



Sensibilidad de *Hydra attenuata* e *Hydra viridis* a los plaguicidas diuron y etoprofos, Costa Rica

Sensitivity of Hydra attenuata and Hydra viridis to diuron and ethoprophos pesticides, Costa Rica

Sensibilidade de Hydra attenuata e Hydra viridis aos pesticidas diuron e etoprofós, Costa Rica

Caroline Jones^{1*}, María del Rocío Ugalde², Katherine Jiménez², Freylan Mena², Seiling Vargas³

Received: Sep/21/2022 • Accepted: Mar/10/2023 • Published: Sep/1/2023


Resumen

[Objetivo] El objetivo fue determinar cuál de las dos especies de hidras (*Hydra attenuata* o *Hydra viridis*) resultaba más sensible a dos plaguicidas, para luego usarla como parte de la batería de organismos de prueba del Laboratorio de Estudios Ecotoxicológicos (ECOTOX). **[Metodología]** Para esto se utilizaron diluciones de dos de los plaguicidas más comúnmente usados en el cultivo de piña en Costa Rica y detectados en muestras de agua: el herbicida diuron y el insecticida etoprofos. Se realizaron bioensayos de toxicidad con cada una de estas sustancias y con una mezcla de estas. Se registró el estado morfológico de las hidras. Además, se evaluaron la concentración de efecto medio (EC_{50}), la concentración letal media (LC_{50}), y las interacciones de toxicidad según tres posibilidades: antagónica, aditiva o sinérgica. **[Resultados]** La *H. attenuata* fue la especie más sensible a ambos plaguicidas, con LC_{50} s de 16,84 mg/L y 103,01 mg/L; y EC_{50} s de 4,24 mg/L y 23,74 mg/L para diuron y etoprofos, respectivamente. Mientras tanto la *H. viridis* tuvo LC_{50} s de 36,94 mg/L y 103,01 mg/L, con EC_{50} s de 13,64 mg/L y 53,12 mg/L, también para diuron y etoprofos, respectivamente. La exposición a la mezcla de plaguicidas solo causó mortalidad a la *H. viridis* y tuvo efecto sinérgico en ambas especies. **[Conclusiones]** Estos resultados sugieren que la *H. attenuata* es la especie más apropiada para la evaluación de efectos de plaguicidas, pero se deben realizar más estudios sobre las interacciones de los contaminantes en mezclas, porque estas pueden modificar su toxicidad para diferentes especies.

Palabras clave: Hidra; diuron; etoprofos; toxicidad; piña.

* Corresponding author

Caroline Jones, ✉ caroline.jones.penaranda@est.una.ac.cr,  <https://orcid.org/0000-0003-4612-3228>

María del Rocío Ugalde, ✉ maria.ugalde.salazar@una.cr,  <https://orcid.org/0000-0001-9069-0284>

Katherine Jiménez, ✉ kathyjq07@outlook.com,  <https://orcid.org/0000-0003-1286-6461>

Freylan Mena, ✉ freylan.mena.torres@una.cr,  <https://orcid.org/0000-0002-1215-0378>

Seiling Vargas, ✉ seiling.vargas.villalobos@una.cr,  <https://orcid.org/0000-0002-8003-6358>

1 Escuela de Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

2 Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas, Laboratorio de Ecotoxicología, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

3 Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas, Laboratorio de Análisis de Plaguicidas, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.



Abstract

[Objective] The objective was to determine which of the two hydra species (*Hydra attenuata* or *Hydra viridis*) was more sensitive to two pesticides, and then use the most sensitive species as part of the battery of test organisms of the Ecotoxicological Studies Laboratory (ECOTOX). **[Methodology]** For this purpose, dilutions of two of the most commonly used pesticides in pineapple cultivation in Costa Rica which were detected in water samples were used: the herbicide diuron and the insecticide ethoprophos. Toxicity bioassays were conducted with each of these substances and with a mixture of these substances. The morphological state of the hydras was recorded. In addition, the mean effective concentration (EC_{50}), mean lethal concentration (LC_{50}) and toxicity interactions were evaluated in terms of three possibilities: antagonistic, additive or synergistic. **[Results]** *H. attenuata* was the most sensitive species to both pesticides, with an LC_{50} s of 16.84 mg/L and 103.01 mg/L, and an EC_{50} s of 4.24 mg/L and 23.4 mg/L for diuron and ethoprophos, respectively. Furthermore, *H. viridis* had an LC_{50} s of 36.94 mg/L and 103.01 mg/L, with an EC_{50} s of 13.64 mg/L and 53.12 mg/L, also for diuron and ethoprophos, respectively. Exposure to the pesticide mixture only caused mortality in *H. viridis* and had a synergistic effect on both species. **[Conclusions]** These results suggest that *H. attenuata* is the most appropriate species for the evaluation of pesticide effects, but further studies should be conducted on the interactions of contaminants in mixtures, since these may modify their toxicity for different species.

Keywords: Hydra; diuron; ethoprophos; toxicity; pineapple.

Resumo

[Objetivo] O objetivo foi determinar qual das duas espécies de hydra (*Hydra attenuata* ou *Hydra viridis*) era mais sensível a dois pesticidas, para ser usada como parte da bateria de organismos de teste do Laboratório de Estudos Ecotoxicológicos (ECOTOX). **[Metodologia]** Foram usadas diluições de dois dos pesticidas mais comumente aplicados no cultivo de abacaxi na Costa Rica e detectados em amostras de água: o herbicida diuron e o inseticida etoprofós. Foram realizados bioensaios de toxicidade com cada uma dessas substâncias e com uma mistura delas. Foi registrado o status morfológico das hidras. Além disso, a concentração de efeito médio (CE_{50}), a concentração letal média (CL_{50}) e as interações de toxicidade foram avaliadas de acordo com três possibilidades: antagônica, aditiva ou sinérgica. **[Resultados]** A *H. attenuata* foi a espécie mais sensível a ambos os pesticidas, com CL_{50} s de 16,84 mg/L e 103,01 mg/L; e CE_{50} s de 4,24 mg/L e 23,74 mg/L para diuron e etoprofós, respectivamente. Enquanto isso, o *H. viridis* apresentou CL_{50} s de 36,94 mg/L e 103,01 mg/L, com CL_{50} s de 13,64 mg/L e 53,12 mg/L, também para diuron e etoprofós, respectivamente. A exposição à mistura de pesticidas causou mortalidade apenas em *H. viridis* e teve um efeito sinérgico em ambas as espécies. **[Conclusões]** Esses resultados sugerem que a *H. attenuata* é a espécie mais adequada para a avaliação dos efeitos dos pesticidas, mas estudos adicionais sobre as interações de contaminantes em misturas devem ser realizados, pois as misturas podem modificar sua toxicidade para diferentes espécies.

Palavras-chave: Hydra; diuron; etoprofós; toxicidade; abacaxi.



Introducción

En la década de los ochenta, Costa Rica inició la exportación de piña. Debido a la gran demanda de este producto, la producción avanzó rápidamente (Obando, 2017). Según un estudio realizado por el Laboratorio PRIAS del Centro Nacional de Alta Tecnología en el año 2018, un total de 65 670 hectáreas de tierras costarricenses están destinadas al cultivo de piña, lo cual equivale a una cobertura del 1,29 % del territorio nacional (Vargas *et al.*, 2020).

Diferentes estudios realizados en sitios asociados con la producción de piña en Costa Rica han evidenciado la contaminación de cuerpos de agua superficial con residuos de plaguicidas utilizados en dicha actividad (Echeverría-Sáenz *et al.*, 2012; Fournier *et al.*, 2019). En el caso de algunas sustancias, las concentraciones superan los límites relacionados con la protección de fauna acuática y se ha estimado que representan un riesgo para esos ecosistemas.

En el presente se observa un escenario cuya búsqueda de la eliminación de plagas en los cultivos ha provocado el uso de sustancias como fungicidas, herbicidas, insecticidas, nematicidas y otros agroquímicos, lo cual ha desencadenado el desplazamiento de esas sustancias hacia los cuerpos de agua por escorrentía, debido a las precipitaciones. Los tóxicos que están incluidos en los plaguicidas inducen a un desbalance a nivel biológico y químico de los ecosistemas (Castro *et al.*, 2015). Por consiguiente, muchas especies que no perjudican el cultivo de la piña sufren los efectos de los plaguicidas aplicados, muchos de estos altamente persistentes, que se mantienen en los ecosistemas por varias décadas (Tribunal Latinoamericano del Agua, 2013).

Según Ramírez (2017), las principales sustancias responsables de causar ecotoxicidad de invertebrados acuáticos, aplicadas en mayor cantidad anualmente en cultivos de piña en el Caribe y zona norte de Costa Rica, regiones donde se realiza la mayor actividad piñera del país, son ametrina, bromacil, diuron, glifosato, benfuracarb, carbaril, diazinon y etoprofos (ver anexo A). Argüello *et al.* (2015) explican que el diuron es utilizado como control pre y postemergente temprano selectivo de malezas en zonas de cultivo. De acuerdo con Caseley (1996), esta sustancia se adhiere a los coloides presentes en el suelo, donde soporta la lixiviación; por lo tanto, es usada en cultivos con raíces extensas y profundas, tal como las de la piña. Mientras que Córdoba (2015) indica que el etoprofos es un insecticida organofosforado altamente tóxico, aplicado de manera manual a plantaciones de piña. Este se ha detectado en fuentes de agua y diversas edificaciones situadas en el Caribe, e inclusive en techos de escuelas. Por lo tanto, se evidencia la importancia de la evaluación toxicológica con bioindicadores para estimar el riesgo que representan estos contaminantes y poder actuar frente a la problemática ambiental.

Los efectos que los plaguicidas ocasionan en las aguas superficiales y en los organismos que habitan esos ecosistemas pueden variar si las sustancias se presentan de manera individual o en una mezcla (Escobar-Chávez *et al.*, 2019). Por lo tanto, dado que en las muestras de agua analizadas cercanas a plantaciones regularmente aparecen mezclas de plaguicidas, con herbicidas e insecticidas dentro de los más comunes, es de gran relevancia realizar análisis que incluyan la mezcla entre estos dos tipos de sustancias, ya que esto permitiría evaluar si hay interacciones de tipo antagónico, aditivas o sinérgicas entre ellas.



