diferencias y pesos de Akaike (Tabla 50)

Modelo	Diferencia	Pesos: $w_i = \frac{\exp\left(-\frac{1}{2} \Delta_i\right)}{\sum_{j=1}^R \exp\left(-\frac{1}{2} \Delta_j\right)}$ $0 \leq w_i \leq 1$
Weibull	$\Delta_W = \Delta_{min} = 0$	0.71513
Gamma	$\Delta_G = AIC_c(G) - AIC_c(W) = 2.2$	0.23804
SD	$\Delta_{SD} = AIC_c(SD) - AIC_c(W) = 6.4$	0.02915
Log-logística	$\Delta_L = AIC_c(L) - AIC_c(W) = 7.4$	0.01768
Normal	$\Delta_N = AIC_c(N) - AIC_c(W) = 19.2$	$4.84 \cdot 10^{-5}$
Exponencial	$\Delta_E = AIC_c(E) - AIC_c(W) = 44.9$	$1.27 \cdot 10^{-10}$

Tabla 50. Diferencias y pesos de Akaike para los seis modelos aplicados al Cd.

El mejor resultado se obtuvo nuevamente para el modelo IT de Weibull, con un peso de 0.7151 que representa una probabilidad del 71.51% de explicar los datos experimentales. Los modelos IT de gamma y logístico, y el modelo SD poseerían bajo este criterio una probabilidad de explicación de los datos del 23.80 %, 1.77% y 2.92% respectivamente, mientras que el peso de los otros dos modelos sería insignificante.

Para el modelo de mayor peso se calculó el *adjusted R-square* como medida de la bondad de ajuste, obteniendo un valor de 0.7019:

$$Adjusted\ R\ square = 1 - \frac{(n-1) \cdot \sum_i (\hat{y}_i - y_i)^2}{v \cdot \sum_i (y_i - \bar{y})^2} = 0.7019$$

3.4.9. Cd. Concentraciones letales con el modelo elegido

Se calcularon las concentraciones letales para *C. riparius* frente al Cd, utilizando el modelo de supervivencia de IT tipo Weibull, escogido en el apartado anterior (Tabla 51).

Comparando las LCx a 48 horas con las estimadas por probit se observa que, si bien las LC10 y LC25 son del mismo orden de magnitud en el resto de LCx la predicción efectuada por el modelo IT Weibull es menor que la efectuada por probit.

I.T. Weibull	24h		48h	
	LCx (mg·L ⁻¹)	IC 95%	LCx (mg·L ⁻¹)	IC 95%
LC10	74.5	(51.9, 118.0)	37.2	(26.0, 59.0)
LC25	122.8	(94.6, 179.27)	61.4	(47.3, 89.6)
LC50	190.4	(160.1, 258.6)	95.2	(80.0, 129.3)
LC75	268.9	(242.3, 345.2)	134.5	(121.1, 172.6)
LC95	394.9	(384.0, 475.9)	197.4	(192.0, 238.0)

Tabla 51. Concentraciones letales de Cd según el modelo IT Weibull.

3.5. GUTS: Cadmio y Cobre

Se utilizó en la mezcla la misma concentración molar de Cu que de Cd en cada experimento. Por esta razón en los resultados se usa el mol·L⁻¹ como unidad de concentración: 1 mol·L⁻¹ en la mezcla representa 1 mol·L⁻¹ de CuCl₂ más 1 mol·L⁻¹ de CdCl₂, esto es, 64.55 g L⁻¹ de Cu y 112.41 g·L⁻¹ de Cd.

3.5.1. Cu+Cd. Modelo IT: función de distribución exponencial

Se ajustaron los datos de supervivencia de *C. riparius* frente al Cd bajo el supuesto de IT, suponiendo que la tolerancia individual posee una distribución exponencial. Se obtuvieron las estimaciones de los parámetros recogidas en la Tabla 52.

Cu+Cd	$h_b (h^{-1})$	$\gamma (L \cdot mol^{-1})$	$k_e (h^{-1})$
IT exponencial	0.0054	$1.73 \cdot 10^6$	$2.57 \cdot 10^5$
IC 95 %	(0.0046, 0.0062)	($1.47 \cdot 10^6$, $2.01 \cdot 10^6$)	($2.18 \cdot 10^5$, $3 \cdot 10^5$)

Tabla 52. Concentraciones letales de Cd según el modelo IT Weibull.

3.5.2. Cu+Cd. Modelo IT: función de distribución Normal

Se realizó el ajuste de los datos de supervivencia frente a una mezcla de Cu y Cd (con igual concentración de ambos) al modelo IT normal, los resultados se recogen en la Tabla 53.

Cu+Cd	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\mu (mol \cdot L^{-1})$	$\sigma (mol \cdot L^{-1})$
IT Normal	0.0045	0.0001	$2.51 \cdot 10^{-6}$	$1.13 \cdot 10^{-6}$
I.C. 95 %	(0.0044,0.0095)	$(7.97 \cdot 10^{-5}, 1.32 \cdot 10^{-5})$	$(2.37 \cdot 10^{-6}, 3.22 \cdot 10^{-6})$	$(1.09 \cdot 10^{-6}, 1.16 \cdot 10^{-6})$

Tabla 53. Modelo de supervivencia IT normal ajustado para la exposición conjunta a Cd y Cu Intervalos de confianza al 95%.

3.5.3. Cu+Cd. Modelo IT: función de distribución logística

El ajuste de los datos de supervivencia frente a Cu y Cd a un modelo IT con distribución logística del umbral de tolerancia llevó a los resultados recogidos en la Tabla 54.

Cu+Cd	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mol \cdot L^{-1})$	$\beta (-)$
IT logística	0.0065	$7.87 \cdot 10^{-6}$	$1.70 \cdot 10^{-7}$	2.76
I.C. 95 %	(0.0057,0.0075)	$(6.92 \cdot 10^{-6}, 8.77 \cdot 10^{-6})$	$(1.51 \cdot 10^{-7}, 1.91 \cdot 10^{-7})$	(2.37,3.91)

Tabla 54. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia a Cu+Cd a una IT logística e intervalos de confianza (IC) al 95%.

3.5.4. Cu+Cd. Modelo IT: función de distribución de Weibull

El ajuste de los datos de supervivencia a la mezcla de Cu y Cd al modelo IT con función de distribución de la tolerancia tipo Weibull llevó a los resultados de la Tabla 55.

Cu+Cd	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mol \cdot L^{-1})$	$\beta (-)$
IT Weibull	0.0045	$7.58 \cdot 10^{-6}$	1.55	$1.80 \cdot 10^{-7}$
I.C. 95 %	(0.0043,0.0076)	$(5.82 \cdot 10^{-6}, 9.17 \cdot 10^{-6})$	(1.18,2.20)	$(1.45 \cdot 10^{-7}, 2.3067 \cdot 10^{-7})$

Tabla 55. Resultados del ajuste de los datos de Cu+Cd a un modelo IT Weibull. Intervalos de confianza al 95%.

3.5.5. Cu+Cd. Modelo IT: función de distribución Gamma

El ajuste de los datos de supervivencia tras exposición simultánea a Cd y Cu al modelo de IT con función gamma de distribución de la tolerancia llevó a los resultados de la Tabla 56.

Cu+Cd	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mol \cdot L^{-1})$	$\beta (-)$
IT gamma	0.0036	$2.58 \cdot 10^{-8}$	0.6327	$9.06 \cdot 10^{-10}$
I.C. 95%	(0.0035,0.007)	($2.41 \cdot 10^{-8}$, $3.48 \cdot 10^{-8}$)	(0.6323,0.6329)	($6.81 \cdot 10^{-10}$, $9.60 \cdot 10^{-10}$)

Tabla 56. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia a Cu y CdCl₂ a una IT tipo gamma e intervalos de confianza (IC) al 95%

3.5.6. Cu+Cd. Modelo SD

El ajuste de los datos de supervivencia a Cu más Cd al modelo de SD produjo el resultado recogido en la Tabla 57.

Cu+Cd	$h_b (h^{-1})$	$z (mol \cdot L^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$k_k (L \cdot mol^{-1} \cdot h^{-1})$
SD	0.0106	$1.15 \cdot 10^{-11}$	$4.79 \cdot 10^{-6}$	0.103
IC 95%	(0.0095,0.0117)	($0,4.5932 \cdot 10^{-9}$)	(0,0.2173)	(0,0.274)

Tabla 57. Resultados del ajuste de los datos de supervivencia a Cu+Cd al modelo de SD e intervalos de confianza (IC) al 95%.

3.5.7. Cu+Cd. Resumen de resultados

La mayor log-verosimilitud de todos los modelos corresponde al caso de IT con función de distribución logarítmica, siendo el modelo de SD el que tiene una función de log-verosimilitud menor. En la Tabla 58 se recogen los valores de los parámetros estimados para cada modelo, así como el de la función de log-verosimilitud correspondiente.

IT	Log F	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\mu, \alpha (mol \cdot L^{-1});$ $\gamma (L \cdot mol^{-1})$	σ, β
Logística	-903.4	0.0065	$7.87 \cdot 10^{-6}$	$1.70 \cdot 10^{-7}$	2.76
Weibull	-904.5	0.0045	$7.58 \cdot 10^{-6}$	1.55	$1.80 \cdot 10^{-7}$
Exponencial	-915.7	0.0054	$1.73 \cdot 10^{-6}$	$2.57 \cdot 10^5$	-----
Normal	-933.3	0.0045	0.0001	$2.51 \cdot 10^{-6}$	$1.13 \cdot 10^{-6}$
Gamma	-948.8	0.0036	$2.58 \cdot 10^{-8}$	0.6327	$9.06 \cdot 10^{-10}$
SD	Log F	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$z (mol \cdot L^{-1})$	$k_k (L \cdot mol^{-1} \cdot h^{-1})$
SD	-1059.2	0.0106	$1.15 \cdot 10^{-11}$	$4.79 \cdot 10^{-6}$	0.103

Tabla 58. Resumen de los ajustes a modelos IT y SD obtenidos para la mezcla de Cu+Cd. Los cinco modelos IT están en orden decreciente del valor de la función de log-verosimilitud.

3.5.8. Cu+Cd. Elección de modelo

Se calcularon los coeficientes de Akaike ajustados para el tamaño muestral de todos los modelos, obteniendo los valores recogidos en la Tabla 59.

Modelo:	IT Normal	IT Logístico	IT Weibull	IT Gamma	IT Exponencial	SD
AIC_c	1875.9	1816.1	1818.3	1906.9	1838.2	2127.7

Tabla 59. Coeficientes de Akaike ajustados al tamaño muestral de los seis modelos estudiados para la mezcla de Cu+Cd.

El modelo con menor coeficiente de Akaike resultó ser el IT logístico, mientras que el coeficiente correspondiente al modelo IT de Weibull sólo es dos unidades mayor. Para facilitar la comparación entre los modelos se hallaron las diferencias y pesos de Akaike (Tabla 60).

Modelo	Diferencia	Pesos: $w_i = \frac{\exp\left(-\frac{1}{2} \Delta_i\right)}{\sum_{j=1}^R \exp\left(-\frac{1}{2} \Delta_j\right)}$ $0 \leq w_i \leq 1$
Logístico	$\Delta_L = \Delta_{min} = 0$	0.7502
Gamma	$\Delta_G = AIC_c(G) - AIC_c(L) = 90.8$	$1.4 \cdot 10^{-20}$
SD	$\Delta_{SD} = AIC_c(SD) - AIC_c(L) = 311.6$	$1.7 \cdot 10^{-68}$
Weibull	$\Delta_L = AIC_c(W) - AIC_c(L) = 2.2$	0.2498
Normal	$\Delta_N = AIC_c(N) - AIC_c(L) = 59.8$	$7.2 \cdot 10^{-14}$
Exponencial	$\Delta_E = AIC_c(E) - AIC_c(L) = 22.1$	$1.2 \cdot 10^{-5}$

Tabla 60. Diferencias y pesos de Akaike para los seis modelos aplicados a la mezcla de Cu+Cd.

El mejor resultado se obtuvo para el modelo IT logístico, que con un peso de 0.7502 posee una probabilidad de explicar los datos de aproximadamente el 75%. El modelo IT de Weibull posee así mismo un peso significativo de 0.2498, que le otorga una probabilidad de explicación de los datos de casi el 25%. Los pesos del resto de modelos resultaron insignificantes.

Para el modelo IT logístico se calculó el *adjusted-R square* como medida de la bondad de ajuste:

$$Adjusted\ R\ square = 1 - \frac{(n-1) \cdot \sum_i (\hat{y}_i - y_i)^2}{v \cdot \sum_i (y_i - \bar{y})^2} = 0.6951$$

3.5.9. Cu+Cd. Concentraciones letales con el modelo elegido

El modelo elegido como mejor según el criterio de Akaike, el IT logístico, se utilizó para estimar varias concentraciones letales a 24 y 48 horas (Tabla 61).

Este modelo prevé unas concentraciones letales a 48 horas mayores que las efectuadas por el modelo probit.

