



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETERMINACIÓN DE CAMBIOS FISIOLÓGICOS DEL GÉNERO  
NECTOPSYCHE (LEPTOCERIDAE: TRICHOPTERA) EN PRESENCIA DE  
AGUAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLIFOSATO

AUTOR

Cristian Iván Sánchez Vínces

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETERMINACIÓN DE CAMBIOS FISIOLÓGICOS DEL GÉNERO  
*NECTOPSYCHE* (LEPTOCERIDAE: TRICHOPTERA) EN PRESENCIA DE  
AGUAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLIFOSATO

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniero Ambiental en Prevención y  
Remediación

Profesor Guía

Ph.D. Christian Patricio Villamarín Flores

Autor

Cristian Iván Sánchez Vincés

Año

2018

## **DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA**

"Declaro haber dirigido el trabajo, Determinación de cambios fisiológicos del género *Nectopsyche* (Leptoceridae: Trichoptera) en presencia de aguas con diferentes concentraciones de glifosato, a través de reuniones periódicas con el estudiante Cristian Iván Sánchez Vincés, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Christian Patricio Villamarín Flores

Doctorado en Ecología

CI: 1002339404

## **DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR**

"Declaro haber revisado este trabajo, Determinación de cambios fisiológicos del género *Nectopsyche* (Leptoceridae: Trichoptera) en presencia de aguas con diferentes concentraciones de glifosato, de Cristian Iván Sánchez Vincés, en el semestre 2018-1 dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación"

---

Blanca Patricia Ríos Touma

Doctora en Ecología

CI: 1707113765

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

---

Cristian Iván Sánchez Vinces

CI: 1724598667

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco profundamente a mi familia, por el apoyo, ejemplo y amor incondicional que siempre me han brindado a lo largo de mis aventuras y proyectos.

A mi profesor guía, Dr. Christian Villamarín, por sus enseñanzas, paciencia, tiempo y apoyo incondicional

A la Dra. Blanca Ríos Touma, por sus consejos y apoyo en el desarrollo de este trabajo

A Carlos Reyes, Constanza Carvajal y Nicole Cerón por su gran colaboración para realizar este proyecto.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, porque el sentido de la vida, el universo, y todo lo demás es 42.

## RESUMEN

En el presente estudio se diseñaron microcosmos (sistemas cerrados) para determinar el nivel de afección sobre la producción primaria y un consumidor primario como el macroinvertebrado acuático del género *Nectopsyche* (Leptoceridae: Trichoptera). Para el experimento los organismos fueron expuestos a diferentes concentraciones de glifosato (0, 50, 200 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), simulando la presencia del contaminante en ríos o arroyos en forma residual en lugares cercanos a zonas de aplicación de este herbicida. Para analizar el efecto sobre la producción primaria se realizó la cuantificación de clorofila  $\alpha$  a las 24, 48 y 72 horas. Donde se registró que el tratamiento de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  presentó reducción drástica en términos de producción primaria a las 48 horas, sin embargo, en los tratamientos de 200 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  se observó un incremento en la turbidez que estaría relacionado a la disponibilidad de fósforo que aportó el glifosato al medio, no obstante, a las 96 horas la mayoría de la producción primaria estaba compuesta por feofitina. Para la determinación de los efectos sobre *Nectopsyche* sp. se realizaron mediciones de los cambios como: peso del individuo, ancho de la cabeza, formación de pupas, movilidad y mortalidad. En el aspecto físico, se observó un incremento de peso significativo en el tratamiento de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , mientras que el ancho de cabeza lo fue en todos los tratamientos (50, 200 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). La emergencia de los organismos no se dio durante el tiempo que duró el experimento, sino hasta 2 meses después de su recolección. En términos de mortalidad, el tratamiento de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  fue donde se registró el mayor número de organismos muertos al inicio del experimento (hasta las 48 horas), y al final del experimento, el tratamiento de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  presentó una tasa de mortalidad del 67.5% y la movilidad más baja entre los tratamientos. En conclusión, se observó que a una concentración mayor de glifosato se generaron cambios como el aumento en la turbidez lo que se relacionó a la producción primaria (incremento de feofitina). Además, el efecto sobre el consumidor primario se reflejó en diferencias en el ancho de la cabeza y peso del individuo, debido a que el herbicida a concentraciones no tóxicas podría actuar como fuente de fósforo. Además, la movilidad se vio reducida a mayor concentración y tiempo.