Las hidras son organismos bioindicadores de niveles de toxicidad del agua. Los bioensayos determinan efectos letales y subletales de los organismos ante la presencia de contaminantes. Estos son apreciables en las hidras por medio de cambios en el estado de sus tentáculos y/o mortalidad de los organismos (Barrera *et al.*, 2019). La *Hydra attenuata* es un organismo de uso estándar a nivel internacional en estudios ecotoxicológicos para medir el efecto letal y subletal en la evaluación de calidad del agua; mientras que la *Hydra viridis* es una especie presente naturalmente en ecosistemas de Costa Rica y que, como indican Hamada *et al.* (2020), también se utiliza en ensayos de toxicidad y posee una relación mutualista con microalgas. En cuanto a los organismos utilizados en los ensayos, es importante mencionar que la *H. attenuata* fue adquirida para cultivarse en el ECOTOX desde el año 1998; mientras que la *H. viridis* es nativa, fue aislada de un cuerpo de agua de Santo Domingo de Heredia y se cultiva en el laboratorio desde el año 2000.

En las bases de datos internacionales sobre plaguicidas existen vacíos de información referente a los efectos ecotoxicológicos que muchas de estas sustancias tienen sobre las hidras. Considerando el escenario de contaminación que ocurre en ecosistemas acuáticos afectados por contaminación agrícola y, en particular, por el cultivo de piña, el objetivo de este trabajo fue determinar la toxicidad de dos plaguicidas utilizados en ese cultivo, individualmente y en mezcla, sobre dos especies de hidras. Por esta razón, se desea conocer la sensibilidad de la *H. attenuata* a dos plaguicidas individuales, de mucho uso en piña y alta residualidad en aguas, así como a la mezcla de estos. Complementariamente, existe la necesidad de conocer más sobre la

sensibilidad a plaguicidas de la *H. viridis*, para compararla con el organismo modelo que es la *H. attenuata*.

Metodología

El enfoque de la investigación es mixto, debido a que posee atributos tanto cuantitativos como cualitativos. Este trabajo condujo hacia el análisis de laboratorio con la utilización de la estadística y, a la misma vez, con descripciones morfológicas de las hidras.

Fase 1: Selección de plaguicidas

Para la selección de los dos plaguicidas se tomaron en consideración las ocho sustancias principalmente responsables de causar ecotoxicidad en invertebrados acuáticos, aplicadas en mayor cantidad anualmente en cultivos de piña en el país. Se utilizó la matriz adjunta en los anexos B y C, que puntuó distintos aspectos ambientales importantes para seleccionar un herbicida y un insecticida.

Fase 2: Ensayos de toxicidad

Las pruebas se basaron en el protocolo “Bioensayo agudo con *Hydra attenuata*”, establecido por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) (Trottier *et al.*, 1997). A cada especie de hidra se le realizaron tres tratamientos: uno con el herbicida diuron, otro con el insecticida etoprofos y el tercero con una mezcla de estos dos. Las soluciones madre de los plaguicidas se prepararon en el Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas (LAREP) según el protocolo “Control de calidad analítico y procedimientos de validación de métodos para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos” (Laboratorios de Referencia de la Unión Europea, 2019). Las



soluciones madre para las pruebas fueron preparadas a partir de soluciones patrón, disueltas en acetona (ver tabla 1).

Para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones y en cada repetición se utilizaron cinco diluciones de la sustancia de

prueba (ver tablas 2 y 3), un control negativo, un control positivo y un blanco de acetona, con tres réplicas cada uno. Como control negativo y agua de dilución se utilizó medio de hidras (ver anexo D). Como control positivo, para la *H. attenuata* se usaron 0,00006

Tabla 1. *Calidad de soluciones patrón de plaguicidas utilizados para realizar las diluciones empleadas en los ensayos de toxicidad con hidras*

Plaguicida	Fórmula química	Marca	Lote	Pureza (%)
Diuron	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	Sigma-Aldrich	BCBZ536	99,10 ± 0,05
Etoprofos	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₂	Sigma-Aldrich	SZBD182XV	93,40 ± 0,05

Nota: Fuente propia de la investigación.

Tabla 2. *Concentraciones utilizadas en los ensayos de toxicidad de la Hydra attenuata con los plaguicidas diuron, etoprofos y la mezcla (diuron-etoprofos)*

Ensayo	Concentración	Diuron (mg/L)	Etoprofos (mg/L)	Mezcla (mg/L)	
				Diuron	Etoprofos
1	Control (-) 100 % medio de hidra	N/A	N/A	N/A	
	Control solvente 32,00 % acetona	1150,00	1060,00	1150,00	1060,00
	Control (+) Cr ⁺⁶	0,00006	0,00006	0,00006	
	6,25 %	3,13	9,09	0,53	3,22
	12,50 %	6,25	18,18	1,05	6,44
	25,00 %	12,50	36,37	2,11	12,88
	50,00 %	25,00	72,73	4,21	25,75
	100,00 %	50,00	145,46	8,42	51,51
2	Control (-) 100 % medio de hidra	N/A	N/A	N/A	
	Control solvente 32,00 % acetona	1150,00	1060,00	1150,00	1060,00
	Control (+) Cr ⁺⁶	0,00006	0,00006	0,00006	
	6,25 %	3,13	9,11	0,53	3,22
	12,50 %	6,25	18,23	1,05	6,44
	25,00 %	12,50	36,46	2,11	12,88
	50,00 %	25,00	72,92	4,21	25,75
	100,00 %	50,00	145,84	8,42	51,51
3	Control (-) 100 % medio de hidra	N/A	N/A	N/A	
	Control solvente 32,00 % acetona	1150,00	1060,00	1150,00	1060,00
	Control (+) Cr ⁺⁶	0,00006	0,00006	0,00006	
	6,25 %	3,09	9,11	0,53	3,22
	12,50 %	6,18	18,22	1,05	6,44
	25,00 %	12,36	36,44	2,11	12,88
	50,00 %	24,73	72,88	4,21	25,75
	100,00 %	49,46	145,75	8,42	51,51

Notas: N/A = No aplica. Fuente propia de la investigación.



Tabla 3. Concentraciones utilizadas en los ensayos de toxicidad de la *Hydra viridis* con los plaguicidas diuron, etoprofos y la mezcla (diuron-etoprofos)

Ensayo	Concentración	Diuron (mg/L)	Etoprofos (mg/L)	Mezcla (mg/L)	
				Diuron	Etoprofos
1	Control (-) 100 % medio de hidra	N/A	N/A	N/A	
	Control solvente 32,00 % acetona	1150,00	1060,00	1150,00	1060,00
	Control (+) Cr ⁺⁶	0,0013	0,0013	0,0013	
	6,25 %	6,25	9,09	1,15	3,22
	12,50 %	12,50	18,18	2,31	6,44
	25,00 %	25,00	36,37	4,62	12,88
	50,00 %	50,00	72,73	9,24	25,75
	100,00 %	100,00	145,46	18,47	51,51
	2	Control (-) 100 % medio de hidra	N/A	N/A	N/A
Control solvente 32,00 % acetona		1150,00	1060,00	1150,00	1060,00
Control (+) Cr ⁺⁶		0,0013	0,0013	0,0013	
6,25 %		6,25	9,11	1,15	3,22
12,50 %		12,50	18,23	2,31	6,44
25,00 %		25,00	36,46	4,62	12,88
50,00 %		50,00	72,92	9,24	25,75
100,00 %		100,00	145,84	18,47	51,51
3		Control (-) 100% medio de hidra	N/A	N/A	N/A
	Control solvente 32,00 % acetona	1150,00	1060,00	1150,00	1060,00
	Control (+) Cr ⁺⁶	0,0013	0,0013	0,0013	
	6,25 %	6,25	9,11	1,15	3,22
	12,50 %	12,50	18,22	2,31	6,44
	25,00 %	25,01	36,44	4,62	12,88
	50,00 %	50,02	72,88	9,24	25,75
	100,00 %	100,04	145,75	18,47	51,51

Nota: N/A = No aplica. Nota: Fuente propia de la investigación.

mg/L Cr⁺⁶ y para la *H. viridis* 0,0013 mg/L Cr⁺⁶, los cuales se prepararon a partir de la sustancia patrón dicromato de potasio del lote 72403A, con grado de pureza de 99,93 ± 0,05 y fórmula química de K₂Cr₂O₇. El blanco de acetona varió en cada ensayo de acuerdo con la concentración de acetona que contenía cada solución madre del plaguicida. La acetona utilizada es de la marca Riedel-de Haën, del lote EE978-US, con grado de pureza de 99,00 % ± 0,05 y fórmula química de C₃H₆O.

En cuanto a la preparación de las mezclas, primeramente, con cada uno de los plaguicidas se determinó el promedio de la concentración que provocó la muerte del 50 % de los organismos expuestos (LC₅₀) a las 48 h del ensayo. Luego, se calculó la mitad de ese promedio. Posteriormente, se mezcló la concentración anterior de diuron con la de etoprofos y se usó como la concentración más alta. Las diluciones se prepararon según el protocolo “Bioensayo agudo con *Hydra attenuata*” establecido por la OCDE.



Los ejemplares se tomaron de la batería de organismos de ensayo del Laboratorio de Estudios Ecotoxicológicos del Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET) de la Universidad Nacional. Durante el cultivo, las hidras permanecieron bajo las siguientes condiciones: en agua de cultivo de dureza media, a temperatura ambiental del laboratorio de 20 ± 2 °C, con fotoperíodo 16/8 (luz/oscuridad) y alimentadas cuatro veces por semana con *Artemia salina* viva.

Se utilizaron hidras en estado normal, sin hidratos ni yemas. Estas no se alimentaron durante las 24 horas previas al inicio del ensayo, ni durante el mismo. El día del

ensayo se apartaron del cultivo, se enjuagaron y se colocaron en un recipiente con medio limpio. Luego, se colocaron 4 mL de cada una de las cinco diluciones de cada sustancia ensayada y de los controles en placas Petri de 35 mm de diámetro, y se pasaron a cada placa 15 hidras para prelavado, donde permanecieron por un tiempo de dos minutos.

Seguidamente, utilizando una placa multicelda de doce pozos, se colocaron en cada pozo (por triplicado) 4 mL de cada una de las cinco diluciones de cada tratamiento y de los controles. En cada pozo se introdujeron tres hidras prelavadas en la concentración respectiva, iniciando por el control negativo, seguida del blanco, las diluciones de prueba (de la más baja a la más alta) y el control positivo. Posteriormente, se cubrió cada multicelda con papel parafilm® y se colocó su tapa (ver figura 1).