I.T. Gamma	24h		48h	
	LCx (mol·L ⁻¹)	IC 95%	LCx (mol·L ⁻¹)	IC 95%
LC10	4.05·10 ⁻⁴	(2.84·10 ⁻⁴ , 6.56·10 ⁻⁴)	2.03·10 ⁻⁴	(1.42·10 ⁻⁴ , 3.28·10 ⁻⁴)
LC25	6.03·10 ⁻⁴	(4.51·10 ⁻⁴ , 8.69·10 ⁻⁴)	3.0163·10 ⁻⁴	(2.26·10 ⁻⁴ , 4.34·10 ⁻⁴)
LC50	8.98·10 ⁻⁴	(7.16·10 ⁻⁴ , 11.50·10 ⁻⁴)	4.4904·10 ⁻⁴	(3.58·10 ⁻⁴ , 5.75·10 ⁻⁴)
LC75	0.0013	(0.0011, 0.0015)	6.6848·10 ⁻⁴	(5.69·10 ⁻⁴ , 7.62·10 ⁻⁴)
LC95	0.0025	(0.0024, 0.0026)	9.95·10 ⁻⁴	(9.04·10 ⁻⁴ , 10.09·10 ⁻⁴)

Tabla 61. Concentraciones letales de Cu+Cd según el modelo IT logístico.

3.6. Comparación de las LC50 de Cu, Cd y mezcla de ambos

A fin de comparar el efecto del Cu y el Cd por separado con el efecto conjunto se analizaron las LC50 obtenidas a 24 y 48 horas (Tablas 41, 51 y 61). Para facilitar la comparación se cambiaron las unidades de concentración de Cu y Cd de mg/L a mol/L (Materiales y Métodos, aptdo. 2.1.1). Los resultados se recogen en la tabla 62.

LC50 (mol·L ⁻¹)	Cd	Cu	Cd+Cu
24h	16.92 · 10 ⁻⁴	6.83 · 10 ⁻⁴	8.98 · 10 ⁻⁴
48h	84.77 · 10 ⁻⁴	3.42 · 10 ⁻⁴	4.50 · 10 ⁻⁴

Tabla 62. LC50 del Cu, Cd y la mezcla de ambos a 24 y 48h.

3.7. Superficies de supervivencia

En la Figura 5 se muestra la superficie de supervivencia correspondiente al modelo elegido para cada compuesto.

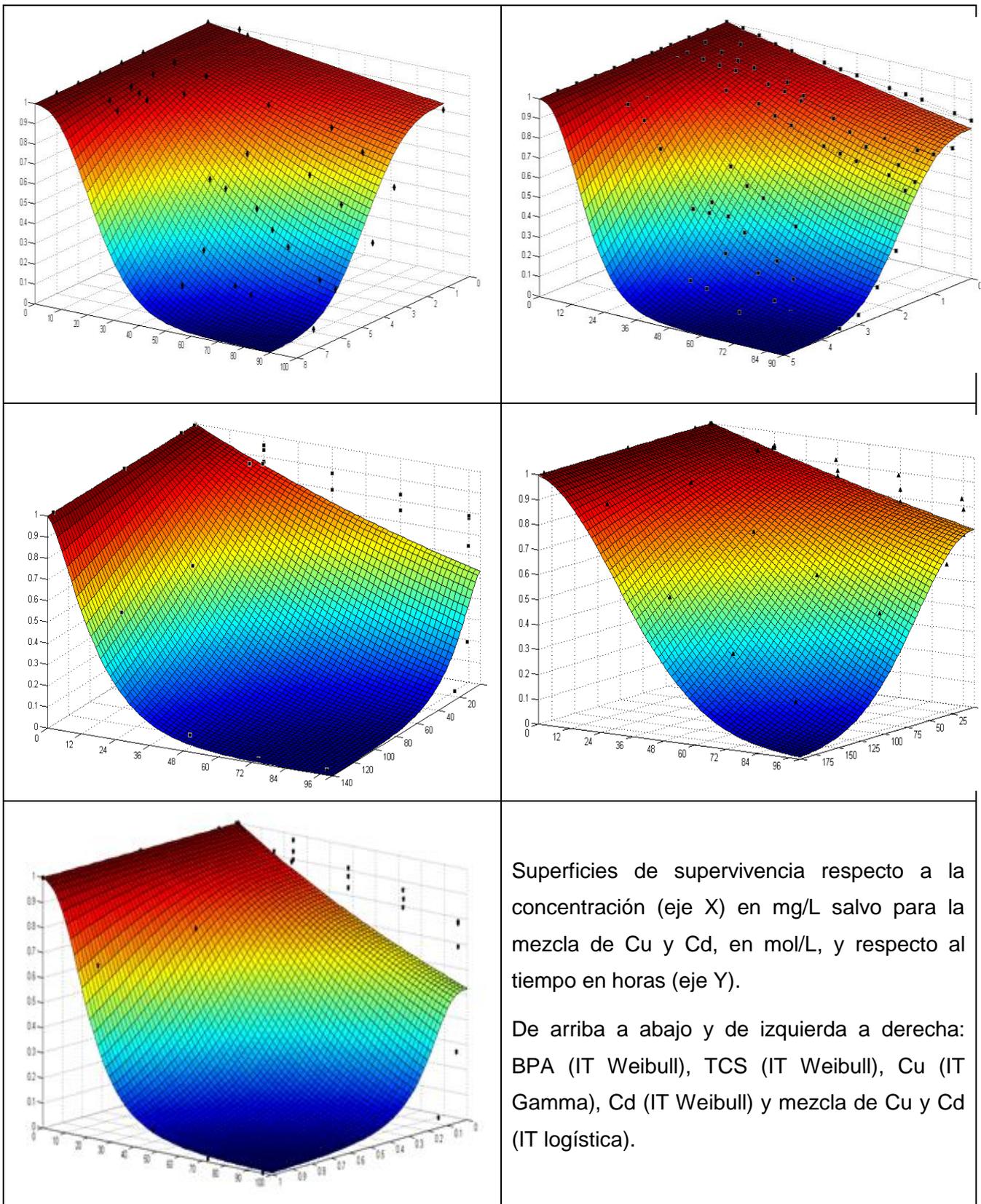


Figura 5. Superficies de supervivencia.

4. SIMULACIONES

En todas las simulaciones de este apartado se consideró una población de larvas de cuarto estadio de *C. riparius* con una tolerancia individual al BPA de tipo Weibull, modelo escogido en el apartado

3.1.7. Se utilizaron por lo tanto las estimaciones de los parámetros obtenidas para este modelo:

IT (BPA)	h_b (h^{-1})	k_e (h^{-1})	α (mg/L)	β
Weibull	0.002	0.0209	3.5270	2.9709

Tabla 63. Resultados del modelo elegido para BPA.

4.1. Condiciones de laboratorio: pulsos de BPA en condiciones de laboratorio

Se simuló la exposición a dos pulsos de BPA a una población de 1000 larvas de *C. riparius* en condiciones de laboratorio, teniendo en cuenta el riesgo basal.

El patrón de concentraciones simuladas fue el siguiente:

- 5 mg/L durante 24 horas.
- Tiempo de recuperación de 72 horas.
- 6 mg/L durante 24 horas.

Se realizaron los gráficos de concentración externa de BPA, concentración escalada interna y supervivencia en los tres intervalos temporales (Figura 6).

Se observó que al inicio del tiempo de recuperación la concentración escalada interna era de aproximadamente 2.2 mg/L, descendiendo hasta 0.4 mg/L justo antes del comienzo del segundo pulso. Esto causó un descenso de la supervivencia incluso en el tiempo de recuperación de 765 a 665 larvas, esto es, un 10% del total de las larvas iniciales murieron mientras no estaban expuestas, a consecuencia de la concentración interna de BPA.

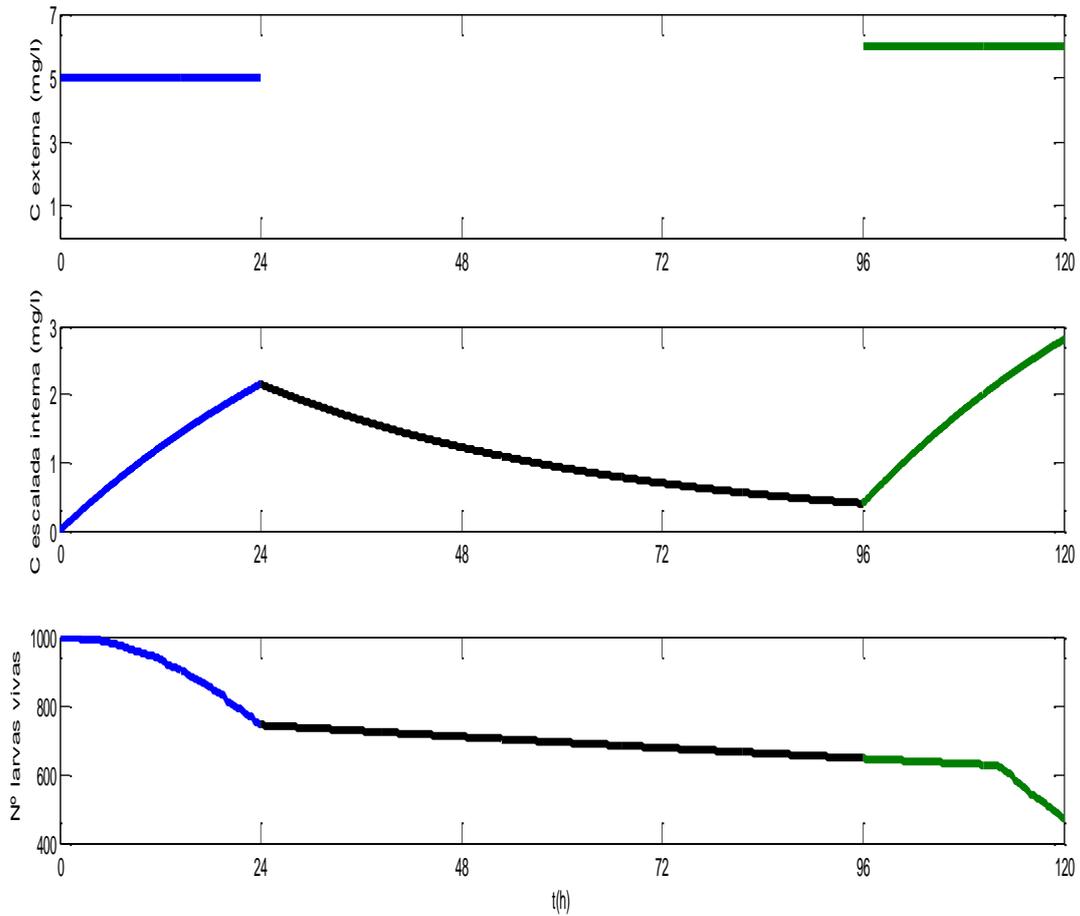


Figura 6. De arriba a abajo: concentración externa de BPA, concentración interna escalada y supervivencia en función del tiempo.

Tras los dos pulsos se encontró una supervivencia final de aproximadamente 475 larvas de las 1000 iniciales, es decir, 525 larvas muertas en un total de 120 horas. Se utilizó este dato para encontrar la concentración externa que provocaría el mismo número de muertes en ese intervalo de tiempo a exposición continua. Para ello se calculó mediante el mismo modelo de IT Weibull la LCx correspondiente (LC52.5 a 120 h) obteniendo una concentración de 2.7 mg/L.

4.2. Vertido fluvial puntual

Se simuló el vertido puntual de BPA en un canal de agua y se analizó la supervivencia de larvas de cuarto estadio de *C. riparius* corriente abajo. A modo de ejemplo se tomaron las siguientes características:

- Profundidad de 1m.
- Velocidad de corriente de 1 cm/s
- Coeficiente de difusión longitudinal $0.5 \text{ m}^2/\text{s}$.
- Longitud del tramo de río: 500 m.
- Masa del vertido de BPA: 500 kg.
- Degradación del BPA (vida media): 4 días.

La simulación mostró los patrones de concentración interna y supervivencia a diferentes tiempos y distancias del punto de vertido. Se pudo apreciar que a las 48 horas los efectos en la supervivencia sólo serían perceptibles en los puntos cercanos al vertido. A partir de los 180 m ambas supervivencias se confunden, siendo la diferencia entre ellas menor del 5% (Figura 7).