## ABSTRACT

In the present study, microcosms (closed systems) were designed to determine the level of affection on the primary production and the primary one as the aquatic macroinvertebrate of the genus *Nectopsyche* (Leptoceridae: Trichoptera). For the purpose of the cases, they were exposed to different concentrations of glyphosate (0, 50, 200 and 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), simulating the presence of the contaminant in rivers or streams in a residual form in places near areas of application of this herbicide. To analyze the effect on primary production, chlorophyll was quantified at 24, 48 and 72 hours. Where the treatment of 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  was recorded, there was a drastic reduction in the terms of primary production at 48 hours, however, in the treatments of 200 and 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  an increase in turbidity was registered that would be related to the availability of phosphorus that contributed the brightness to the medium, however, at 96 hours most of the primary production was composed of pheophytin. For the determination of the effects on *Nectopsyche* sp. Measurements of changes were made as weight of the individual, head width, pupal formation, mobility and mortality. In the physical aspect, the weight of 500 g  $\text{L}^{-1}$ , while the width of the head went in all treatments (50, 200 and 500 g  $\text{L}^{-1}$ ). The emergence of the organisms did not occur during the time that lasted the time, but until 2 months after their collection. In terms of mortality, the treatment of 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  was where the highest number of deaths was recorded at the beginning of the cycle until 48 hours, and at the end of the cycle, the treatment of 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  presented a mortality rate 67.5% and the lowest mobility between treatments. In conclusion, it was observed that at a higher concentration of glyphosate, changes were generated such as the increase in turbidity that was related to primary production (increase in pheophytin). In addition, the effect on primary consumption is reflected in the differences in head width and weight of the individual, because the herbicide at non-toxic concentrations acts as a source of phosphorus. In addition, mobility is reduced to a greater concentration and time.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Alcance .....	3
1.3 Justificación .....	3
1.4 Objetivos.....	4
1.4.1 Objetivo General.....	4
1.4.2 Objetivos Específicos .....	4
1.5 Hipótesis.....	5
1.5.1 Alternativa.....	5
1.5.2 Nula .....	5
2. MARCO TEÓRICO .....	5
2.1 Glifosato.....	5
2.2 Situación Actual sobre el uso de glifosato en el Ecuador .....	7
2.3 Macroinvertebrados como bioindicadores.....	8
2.4 Métodos de experimentación con comunidades acuáticas .....	10
2.5 Orden Trichoptera, organismo que registra cambios en el medio .....	14
2.6 Género <i>Nectopsyche</i> .....	15
2.7 Descripción de <i>Nectopsyche</i> sp. y su ciclo de vida.....	16
2.7.1 Huevos .....	16
2.7.2 Larva.....	16
2.7.3 Pupa .....	18
3. METODOLOGÍA.....	18
3.1 Diseño del plan experimental metodología .....	18
3.2 Construcción e infraestructura.....	20
3.2.1 Infraestructura para la experimentación .....	20