Las muestras se mantuvieron a una temperatura de 20 ± 2 °C, con un fotoperíodo 16/8 (luz/oscuridad). Pasadas 24 h y 48 h se registró el estado morfológico de las hidras expuestas según la figura 2. Se consideró efecto letal a los estados

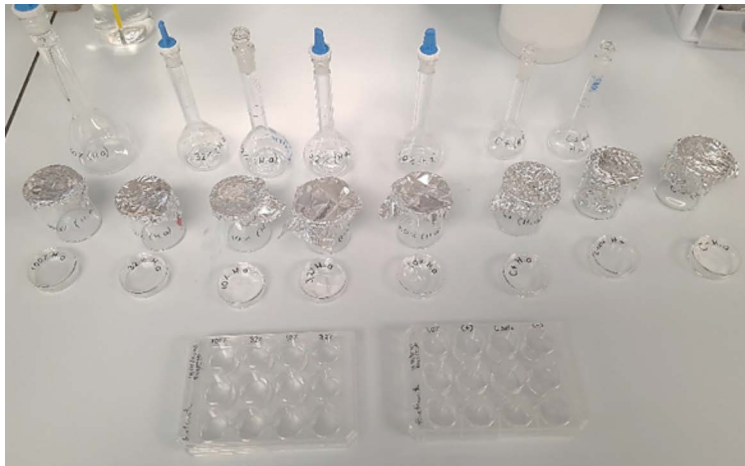


Figura 1. Montaje de bioensayo agudo con hidras. Fuente propia de la investigación.

Figura 2. Estados morfológicos de la *Hydra attenuata* e *Hydra viridis*

Especie	Cuerpo normal	Tentáculos abastionados	Tentáculos acortados	Estado de tulipán	Cuerpo desintegrado
<i>Hydra attenuata</i>					
<i>Hydra viridis</i>					

Nota: Fuente propia de la investigación.



tulipán y cuerpo desintegrado; mientras que se tomó como efecto subletal a los estados de tentáculos abastados y acortados, ya que tendrían la capacidad de regenerarse si volvieran a condiciones ideales. Se consideró válida la prueba cuando al menos el 90 % de los organismos en el control negativo sobrevivieron y presentaron morfología normal. Además, se corroboró que el control positivo afectara aproximadamente a un 50 % de los organismos expuestos.

Para evaluar la toxicidad aguda de los plaguicidas sobre las hidras se examinaron los cambios en la longitud y forma de su cuerpo. La concentración de efecto medio (EC_{50}) y la concentración letal media (LC_{50}) se estimaron por medio de una regresión de la respuesta observada sobre la concentración de exposición, utilizando el modelo Probit. Los cálculos fueron hechos en R (R Core Team) con el paquete Ecotox (Hlina *et al.*, 2021).

Las interacciones de toxicidad se analizaron según DeLorenzo y Serrano (2007), calculando primeramente la suma de actividad biológica (S) para el valor de EC_{50} y LC_{50} ; y los límites inferiores (LCL) y límites superiores (UCL) de ambos valores. La fórmula corresponde a: $S = \frac{A_m}{A_i} + \frac{B_m}{B_i}$, donde A_m es el valor del compuesto A en mezcla, A_i es el valor del compuesto A individualmente, B_m es el valor del compuesto B en mezcla y B_i es el valor del compuesto B individualmente. Luego, se utilizaron los valores de S para calcular los índices aditivos: Si $S < 1$, el *índice aditivo* = $\frac{1}{S} - 1$; y si $S > 1$, el *índice aditivo* = $S - 1$. Por último, se clasificaron las interacciones según tres posibilidades: antagónica, si el índice aditivo es menor a cero; aditiva, si es igual a cero; o sinérgica, si es mayor a cero.

Resultados

En todos los ensayos la totalidad de los organismos del control negativo a las 48 horas estaban en estado normal. Además, los controles positivos se mantuvieron dentro de los rangos aceptables para la validación del ensayo. Asimismo, en todos los casos las tres réplicas de cada ensayo arrojaron resultados muy similares, lo cual sustenta la reproductibilidad de los resultados. Los hallazgos de los bioensayos se muestran de forma resumida en las tablas 4 y 5; sin embargo, los resultados completos se encuentran en los anexos E y F. Referente al efecto causado por los plaguicidas, la *H. attenuata* resultó ser la especie más sensible tanto para diuron como para etoprofos, la cual mostró efecto subletal desde la concentración más baja de ambas sustancias. En contraste, la *H. viridis* mostró mayor tolerancia ante la exposición a los plaguicidas de forma individual, pero fue la más sensible ante la mezcla, ya que se observó letalidad en la concentración mayor de la mezcla.

Los parámetros fisicoquímicos de los controles y concentraciones de plaguicidas, en las tres réplicas de cada sustancia, arrojaron valores muy similares, lo cual muestra que las hidras estuvieron bajo condiciones semejantes durante los ensayos (ver tablas 6 y 7).



Tabla 4. Resultados obtenidos a las 48 horas en los ensayos de toxicidad de la *Hydra attenuata* con los plaguicidas diuron, etoprofos y la mezcla (diuron-etoprofos)

Concentración (mg/L) \bar{x}	Diuron			Etoprofos			Mezcla (diuron-etoprofos)		
	No efecto	Efecto subletal	Efecto letal	No efecto	Efecto subletal	Efecto letal	No efecto	Efecto subletal	Efecto letal
Control (-) (100,00 % medio de hidra)	N/A	x		N/A	x		N/A		x
Control solvente (32,00 % acetona) 1150,00 mg/L	0,00	x	x	0,00	x	x	D: 0,00 E: 0,00		x
Control (+) 0,00006 mg/L Cr ⁺⁶	0,00	x	x	0,00	x	x	0,00		x
3,11 mg/L	0,02	x	x	0,01	x	x	D: 0,00 E: 3,22 mg/L		x
6,23 mg/L	0,04	x	x	0,02	x	x	D: 0,00 E: 6,44 mg/L		x
12,45 mg/L	0,08	x	x	0,05	x	x	D: 0,00 E: 12,88 mg/L		x
24,91 mg/L	0,16	x	x	0,10	x	x	D: 0,00 E: 25,75 mg/L		x
49,82 mg/L	0,31	x	x	0,20	x	x	D: 0,00 E: 51,51 mg/L		x

Notas: \bar{x} = promedio, s = desviación estándar, D = diuron, E = etoprofos, N/A = No aplica.
 Fuente propia de la investigación.



Tabla 5. Resultados obtenidos a las 48 horas en los ensayos de toxicidad de la *Hydra viridis* con los plaguicidas diuron, etoprofos y la mezcla (diuron-etoprofos)

Concentración (mg/L)	Diuron			Etoprofos			Mezcla (diuron-etoprofos)			
	\bar{x}	s	No efecto	\bar{x}	s	No efecto	\bar{x}	s	No efecto	
Control (-) (100,00 % medio de hidra)	N/A		x	Control (-) (100,00 % medio de hidra)	N/A		x	N/A		x
Control solvente (32,00 % acetona) 1150,00 mg/L	0,00		x	Control solvente (0,80 % acetona) 1060,00 mg/L	0,00		x	D: 0,00 E: 0,00		x
Control (+) 0,0013 mg/L Cr ⁺⁶	0,00		x	Control (+) 0,0013 mg/L Cr ⁺⁶	0,00		x	0,00		x
6,25 mg/L	0,00		x	9,11 mg/L	0,01		x	D: 0,00 E: 3,22 mg/L		x
12,50 mg/L	0,00		x	18,21 mg/L	0,02		x	D: 0,00 E: 6,44 mg/L		x
25,00 mg/L	0,01		x	36,42 mg/L	0,05		x	D: 0,00 E: 12,88 mg/L		x
50,01 mg/L	0,01		x	72,84 mg/L	0,10		x	D: 0,00 E: 25,75 mg/L		x
100,01 mg/L	0,02		x	145,68 mg/L	0,20		x	D: 0,00 E: 51,51 mg/L		x

Notas: \bar{x} = promedio, s = desviación estándar, D = diuron, E = etoprofos, N/A = No aplica. Fuente propia de la investigación.



Tabla 6. *Parámetros fisicoquímicos de los controles y concentraciones de plaguicidas utilizados en los ensayos con Hydra attenuata*

Plaguicida	Concentración	pH		Conductividad (μS/cm)		Temperatura (°C)		Oxígeno disuelto (mg/L)	
		\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Diuron	Control (-) 100,00 % medio hidra	7,21	0,82	285,00	36,86	23,90	0,46	7,44	0,21
	Control solvente 1150,00 mg/L (32,00 % acetona)	7,10	0,77	243,33	6,51	24,27	0,12	7,47	0,10
	Control (+) 0,00006 mg/L Cr ⁺⁶	7,01	0,66	249,67	8,50	23,87	0,25	7,31	0,11
	3,11 mg/L	6,91	0,55	258,00	5,29	24,03	0,06	7,45	0,12
	12,45 mg/L	6,84	0,50	246,33	14,15	24,07	0,49	7,29	0,08
	49,82 mg/L	6,76	0,47	246,00	2,65	24,00	0,46	7,20	0,01
Etoprofos	Control (-) 100,00 % medio hidra	8,06	0,21	292,67	9,29	23,90	0,46	7,77	0,10
	Control solvente 1060,00 mg/L (0,80 % acetona)	7,84	0,21	212,20	15,27	24,27	0,12	7,62	0,08
	Control (+) 0,00006 mg/L Cr ⁺⁶	7,63	0,25	243,67	23,97	23,87	0,25	7,56	0,05
	9,11 mg/L	7,38	0,11	259,00	1,00	24,03	0,06	7,66	0,08
	36,42 mg/L	7,13	0,13	237,67	1,53	24,07	0,49	7,53	0,12
	145,68 mg/L	7,10	0,19	215,67	5,51	24,00	0,46	7,48	0,11
Mezcla (diuron - etoprofos)	Control (-) 100,00 % medio hidra	7,61	1,16	278,33	8,02	24,03	0,81	7,46	0,12
	Control solvente D: 1150,00 mg/L E: 1060,00 mg/L	7,58	0,95	240,67	2,08	23,97	0,95	7,27	0,23
	Control (+) 0,00006 mg/L Cr ⁺⁶	7,27	0,65	254,00	1,00	23,80	1,08	7,20	0,28
	D: 0,53 mg/L E: 3,22 mg/L	7,06	0,51	258,00	1,00	23,93	0,86	7,32	0,18
	D: 2,11 mg/L E: 12,88 mg/L	6,79	0,44	250,00	1,00	24,13	1,24	7,02	0,58
	D: 8,42 mg/L E: 51,51 mg/L	6,64	0,29	238,67	3,51	24,17	1,29	6,94	0,55

Notas: \bar{x} = promedio, s = desviación estándar, D = diuron, E = etoprofos.
 Fuente propia de la investigación.