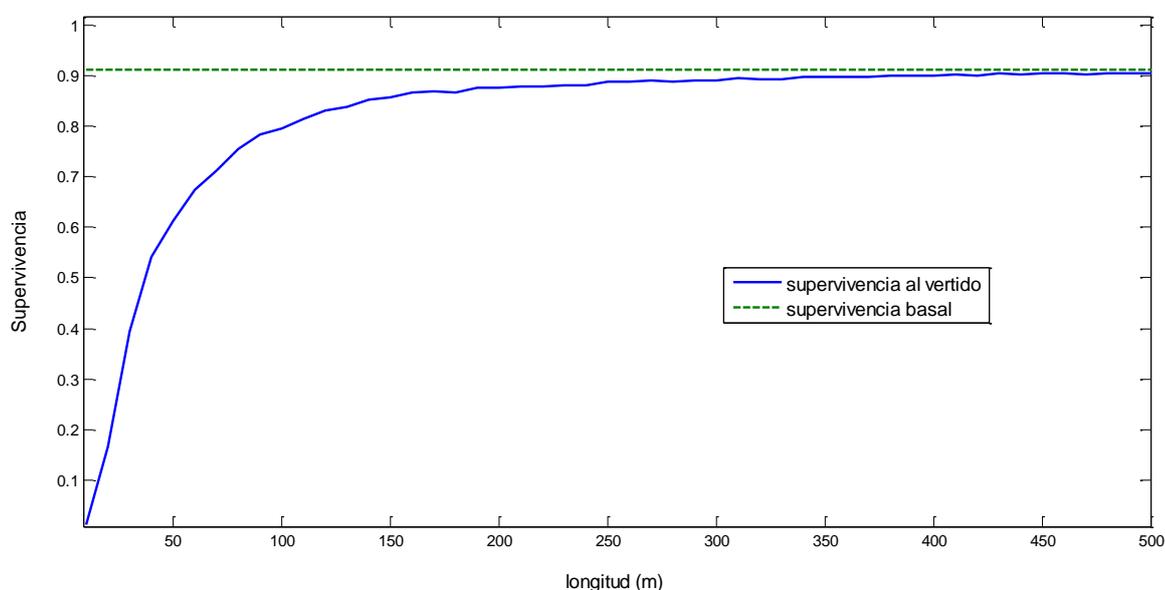


Figura 7. Supervivencia a las 48 horas tras un vertido de BPA frente a la supervivencia basal, en un tramo de río de 500 m de longitud.

Como ejemplo de punto cercano al vertido se analizó así mismo la evolución de la concentración interna escalada durante 96 horas, a 10 m del origen. Se observó que alcanzaba un máximo de 4mg/L aproximadamente a las 6 horas y que tras cuatro días (96 horas) había descendido a unos 0.7 mg/L, valor que aunque por debajo de la tolerancia media de la población aún puede afectar a la supervivencia (Figura 8).

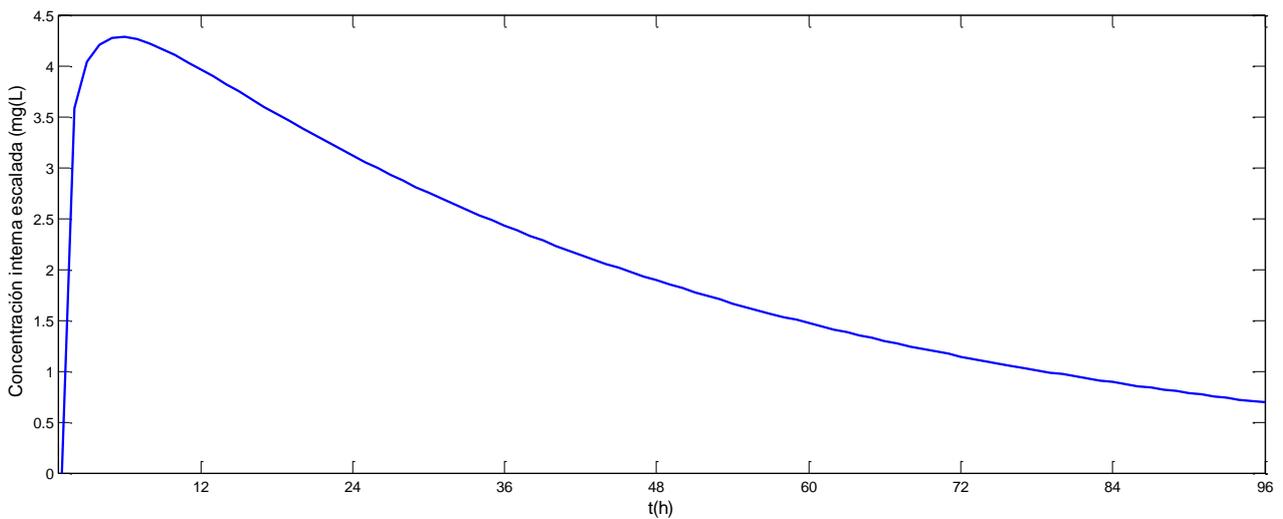


Figura 8. Evolución de la concentración escalada interna en un punto a 10 m del vertido durante las primeras 96 horas.

4.3 Vertido fluvial continuo

Se realizó la simulación de un vertido continuo de BPA en un río, utilizando los siguientes datos como ejemplo:

- Velocidad de la corriente 0.5 m/s.
- Tramo de río de 5m de largo por 5 m de ancho.
- Coeficiente de difusión transversal 10 m²/s.
- Masa del vertido continuo: 0.5 kg/s.
- Vida media del BPA: 4 días.
- Densidad de larvas: 200 larvas/dm².

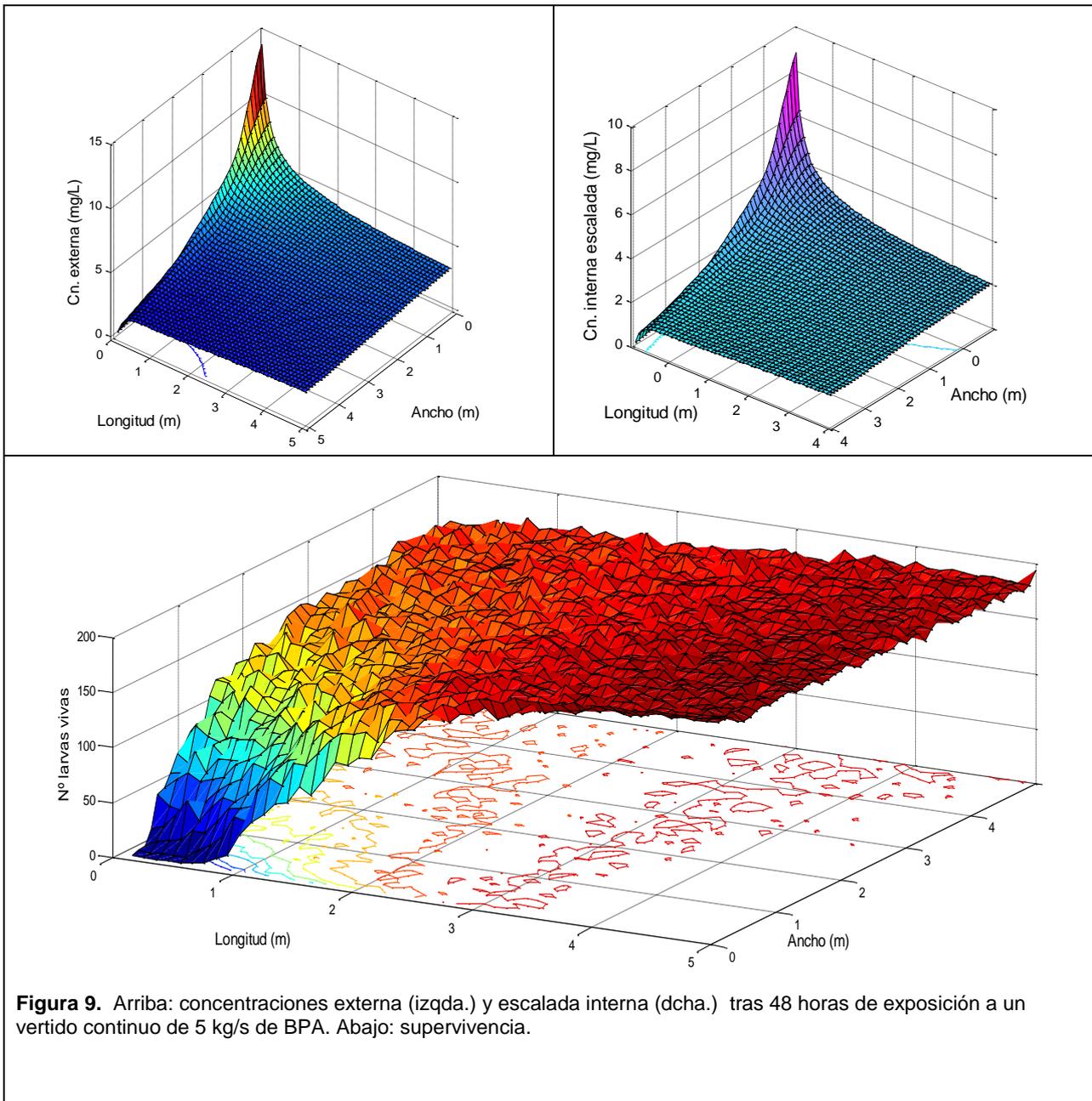


Figura 9. Arriba: concentraciones externa (izqda.) y escalada interna (dcha.) tras 48 horas de exposición a un vertido continuo de 5 kg/s de BPA. Abajo: supervivencia.

Con estos datos se consiguió una concentración externa del orden de las máximas observadas en campo (Introducción, apartado 5.1) excepto a 1m de radio alrededor del vertido. Se pudo comprobar que la incidencia en la supervivencia de un vertido de estas características es prácticamente nula excepto en el foco del vertido, donde la concentración de BPA superaba los 1.5 mg/L.

Se realizó otra simulación aumentando 10 veces la cantidad de BPA (5 kg/s) y se obtuvieron las concentraciones externas e interna escalada y la supervivencia a 48 horas (Figura8). Bajo estas condiciones sí pudo observarse un patrón de mortalidad, acentuado alrededor del foco del vertido

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los seres vivos se encuentran expuestos a un gran número y variedad de compuestos químicos de origen antropogénico cuyos efectos en el medio ambiente es preciso conocer. Para estudiar la posible toxicidad de cada uno de los compuestos se realizan estudios a nivel molecular que precisan de una evaluación preliminar de la toxicidad aguda: la elección de dosis subletales permite analizar el efecto del compuesto exclusivamente, ya que en momentos cercanos a la muerte se desencadenan otra serie de eventos que interferirían en el estudio. Así, la mayoría de estos ensayos van precedidos de un análisis de supervivencia que permite escoger la dosis subletal adecuada.

Hasta hace pocos años este análisis era un paso previo rutinario que se realizaba con técnicas sencillas como el probit, incluidas en la mayoría de los programas informáticos de estadística. Sin embargo, en las últimas décadas hay un interés creciente por mejorar estos métodos de forma que, por un lado, puedan ofrecer una estimación más completa y certera sobre la dosis subletal, y por otro aporten por sí mismas información relevante sobre el propio proceso que culmina en supervivencia o muerte.

En este estudio se ha analizado la supervivencia de larvas de cuarto estadio de *C. riparius*, organismo de referencia en ecotoxicología, frente a dos derivados del fenol (BPA y TCS) y dos metales (Cu y Cd), utilizando diferentes modelos matemáticos en el marco de la teoría GUTS. El estudio se ha realizado ajustando los datos a un modelo de SD y cinco modelos de IT. Estos últimos se diferencian entre sí en la forma de la distribución de la tolerancia entre la población: gamma, normal, Weibull, logística y exponencial. Salvo este último, de tres parámetros, todos los modelos constan de cuatro parámetros (Tabla 64).

BPA IT Weibull	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mg \cdot L^{-1})$	β
	0.0020	0.0209	3.5270	2.9709
TCS IT Weibull	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mg \cdot L^{-1})$	β
	0.0031	0.0245	2.7012	1.9798
Cu+Cd IT logística	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\mu (mol \cdot L^{-1}) ;$	β
	0.0065	$7.8738 \cdot 10^{-6}$	$1.6968 \cdot 10^{-7}$	2.7610
Cd IT Weibull	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mg \cdot L^{-1})$	β
	0.0034	$3.1643 \cdot 10^{-6}$	0.0174	2.0066
Cu IT Gamma	$h_b (h^{-1})$	$k_e (h^{-1})$	$\alpha (mg \cdot L^{-1})$	β
	0.0063	$1.2514 \cdot 10^{-6}$	0.7985	0.00205

Tabla 64. Modelo elegido y parámetros calculados para cada compuesto

1. Supervivencia de *C. riparius* ante BPA y TCS

La supervivencia de *C. riparius* frente al BPA se estudió con un total de 65 datos de supervivencia frente a tiempo y concentración. Tanto el número elevado de datos como su buena distribución permitieron un buen ajuste a todos los modelos posibles.

De entre ellos el mejor según el criterio de información de Akaike fue el modelo IT de Weibull, con un peso relativo del 97% frente al resto de modelos, que sumaban el 3% restante. El *adjusted-R squared* calculado después confirmaba la bondad del ajuste con un valor de 0.94.

En los modelos IT se considera que cada individuo posee un umbral de tolerancia, una concentración interna límite a partir de la cual muere. En este ajuste los parámetros α y β resultaron ser 3.53 mg/L y 2.97 mg/L respectivamente. Estos valores de la función de distribución de Weibull nos permiten calcular la tolerancia media de la población al BPA:

$\alpha \Gamma (1+1/\beta) = 3.15$ mg/L. Es decir, la población de larvas de cuarto estadio de laboratorio de *C.*

riparius utilizadas tolera de media 3.15 mg/L de concentración interna escalada de BPA, límite a partir del cual mueren.