3.3	Experimentación .....	21
3.3.1	Área de muestreo .....	21
3.3.2	Toma de muestras de agua y adaptación de los productores primarios .....	22
3.3.3	Cuantificación de clorofila $\alpha$ de algas bentónicas .....	23
3.3.4	Toma de individuos de experimento .....	24
3.3.5	Peso del individuo.....	25
3.3.6	Ancho de la cabeza del individuo .....	25
3.3.7	Mortalidad.....	26
3.3.8	Número de individuos que establecen pupas .....	26
3.3.9	Movilidad de los individuos .....	26
3.4	Análisis de datos.....	26
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
4.1	Resultados .....	27
4.1.1	Efectos sobre la producción primaria: Mediciones de Clorofila $\alpha$ .....	27
4.1.2	Turbidez.....	29
4.1.3	Efectos sobre el consumidor primario <i>Nectopsyche sp.</i> .....	30
4.1.3.1	Peso del individuo .....	30
4.1.3.2	Ancho de la cabeza del individuo.....	31
4.1.3.3	Individuos que empupan .....	33
4.1.3.4	Mortalidad .....	33
4.1.3.5	Movilidad.....	34
4.2	Discusión.....	35
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	39
5.1	Conclusiones.....	39
5.2	Recomendaciones.....	39
	REFERENCIAS .....	41
	ANEXOS .....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de escalas en tiempo y volumen entre las diferentes unidades experimentales .....	11
Figura 2. Macroinvertebrado acuático género Nectopsyche sp.....	15
Figura 3. Hembra adulta Nectopsyche sp. depositando huevos .....	16
Figura 4. Casas de Nectopsyche sp. a diferentes resoluciones .....	17
Figura 5. Crecimiento de Nectopsyche albia y su diferenciación del tamaño de cabezas. ....	18
Figura 6. Diseño Experimental, donde se explica las concentraciones usadas en el experimento y sus réplicas .....	19
Figura 7. Microcosmos en funcionamiento .....	21
Figura 8. Río Alambi, sitio de recolección de los macroinvertebrados acuáticos. ....	22
Figura 9. Cerámicas de 6.5x2 cm, usados para la cuantificación de clorofila $\alpha$ de algas bentónicas. ....	23
Figura 10. Medición del ancho de la cabeza que se relaciona con el crecimiento del tricóptero. ....	25
Figura 11. Concentración de clorofila $\alpha$ en diferentes tratamientos a las 24, 48 y 72 horas de muestreo. ....	28
Figura 12. Turbidez de los tratamientos a las 0 y 96 horas.....	30
Figura 13. Peso neto de los tratamientos .....	31
Figura 14. Mean box del ancho de la cabeza del individuo.....	32
Figura 15. Crecimiento neto del ancho de la cabeza de los tratamientos.....	33
Figura 16. Gráfico de supervivencia de los 160 individuos en horas en función de su supervivencia acumulada.....	34
Figura 17. Movilidad de los individuos en los diferentes tratamientos.....	35

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

Los herbicidas representan el 49% del mercado mundial de pesticidas, siendo el glifosato el más común en la agricultura y a nivel doméstico; seguido del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Atwood & Paisley-Jones, 2017). El glifosato fue uno de los primeros herbicidas de ser usados con cultivos modificados genéticamente (ej. Soya, maíz, algodón). Desde su comercialización en 1974, su volumen de aplicación ha aumentado aproximadamente 100 veces (Woodburn, 2000).

Los informes de ventas y uso de EPA (1984 - 2017), registra que el uso del glifosato aumentó más rápido y más sustancialmente que cualquier otro pesticida. Los datos publicados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), el Servicio Geológico de los Estados Unidos (USGS) y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) muestran que en los últimos 10 años se aplicó el 66% del volumen total producido desde 1974 (Atwood y Paisley-Jones, 2017; Grube, Donaldson, Kiely, y Wu, 2011; Myers et al., 2016).

En marzo del 2015, la Organización Mundial de la Salud clasificó al glifosato como probablemente cancerígeno para humanos (Grupo 2A), basándose en estudios de exposiciones abiertas en Estados Unidos, Canadá y Suecia (International Agency for Research on Cancer, 2014). Igualmente se corroboró en estudios de animales en laboratorio con el resultado de que puede causar cáncer, provocar afectación a nivel genético y daño a células (Mesnage, Defarge, Spiroux de Vendômois, y Séralini, 2015).

Myers et al. (2016) realizaron un estudio sobre los usos de glifosato, los mecanismos de acción, y la toxicidad en animales de laboratorio. También examinaron la derivación de los estándares de seguridad humana actuales. Concluyeron que las estimaciones reglamentarias de la ingesta diaria tolerable

de glifosato en los Estados Unidos y la Unión Europea se basan en una ciencia obsoleta, y recomiendan estudios epidemiológicos, biomonitoreo y toxicología para la actualización del riesgo asociado con la exposición.

Los estudios de glifosato en la salud humana son extensos debido a su uso en la agricultura (Duke y Powles, 2008). Investigaciones de presencia residual de glifosato en granos de soya transgénica registran concentraciones de 0.1 a 1.8 mg kg<sup>-1</sup> (Arregui et al., 2004), que posteriormente es consumido por la población. Es por esto que se han realizado estudios sobre el posible daño en células, afecciones al sistema endocrino y posible daño teratogénico en humanos (Koller et al., 2012; Paganelli, Gnazzo, Acosta, López, y Carrasco, 2010; Paz-y-Miño et al., 2011; Vila-Aiub et al., 2008). No obstante, Rico, Scoppetta, Alzate y Ferro (2016) hacen una revisión de los estudios realizados con este contaminante y concluye que, de 32 estudios revisados de los efectos del glifosato, 16 fueron en humanos, 8 fueron en células, 7 en animales, y 1 en ecosistemas. Lo que evidencia una falta de conocimiento de los efectos en el ambiente y sus organismos, tanto terrestres como acuáticos.