Tabla 7. *Parámetros fisicoquímicos de los controles y concentraciones de plaguicidas utilizados en los ensayos con Hydra viridis*

Plaguicida	Concentración	pH		Conductividad (μS/cm)		Temperatura (°C)		Oxígeno disuelto (mg/L)	
		\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Diuron	Control (-) 100,00 % medio hidra	6,91	0,60	214,00	8,54	24,03	0,25	7,08	0,46
	Control solvente 1150,00 mg/L (32,00 % acetona)	6,81	0,68	202,33	18,61	24,23	0,15	7,26	0,27
	Control (+) 0,0013 mg/L Cr ⁺⁶	6,81	0,61	201,87	13,68	24,27	0,38	7,04	0,39
	6,25 mg/L	6,75	0,64	224,67	16,17	24,30	0,35	7,00	0,39
	25,00 mg/L	6,73	0,63	213,67	17,79	24,30	0,50	7,00	0,29
	100,01 mg/L	6,71	0,62	203,70	18,51	23,67	0,32	6,93	0,27
Etoprofos	Control (-) 100,00 % medio hidra	6,97	0,13	217,67	4,51	21,87	0,32	7,56	0,09
	Control solvente 1060,00 mg/L (0,80 % acetona)	6,75	0,08	175,80	16,73	21,87	0,40	7,55	0,14
	Control (+) 0,0013 mg/L Cr ⁺⁶	6,63	0,09	190,27	5,88	21,90	0,17	7,43	0,07
	9,11 mg/L	6,50	0,15	215,00	6,56	21,97	0,35	7,51	0,05
	36,42 mg/L	6,40	0,07	197,07	4,31	22,10	0,10	7,41	0,06
	145,68 mg/L	6,36	0,08	179,40	9,78	21,97	0,15	7,33	0,06
Mezcla (diuron - etoprofos)	Control (-) 100,00 % medio hidra	6,98	0,62	232,33	11,02	23,97	1,29	7,27	0,25
	Control solvente D: 1150,00 mg/L E: 1060,00 mg/L	6,74	0,64	212,67	6,51	23,67	1,19	7,16	0,18
	Control (+) 0,0013 mg/L Cr ⁺⁶	6,75	0,57	204,67	4,51	23,90	1,25	7,08	0,14
	D: 1,15 mg/L E: 3,22 mg/L	6,67	0,48	231,33	7,02	23,90	1,01	7,27	0,12
	D: 4,62 mg/L E: 12,88 mg/L	6,37	0,15	219,67	8,96	23,33	1,18	7,21	0,17
	D: 18,47 mg/L E: 51,51 mg/L	6,62	0,41	217,67	14,01	24,00	0,92	6,99	0,21

Notas: \bar{x} = promedio, s = desviación estándar, D = diuron, E = etoprofos.
 Fuente propia de la investigación.

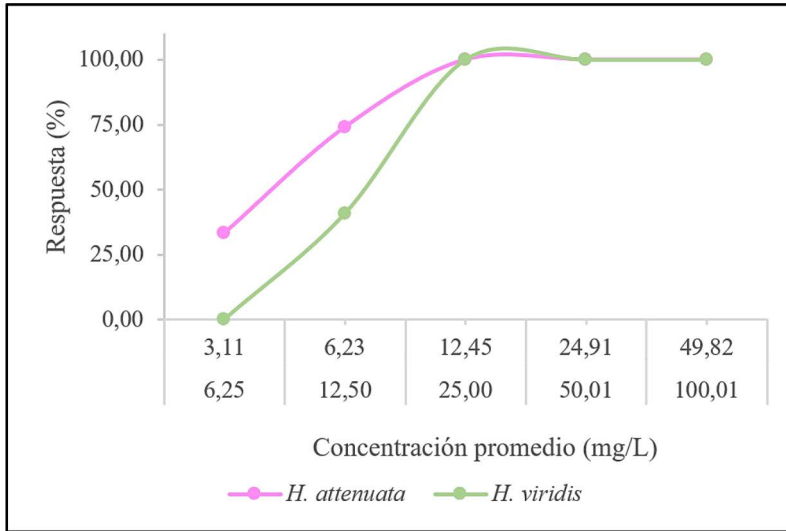
Las primeras manifestaciones de afectación a las hidras en los tratamientos con diuron y etoprofos a las 48 horas se evidenciaron con los estados abastonado y acortado, lo cual indica un efecto subletal de estas sustancias. La *H. attenuata* mostró estos cambios morfológicos en el 33,33 % de los organismos expuestos a diuron a partir de la concentración más baja (3,11 mg/L) (gráfica 1). En la siguiente concentración (6,23 mg/L), la afectación fue del 74,07 % de individuos, y para las concentraciones superiores (12,45; 24,91 y 49,82

mg/L) la afectación alcanzó 100,00 % de la población. Por su parte, la *H. viridis* presentó sus primeras afectaciones ante el diuron a la concentración 12,50 mg/L con una respuesta del 40,74 % de los individuos; y, al igual que la *H. attenuata*, en las siguientes concentraciones (25,00; 50,01 y 100,01 mg/L) la afectación fue del 100,00 % de individuos expuestos.

Para la sustancia etoprofos la *H. attenuata* mostró cambios morfológicos a partir de la concentración 9,11 mg/L, afectando el 14,81 % de los individuos expuestos.



Gráfica 1. Efecto subletal en la *Hydra attenuata* e *Hydra viridis* ante la exposición a diuron durante 48 horas



Nota: Fuente propia de la investigación.

En las concentraciones siguientes correspondientes a 18,21; 36,42; 72,84 y 145,68 mg/L de esta sustancia, la afectación fue de 25,93; 81,48; 100,00 y 100,00 % de individuos respectivamente. Por su parte, la *H. viridis* presentó sus primeras afectaciones ante el etoprofos a la concentración de 36,42 mg/L, con una respuesta de 22,22 % de los individuos expuestos, mientras que en las concentraciones de 72,84 y 145,68 mg/L, la afectación fue de 74,07 y 100,00 % respectivamente (gráfica 2).

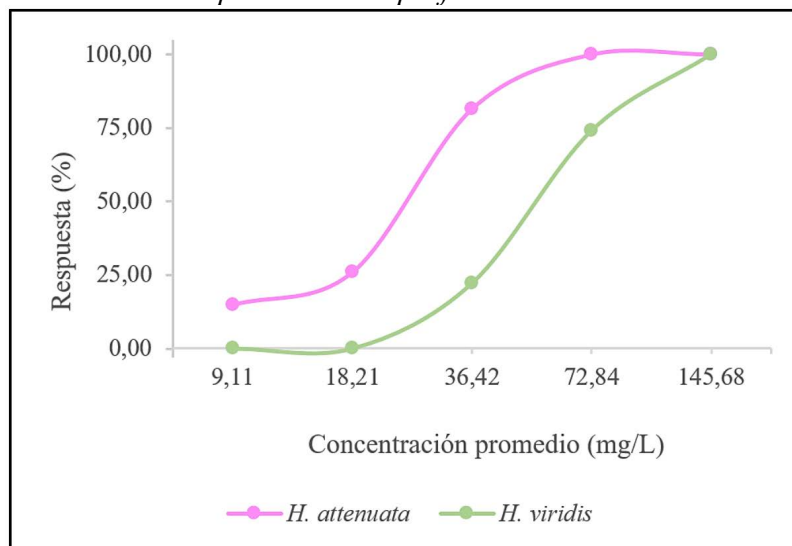
Para la *H. attenuata*, en la concentración más alta de diuron (49,82 mg/L) y de etoprofos (145,68 mg/L) se registraron 24 y 22 individuos desintegrados respectivamente (efecto letal más importante), mientras que

para la *H. viridis* en la concentración más alta de diuron (100,01 mg/L) y de etoprofos (145,68 mg/L) se registraron 20 y 3. En el tratamiento con mezcla de diuron-etoprofos no se obtuvieron individuos desintegrados de ninguna de las dos especies de ensayo (ver anexos E y F). Estos resultados muestran que conforme aumentó la concentración de los plaguicidas diuron y etoprofos, incrementó la afectación de individuos expuestos, y que ambas especies de

hidras resultaron ser más sensibles al herbicida diuron que al insecticida etoprofos.

En cuanto los parámetros de toxicidad evaluados, en el ensayo con diuron, la EC_{50} de la *H. viridis* fue 3,22 veces mayor respecto a la otra especie de hidra, y la LC_{50} fue 2,19 veces. Asimismo, en el ensayo con

Gráfica 2. Efecto subletal en la *Hydra attenuata* e *Hydra viridis* ante la exposición a etoprofos durante 48 horas



Nota: Fuente propia de la investigación.



etoprofos la EC_{50} de la *H. viridis* fue 2,24 veces mayor respecto a la *H. attenuata*, mientras que la LC_{50} de las dos especies mostró el mismo resultado. Lo anterior muestra una menor tolerancia de la *H. attenuata* ante la exposición a los plaguicidas (ver Tabla 8).

En el bioensayo de la interacción entre diuron y etoprofos según EC_{50} , para la *H. attenuata* el resultado del índice aditivo fue de 0,19; 1,72 y 4,13 para UCL, EC_{50} y LCL respectivamente; por lo tanto, al ser valores mayores a cero, indica una toxicidad sinérgica (ver anexo G). En el caso de la interacción según LC_{50} , en el ensayo con la mezcla de ambos plaguicidas no hubo mortalidad; por consiguiente, no fue posible determinar el LC_{50} de la mezcla ni su interacción.

Respecto a la interacción de los plaguicidas con la *H. viridis*, según EC_{50} el resultado del índice aditivo fue de 0,93; 0,96 y 0,99 para UCL, EC_{50} y LCL respectivamente. Al ser valores mayores a cero, corresponde a una toxicidad sinérgica. Asimismo, en la interacción según LC_{50} el índice aditivo fue de 0,36; 0,37 y 0,38; lo cual expresa una toxicidad sinérgica (ver anexo H).

Discusión

Al ser la hidra un organismo diploblástico, sus células se ubican de manera muy próxima al entorno; por consiguiente, responde rápidamente a los cambios

que ocurren en el medio, de tal forma que los tóxicos presentes contribuyen a alteraciones en su morfología y capacidad de regeneración de fracciones de su cuerpo (Murugadas *et al.*, 2016). En los ensayos realizados tanto la *H. attenuata* como la *H. viridis* fueron más sensibles al herbicida diuron que al insecticida etoprofos. Según Demetrio (2012), las concentraciones necesarias de herbicida para afectar la vía metabólica de las plantas generan toxicidad también para los cnidarios. Además, Barre-*ra et al.* (2019) mencionan que las hidras presentan alta sensibilidad a los herbicidas ya que, en un estudio que empleó el herbicida glifosato y los insecticidas clorpirifos y cipermetrina, la *H. attenuata* mostró mayor sensibilidad al glifosato.