Conviene recordar que se trata de concentración interna *escalada*, relacionada con la concentración interna real por el factor de bioacumulación según la ecuación 16. Esta versión simplificada de la teoría GUTS no permite establecer el factor de bioacumulación y por tanto no es posible conocer la relación exacta entre ambas concentraciones. Para ello sería necesario un experimento más complejo en el que pudiera medirse la concentración interna real, como se ha efectuado ya en algunos estudios utilizando trazadores radiactivos (Nyman y col., 2012).

No obstante es un parámetro muy interesante que permite establecer relación entre compuestos, pautas de exposición a la misma concentración (continua, por pulsos, etc.), o entre diferentes poblaciones de *C. riparius* de laboratorio y de campo, cultivos de diferentes laboratorios, o incluso las diferencias estacionales de una misma población.

Además permite calcular las concentraciones letales *externas*, esto es, las LCx tal y como se vienen utilizando en ecotoxicología durante décadas, pero con mucha más flexibilidad: al obtener la relación de la supervivencia con tiempo y concentración simultáneamente no sólo se hallan con facilidad las LCx a cualquier tiempo (aunque no se hayan tomado datos específicamente en ese instante o estos no sean demasiado buenos) sino que permite así mismo el cálculo de las LTx (tiempo letal para el x% de las larvas a concentración fija) para cualquier concentración.

Las LCx ante BPA calculadas de esta forma son similares a las halladas por el método probit, aunque a las 48 horas las LC75 y LC90 son menores calculadas por la teoría GUTS. En el caso concreto de la LC50 a 24 horas (6.78 mg/L IT Weibull, 6.63 mg/L probit) concuerda también con la calculada por probit como paso previo a un estudio enzimático: 6.03 mg/L (Lee y Choi, 2007).

La supervivencia al TCS se analizó con un total de 130 datos. Tras ajustar todos los modelos el mejor según el criterio de información de Akaike resultó ser, al igual que para el BPA, el modelo de IT con función de distribución de Weibull, con un peso relativo del 82%. El modelo de distribución

normal copaba prácticamente el peso restante (18%) siendo el peso relativo de los demás modelos insignificante. El estudio posterior del *adjusted R-square* para el modelo IT de Weibull ratificaba la bondad de este ajuste con un valor de 0.95. Aunque los autores de la teoría GUTS no señalan preferencia por ninguna distribución de la tolerancia (Jagger y col., 2011) esta coincidencia podría analizarse en más profundidad en estudios posteriores.

Al igual que con el BPA, se puede calcular la tolerancia media de la población al TCS a partir de los parámetros α y β , obteniendo en este caso un valor de 1.76 mg/L, que representa la concentración escalada interna media de la población, valor a partir del cual la larva muere. Tal y como se ha comentado en el caso del BPA, esta concentración escalada interna está relacionada con la concentración interna real del TCS a través del factor de bioacumulación, cuyo valor no puede estimarse con estos modelos basados sólo en datos de supervivencia, sino que son necesarias técnicas de laboratorio más complejas que permitan medir la concentración interna en los tiempos de exposición.

Con el modelo elegido para el TCS, IT de Weibull, se hallaron algunas LCx significativas a 24 y 48 horas que resultaron ser algo mayores que las estimadas por probit, aumentando este efecto con la mortalidad. Por ejemplo, a 24 horas la LC50 es 5.05 mg/L con el modelo IT GUTS y 3.65 mg/L con el probit, mientras que las LC95 son 10.57 mg/L y 6.50 mg/L respectivamente. En la literatura científica no se han encontrado LCx comparables; en el estudio de Dussault y col. con larvas de 12 días de edad de *Chironomus tentans* se halla la LC50 a diez días, obteniendo un valor de 0.40 mg/L (Dussault y col., 2008). Calculada la LC50 equivalente para *C. riparius* con el modelo elegido en este estudio, también a 10 días, sería de 2.25 mg/L. La diferencia puede deberse a que son especies diferentes, pero también el intervalo temporal sería inadecuado: puesto que el ciclo vital de *C. riparius* apenas llega al mes, diez días es un período demasiado largo en el que son de esperar diversas transformaciones fisiológicas.

En cuanto a la constante de proceso dominante (eliminación o reparación), k_e , en el caso del BPA se obtuvo un valor de 0.021 h^{-1} , frente a 0.025 h^{-1} para el TCS. La similitud entre ambas constantes

puede deberse a que ambos son compuestos orgánicos derivados del fenol con masas molares del mismo orden.

La tasa de riesgo basal calculada, hb , también llamada tasa de muerte natural por no tener en cuenta el efecto del compuesto químico, fue del mismo orden en ambos casos: 0.0020 h^{-1} con los datos del BPA y 0.0031 h^{-1} con los del TCS.

2. Supervivencia de *C. riparius* ante Cu y Cd por separado

Se analizó la supervivencia de larvas de cuarto estadio de *C. riparius* expuestas a cobre (Cu) y (Cd). Se efectuaron ensayos con Cu y Cd por separado, y un tercero con una mezcla de ambos. Se realizó el ajuste de los datos obtenidos a un modelo de SD y cinco modelos de IT, en el marco de la teoría GUTS. Todos los modelos constan de cuatro parámetros, salvo el modelo de tolerancia individual con distribución exponencial, de tres parámetros. Se hallaron también las LCx con el método tradicional probit.

Se midió la supervivencia a concentraciones $0-10^{-7}-10^{-6}-10^{-5}-10^{-4}-5 \cdot 10^{-4}-10^{-3}$ mol/L cada 24 horas hasta las 96 horas, con un total de 35 datos para el Cu y Cd.

En el caso del Cu el mejor método según el criterio de información de Akaike resultó ser el modelo de IT con distribución gamma, con un peso relativo del 99.22%, por lo que ningún otro modelo tiene un peso comparable. La bondad de ajuste se midió a través del *adjusted R-squared* obteniéndose un valor de 0.76.

Con los parámetros obtenidos se puede hallar la tolerancia media esperada para la población de *C. riparius*, obteniéndose un valor de aproximado de 0.0016 mg/L de Cu, que sería la concentración escalada interna media que puede tolerar una larva antes de morir.

La constante de eliminación k_e también es pequeña: $1.2 \cdot 10^{-6} \text{ h}^{-1}$. Recordemos que no es exactamente la tasa de eliminación, sino que representa el mecanismo dominante entre eliminación

y reparación de daño. En todo caso sería un mecanismo lento, que puede explicar el valor de la tolerancia media, también pequeño.

Este modelo IT de gamma permite hallar las LCx a cualquier tiempo, a pesar de que los datos tomados a las 24 horas no eran coherentes entre sí a concentraciones pequeñas (había mayor supervivencia frente a una concentración exterior de Cu de 6.455 mg/L que a 0.6455 mg/L). Los modelos GUTS, que incorporan tanto la concentración como el tiempo en una curva de superficie (Figura 5) pueden hacer frente a estas desavenencias puntuales. En cambio el modelo probit ajusta únicamente los datos a tiempo fijo y es mucho más sensible a este tipo de contratiempos. No se pudo obtener un ajuste probit a 24 horas, y el ajuste realizado a 48 horas estima LCx muy inferiores a las del modelo IT gamma (LC50=3.24 mg/L con probit frente a 22.05 mg/L con IT gamma).

En un estudio realizado con una población de *C. riparius* silvestre expuesto a Cu se estimó, por el método probit, una LC50 a 24 de 26 mg/L (Lencioni y col., 2016). La discrepancia con el valor obtenido en este estudio (44.10 mg/L) puede ser debida a la diferencia entre larvas de laboratorio y larvas silvestres, aunque sería preciso mayor investigación al respecto.

Respecto al Cd, el mejor ajuste según el criterio de información de Akaike resultó ser el modelo de IT con distribución tipo Weibull, con un peso relativo del 71.5% y un *adjusted-R squared* de 0.70. El modelo con distribución de la tolerancia tipo gamma obtuvo un peso relativo del 23.8 %.

La tolerancia media de la población al Cd puede hallarse con los parámetros obtenidos para este modelo IT de Weibull, resultando un valor de 0.0156 mg/L. Es decir, la concentración escalada interna media que tolera la población sin morir es de 0.0156 mg/L. Dado que en este tipo de estudios se desconoce el factor de bioacumulación no es posible saber la concentración interna correspondiente. Sin embargo este valor puede compararse con el relativo al Cu, 0.0016 mg/L, encontrando que la tolerancia media al Cd es casi diez veces mayor. Este dato está en concordancia con diversos estudios que sugieren que *C. riparius* es un organismo especialmente tolerante al Cd (Timmermans y col., 1991; Gillis y Wood, 2008).

Para relacionar la supervivencia con la concentración externa es habitual calcular las LCx. Los modelos de la teoría GUTS proporcionan superficies de supervivencia en función del tiempo y la concentración, lo que permite mayor flexibilidad que con el modelo probit habitualmente utilizado. En concreto, con el probit pudieron obtenerse las LCx a 24 horas, mientras que a 48 horas la LC10 (27.0 mg/L probit, 37.2 mg/L GUTS) y LC25 (77.3 mg/L probit, 61.4 mg/L GUTS) son del mismo orden con ambos métodos. Sin embargo para mortalidades altas difieren: (LC95 de 4301.6 mg/L probit, 197.4 mg/L GUTS). La medida más habitual a 48h, el LC50, es 249 mg/L con el probit y sólo 95 mg/L con el modelo IT Weibull de la teoría GUTS.

En la literatura científica se encuentran LC50 a 48 horas para larvas de tercer y cuarto estadio (juntas) de *C. riparius* de 331 mg Cd/L en agua blanda y 1106 mg Cd/L en agua dura (Gillis y Wood, 2008 (2)). En cambio, el estudio de Planelló y col. describe una mortalidad más parecida a la obtenida por probit (Planelló y col., 2007): aproximadamente un 30% de supervivencia a las 48 horas con una concentración 10 mM (1124 mg/L de Cd).

En cuanto a la constante de eliminación para el Cd, resultó ser del orden de la del cobre ($k_e(\text{Cu})=3.2 \cdot 10^{-6} \text{ h}^{-1}$, $k_e(\text{Cd})=1.3 \cdot 10^{-6} \text{ h}^{-1}$), lo que sugiere un mecanismo de eliminación/reparación lento, o una alta tendencia a la bioacumulación.

3. Supervivencia de *C. riparius* ante una mezcla de Cu+Cd

Las larvas de cuarto estadio de *C. riparius* se expusieron a las mismas concentraciones de Cu y Cd referidas anteriormente, pero simultáneamente. Esto es: $0-10^{-7}-10^{-6}-10^{-5}-10^{-4}-5 \cdot 10^{-4}-10^{-3} \text{ mol/L}$ de cada uno (por ejemplo 10^{-3} mol/L corresponde a 64.55 mg/L de Cu más 112.4mg/L de Cd). Se midió la supervivencia cada 24 horas hasta las 96h, obteniendo un total de 34 datos de concentración, tiempo y supervivencia.

Tras comparar los diferentes modelos de la teoría GUTS utilizados en este estudio, por medio del criterio de información de Akaike se eligió el modelo de IT con distribución logística como el mejor, con un peso relativo cercano al 75%. El modelo IT de Weibull tenía un peso relativo considerable, del 25%. La bondad de ajuste para el modelo IT logístico medida mediante el *adjusted-R squared* fue de 0.70.

Compuesto	Modelo	ke	IT (concentración escalada interna)	LC50 a 48h
BPA	IT Weibull	0.021 h ⁻¹	3.15 mg/L	4.22 mg/L
TCS	IT Weibull	0.025 h ⁻¹	1.76 mg/L	3.24 mg/L
Cu	IT Gamma	1.3·10 ⁻⁶ h ⁻¹	0.0016 mg/L	22.05 mg Cu/L
Cd	IT Weibull	3.2·10 ⁻⁶ h ⁻¹	0.0156 mg/L	95.18 mg Cd/L
Cu+Cd	IT logística	7.9·10 ⁻⁶ h ⁻¹	0.0110 mgCu/L + + 0.0191 mgCd/L	50.56 mgCd/L+ +29.03 mgCu/L

Tabla 65. Constante de eliminación, IT media de la población en términos de concentración interna escalada y LC50 a las 48 horas para todas las sustancias estudiadas

La tolerancia umbral media de la población (concentración escalada interna) hallada con el modelo logístico es de 1.7·10⁻⁷ mol/L, que corresponde aproximadamente a 0.011mg/L de Cu más 0.019 mg/L de Cd.