La investigación sobre los efectos del glifosato a distintos niveles de organización de comunidades biológicas (ej. algas, anfibios, bacterias, mamíferos, peces, etc.) se ha desarrollado en los últimos 15 años. Sin embargo, el estudio en ecosistemas acuáticos representa una proporción pequeña versus temas de salud o en el campo de la dinámica del glifosato y su permanencia en los compartimentos ambientales (aire, agua, suelo) (Comes, Bruns, y Kelley, 1976; Frank y Hodgson, 1967; Newton et al., 1984; Sihtmäe et al., 2013; Zaranyika y Nyandoro, 1993).

En el Ecuador los estudios realizados de glifosato han estado dirigidos por Paz y Miño (2007, 2011 y 2015), los cuales han permitido obtener información en temas de genética y salud sobre poblaciones que estuvieron en contacto con glifosato por un periodo de 15 años. Este investigador registra un aumento de abortos, incidencia de diversos tipos de cáncer, mortalidad infantil, patologías en ojos y piel (Paz y Miño, 2015).

El Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales con el Instituto Nacional de Biodiversidad (INABIO) desarrollan el proyecto: “EFECTOS DE LA ASPERCIÓN DEL GLIFOSATO SOBRE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA EN LA ZONA FRONTERIZA CON COLOMBIA”, los cuales han publicado guías visuales de aves y peces, pero no se incluye datos sobre el efecto del glifosato en la biodiversidad (Garzón, Valenzuela, Olmedo, Román, y Proaño, 2017; Valdiviezo-rivera, 2017; Yáñez-muñoz, Altamirano, y Oyataga, n.d.).

Ante lo expuesto anteriormente, y la falta de datos sobre el efecto del glifosato en los trópicos, nos planteamos las siguientes preguntas de investigación: ¿Cómo estas concentraciones residuales afectarían la ecología de ríos o arroyos? y ¿Cuál podría ser su grado de afección en productores primarios y consecuentemente en la cadena trófica?

## **1.2 Alcance**

Este estudio presenta el diseño, la construcción y experimentación en ambientes acuáticos controlados (microcosmos) donde los productores primarios y el macroinvertebrado acuático *Nectopsyche sp.* (Trichoptera) se expusieron a diferentes concentraciones del glifosato para determinar efectos letales y subletales.

Se analizó las repercusiones que podrían tener el glifosato en los productores primarios como las algas bentónicas y un triturador como *Nectopsyche sp.*, debido que el herbicida es usado en zonas cercanas a ríos o arroyos, y podrían tener un efecto en la producción primaria y llegar afectar al organismo en su ciclo de vida como un aumento/pérdida de peso o incidir en la mortalidad. La observación de las variables permitió obtener la información de los efectos del glifosato en dos niveles de organización biológica en un ambiente controlado.

## **1.3 Justificación**

El glifosato es el herbicida con mayor aplicación en el mundo, siendo la agricultura el campo de mayor uso. El glifosato está clasificado como un

probable cancerígeno para humanos por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (2015). El uso del glifosato en cultivos transgénicos ha permitido el desarrollo de investigaciones sobre posibles efectos en la salud humana (Mesnage, Defarge, Spiroux de Vendômois, y Séralini, 2015; Myers et al., 2016; Paz-y-Miño et al., 2007; Williams, Kroes, y Munro, 2000). Sin embargo, la información de los efectos sobre los organismos que habitan zonas de afectación indirecta como son bosques aledaños y cuerpos de agua cercanos a las zonas agrícolas (Van Bruggen et al., 2018).

Si bien la aplicación del glifosato se da en zonas aledañas a ríos o arroyos, factores como escorrentía o transporte aéreo hacen que los cuerpos hídricos sean afectados por concentraciones residuales del contaminante (Popp et al., 2008). Sin embargo, los estudios son escasos sobre el efecto que este compuesto químico tiene sobre las comunidades biológicas de los ríos y la cadena trófica (Magbanua, 2012). Sin conocer el nivel de afección que podría tener en los productores primarios, como las algas bentónicas y los efectos que podría tener sobre los niveles superiores de las cadenas tróficas.