El diuron actúa de manera sistémica en las plantas, ya que es absorbido en mayor medida por las raíces, inhabilitando el transporte de electrones dentro del fotosistema II (IRET-UNA, 2020). A pesar de que no se registran en la literatura datos sobre la exposición de hidras al diuron, Dal (2020) menciona que al exponer la *H. viridis* a 400 $\mu\text{g/L}$ de atrazina (cuyo modo de acción es similar al del diuron) por 35 días, se detectó una disminución de células del alga *Chlorella* presentes en las células de la hidra. Lo anterior resulta realmente negativo para esta especie de hidra, debido a que la relación de simbiosis con el alga le favorece la obtención de carbohidratos para su supervivencia.

Tabla 8. *Parámetros de toxicidad de la Hydra attenuata e Hydra viridis en los bioensayos con diuron y etoprofos*

Plaguicida	<i>Hydra attenuata</i>				<i>Hydra viridis</i>			
	EC_{50} (mg/L)		LC_{50} (mg/L)		EC_{50} (mg/L)		LC_{50} (mg/L)	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Diuron	4,24	0,68	16,84	1,20	13,64	2,48	36,94	0,01
Etoprofos	23,74	1,37	103,01	0,14	53,12	2,72	103,01	0,14

Notas: \bar{x} = promedio, s = desviación estándar.

Fuente propia de la investigación.



Howe *et al.* (2017) también mencionan que al exponer a diuron al cnidario *Exaiptasia pallida* (anémona de mar que vive en simbiosis con el alga *Symbiodinium spp.*) por un periodo de doce días, a concentraciones de 10 µg/L y 200 µg/L, presentó un fuerte blanqueamiento; una EC₅₀ de 100 µg/L y 132 µg/L; y la inhibición del 50 % de la reproducción asexual. Asimismo, Mansano *et al.* (2018) citan hallazgos de otros cnidarios sensibles al diuron, tales como *Acropora tumida* y *Aiptasia sp.*

No se registra en la literatura información que explique la mayor sensibilidad que presentó *H. attenuata* al diuron en comparación con *H. viridis*. Sin embargo, a pesar de que el alga *Chlorella sp.* (que permanece en simbiosis con la *H. viridis*) se ve afectada por herbicidas, se considera que la acción antioxidante que le brinda a la hidra desde el inicio de su desarrollo hace que muestre menor afectación ante el diuron respecto a la otra especie de hidra; pero es conveniente realizar más investigaciones que permitan verificar lo mencionado. Referente al control solvente, la *H. attenuata* mostró sensibilidad a la acetona, y es posible que los efectos observados se relacionen con esa exposición junto al efecto del plaguicida.

Las especies de hidras estudiadas en este artículo, tanto la *H. attenuata* como la *H. viridis*, mostraron menor sensibilidad ante el insecticida etoprofos. Según Demetrio (2012), los insecticidas organofosforados actúan afectando el sistema nervioso por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Klimovich y Bosch (2018) mencionan que el sistema nervioso de la hidra es muy sencillo y carece de células migratorias mesodérmicas especializadas. Asimismo, Demetrio (2012) indica que solo un 3 % del total de sus células corresponden a neuronas; por lo tanto, sufren un menor efecto ante este tipo

de sustancias. “La baja sensibilidad de *Hydra attenuata* respecto a estos insecticidas podría deberse a que son organismos más sencillos con un sistema neuronal difuso y no centralizado, con la mayoría de las neuronas sin una polaridad definida” (p. 61).

Por su parte, el modo de acción del etoprofos es de contacto y actúa como inhibidor de la enzima colinesterasa (IRET-UNA, 2020). Los estudios de toxicidad con etoprofos son realmente escasos y en la literatura no se registran resultados sobre la exposición de los cnidarios a este plaguicida; sin embargo, se indica un análisis con un insecticida organofosforado que posee su mismo modo de acción: el clorpirifos. Olguín (2021) menciona que al exponer al cnidario *Aurelia coerulea* a 0,04 µg/L de clorpirifos por un periodo de nueve semanas, la tasa de reproducción por medio de brotación no se vio afectada; además, no hubo cambios en los perfiles de metabolitos. En otras palabras, este organismo resultó ser resistente al plaguicida.

La *H. viridis* fue la hidra que se vio menos afectada al estar expuesta a diuron y etoprofos. Hamada *et al.* (2018) y Ye (2017) observaron que la simbiosis de la *H. viridis* con el alga *Chlorella sp.* le proporciona una menor sensibilidad ante varios contaminantes. El alga se alberga en las células epiteliales de la región gástrica de la hidra; como beneficio el alga obtiene nitrógeno derivado del metabolismo de la hidra, mientras esta última obtiene carbohidratos del alga. Se reporta adición de la actividad antioxidante en cnidarios que se relacionan simbióticamente con el alga, esto por medio de la presencia del gen encargado de codificar la enzima glutatión S-transferasa. Además, Guinou (2010) menciona que en épocas de extrema debilidad, las algas proveen a la hidra de alimento endógeno, lo cual representa una ventaja competitiva.



La interacción entre diuron y etoprofos, tanto para la *H. attenuata* como la *H. viridis*, resultó en una toxicidad sinérgica. Una mezcla es aditiva si la toxicidad corresponde a la suma de los efectos de cada sustancia, mientras que el sinergismo ocurre cuando la toxicidad es más elevada que la aditiva, y el antagonismo sucede cuando es inferior a la aditiva. El etoprofos es una sustancia neurotóxica que actúa al inhibir la actividad colinesterasa. A pesar de que los cnidarios no presentan un sistema nervioso complejo, sí se ha relacionado la actividad colinesterasa en estos organismos con la transmisión nerviosa (Flores *et al.*, 2020), sugiriendo que la toxicidad de los organofosforados puede seguir ese mismo mecanismo. En el caso del diuron, tampoco es claro el mecanismo de toxicidad para los cnidarios, pero en otros invertebrados se han observado señales de estrés oxidativo, daño mitocondrial y neurotoxicidad relacionados con la exposición a la sustancia y sus metabolitos (Lima *et al.*, 2022). Una combinación de esos mecanismos descritos podría explicar el aumento de la toxicidad de la mezcla con respecto a las partes, si bien es necesaria más investigación para el caso específico de las hidras. Además, los efectos de las mezclas son producto de alteraciones de la actividad biológica que una sustancia provoca a la otra, ya se trate de cambios en la eliminación, en las tasas de absorción o en el metabolismo (Aronzon, 2013). Los efectos de los contaminantes pueden variar entre organismos y niveles de organización biológica (Andrade, 2021). Adicionalmente, realizar estudios con las sustancias por separado subestima el efecto que ocasionan los tóxicos en panoramas reales, cuyos ecosistemas acuáticos pueden estar contaminados por diversas sustancias, las cuales afectan de manera distinta a los organismos

presentes. En este trabajo se evidenció que la mezcla de diuron y etoprofos es sinérgica, de forma que ocasionó a nivel subletal una afectación mayor en las hidras estudiadas en comparación con el efecto de las sustancias de manera individual. Por lo consiguiente, se rescata la gran utilidad de estos cnidarios como bioindicadores en el monitoreo de la calidad de agua y, de igual modo, la importancia de realizar más estudios con hidras, utilizando diferentes mezclas de sustancias para comprender la afectación de los tóxicos en los seres vivos.

Este trabajo es un aporte para la comunidad científica porque ha generado información que se desconocía sobre la sensibilidad de las hidras (como organismo de ensayo) a plaguicidas. La *H. attenuata* resultó ser la especie más sensible ante los plaguicidas de forma individual, mientras que la *H. viridis* fue la más sensible ante la mezcla. Este dato es sumamente relevante, ya que en la ejecución de bioensayos de laboratorio permitiría otorgarle diferentes usos a cada especie de hidra, según la composición de la muestra de agua a estudiar. Por ejemplo, la *H. attenuata* podría ser una excelente herramienta para evaluar efectos de plaguicidas ante sustancias individuales; mientras que la *H. viridis* sería mucho más útil en la evaluación de muestras de agua que contengan mezclas de plaguicidas. Por esta razón, los resultados obtenidos son un primer indicio para la realización de más investigaciones con otras sustancias individuales y mezclas, que permitan verificar si efectivamente es conveniente darle el uso sugerido a cada especie de hidra.

Los valores de los parámetros de toxicidad (EC_{50} y LC_{50}) obtenidos indican la afectación a los niveles subletal y letal, respectivamente, en hidras, por permanecer expuestas a diuron y etoprofos. Estos



datos ayudan a solventar el faltante de estudios realizados con hidras como organismos bioindicadores; además, proporcionan información que le permitirá al Laboratorio de Estudios Ecotoxicológicos (ECOTOX) optimizar su base de datos de bioindicadores y la realización de futuros ensayos que contribuyan al estudio de la sensibilidad de hidras ante otros contaminantes.

Conclusiones

La *H. attenuata* y la *H. viridis* resultaron ser más sensibles al herbicida diuron, debido al modo de acción de los herbicidas, que representan mayor toxicidad para estos organismos. Mientras que la sensibilidad de ambas especies al insecticida etoprofos fue menor, debido a que los insecticidas organofosforados están diseñados para afectar el sistema nervioso de los organismos y, al tener las hidras un sistema nervioso relativamente simple, sufren un menor efecto ante este tipo de sustancias.

Se debe profundizar con más investigaciones para determinar si la simbiosis de la *H. viridis* con el alga *Chlorella sp.* la hace más resistente ante diversas sustancias individuales del medio, debido a que el alga le adiciona acción antioxidante y carbohidratos como alimento, ventaja que no posee la *H. attenuata*.

La interacción entre diuron y etoprofos, tanto para la *H. attenuata* como para la *H. viridis*, resultó en una toxicidad sinérgica, de modo que la mezcla ocasiona a nivel subletal una afectación mayor en las hidras en comparación con el efecto de las sustancias de manera individual.

La *H. attenuata* resultó ser la especie más sensible tanto para diuron como para etoprofos, mientras que la *H. viridis* fue la más sensible ante la mezcla de los dos

plaguicidas. La *H. attenuata*, al verse más afectada por dos de las tres sustancias, es la hidra que mostró mayor sensibilidad, por lo que se recomienda mantenerla dentro de los organismos de la batería de pruebas de ECOTOX para la ejecución de bioensayos de toxicidad. Sin embargo, se recomienda realizar más investigaciones para verificar si es conveniente otorgarle diferentes usos a cada especie de hidra, de manera que la *H. attenuata* se utilice en ensayos toxicológicos con sustancias individuales y la *H. viridis* con mezclas de sustancias.

Financiamiento

Universidad Nacional, Costa Rica.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener algún conflicto de interés.