La comparación de esta tolerancia umbral media a la mezcla de Cu y Cd con las tolerancias de cada uno de los productos de forma individual (Cu: 0.0016 mg/L, Cd: 0.0156 mg/L) sugiere una mayor resistencia del *C. riparius* a los dos metales administrados simultáneamente. En esta línea apunta también la comparación de las LC50 a 48 horas: 22.05 mgCu/L y 95.18 mgCd/L por separado, mientras que la correspondiente a la mezcla es de 29.03 mgCu/L+ 50.56mgCd/L. Sólo la concentración de Cu de la mezcla ya es mayor que la LC50 de este metal a 48 horas. Sin embargo, dado que el umbral de tolerancia al Cu parece ostensiblemente menor que al Cd, para analizar este efecto en profundidad estaría indicado realizar nueva investigación con exposiciones a mezclas de Cu y Cd en concentraciones proporcionales a sus respectivas tolerancias.

La interacción entre metales en los procesos de absorción y eliminación, así como en diversos procesos fisiológicos, ha sido descrita en numerosos estudios con insectos (Butchwalter y Loma, 2005; Gillis y Wood, 2008; Leonard y col., 2009;) y se ha apuntado a varios mecanismos, aunque el proceso exacto no está claro y es necesaria más investigación. Hasta la fecha la mayoría de estos estudios se han realizado desde una perspectiva exclusivamente biológica (actividad enzimática, genotoxicidad, etc.). La teoría GUTS utilizada en este trabajo puede aportar información fundamental que complemente la investigación tradicional. Además es lo suficientemente flexible como para poder adaptarse e incluir parámetros de diferente significado biológico, relacionando supervivencia con biomarcadores, aunque es un campo incipiente (Jager y Hansen, 2013).

En cuanto a la constante de proceso dominante k_e (eliminación o reparación) en el caso de los metales es muy baja en comparación con los fenoles, pero del mismo orden entre ellos, tanto por separado como para la mezcla de Cu y Cd. Otra discrepancia con el TCS y el BPA es que en estos se observa que la tolerancia media (concentración escalada interna) y la LC50 a 48 horas, aunque son magnitudes diferentes tienen el mismo orden de magnitud. En cambio en el caso de los metales la concentración escalada interna es varios órdenes de magnitud menor que las LC50.

En este estudio no se han utilizado factores de bioacumulación (constante de absorción dividida por la constante de eliminación) obtenidos por otros autores para plantear ni obtener los modelos. Sin embargo, teniendo en cuenta que en el caso de los metales suele ser muy alto, la discrepancia entre ambos tipos de concentración es lógica. Timmermans y col. describen un factor de bioacumulación para *C. riparius* de 5830 en el caso del Cu y 7000 para el Cd (Timmermans y col., 1992). Dado que la concentración escalada interna es la concentración interna dividida por el factor de bioacumulación, es de esperar esta diferencia en el orden de magnitud entre ambas concentraciones.

Por lo tanto los valores obtenidos por la teoría GUTS para la constante de eliminación, la tolerancia interna y las LCx concuerdan con un factor de bioacumulación muy elevado en el caso de los metales.

Por último, la tasa de muerte basal h_b fue del mismo orden para todas las sustancias, tomando valores entre 0.0020 h^{-1} para el BPA y 0.0064 h^{-1} para la mezcla de Cu y Cd.

4. Estudio de la supervivencia mediante la teoría GUTS

En los apartados anteriores se han descrito los resultados de la aplicación de la teoría GUTS al análisis de supervivencia de sustancias de diferente tipo, así como a la mezcla de dos de ellas. Los modelos de esta teoría resultan en superficies de supervivencia frente a tiempo y concentración (Figura 6), en vez de curvas supervivencia/tiempo o supervivencia/concentración, como ocurre con los métodos más tradicionales como el probit. El poder manejar ambas variables a la vez proporciona una información mucho más completa, y permite el cálculo rápido de cualquier LCx o LTX aunque la información obtenida justo en el punto deseado no sea buena. De esta forma se han podido obtener las LCx a 24 horas de los metales a pesar de que los datos de supervivencia en ese tiempo se solapaban entre concentraciones. El método tradicional probit aplicado a través del software SPSS no dio un buen ajuste a las 24 horas, ya que su cálculo se realiza sólo a partir de los datos de supervivencia a ese tiempo (Figura 10).

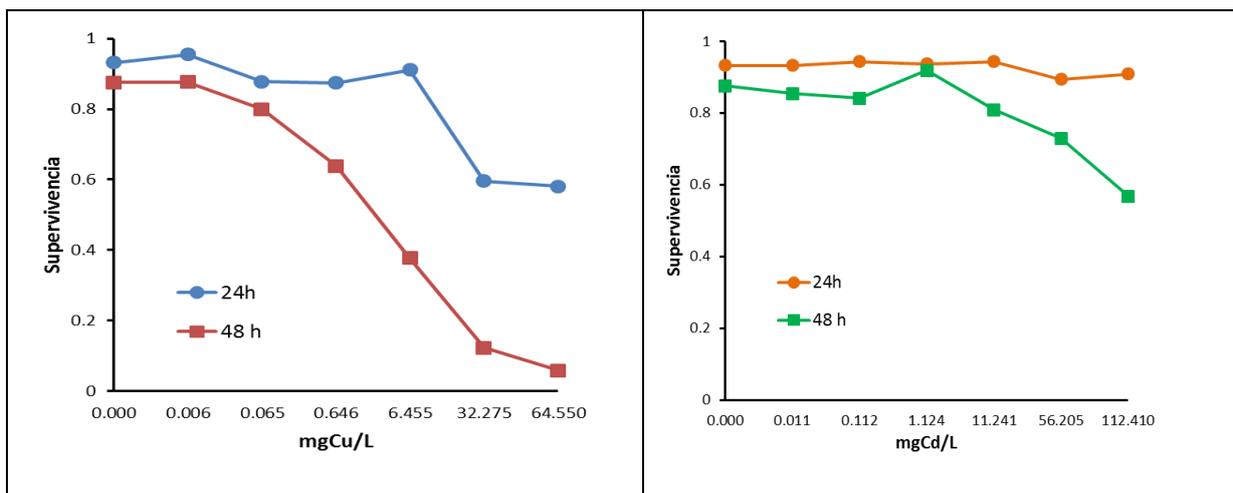


Figura 10. Supervivencia de *C. riparius* expuesto al Cu (izqda.) y a Cd (dcha.) a las 24 y 48 horas. A las 24 horas la supervivencia a 6.455 mgCu/L es mayor que a concentraciones menores mientras que para el Cd la mortalidad es similar con todas las concentraciones y el control. A 48h la supervivencia a 11.241 mgCd/L es mayor que a cualquier otra concentración, incluido el control.

Respecto a la elección de modelo dentro del marco de la teoría GUTS, en todos los casos el mejor ajuste ha correspondido a un modelo de IT de 4 parámetros. Los tres parámetros del modelo IT exponencial parecen insuficientes para describir la supervivencia de las larvas de cuarto estadio de *C. riparius* con ninguna de las sustancias estudiadas. Los autores de la teoría GUTS no dan preferencia al modelo IT frente al SD, y resaltan que a menudo ambos describen la supervivencia con igual eficacia. Sin embargo en este estudio ningún caso se ha ajustado mejor al modelo de SD. Esto no significa que *realmente* haya una tolerancia umbral y que la muerte no tenga absolutamente ningún componente estocástico, sino que por las características de estos resultados estos modelos se adaptan mejor. Todas las superficies de supervivencia halladas muestran una caída de la supervivencia muy suave al principio seguida de un descenso brusco lo que apoyaría la teoría de que las larvas viven hasta alcanzar su límite de concentración interna y después mueren inexorablemente, pero serían necesarios estudios más complejos, accediendo a la concentración interna real de las larvas en función del tiempo para poder sustentar esta teoría.

5. Toma de datos de supervivencia

El estudio de la supervivencia de larvas de cuarto estadio frente a BPA y TCS se realizó a partir de 65 y 130 datos respectivamente. Las concentraciones fueron elegidas en base a intervalos de 0.5-1 mg/L de compuesto, y los intervalos temporales fueron de 12 horas máximo. Esta amplia y adecuada distribución de los datos permitió un ajuste rápido a los modelos, aunque luego se eligiera el mejor entre todos, que en ambos casos obtuvo una bondad de ajuste (medida por el *adjusted R-squared*) cercana al 95%.

En el caso de los metales se siguió el protocolo habitual en muchos ensayos de toxicología: concentraciones escaladas por un factor de 10 e intervalos temporales de 24h. Como resultado, sólo 35 datos por sustancia, repartidos de forma irregular, de forma que en el rango de

concentraciones que *a posteriori* resultó ser más relevante (en base a las LCx obtenidas) escaseaban los datos de supervivencia, mientras que con las concentraciones más bajas la supervivencia era cercana a la del control. El *adjusted R-squared* en el caso de los metales se mantuvo entre el 69.5 y el 76%.

No sólo es importante el número de datos (con el BPA se lograron ajustes tan buenos como con el TCS con la mitad de datos), sino que es tanto o más relevante el rango de concentraciones empleadas. La opción de elegir las en potencias de 10 puede no ser la más adecuada para estudios de supervivencia. En próximas investigaciones, si no pueden encontrarse referencias de otros estudios que ayuden en la elección, sería aconsejable realizar *a priori* un muestreo de supervivencia con pocos individuos en un amplio rango de concentraciones. Los resultados de este muestreo, aunque no pudieran utilizarse como datos de supervivencia, servirían para la elección adecuada de concentraciones en el ensayo definitivo.

6. Simulación en condiciones de laboratorio

Se realizó la simulación de un vertido por pulsos de BPA en condiciones de laboratorio. Para ello se utilizó una población ficticia de 1000 larvas cuya tolerancia individual tenía una distribución de Weibull, modelo elegido para el BPA.

Se simularon dos pulsos de 5 y 6 mg/L durante 24 horas cada uno, separados por un tiempo de recuperación de 72 horas. Se obtuvo la supervivencia a cada pulso, así como la evolución de la concentración escalada interna durante las tres etapas, observando su descenso en la etapa de recuperación en la que no obstante causó la muerte del 10% de las larvas iniciales.

El patrón de concentraciones y tiempos escogidos es sólo un ejemplo de la infinidad de combinaciones de concentraciones y tiempos que pueden utilizarse. Además de constituir objeto de estudio por sí mismo, y proporcionar valiosa información sobre el proceso de supervivencia y

recuperación, el análisis de supervivencia por pulsos y su simulación pueden preceder a cualquier estudio de tipo biológico, ayudando a elegir tiempos y concentraciones para los ensayos, probando con diferentes posibilidades sin necesidad de sacrificar ningún animal.

En la práctica las sustancias contaminantes arrojadas al medio ambiente raramente siguen un patrón regular a concentración constante, sino que a menudo son vertidos en pulsos que responden a diferentes horarios y calendarios de la industria y agricultura. A la hora de establecer el riesgo y la legislación pertinente para cada sustancia hasta hace pocos años se extrapolaban los resultados obtenidos en laboratorio a concentración constante. Hoy en día los diferentes organismos reguladores están poniendo su atención en los modelos TKTD, que ofrecen la oportunidad de simular estos escenarios de concentración cambiante con mayor garantía. (Ashauer y Eschel, 2010; Ashauer y col., 2013).

No obstante, aunque puede simularse cualquier escenario de concentración y periodo de recuperación, será a partir de la tolerancia obtenida con larvas de laboratorio. Cuando el estudio se enfoca a simular situaciones de vertido por pulsos en escenario real las características de tolerancia obtenidas en los ensayos con larvas de laboratorio pueden no coincidir con la tolerancia de las larvas silvestres (Nowak y col., 2007; Dallinger y Höckner, 2013). Es necesaria más investigación sobre las diferencias entre poblaciones, área en la que la aplicación de la teoría GUTS puede ser también de gran utilidad.

7. Simulación de escenario real

Se realizó la simulación de un vertido puntual y un vertido continuo de BPA con modelos sencillos de cauces fluviales, teniendo en cuenta tanto la forma en que se dispersa la sustancia en el agua a lo largo del tiempo y su degradación, como el modelo de supervivencia IT Weibull elegido para el BPA en este estudio.

La simulación del vertido puntual de BPA se realizó en un tramo de 500 m de un canal de 1 m de profundidad, analizando la concentración externa en función del tiempo y la distancia al punto de vertido, así como su repercusión en la supervivencia de las larvas de cuarto estadio que habitaran en el lecho del río. Pudo establecerse un patrón de mortalidad en el tiempo para cada punto y compararlo con la mortalidad base. También se estableció la evolución en el tiempo de la concentración interna escalada en cada tramo del río.

La simulación de un vertido continuo de BPA se efectuó en un modelo sencillo de río, tomando un tramo de 5 m de largo por 5 m de ancho. En primer lugar se estudió la repercusión en la supervivencia de un vertido continuo de BPA del orden de las máximas concentraciones encontradas en escenario real, y se pudo comprobar que la supervivencia sólo se vería afectada en los puntos más cercanos al origen del vertido. A continuación se realizó una nueva simulación con un vertido diez veces mayor, que sí repercutió en la mortalidad de las larvas de *C. riparius*.