Declaración de la contribución de los autores

Todos los autores afirmamos que se leyó y aprobó la versión final de este artículo. El porcentaje total de contribución para la conceptualización, preparación y corrección de este artículo fue el siguiente: C.J.P.: 45 %, M.U.S.: 20 %, K.J.Q.: 15 %, F.M.T.: 15 % y S.V.V.: 5 %.

Declaración de disponibilidad de los datos

Los datos que apoyan los resultados de este estudio están disponibles como “archivos suplementarios” en el sitio web de *Uniciencia*.



Referencias

- Andrade, V. (2021). *Efectos de la contaminación directa y difusa por plaguicidas sobre el zooplancton a distintas escalas de análisis* [tesis de doctorado]. Santa Fe, Argentina: Universidad Nacional del Litoral. <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/5764/Tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Argüello, E., Chaves, A., Chinchilla, A. y Navarrete, M. (2015). *Posibles efectos en la salud asociados a la exposición al agua para consumo humano contaminada por plaguicidas, en las poblaciones de Milano, Luisiana y El Cairo, Siquirres, estudiados en el periodo de septiembre 2013 a enero de 2014* [Seminario de grado]. San José: Universidad de Costa Rica. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3368/1/39201.pdf>
- Aronzon, C. (2013). *Evaluación de la toxicidad de los contaminantes cobre, nonilfenol y diazinón sobre embriones y larvas de Rhinella (Bufo) arenarum* [tesis de posgrado]. Argentina: Universidad de Buenos Aires. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5340_Aronzon.pdf
- Barrera, J., Espinosa, A. y Álvarez, J. (2019). Contaminación en el Lago de Tota, Colombia: Toxicidad aguda en *Daphnia magna* (Cladocera: Daphniidae) e *Hydra attenuata* (Hydrozoa: Hydridae). *Revista de Biología Tropical*, 67(1), 11-23. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v67i1.33573>
- Caseley, J.C. (1996). Capítulo 10. Herbicidas. En Labrada, R., Caseley, J.C. y Parker, C. *Manejo de malezas para países en desarrollo*. FAO.
- Castro, S., Picado, H. y Vega, W. (2015). Comunidades fumigadas en Costa Rica acusan al Estado y transnacionales ante la Comisión Interamericana de Derechos Humanos. *Revista Biodiversidad*, 85, 23-26. <https://www.grain.org/media/w1siziisijwmtuvmduvmdvmtbfndd-fmtnfmjq3xza2q29tdw5pzgfkzxfzntawdhz-gfzx2vux0nvc3rhx1jpy2ffyn1c2fux2fsx0vz-dgfk195x3ryyw5zbfmfw9uywxc19hbnrlx-2xhx0nvwblzav9ux0ludgvyw1lcmlyw5hx2rlx0rlcmvjag9zx0h1bwfub3mucgmilld>
- Córdoba, L. (2015). *Evaluación de la contaminación ambiental en aire y polvo por plaguicidas, en 12 centros educativos del cantón de Matina, Limón* [tesis de posgrado]. San José: Universidad de Costa Rica. https://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/84505/Tesis%20versi%c3%b3n%20final%20200715_license.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Dal, J. (2020). *Effects of the herbicide atrazine on members of the freshwater genus Hydra*. <https://jayscholar.etown.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1008&context=biostu>
- DeLorenzo, M. y Serrano, L. (2007). Individual and Mixture Toxicity of Three Pesticides: Atrazine, Chlorpyrifos, and Chlorothalonil to the Marine Phytoplankton Species *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Environmental Science and Health*, 38(5), 529-538. <https://doi.org/10.1081/PFC-120023511>
- Demetrio, P. (2012). *Estudio de efectos biológicos de plaguicidas utilizados en cultivos de soja RR y evaluación de impactos adversos en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampeana* [tesis de doctorado]. Argentina: Universidad Nacional de La Plata. <https://doi.org/10.35537/10915/18139>
- Echeverría-Sáenz, S., Mena, F., Pinnock, M., Ruedert, C., Solano, K., de la Cruz, E., Campos, B., Sánchez-Avila, J., Lacorte, S. y Barata, C. (2012). Environmental hazards of pesticides from pineapple crop production in the Río Jiménez watershed (Caribbean Coast, Costa Rica). *Science of the Total Environment*. 440, 106-114. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.092>
- Escobar-Chávez, C., Alvariano, L. y Iannacone, I. (2019). Evaluación del riesgo ambiental acuático de la mezcla de los plaguicidas imidacloprid (insecticida) y propineb (fungicida) en *Daphnia magna straus*, 1820. *Paideia XXI*, 9(2), 301-332. doi: <https://doi.org/10.31381/paideia.v9i2.2759>
- Flores, F., Kaserzon, S., Elisei, G., Ricardo, G. y Negrí, AP. (2020). Toxicity thresholds of three insecticides and two fungicides to larvae of the coral *Acropora tenuis*. *PeerJ*, 8, e9615. <https://doi.org/10.7717/peerj.9615>
- Fournier, L., Castillo, L., Ramírez, F., Moraga, G. y Ruedert, C. (2019). Preliminary Assessment of Agricultural Area and its Influence to the Quality of Water in Golfo Dulce, Costa Rica. *Revista de Ciencias Ambientales*, 53(1). <http://dx.doi.org/10.15359/rca.53-1.5>
- Guinou, C. (2010). *The Toxicity of Harmony Landfill Leachate to Green Hydra* (*Hydra viridissima*) (tesis de posgrado). Oshawa, Canadá: University of Ontario Institute of Technology.



- https://ir.library.ontariotechu.ca/xmlui/bits-tream/handle/10155/102/Ginou_Carrie.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Laboratorios de Referencia de la Unión Europea (EURL). (2019). *Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. SANTE/12682/2019. Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf
- Hamada, M., Satoh, N. y Khalturin, K. (2020). A Reference Genome from the Symbiotic Hydrozoan, *Hydra viridissima*. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 10(11), 3883-3895. <https://doi.org/10.1534/g3.120.401411>
- Hamada, M., Schröder, K., Bathia, J., Ulrich, K., Fraune, S., Khalturina, M., Khalturin, K., Shinzato, Satoh., N. y Bosch., T. (2018). *Metabolic co-dependence drives the evolutionarily ancient Hydra-Chlorella symbiosis*. Tancha, Japón: Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University. <https://elifesciences.org/articles/35122>
- Hlina, B.L., Birceanu, O., Robinson, C.S., Dhiyebi, H. y Wilkie, M.P. (2021). The relationship between thermal physiology and lampricide sensitivity in larval sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *Journal of Great Lakes Research*, 47, S272-S284. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2021.10.002>
- Howe, P., Reichelt-Brushett, A., Clark, M. y Seery, C. (2017). Toxicity estimates for diuron and atrazine for the tropical marine cnidarian *Exaiptasia pallida* and in-hospite *Symbiodinium spp.* using PAM chlorophyll-a fluorometry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 171, 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.05.006>
- Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET-UNA). (2020). *Manual de plaguicidas de Centroamérica*. <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu>
- Klimovich, A. y Bosch, T. (2018). Rethinking the Role of the Nervous System: Lessons From the Hydra Holobiont. *BioEssays*, 40, (1800060), 1-9. <https://doi.org/10.1002/bies.201800060>
- Lima, T. R. R., Martins, A. C., Pereira, L. C. y Aschner, M. (2022). Toxic Effects Induced by Diuron and Its Metabolites in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicity Research*, 40(6), 1812-1823. <https://doi.org/10.1007/s12640-022-00596-2>
- Mansano, A. S., Moreira, R. A., Dornfeld, H. C., Diniz, L., Daam, M., Rocha, O. y Seleglim, M. (2018). Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 13335-13346. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8274-9>
- Murugadas, A., Zeeshan, M., Thamaraiselvi, K., Ghaskadbi, S. & Abdulkader, M. (2016). Hydra as a model organism to decipher the toxic effects of copper oxide nanorod: Eco-toxicogenomics approach. *Scientific Reports*, 6 (29663), 1-14. <https://doi.org/10.1038/srep29663>
- Obando, A. (2017). El Estado detrás de la piña: El desarrollo de los monocultivos de exportación en la Región Huetar Norte de Costa Rica. 9º Congreso Latinoamericano de Ciencia Política. Montevideo: ALACIP. <http://www.congresoalacip2017.org/archivo/downloadpublic2?q=YToyOntzOjY6InBhemFtcyI7czozNToiYToxOntzOjEwOiJRRF-9BUiFVSZPjIjtzOjQ6IjZzNzkiO30iO3M-6MToiaCI7czozMjoiNjdhYjNhNzc3ZD-gxMDI2M2RjMjQzMzBiYTExOTRkZ-GUio30%3D>
- Olguín, C. (2021). *Responses of jellyfish to pesticides across different life history stages* (tesis de posgrado). Griffith University. <https://doi.org/10.25904/1912/4080>
- Pesticide Action Network (PAN). (2020). Pesticide info. <https://www.pesticideinfo.org/>
- Ramírez, F. (2017). *Diagnóstico de plaguicidas en Caribe y Zona Norte*. Heredia, Costa Rica: IRET-UNA.
- Tribunal Latinoamericano del Agua (TLA). (2013). *Memoria del foro: "El monocultivo de piña en Costa Rica y la repercusión en los sistemas hídricos"*. TLA.
- Trottier, S., Blaise, C., Kusui, T. y Johnson, E. (1997). Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 12(3), 265-271. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2256\(1997\)12:3<265::aid-tox10>3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2256(1997)12:3<265::aid-tox10>3.0.co;2-9)
- University of Hertfordshire (2019). *PPDB: Pesticide Properties DataBase*. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/search.htm>



Vargas, C. , Miller, C. y Arguedas, C. (2020). *Informe: Monitoreo del estado de la piña en Costa Rica para el año 2018*. San José: CONARE, CENAT y Laboratorio PRIAS. https://repositorio.conare.ac.cr/bitstream/handle/20.500.12337/7892/Vargas_C_Informe_monitoreo_pina_CR_ano_2018_2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Ye, S. (2017). The Roles of Endosymbionts and Hosts in Adaptive Response to Stress. Houston: Rice University. <https://hdl.handle.net/1911/94004>



Sensibilidad de *Hydra attenuata* e *Hydra viridis* a los plaguicidas diuron y etoprofos, Costa Rica (Caroline Jones • María del Rocío Ugalde • Katherine Jiménez • Freylan Mena • Seiling Vargas) Uniciencia is protected by Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported (CC BY-NC-ND 3.0)



Anexos

Anexo A. Plaguicidas utilizados en el cultivo de piña en el Caribe y Zona Norte de Costa Rica

Plaguicidas	Cantidad aplicada en cultivos de piña por año (kg ia/ha/año)	Ecotoxicidad en invertebrados acuáticos
Ametrina	2 a 3	Peligroso
Bromacil	2 a 3	Medianamente peligroso
Diuron	2 a 3	Peligroso
Glifosato	0 a 1	Peligroso
Benfuracarb	7 a 8	Altamente peligroso
Carbaril	3 a 4	Altamente peligroso
Diazinón	4 a 5	Altamente peligroso
Etoprofos	8 a 10	Peligroso

Nota: Elaboración propia (2020) con datos de [Ramírez, 2017](#) y [University of Hertfordshire, 2019](#).



Anexo B. Determinación del herbicida con mayor puntaje para ser utilizado en los bioensayos

Indicadores	Ametrina			Bromacil			Diuron			Cifosato						
	Dato	Clasificación	Puntaje	Fuente	Dato	Clasificación	Puntaje	Fuente	Dato	Clasificación	Puntaje	Fuente	Dato	Clasificación	Puntaje	Fuente
Cantidad importada por año (ton/a)	198,7	Altamente peligroso	4	C	198,7	Altamente peligroso	4	C	418,6	Extremadamente peligroso	5	C	1371,9	Extremadamente peligroso	5	C
Cantidad aplicada en cultivos de piña por año (kg/ha/año)	2 a 3	Mediamente peligroso	2	C	2 a 3	Mediamente peligroso	2	C	2 a 3	Mediamente peligroso	2	C	0 a 1	Ligeramente peligroso	1	C
Solubilidad en agua (20°C) (mg/L)	200	Peligroso	3	A	815	Altamente peligroso	4	A	35,6	Mediamente peligroso	2	A	10500	Extremadamente peligroso	5	A
Coefficiente de reparto octanol-agua (en pH 7, 20°C) (LogP)	2,63	Mediamente peligroso	2	A	1,88	Mediamente peligroso	2	A	2,87	Peligroso	3	A	-3,2	Mediamente peligroso	2	A
Volatilidad 20°C (mPa)	0,365	Mediamente peligroso	2	A	0,041	Mediamente peligroso	2	A	0,00115	Mediamente peligroso	2	A	0,0131	Mediamente peligroso	2	A



Indicadores	Rangos de clasificación			Ametrina			Bromacil			Diuron			Cifosato			
	Dato	Clasificación	Puntaje	Fuente	Dato	Clasificación	Puntaje	Fuente	Dato	Clasificación	Puntaje	Fuente	Dato	Clasificación	Puntaje	Fuente
Persistencia en suelo (días)	37	Peligroso	3	A	60	Peligroso	3	A	146,6	Altamente peligroso	4	A	15	Ligeramente peligroso	1	A
		< 30 = Ligeramente peligroso 30 - 100 = Peligroso 100 - 365 = Altamente peligroso > 365 = Extremadamente peligroso														
Persistencia en agua (días)	28	Peligroso	3	B	30	Peligroso	3	B	8,8	Medianamente peligroso	2	A	9,9	Medianamente peligroso	2	A
		< 1 = Ligeramente peligroso 1 - 14 = Medianamente peligroso 14 - 30 = Peligroso > 30 = Altamente peligroso														
Ecotoxicidad en invertebrados acuáticos (agudos 48 h LC ₅₀ (mg/L))	28	Peligroso	3	A	119	Medianamente peligroso	2	A	5,7	Peligroso	3	A	40	Peligroso	3	A
		> 100 = Medianamente peligroso 0,1 - 100 = Peligroso < 0,1 = Altamente peligroso														
Sumatoria			22				22				23				21	

Nota: La fuente de cada dato se indica con una letra como se especifica seguidamente: (A) University of Hertfordshire, 2019; (B) Pesticide Action Network, 2020; (C) Ramírez, 2017; (D) IRET, 2020.
 Fuente propia de la investigación.



Anexo C. Determinación del insecticida con mayor puntaje para ser utilizado en los bioensayos

Indicadores	Rangos de clasificación	Benfuracarb					Carbaril					Diazinon					Etoprofos				
		Dato	Clasificación	Puntaje	Fuente	Dato	Clasificación	Puntaje	Fuente	Dato	Clasificación	Puntaje	Fuente	Dato	Clasificación	Puntaje	Fuente	Dato	Clasificación	Puntaje	Fuente
Cantidad importada por año (ton/a)	<50 = Ligeramente peligroso 50 - 150 = Peligroso 150 - 400 = Altamente peligroso 400 - 1000 = Extremadamente peligroso	59,3	Peligroso	3	C	71	Peligroso	3	C	718,6	Extremadamente peligroso	5	C	217,2	Altamente peligroso	4	C				
Cantidad aplicada en cultivos de piña por año (kg/ha/año)	0-1 = Ligeramente peligroso 1-2 = Medianamente peligroso 2-3 = Medianamente peligroso 3-4 = Peligroso 4-5 = Altamente peligroso > 5 = Extremadamente peligroso	7 a 8	Extremadamente peligroso	5	C	3 a 4	Peligroso	3	C	4 a 5	Altamente peligroso	4	C	8 a 10	Extremadamente peligroso	5	C				
Solubilidad en agua (20°C) (mg/L)	≤ 50 = Medianamente peligroso 50 - 500 = Peligroso 500 - 1000 = Altamente peligroso > 1000 = Extremadamente peligroso	8,4	Medianamente peligroso	2	A	9,1	Medianamente peligroso	2	A	60	Peligroso	3	A	1300	Extremadamente peligroso	5	A				
Coefficiente de reparto octanol-agua (en pH 7, 20°C) (LogP)	< 2,7 = Medianamente peligroso 2,7 - 3,0 = Peligroso > 3,0 = Altamente peligroso	4,22	Altamente peligroso	4	A	2,36	Medianamente peligroso	2	A	3,69	Altamente peligroso	4	A	2,99	Peligroso	3	A				
Volatilidad 20°C (mPa)	< 5,0 = Medianamente peligroso 5,0 - 10,0 = Peligroso 10,0 = Altamente peligroso	0,0042	Medianamente peligroso	2	A	0,0416	Medianamente peligroso	2	A	11,97	Altamente peligroso	4	A	78	Altamente peligroso	4	A				
Persistencia en suelo (días)	< 30 = Ligeramente peligroso 30 - 100 = Peligroso 100 - 365 = Altamente peligroso > 365 = Extremadamente peligroso	0,5	Ligeramente peligroso	1	A	16	Ligeramente peligroso	1	A	9,1	Ligeramente peligroso	1	A	13,6	Ligeramente peligroso	1	A				



Indicadores	Rangos de clasificación	Benfuracarb			Carbaril			Diazinon			Etoprofos						
		Dato	Clasificación	Puntaje	Fuente	Dato	Clasificación	Puntaje	Fuente	Dato	Clasificación	Puntaje	Fuente				
Persistencia en agua (días)	<1 = Ligeramente peligroso 1 - 14 = Medianamente peligroso 14 - 30 = Peligroso > 30 = Altamente peligroso	-	Ligeramente peligroso	1	D	3,1	Medianamente peligroso	2	A	4,3	Medianamente peligroso	2	A	20	Peligroso	3	A
Ecotoxicidad en invertebrados acuáticos (Agudos 48 h LC ₅₀ (mg/L))	>100 = Medianamente peligroso 0,1 - 100 = Peligroso <0,1 = Altamente peligroso	0,01	Altamente peligroso	4	A	0,0064	Altamente peligroso	4	A	0,001	Altamente peligroso	4	A	0,2	Peligroso	3	A
Sumatoria				22				19				27				28	

Nota: La fuente de cada dato se indica con una letra como se especifica seguidamente: (A) University of Hertfordshire, 2019; (B) Pesticide Action Network, 2020; (C) Ramírez, 2017; (D) IRET, 2020.

Fuente: Propia de la investigación.



Anexo D. Composición del medio de cultivo para hidras, utilizado como control negativo y agua de dilución

Reactivos	En 20,00 litros
Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2,94 g
Ácido N-tris [hidroximetil] metil 1-2- aminoetanosulfónico (TES)	2,20 g
Ácido etilendiamintetraacético (EDTA)	0,08 g
Hidróxido de sodio (NaOH 1N)	Agregar por gotas hasta alcanzar pH 7,00.
Agua Milli-Q®	Hasta aforar en botellón de 20,00 L.

Nota: Fuente: Adaptado de [Trottier et al., 1997](#).



Anexo E. Cambios morfológicos ocurridos a la *Hydra attenuata* en ensayos de toxicidad aguda con dos plaguicidas y la mezcla de estos

Ensayo	Diuron			Etoprofos			Mezcla (diuron - etoprofos)		
	24 h	48 h	Concentración	24 h	48 h	Concentración	24 h	48 h	Concentración
1	9N	9N	Control (-) 100,00 % medio hidra	9N	9N	Control (-) 100,00 % medio hidra	9N	9N	Control (-) 100,00 % medio hidra
	5N, 4S	7N, 1B, 1S	Control solvente 1150,00 mg/L (32,00 % acetona)	7N, 2B	7N, 2B	Control solvente 1060,00 mg/L (0,80 % acetona)	7N, 2B	7N, 2B	Control solvente 1150,00 mg/L
	9N	2N, 2B, 5S	Control (+) 0,00006 mg/L Cr ⁻⁶ 3,13 mg/L	6N, 3B	2N, 5B, 2S	Control (+) 0,00006 mg/L Cr ⁻⁶ 9,09 mg/L	6N, 3B	2N, 5B, 2S	Etoprofos: 1060,00 mg/L Control (+) 0,00006 mg/L Cr ⁻⁶
	8N, 1S	4N, 3B, 2S		9N	8N, 1B		9N	8N, 1B	Duron: 0,53 mg/L Etoprofos: 3,22 mg/L
	4N, 4B, 1S	2N, 3B, 2S, 1T, 1D	6,25 mg/L	9N	7N, 2B	18,18 mg/L	9N	7N, 2B	Duron: 1,05 mg/L Etoprofos: 6,44 mg/L
	1N, 3B, 4S, 1T	1B, 7S, 1T	12,50 mg/L	9N	1N, 8B	36,37 mg/L	9N	1N, 8B	Duron: 2,11 mg/L Etoprofos: 12,88 mg/L
	1S, 5T, 3D	1S, 1T, 7D	25,00 mg/L	9B	4B, 5S	72,73 mg/L	9B	1N, 8B	Duron: 4,21 mg/L Etoprofos: 25,75 mg/L
	7T, 2D	2T, 7D	50,00 mg/L	6S, 1T, 2D	2T, 7D	145,46 mg/L	6S, 1T, 2D	8B, 1S	Duron: 8,42 mg/L Etoprofos: 51,51 mg/L
	9N	9N	Control (-) 100,00 % medio hidra	9N	9N	Control (-) 100,00 % medio hidra	9N	9N	Control (-) 100,00 % medio hidra
	6N, 2B, 1S	7N, 1B, 1S	Control solvente 1150,00 mg/L (32,00 % acetona)	7N, 2B	3N, 6B	Control solvente 1060,00 mg/L (0,80 % acetona)	7N, 2B	3N, 6B	Control solvente 1150,00 mg/L
9N	2N, 7S	Control (+) 0,00006 mg/L Cr ⁻⁶ 3,13 mg/L	7N, 2B	4N, 5B	Control (+) 0,00006 mg/L Cr ⁻⁶ 9,11 mg/L	7N, 2B	4N, 5B	Etoprofos: 1060,00 mg/L Control (+) 0,00006 mg/L Cr ⁻⁶	
9N	7N, 1B, 1T		9N	8N, 1B		9N	8N, 1B	Duron: 0,53 mg/L Etoprofos: 3,22 mg/L	
4N, 5B	3N, 4B, 2S	6,25 mg/L	9N	7N, 2B	18,23 mg/L	9N	5N, 4B	Duron: 1,05 mg/L Etoprofos: 6,44 mg/L	
3B, 6S	9S	12,50 mg/L	9N	2N, 7B	36,46 mg/L	9N	4N, 5B	Duron: 2,11 mg/L Etoprofos: 12,88 mg/L	
1S, 7T, 1D	1S, 2T, 6D	25,00 mg/L	9B	6B, 3S	72,92 mg/L	9B	2N, 7B	Duron: 4,21 mg/L Etoprofos: 25,75 mg/L	
1S, 5T, 3D	1T, 8D	50,00 mg/L	8S, 1D	3T, 6D	145,84 mg/L	8S, 1D	7B, 2S	Duron: 8,42 mg/L Etoprofos: 51,51 mg/L	