Como se ha descrito en la introducción, son numerosos los estudios que reflejan la toxicidad del BPA a concentraciones muy por debajo de las observadas en los sistemas acuáticos, por lo que se puede concluir que el análisis de la supervivencia (monitorización del número de larvas) no puede constituir la medida principal de control a la hora de evaluar el estado biológico de los sistemas acuáticos.

Sin embargo, la simulación puede ser un instrumento muy útil a la hora de estudiar el efecto de diferentes vertidos en los ecosistemas acuáticos, dado que muchos de ellos no pueden ser identificados en análisis físico-químicos por haber ocurrido con mucha antelación. Una simulación del efecto de las sustancias en los diferentes elementos del ecosistema acuático daría un mapa del estado del ecosistema y podría ayudar en la identificación del vertido. También realizando el proceso inverso: la simulación puede ayudar a evaluar riesgos y legislar en consecuencia, estudiando diferentes escenarios de contaminación.

Según el conocimiento de la autora de este trabajo, éste es el primer estudio de supervivencia que se realiza simulando la supervivencia de una especie en relación a un cauce fluvial de condiciones específicas. El modelado y simulación en ecotoxicología es un campo que en los últimos años está suscitando un interés creciente por parte de gobiernos y organismos reguladores. Se han dado algunos pasos en este sentido, como el software FOCUS TOXSWA desarrollado con la colaboración de la Comisión Europea (European Commission, 2001), que simula la concentración de pesticidas en canales sencillos de regadío. Ashauer y col. utilizaron este software para simular las concentraciones del fungicida benzovindiflupyr en primavera e invierno y, tomando como base los modelos de la teoría GUTS, estudiar su repercusión en la supervivencia de dos peces, *Cyprinus carpio* y *Pimephales promelas*. Sin embargo el software TOXSWA limita sus simulaciones a ciertos pesticidas y tipos de canales fluviales concretos (canales de regadío y arroyos estrechos y de escasa profundidad).

Realizar simulaciones fiables de escenarios reales entraña gran dificultad, debido a la gran cantidad de factores involucrados. Los ejemplos de simulación mostrados aquí no tienen intención de aportar resultados concluyentes, sino que indican un camino futuro muy incipiente en el que es necesaria investigación y colaboración de distintas disciplinas. En concreto es necesario tener en cuenta los siguientes puntos:

- La densidad de larvas en el cauce del río varía entre puntos, incluso de un día para otro. Puede trabajarse con una densidad media aproximada, o bien intentar estudiar el porqué de esa variabilidad e incluirla después en la simulación.
- Los sistemas fluviales reales son mucho más complicados que los presentados en este trabajo. El cauce es irregular, y el caudal varía con la lluvia, los afluentes e incluso las mareas. En ingeniería civil es habitual utilizar programas informáticos especializados para simular las condiciones exactas de ríos concretos en distintas situaciones (época del año, condiciones meteorológicas, etc.), sería interesante un estudio conjunto entre especialistas en ecotoxicología y en hidrología.

- Las larvas de *C. riparius* habitan en los sedimentos del río. No es suficiente estudiar la concentración de la sustancia en el agua, sino que debe tenerse en cuenta la concentración en sedimentos y su evolución temporal. En consecuencia, deberían realizarse más ensayos de laboratorio con sedimentos, especialmente en el caso de los metales, que pueden acumularse y persistir durante mucho tiempo en el lecho de los ríos.
- En los ensayos de laboratorio se han utilizado larvas de cuarto estadio, pero en campo coexisten todas las fases del ciclo vital de *C. riparius*, y la supervivencia de cada fase afecta a las demás.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha realizado un estudio de la supervivencia de larvas de cuarto estadio de *C. riparius* frente a BPA, TCS, Cd y Cu mediante modelos de la teoría GUTS, obteniendo las siguientes conclusiones:

- La teoría GUTS establece un marco adecuado para el estudio de la supervivencia de *C. riparius*, pudiendo adaptarse a diferentes supuestos de SD o IT. En todos los casos estudiados se consiguió un mejor ajuste bajo el supuesto de IT, lo que explica el descenso brusco de la supervivencia a determinadas exposiciones. Estos resultados tienen unas implicaciones que deberán ser contrastadas por estudios posteriores.
 - En el estudio de la supervivencia mediante la teoría GUTS se relaciona de manera conjunta tiempo, concentración y supervivencia. Las tradicionales curvas de supervivencia a tiempo o concentración fijas pasan a ser superficies de supervivencia. Como consecuencia el cálculo de concentraciones letales, LCx, es más flexible que con el método tradicional probit, que para cada tiempo prefijado precisa de datos en los que la supervivencia decrezca con la concentración.
- La toxicidad del Cd y Cu en larvas de *C. riparius* expuestas a estos compuestos es mayor que la toxicidad de la mezcla de ambos en larvas de *C. riparius*. Resaltar la complejidad de estas interacciones y las posibilidades que abren de combinar la teoría GUTS con otras técnicas orientadas al estudio toxicodinámico o de biomarcadores.
- La utilización de la teoría GUTS en el análisis de supervivencia de *C. riparius* permite la simulación de nuevas exposiciones en condiciones de laboratorio, así como la extrapolación a escenarios reales de riesgo ambiental, en este caso siempre teniendo en cuenta la complejidad de dichos escenarios.

- Además del conocimiento adquirido sobre *C. riparius* en la exposición a las sustancias químicas, se ha aprendido que la distribución de concentraciones es muy importante para los ajustes (a pesar de que en este aspecto los modelos GUTS parecen ser más robustos que los métodos de probit).

ESTUDIOS FUTUROS

ESTUDIOS FUTUROS

En este trabajo se ha estudiado la supervivencia de *C. riparius* frente a BPA, TCS, Cu y Cd por medio de la teoría GUTS. Se han elegido los modelos que mejor se adaptaban a los datos de los ensayos de laboratorio y a partir de ellos se ha podido relacionar la supervivencia con parámetros como la tolerancia individual o la concentración e interna escalada, comparando los efectos de las cuatro sustancias. Como aspecto novedoso se ha señalado la posibilidad de simular ensayos en condiciones de laboratorio, así como de vertidos reales.

Cada una de las etapas en las que se ha trabajado (ensayos de laboratorio, ajustes matemáticos y simulación) ha abierto nuevas cuestiones y posibles líneas de investigación. En especial se han apreciado las siguientes necesidades:

- Estudios de supervivencia con larvas obtenidas en campo, comparando los resultados con los datos obtenidos con larvas de laboratorio, tanto en régimen de exposición continua como en exposición por pulsos, y analizando el tiempo de recuperación. Posteriormente podrían compararse poblaciones de larvas silvestres que hayan crecido en ambientes diferentes (arroyos limpios frente a aguas contaminadas, o en ausencia o presencia de una sustancia en particular).
- Mayor investigación en la supervivencia en el ciclo vital completo de *C. riparius*.
- Planteamiento de nuevos modelos dentro de la teoría GUTS, más complejos, que consideren la variación de todos los parámetros (no sólo la tolerancia) dentro de la población, o respecto del tiempo (por ejemplo, la constante de eliminación puede no ser la misma al principio de la exposición y al final).
- Incorporación a los modelos de la teoría GUTS de variables relacionadas con la toxicidad a nivel microscópico, como la actividad enzimática, el daño celular, la genotoxicidad, etc., realizando estudios conjuntos de biomarcadores y supervivencia.

- Análisis del efecto de las mezclas de sustancias, así como de la interacción de otros agentes físicos (temperatura, pH, etc.). Son numerosos los estudios al respecto, pero las combinaciones posibles son casi infinitas. La teoría GUTS y las simulaciones podrían ayudar a esclarecer el efecto de estas mezclas, tras analizar algunas combinaciones seleccionadas.
- Estudio de la repercusión de la supervivencia de cada especie en todo el ecosistema. Puesto que los ecosistemas constan de complejas relaciones entre especies, y normalmente una misma sustancia perjudica de forma diferente a cada una, es importante investigar de forma conjunta tanto el efecto en los diferentes organismos como la repercusión que tiene en el resto de las especies el aumento o disminución de la población de una de ellas. Este tipo de investigaciones debería manejar gran cantidad de datos y condiciones diferentes, los modelos matemáticos y la simulación son especialmente útiles en estos casos.
- Incorporación de programas informáticos de hidrología para el estudio de los efectos de las sustancias contaminantes en escenarios reales escogidos. Estos programas proporcionarían la distribución detallada de concentraciones que permitiría el estudio y posterior simulación de la supervivencia bajo distintos supuestos.
- El análisis de supervivencia se aplica en muchos campos de la ciencia, tecnología o economía, y la teoría GUTS puede adaptarse a cualquiera de ellos. En el área médica el estudio de la supervivencia es especialmente relevante: la introducción del concepto de tolerancia individual y su distribución en la población constituiría un enfoque novedoso con cabida en infinidad de estudios (tolerancia a medicamentos, resistencia a microorganismos, etc.).

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Agra AR, Soares, AMVM (2009). Effects of Two Insecticides on Survival, Growth and Emergence of *Chironomus riparius* Meigen. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 82:501-504.

Akaike H (1974). A new look at the statistical model identification. IEEE Transactions on Automatic Control. 19(6):716-723.

Alba-Tercedor J (1996). Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los ríos. Memorias del IV Simposio el agua en Andalucía. Siaga, Almeria, 2: 202-213.

Al-Shami S, Rawi CSM, Nor SAM, Ahmad AH y Ali A (2010). Morphological deformities in *chironomus* spp. (diptera: Chironomidae) larvae as a tool for impact assessment of anthropogenic and environmental stresses on three rivers in the Juru river system, Penang, Malaysia. Environmental Entomology. 39(1), 210.

Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquatic Toxicology. 10; 76(2):160-202.

Andes D y Craig WA (2002). Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. International Journal of Antimicrobial Agents. 19(4):261-268.

Aranami K, Readman JW (2007). Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater. Chemosphere. 66,1052-1056.

Ashauer R y Brown, CD (2008). Toxicodynamic assumptions in ecotoxicological hazard models. Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC, 27(8), 1817.

Ashauer R, y Escher BI (2010). Advantages of toxicokinetic and toxicodynamic modelling in aquatic ecotoxicology and risk assessment. Journal of Environmental Monitoring JEM. 12(11), 2056.

Ashauer R, Thorbek P, Warinton JS, Wheeler JR, Maund S (2013). A method to predict and understand fish survival under dynamic chemical stress using standard ecotoxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC. 32(4), 954.

Ashauer R, O'Connor I, Hintermeister A, Escher BI (2015). Death Dilemma and Organism Recovery in Ecotoxicology. Environmental Science and Technology. 49(16), 10136.

ASTM (2006). Standard test methods for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Book of Standards Vol. 11.06. American Society for Testing Materials. Philadelphia.

Bhattacharyay G, Sadhu AK, Mazumdar A, Chaudhuri PK (2005). Antennal Deformities of Chironomid Larvae and Their Use in Biomonitoring of Heavy Metal Pollutants in the River Damodar of West Bengal, India. Environmental Monitoring and Assessment. 108:67-84.

Beatty Jr TV, Hendricks AC. Effects of Culture Methods on Survival, Weight, and Development of *Chironomus riparius* Meigen (2004). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 73:1009-1016.

Bedaux JJM y Kooijman SALM (1994). Statistical analysis of bioassays, based on hazard modelling. *Environmental and Ecological Statistics*. 1 (4), 303-314.

Benfenati E (2007). *Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) for Pesticide Regulatory Purposes*. NL: Elsevier Science.

Berg MB, Hellenthal RA (1992). The role of Chironomidae in energy flow of a lotic ecosystem. *Aquatic Ecology*. 26(2-4): 471-476.

Bernabò P, Gaglio M, Bellamoli F, Viero G, Lencioni V. DNA damage and translational response during detoxification from copper exposure in a wild population of *Chironomus riparius*. *Chemosphere*. 173: 235-244.

Bervoets L, Wils C y Verheyen R (1996). Tolerance of *Chironomus riparius* larvae (Diptera: Chironomidae) to salinity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 57(5): 829-835.

Bolker BM (2008). *Ecological Models and Data in R*. Princeton University Press.

Bonada N, Prat, N, Resh, V. H., & Statzner, B. (2006). Developments in aquatic insect biomonitoring: A comparative analysis of recent approaches. *Annual Review of Entomology*. 51(1): 495-523.

Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K (2000). Estrogen receptor gene expression and its relation to the estrogen-inducible HSP27 heat shock protein in hormone refractory prostate cancer. *Prostate*. 45(1): 36-41.

Burnham KP y Anderson DR (2002). *Model selection and multimodel inference: A practical information-theoretic approach* (2nd ed.). New York: Springer.

Burnham KP, Anderson DR, Huyvaert KP (2011). AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: some background, observations, and comparisons. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 65:23-35.

Careghini A, Mastorgio AF, Saponaro S, Sezenna E (2015). Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. *Environmental science and pollution research international*. 22: 5711-5741.

Chen J, Ahn KC, Gee NA, Gee SJ, Hammock BD, Lasley BL (2007). Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 221(3): 278-284.