Ensayo	Diuron			Etoprofos			Mezcla (diuron - etoprofos)		
	Concentración	24 h	48 h	Concentración	24 h	48 h	Concentración	24 h	48 h
3	Control (-) 100,00 % medio hidra Control solvente 1150,00 mg/L (32,00 % acetona) Control (+) 0,000006 mg/L Cr ⁺⁶ 3,09 mg/L 6,18 mg/L 12,36 mg/L 24,73 mg/L 49,46 mg/L	9N 4N, 5B 9N 9N 5N, 4B 3N, 4B, 2S 1B, 1S, 7T 3T, 6D	9N 7N, 2B 4N, 4B, 1S 7N, 2B 2N, 2B, 5S 2B, 5S, 2T 1S, 8T 9D	Control (-) 100,00 % medio hidra Control solvente 1060,00 mg/L (0,80 % acetona) Control (+) 0,000006 mg/L Cr ⁺⁶ 9,11 mg/L 18,22 mg/L 36,44 mg/L 72,88 mg/L 145,75 mg/L	9N 5N, 1B, 3S 7N, 2B 9N 9N 9N 9B 2T, 7D	9N 3N, 6B 3B, 6S 7N, 2B 6N, 3B 2N, 7B 5B, 4S 9D	Control (-) 100,00 % medio hidra Control solvente Diuron: 1150,00 mg/L Etoprofos: 1060,00 mg/L Control (+) 0,000006 mg/L Cr ⁺⁶ Diuron: 0,53 mg/L Etoprofos: 3,22 mg/L Diuron: 1,05 mg/L Etoprofos: 6,44 mg/L Diuron: 2,11 mg/L Etoprofos: 12,88 mg/L Diuron: 4,21 mg/L Etoprofos: 25,75 mg/L Diuron: 8,42 mg/L Etoprofos: 51,51 mg/L	9N 5N, 4B 6N, 3B 6N, 3B 5N, 4B 5N, 4B 2N, 7B 7B, 2S 4B, 5S	9N 6N, 3B 5B, 4S 5N, 4B 4N, 5B 2N, 7B 1N, 8B 4B, 5S

Nota: N = hidra normal; B = hidra con tentáculos abastionados; S = hidra con tentáculos acortados; T = hidra en estado de tulipán; D = hidra desintegrada.
 Fuente: Propia de la investigación.



Anexo F. Cambios morfológicos ocurridos a la *Hydra viridis* en ensayos de toxicidad aguda con dos plaguicidas y la mezcla de estos

Ensayo	Diuron		Etoprofos		Mezcla (diuron - etoprofos)	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
1	Concentración					
	Control (-)	9N	9N	9N	9N	9N
	100,00 % medio hidra					
	Control solvente	9N	9N	9N	9N	9N
	1150,00 mg/L					
	(32,00 % acetona)					
	Control (+)	1N, 1B, 7S	9S	3N, 3B, 1S	8S, 1D	3N, 4B, 2S
	0,0013 mg/L Cr ⁻⁶					
	6,25 mg/L	9N	9N	9N	9N	9N
	12,50 mg/L	5N, 2B, 2S	6N, 3B	9N	9N	9N
2	25,00 mg/L	1N, 8S	1B, 8S	7N, 2B	6N, 3B	2N, 3B
	50,00 mg/L	7S, 2T	1S, 8T	5N, 4B	9B	2B, 7S
	100,00 mg/L	2S, 7T	6T, 3D	1B, 8S	4B, 5S	9T
	Control (-)	9N	9N	9N	9N	9N
	100,00 % medio hidra					
	Control solvente	9N	9N	9N	9N	9N
	1150,00 mg/L					
	(32,00 % acetona)					
	Control (+)	5N, 4B	9S	1N, 7B, 1S	5S, 2T, 2D	6B, 3S
	0,0013 mg/L Cr ⁻⁶					
6,25 mg/L	9N	9N	9N	9N	9N	
12,50 mg/L	3N, 6B	3N, 6B	9N	9N	9N	
25,00 mg/L	9S	1B, 8S	9N	9N	9N	
50,00 mg/L	9S	1S, 8T	2N, 7B	2N, 3B, 4S	9B	
100,00 mg/L	8T, 1D	1T, 8D	9S	9T	9S	
Concentración						
Control (-)						
100,00 % medio hidra						
Control solvente						
1060,00 mg/L						
(0,80 % acetona)						
Control (+)						
0,0013 mg/L Cr ⁻⁶						
9,09 mg/L						
18,18 mg/L						
36,37 mg/L						
72,73 mg/L						
145,46 mg/L						
Control (-)						
100,00 % medio hidra						
Control solvente						
1060,00 mg/L						
(0,80 % acetona)						
Control (+)						
0,0013 mg/L Cr ⁻⁶						
9,11 mg/L						
18,23 mg/L						
36,46 mg/L						
72,92 mg/L						
145,84 mg/L						



Ensayo	Diuron			Etoprofos			Mezcla (diuron - etoprofos)		
	Concentración	24 h	48 h	Concentración	24 h	48 h	Concentración	24 h	48 h
3	Control (-) 100,00 % medio hidra	9N	9N	Control (-) 100,00 % medio hidra	9N	9N	Control (-) 100,00 % medio hidra	9N	9N
	Control solvente 1150,00 mg/L (32,00 % acetona)	9N	9N	Control solvente 1060,00 mg/L (0,80 % acetona)	9N	9N	Control solvente Diuron: 1150,00 mg/L Etoprofos: 1060,00 mg/L	9N	9N
	Control (+) 0,0013 mg/L Cr ⁶⁺ 6,25 mg/L	1N, 8B	4S, 2T, 3D	Control (+) 0,0013 mg/L Cr ⁶⁺ 9,11 mg/L	2B, 7S	2S, 5T, 2D	Control (+) 0,0013 mg/L Cr ⁶⁺	8B, 1S	5S, 3T, 1D
	12,50 mg/L	9N	9N	9,11 mg/L	9N	9N	Diuron: 1,15 mg/L Etoprofos: 3,22 mg/L	9N	9N
	25,01 mg/L	5N, 4B	7N, 1B, 1S	18,22 mg/L	9N	9N	Diuron: 2,31 mg/L Etoprofos: 6,44 mg/L	7N, 2B	9N
	50,02 mg/L	2B, 7S	1B, 8S	36,44 mg/L	9N	7N, 2B	Diuron: 4,62 mg/L Etoprofos: 12,88 mg/L	4N, 5B	3N, 6B
	100,04 mg/L	9S	1S, 8T	72,88 mg/L	4N, 5B	2N, 7B	Diuron: 9,24 mg/L Etoprofos: 25,75 mg/L	8B, 1S	4B, 5S
		1T, 8D	9D	145,75 mg/L	1B, 8S	9T	Diuron: 18,47 mg/L Etoprofos: 51,51 mg/L	1B, 8S	1S, 8T

Nota: N = hidra normal; B = hidra con tentáculos abastionados; S = hidra con tentáculos acortados; T = hidra en estado de tulipán; D = hidra desintegrada.
 Fuente: Propia de la investigación.



Anexo G. Toxicidad de la mezcla de diuron y etoprofos según EC_{50} para la *Hydra attenuata*

Plaguicida	EC_{50} (mg/L)	LCL (mg/L)	UCL (mg/L)
Diuron	4,24	2,95	6,20
Etoprofos	23,74	16,71	33,91
Diuron mezcla	0,74	0,28	2,47
Etoprofos mezcla	4,55	1,69	15,10
S	0,37	0,19	0,84
Índice aditivo	1,72	4,13	0,19
Rango del índice		(0,19... 1,72... 4,13)	
Interacción		Sinergismo	

Fuente: Propia de la investigación.

Anexo H. Toxicidad de la mezcla de diuron y etoprofos para la *Hydra viridis*

Plaguicida	Según EC_{50}			Según LC_{50}		
	EC_{50} (mg/L)	LCL (mg/L)	UCL (mg/L)	LC_{50} (mg/L)	LCL (mg/L)	UCL (mg/L)
Diuron	13,64	10,48	17,76	36,94	33,19	41,11
Etoprofos	53,12	38,95	72,46	103,01	103,01	103,01
Diuron mezcla	4,06	3,01	5,48	13,45	12,66	14,30
Etoprofos mezcla	11,32	8,40	15,27	37,50	35,31	39,89
S	0,51	0,50	0,52	0,73	0,72	0,74
Índice aditivo	0,96	0,99	0,93	0,37	0,38	0,36
Rango del índice		(0,93... 0,96... 0,99)			(0,36... 0,37... 0,38)	
Interacción		Sinergismo			Sinergismo	

Nota: Fuente propia de la investigación.