Cherkasov A, Muratov EN, Fourches D, Varnek A, Baskin II, Cronin M, ... Tropsha A. (2014). QSAR Modeling: Where have you been? Where are you going to? *Journal of Medicinal Chemistry*. 57(12): 4977–5010.

Corrales J, Kristofco LA, Steele WB, Yates BS, Breed CS, Williams ES y Brooks BW (2015). Global Assessment of Bisphenol A in the Environment. Dose-Response. 13 (3):1-29.

Datkhile KD, Mukhopadhyaya R, Dongre TK, Nath BB (2009). Increased level of superoxide dismutase (SOD) activity in larvae of *Chironomus ramosus* (Diptera: Chironomidae) subjected to ionizing radiation. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology, Pharmacology and Endocrinology. 149(4): 500-506.

Dallinger R, Höckner M (2013). Evolutionary concepts in ecotoxicology: tracing the genetic background of differential cadmium sensitivities in invertebrate lineages. Ecotoxicology. 22:7 67-778.

Dann AB, Hontela A. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action (2011). Journal of applied toxicology. 31: 285-311.

De Bisthoven LJ, Postma J, Vermeulen A, Goemans G, Ollevier F (2001). Morphological deformities in *Chironomus riparius* Meigen larvae after exposure to cadmium over several generations. Water, Air and Soil Pollution. 129 (1-4): 167-179.

Devillers J (2009). Ecotoxicology Modeling. Vol 2. 1. Aufl. Ed. Boston, MA: Springer-Verlag.

Dhillon GS, Kaur S, Pulicharla R, Brar, SK, Cledón, M, Verma M, Surampalli RY (2015). Triclosan: current status, occurrence, environmental risks and bioaccumulation potential. International journal of environmental research and public health. 12: 5657-5684.

Dixon, KR (2012). Modeling and simulation in ecotoxicology with applications in MATLAB and simulink (1st ed.). London: CRC Press. Taylor and Francis Group.

Domingues I, Guilhermino L, Soares AM, Nogueira AJ, Monaghan KA (2009). Influence of exposure scenario on pesticide toxicity in the midge *Kiefferulus calligaster* (Kieffer). Ecotoxicology and Environmental Safety. 72(2): 450-457.

Dussault EB, Balakrishnan VK, Sverko E, Solomon KR, Sibley PK (2008). Toxicity of human pharmaceuticals and personal care products to benthic invertebrates. Environmental toxicology and chemistry. SETAC. (27): 425.

Echarri L (2016). Ciencias de la Tierra y el Medio Ambiente. Tecnum, Universidad de Navarra. Libro electrónico. <http://www4.tecnun.es/asignaturas/Ecologia/Hipertexto/>

European Environment Agency (EEA) (2001). Hazardous substances in rivers. Indicator Fact Sheet, WHS2. EEA (European Environment Agency) (2011). Hazardous substances in Europe's fresh and marine waters. An overview. Technical report, No 8.

Efron B y Hinkley DV (1978). Assessing the accuracy of the maximum likelihood estimator: Observed versus expected fisher information. Biometrika. 65(3): 457-482.

Eisler R (2000). Handbook of Chemical Risk Assessment: Health Hazards to Humans, Plants, and Animals. Volume 1: Metals; Volume 2: Organics; Volume 3: Metalloids, Radiation, Cumulative Publishers: Boca Raton, FL. 2000. ISBN 1-56670-506-1.

Escolástico León C, Cornago Ramírez MP, Cabildo Miranda MP (2013). *Bases químicas del medio ambiente*. UNED - Universidad Nacional de Educación a Distancia.

European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium. Forum for Co-ordination of Pesticide Fate Models and Their Use (FOCUS) (2001). FOCUS surface water scenarios in the EU evaluation process under 91/414/EEC. Report prepared by the FOCUS Working Group on Surface Water Scenarios. <http://esdac.jrc.ec.europa.eu/projects/toxswa>.

European Commission, European Chemicals Bureau, Institute for Health and Consumer Protection, (2003). Technical Guide Document on Risk Assessment (TGD), Part I.

European Commission - DG Environment (2003). Pollution reduction programmes in Europe. Updated report on the assessment of programmes under article 7 of directive 76/464/EEC

European Commission - DG Environment (2003). Pollution reduction programmes in Europe. Updated report on the assessment of programmes under article 7 of directive 76/464/EEC.

European Commission. SCHER, SCENIHR, SCCS (2013). Addressing the New Challenges for Risk Assessment.

European Council and European Parliament (2008). EU Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. Off. J. European Union 2008. 348, 84-97.

European Union (2008) .Risk Assessment Report: 4,4'-isopropylidenediphenol (Bisphenol-A). Part 1: Environment. CAS: 80-05-7 EINECS No: 201-245-8.

Fenoglio S, Badino G y Bona F. (2002). Benthic macroinvertebrate communities as indicators of river environment quality: An experience in Nicaragua. *Revista De Biología Tropical*. 50(3-4): 1125.

.European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium. Forum for Co-ordination of Pesticide Fate Models and Their Use (FOCUS) (2001). FOCUS surface water scenarios in the EU evaluation process under 91/414/EEC. Report prepared by the FOCUS Working Group on Surface Water Scenarios.

Fisher TC, Crane M, Callaghan A (2000). An optimized microtiterplate assay to detect acetylcholinesterase activity in individual *Chironomus riparius* Meigen. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19(7): 1749-1752.

Gamboa M, Reyer R, Arrivillaga J (2008). Macroinvertebrados bentónicos como indicadores de salud ambiental. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 48 (2): 109-120.

Gee RH, Charles A, Taylor N, Darbre PD (2008). Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. *Journal of applied toxicology*. 28:78.

Greene, W. H. (2003). *Econometric analysis (International; 5th, ed.)*. Prentice-Hall.

Gillis PL, Wood CM (2008). Investigating a potential mechanism of Cd resistance in *Chironomus riparius* larvae using kinetic analysis of calcium and cadmium uptake. *Aquatic Toxicology*. 89(3):180-7.

Gillis PL, Wood CM (2008). The effect of extreme waterborne cadmium exposure on the internal concentrations of cadmium, calcium, and sodium in *Chironomus riparius* larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71:56-64.

Helbing CC, van Aggelen G, Veldhoen N (2010). Triclosan affects thyroid hormone-dependent metamorphosis in anurans. *Toxicological Sciences*. 119(2): 417-418.

Hellawell JM (1986). *Biological indicators of freshwater pollution and environmental management*. Elsevier, New York. 546 p.

Hernández S (2006). El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina*, 2 (3): 252-256.

Jager T, Albert C, Preuss TG, Ashauer R (2011). General Unified Threshold Model of Survival - a Toxicokinetic-Toxicodynamic Framework for Ecotoxicology. *Environmental Science and Technology*. 45(7): 2529-2540.

Jager T y Hansen BH (2013). Linking survival and biomarker responses over time. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*. 32(8): 1842.

Janssens de Bisthoven L, Vermeulen A, Ollevier F (1998). Experimental Induction of Morphological Deformities in *Chironomus riparius* Larvae by Chronic Exposure to Copper and Lead. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 35: 249-256.

Janssens de Bisthoven L, Postma J, Vermeulen A, Goemans G, Ollevier F (2001) Morphological Deformities in *Chironomus Riparius* Meigen Larvae after Exposure to Cadmium over Several Generations. *Water, Air, and Soil Pollution*, 129(1), 167-79.

Johnson JB, Omland KS (2004). Model selection in ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*. 19:101-108.

Kang J, Aasi D, Katayama Y (2007). Bisphenol A in the Aquatic Environment and Its Endocrine-Disruptive Effects on Aquatic Organisms. *CRC Critical Reviews in Toxicology*. 37: 607-625.

Khatikarn J, Satapornvanit K, Price OR, Van den Brink, Paul J (2016). Effects of triclosan on aquatic invertebrates in tropics and the influence of pH on its toxicity on microalgae. *Environmental Science and Pollution Research*. 1-10.

Kiaune L y Singhasemanon N (2011). Pesticidal copper (I) oxide: environmental fate and aquatic toxicity. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 213: 1-26.

Kleinbaum DG y Klein M (2005). *Survival Analysis. A Self-Learning Text*. Nueva York (USA). Ed. Springer.

Kooijman SALM (2010). *Dynamic energy budget theory for metabolic organisation*. Cambridge University Press.

Kooijman SALM (2011). Basic methods in Theoretical Biology. Vrije Universiteit, Amsterdam. Libro electrónico. <http://www.bio.vu.nl/thb/deb/course/>

Krishnan K y Peyret T (2009). Physiologically Based Toxicokinetic (PBTK) modeling in ecotoxicology. Ecotoxicology modeling (145-175). Springer US.

Kulkarni D, Daniels B y Preuss TG (2013). Life-stage-dependent sensitivity of the cyclopoid copepod *mesocyclops leuckarti* to triphenyltin. Chemosphere. 92(9): 1145-1153.

Lee J, Landrum PF, Koh C (2002). Prediction of time-dependent PAH toxicity in *Hyalella azteca* using a damage assessment model Environmental science and technology. 36(14): 3131-3138.

Lee SB, Choi J (2006). Multilevel evaluation of nonylphenol toxicity in fourth-instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). Environmental Toxicology and Chemistry. 25(11): 3006-3014.

Lee SM, Lee SB, Park CH, Choi J (2006). Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. Chemosphere. 65(6): 1074-1081.

Lee S, Choi J (2007). Effects of bisphenol A and ethynyl estradiol exposure on enzyme activities, growth and development in the fourth instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). Ecotoxicology and Environmental Safety. 68:84-90.

Lencioni V, Grazioli V, Rossaro B, Bernabò P (2016). Transcriptional profiling induced by pesticides employed in organic agriculture in a wild population of *Chironomus riparius* under laboratory conditions. Science of the Total Environment. 557:183-191.

Leonard EM, Pierce LM, Gillis PL, Wood CM, O'Donnell MJ (2009). Cadmium transport by the gut and Malpighian tubules of *Chironomus riparius*. Aquatic Toxicology. 92(3):179-86.

Liu X (2012). Survival analysis: Models and applications (1. Aufl.;1; ed.). Chichester, West Sussex, United Kingdom: Wiley.

Markert BA, Breure AM y Zechmeister HG (2004). Bioindicators and biomonitors: Principles, concepts and applications (1st, 2nd impression ed.). Amsterdam. Elsevier.

Martinez EA, Moore BC, Schaumloffel J y Dasgupta N (2003). Morphological abnormalities in *chironomus tentans* exposed to cadmium and copper-spiked sediments. Ecotoxicology and Environmental Safety. 55(2): 204-212.

Martinez EA, Moore BC, Schaumloffel J, Dasgupta N (2004). Teratogenic versus mutagenic abnormalities in chironomid larvae exposed to zinc and lead. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 47(2): 193-198.

Martínez-Paz P, Morales M, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2012). Characterization of a cytochrome P450 gene (CYP4G) and modulation under different exposures to xenobiotics (tributyltin, nonylphenol,

bisphenol A) in *Chironomus riparius* aquatic larvae. Comparative biochemistry and physiology. Toxicology and Pharmacology . 155: 333-343.

Martínez-Paz P, Morales M, Martín R, Martínez-Guitarte JL y Morcillo G (2014). Characterization of the small heat shock protein Hsp27 gene in *Chironomus riparius* (diptera) and its expression profile in response to temperature changes and xenobiotic exposures. Cell Stress and Chaperones. 19(4): 529-540.

Martínez-Paz P, Morales M, Urien J, Morcillo G y Martínez-Guitarte JL (2017). Endocrine-related genes are altered by antibacterial agent triclosan in *Chironomus riparius* aquatic larvae. Ecotoxicology and Environmental Safety. 140: 185-190.

Martín-Folgar R, Martínez-Guitarte J (2017). Cadmium alters the expression of small heat shock protein genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. Chemosphere. 169:485-492

MathWorks (2017). Optimization Toolbox. User's guide. The Math Works Inc. Libro electrónico: https://www.mathworks.com/help/pdf_doc/optim/optim_tb.pdf

Meeker WQ, Escobar LA (1995). Teaching about Approximate Confidence Regions Based on Maximum Likelihood Estimation. The American Statistician. 49:48-53.

Menéndez AN (2010). Transporte de contaminantes en el medio acuático. Universidad Tecnológica Nacional (Buenos Aires). Libro electrónico: <http://www.redmodelacion.com.ar>

Meregalli G, Ollevier F (2001). Exposure of *Chironomus riparius* larvae to 17- α -ethynylestradiol: effects on survival and mouthpart deformities. Science of the Total Environment. 269(1-3): 157-161.

Michailova P, Petrova N, Ilkova J, Bovero S, Brunetti S, White K y Sella G (2006). Genotoxic effect of copper on salivary gland polytene chromosomes of *Chironomus riparius* Meigen 1804 (Diptera, Chironomidae). Environmental Pollution. 144: 647-654.

Mihaich EM, Friederich U, Caspers N, Hall AT, Klecka GM, Dimond SS y Hentges SG (2009). Acute and chronic toxicity testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants. Ecotoxicology and Environmental Safety. 72(5):1392-1399.

Mogren CL, von Kiparski GR, Parker DR, Trumble JT. Survival, reproduction, and arsenic body burdens in *Chironomus riparius* exposed to arsenate and phosphate. The Science of the total environment. 425:60-65.

Moller Pillot HKM (2009). Chironimidae larvae II: Biology and Ecology of the Chironomini (2nd. revised edition). Amsterdam. KNNV.

Morales M, Planelló R, Martínez-Paz P, Herrero O, Cortés E, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2011). Characterization of *Hsp70* gene in *Chironomus riparius*: expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology, Pharmacology and Endocrinology. 153(1): 150-158.

Morales M, Martínez-Paz P, Ozáez I, Martínez-Guitarte JL y Morcillo G (2013). DNA damage and transcriptional changes induced by tributyltin (TBT) after short in vivo exposures of *Chironomus riparius*

(diptera) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and Pharmacology : CBP. 158(2): 57-63.

Morales M, Martínez-Paz P, Martín R, Planelló R, Urien J, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. (2014). Transcriptional changes induced by in vivo exposure to pentachlorophenol (PCP) in *Chironomus riparius* (diptera) aquatic larvae. Aquatic Toxicology. 157: 1-9.

Nam SH, Seo YM, Kim MG (2010). Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. Chemosphere. 79(9): 949-952.

Nair PMG, Park SY, Choi J (2011). Expression of catalase and glutathione S-transferase genes in *Chironomus riparius* on exposure to cadmium and nonylphenol. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 154(4): 399-408.

Nepf H (2008). Transport Processes in the Environment. MIT Open Course Ware. Course number 1.061 / 1.61. Massachusetts Institute of Technology. <https://ocw.mit.edu/courses/civil-and-environmental-engineering/>

Newman MC y McCloskey JT (2000). The individual tolerance concept is not the sole explanation for the probit dose-effect model. Environmental toxicology and chemistry. 19(2):520-6.

Newman MC (2012). Quantitative Ecotoxicology, 2nd edition. CRC Press, Taylor and Francis Group.

Nowak C, Jost D, Vogt C, Oetken M, Schwenk K, Oehlmann J (2007). Consequences of inbreeding and reduced genetic variation on tolerance to cadmium stress in the midge *Chironomus riparius*. Aquatic Toxicology. 85:278-284.

Nordberg G (2007). Medicinska fakulteten, Miljömedicin, Umeå universitet, & Institutionen för folkhälsa och klinisk medicin. Handbook on the toxicology of metals (3rd ed.). Amsterdam; Boston; Academic Press.

Nyman AM, Schirmer K y Ashauer R (2012). Toxicokinetic-toxicodynamic modelling of survival of *Gammarus pulex* in multiple pulse exposures to propiconazole: model assumptions, calibration data requirements and predictive power. Ecotoxicology. 21(7): 1828-1840.

OCDE (2004). Guideline for testing of chemicals, sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment. Test No. 218. Organization for Economic Cooperation and Development. París.

OCDE (2006b). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment No. 54. Organization for Economic Co-operation and Development. París.

OCDE (2007). Report on the regulatory uses and applications in OECD member countries of (quantitative) structure-activity relationship [(Q)SARs] models in the assessment of new and existing chemicals. Series on Testing and Assessment No. 58. Organization for Economic Co-operation and Development. París.

OCDE (2011). Guideline for the testing of chemicals, section 2. *Chironomus sp.*, acute immobilisation test. Test No. 235. Organization for Economic Co-operation and Development. París.

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B (2000). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xenoestrogens. *Ecotoxicology*. 9(6): 383-397.

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Bachmann J, Oetken M, Lutz I, Kloas W, Ternes TA (2006). Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. *Environmental Health Perspectives*. 114(Supl. 1): 127-133.

Oliveira R, Domingues I, Grisolia CK, Soares A. (2009). Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16(6):679–688.

Oskarsson A, Widell A, Olsson IM, Grawe KP (2004). Cadmium in food chain and health effects in sensitive population groups. *Biometals*. 17: 531–534.

Ozáez I, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2013). Effects of *in vivo* exposure to UV filters (4-MBC, OMC, BP-3, 4-HB, OC, OD-PABA) on endocrine signaling genes in the insect *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment*. 456: 120-126.

Palawski DU, Hunn JB, Chester DN y Wiedmeyer RH (1989). Interactive effects of acidity and aluminum exposure on the life cycle of the midge *Chironomus riparius* (diptera). *Journal of Freshwater Ecology*. 5(2): 155-162.

Palmer, M. D. (2001). *Water quality modeling: a guide to effective practice*. World Bank Publications.

Pan J, Plant JA, Voulvoulis N, Oates CJ, Ihlenfeld C (2010). Cadmium levels in Europe: implications for human health. *Environmental Geochemistry and Health*. 32(1): 1-12.

Park S, Choi J (2009). Genotoxic effects of nonylphenol and bisphenol A exposure in aquatic biomonitoring species: freshwater crustacean, *Daphnia magna*, and aquatic midge, *Chironomus riparius*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 83: 463-468.

Park K, Kwak IS (2008). Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: effects of di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. *Chemosphere*. 74(1): 89-95.

Pérez López C (2002). *Matlab y sus aplicaciones en la ciencia y la ingeniería*. Prentice Hall. Pearson Educación SA, Madrid.

Pérez J, Monteiro MS, Quintaneiro C, Soares AM, Loureiro S (2013). Characterization of cholinesterases in *Chironomus riparius* and the effects of three herbicides on chlorpyrifos toxicity. *Aquatic Toxicology*. 144: 296-302.

Péry ARR, Ducrot V, Mons R, Miège C, Gahou J, Gorini D y Garric J (2003). Survival tests with *Chironomus riparius* exposed to spiked sediments can profit from DEBtox model. *Water Research*. 37: 2691-2699.

Phillips DJH y Rainbow PS (1994). *Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants*, 2nd edition. Chapman and Hall, London.

Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2007). Ribosomal genes as early targets of cadmium-induced toxicity in *Chironomus riparius* larvae. *Science of the Total Environment*. 373:113-121.

Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2008) The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. *Chemosphere*. 71: 1870-1876.

Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2010). Effect of acute exposure to cadmium on the expression of heat-shock and hormone-nuclear receptor genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment*. 408 (7):1598-1603.

Planelló R, Servia MJ, Gómez-Sande P, Herrero Ó, Cobo Fy Morcillo G (2015). Transcriptional responses, metabolic activity and mouthpart deformities in natural populations of *Chironomus riparius* larvae exposed to environmental pollutants. *Environmental Toxicology*. 30(4): 383-395.

Ramírez A (2002). Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Anales de la Facultad de Medicina. 63(1): 51-64.

Reglamento (CE) n.o 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 18 de diciembre de 2006 relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) n.o 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) n.o 1488/94 de la Comisión, así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión.

Rainbow PS (2002). *Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what?* Environmental Pollution. Elsevier Ltd.

Rodríguez G (2007). *Lecture Notes on Generalized Linear Models*. Review of likelihood theory. Princeton University. URL: <http://data.princeton.edu/wws509/notes/>.

Rodricks JV, Swenberg JA, Borzelleca JF, Maronpot RR, Shipp AM. (2010). Triclosan: a critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products. *Critical Reviews in Toxicology*. 40(5): 422–484.

Roman YE, De Schamphelaere KAC, Nguyen LTH, Janssen CR (2007). Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: Sensitivity comparison and preliminary risk assessment. *Science of the Total Environment*. 387: 128-140.

Ruiz P, Mumtaz M, Osterloh J, Fisher J y Fowler BA (2010). Interpreting NHANES biomonitoring data, cadmium. *Toxicology letters*, 198(1): 44-48.

Rutherford, JC (1994). *River mixing*. John Wiley and Son Ltd.

Rykowska I, Wasiak W (2006) Properties, threats, and methods of analysis of bisphenol A and its derivatives. *Acta Chromatographica*. 16: 7–27

Sandborgh-Englund G, Adolfsson-Erici M, Odham G, Ekstrand J (2006). Pharmacokinetics of triclosan following oral ingestion in humans. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*. 69:1861-1873.

Servia MJ, Péry ARR, Heydorff M, Garric J, Lagadic L (2006). Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology*. 15: 229-240.

Sildanchandra W, Crane M (2000). Influence of sexual dimorphism in *Chironomus riparius* meigen on toxic effects of cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19(9): 2309-2313.

Socolofsky SA y Jirka GH (2005). Special topics in mixing and transport processes in the environment. Engineering lectures, 5th ed, Coastal and Ocean Engineering Division. Ed. Texas A&M University.

Sparling DW (2016). *Ecotoxicology Essentials*. Chapter 8: Metals. Elsevier Science.

Symonds M y Moussalli A (2011). A brief guide to model selection, multimodel inference and model averaging in behavioural ecology using Akaike's information criterion. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 65(1):13-21.

Soteropoulos DL, Lance SL, Flynn RW, Scott DE (2014). Effects of copper exposure on hatching success and early larval survival in marbled salamanders, *Ambystoma opacum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 33:1631–1637.

Sparling DW (1990). Acid precipitation and food quality: inhibition of growth and survival in black ducks and mallards by dietary aluminum, calcium, and phosphorus. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 19(3):457-463.

Sparling DW (2016). *Ecotoxicology Essentials: Environmental Contaminants and their Biological Effects on Animals and Plants*. US: Academic Press.

Taenzler V, Bruns E, Dorgerloh M, Pfeifle V y Weltje L (2007). Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine disrupting properties of pesticides. *Ecotoxicology*. 16(1): 221-230.

Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AKK, y Sutton DJ (2012). Heavy Metals Toxicity and the Environment. *Experientia Supplementum (EXS)*. 101:133–164.

Timmermans KR, Peeters W, y Tonkes M. (1992). Cadmium, zinc, lead and copper in *Chironomus riparius* (Meigen) larvae (Diptera, Chironomidae): uptake and effects. *Hydrobiologia*. 241(2): 119-134.

Toms LL, Allmyr M, Mueller JF, Adolfsson-Erici M, McLachlan M, Murby J, Harden FA (2011). Triclosan in individual human milk samples from Australia. *Chemosphere*. 85:1682-1686.

Toušová Z, Kuta J, Hynek D, Votjeh A, Kizek R, Ludek B, Hilscherová K (2016). Metallothionein modulation in relation to cadmium bioaccumulation and age-dependent sensitivity of *Chironomus riparius* larvae. *Environmental Science and Pollution Research*. 23 (1):10504-10513.

UK Technical Advisory Group on the Water Framework Directive (2013). Updated Recommendations on Environmental Standards River Basin Management (2015-21).

US Department of the Interior, US Geological Survey, Biological Resources Division (1997). Copper Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. Technical Report Series ISSN 1081-2911.

US EPA, U.S. Environmental Protection Agency,(1980). Ambient Water Quality Criteria for Cadmium. U.S. Environmental Protection Agency Rep. 440/5-80-025, Washington, DC.

USEPA (1996). Ecological effects test guidelines, OPPTS 850.1790. Chironomid sediment toxicity test. EPA 712-C-96-313. United States Environmental Protection Agency. Washington DC.

USEPA (2000). Methods of measuring the toxicity and bioaccumulation of sediments associated contaminants with freshwater invertebrates, second edition. EPA 600/R-99/064. United States Environmental Protection Agency. Washington DC.

US EPA (2010). Bisphenol A Action Plan.. (CASRN 80-05-7). United States Environmental Protection Agency. Washington DC.

US EPA (2014). Priority pollutants list. Clean Water Act program. United States Environmental Protection Agency. Washington DC.

US EPA (2016). Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria Update for Cadmium – 2016. Office of Water EPA 822-F-16-003.

Vighi M, y Villa, S.(2013). Ecotoxicology: The challenges for the 21st century. *Toxics*. 1(1): 18-35.

Vogt C, Langer-Jaesrich M, Elsässer O, Schmitt C, Van Dongen S, Köhler HR, Oehlmann J, Nowak C (2013). Effects of inbreeding on mouthpart deformities of *Chironomus riparius* under sublethal pesticide exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 32(2): 423-425.

Walker IR (1987). Chironomidae (Diptera) in paleoecology. *Quaternary Science Reviews*. 6(1): 29-40.

Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM y Peakall DB (1997). *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis, Gran Bretaña.

Watts MM, Pascoe D, Carroll K (2003). Exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A—effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54: 207-215.

Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, 147 (Supl. 6): S56-S69.

Weltje L, Bruns E (2009). The chironomid full life-cycle test .Validation report. OCDE.

Wiseman SB, Anderson JC, Liber K, Giesy JP (2013). Endocrine disruption and oxidative stress in larvae of *Chironomus dilutus* following short-term exposure to fresh or aged oil sands process-affected water. *Aquatic Toxicology*. 142: 414-421.

Xu X, Lu Y, Zhang D, Zhang D, Wang Y, Zhou X, Xu H y Mei Y. (2015). Toxic Assessment of Triclosan and Triclocarban on *Artemia salina*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 95:728-733.