Este estudio pretende desarrollar un experimento donde se pueda comprender los efectos del glifosato sobre la producción primaria y un consumidor. Esta información pretende apoyar en la elaboración de acciones en los ríos que podrían tener influencia del herbicida usado en zonas agrícolas.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo General**

Determinar los cambios fisiológicos del género *Nectopsyche* sp. en presencia de aguas con diferentes concentraciones de glifosato

### **1.4.2 Objetivos Específicos**

Establecer un diseño experimental para las variables concentración de glifosato y tiempo.



Cuantificar los cambios de la producción primaria en las diferentes concentraciones de glifosato

Medir cambios letales y subletales que manifiesta el género *Nectopsyche* sp. a las diferentes concentraciones de glifosato

## **1.5 Hipótesis**

### 1.5.1 Alternativa

El aumento de las concentraciones de glifosato afecta a los productores primarios y por lo tanto al ciclo de vida de *Nectopsyche* (Leptoceridae: Trichoptera)

### 1.5.2 Nula

El aumento de las concentraciones de glifosato no afecta a los productores primarios y por lo tanto al ciclo de vida de *Nectopsyche* (Leptoceridae: Trichoptera)

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Glifosato**

El glifosato fue descubierto por el químico suizo Henri Martin en 1950, que formaba parte de la compañía Gilag, la cual al no tener una aplicación para la empresa no publicó registró o patente del glifosato (Dill et al., 2010). En el año de 1970, Monsanto desarrolla y patenta el glifosato bajo el nombre de Roundup, ingresando al mercado en 1974 y mostrando grandes beneficios para 100 cultivos como herbicida de amplio espectro de aplicación foliar (Dill, 2005).

Desde la comercialización en 1974, solo en Estados Unidos se ha utilizado 1.8 millones de toneladas métricas de las 9.4 millones de toneladas métricas que se usaron a nivel mundial (Benbrook, 2016), lo que alcanzaría para esparcir media libra en cada metro cuadrado de cultivo del mundo. En el año 2000 sus patentes caducaron, y fábricas alrededor del mundo comenzaron con la producción genérica del Roundup, aumentando el volumen de producción, bajando costos y siendo más accesible a los mercados. Los centros de mayor producción por volumen anual se encuentran en China e India, sin tomar en cuenta a Monsanto con sus distintos centros de producción a nivel mundial: Bélgica, Argentina, Brasil y Malasia (Woodburn, 2000).

El glifosato es considerado uno de los herbicidas menos tóxicos (Duke y Powles, 2008), aunque en su ficha de seguridad se cataloga como “peligroso para ambientes acuáticos (tóxico para vida acuática y larga duración de efectos)” (Bruggen y Jr, 2017; World Health Organization, 2010). Ante esto se han desarrollado estudios sobre pesticidas basados en glifosato, por las propiedades de ser posibles causantes de efectos adversos hacia humanos, por ejemplo: precursores de cáncer (U.S. EPA, 1993), necrosis en células hepáticas (Mesnage et al., 2015; Zouaoui, Dulaurent, Gaulier, Moesch, y Lachâtre, 2013), afecciones a células embrionarias (Paganelli et al., 2010), entre otros.

En marzo del 2014 la Organización Mundial de la Salud lo clasificó como probablemente cancerígeno para humanos (Grupo 2A), basándose en estudios de exposiciones abiertas en Estados Unidos, Canadá y Suecia. Adicionalmente, se corroboró en estudios con animales de laboratorio con el resultado de que pueden ser posibles causante de cáncer, con afectaciones a nivel genético y daño celular (Govindarajulu, 2008; International Agency for Research on Cancer, 2014).

En cuanto a su uso y manejo, estudios realizados en cultivos de *Ambrosia artemissifolia*, *Ambrosia trifid*, *Amaranthus palmer*, *Amaranthus rudis* y

*Amaranthus tuberculatus*, se demostró que los cultivos desarrollan resistencia al glifosato (C. Boerboom et al., 2013; C. M. Boerboom y Wyse, 1988), lo que ha provocado el aumentando en el volumen aplicado en los campos y acumulación en suelo con afecciones a la biota (Sihtmäe et al., 2013). Teniendo en cuenta que la vida media en el suelo varía desde 30 días hasta los 1000 días las afectaciones a otros recursos ambientales, como es el agua, podrían darse gracias a la acción del clima (viento, escorrentía, infiltración, etc) (De Andréa et al., 2003).

En investigaciones realizadas por la Universidad de Olabisi Onabanjo de Nigeria, se encontró signos de acumulación de glifosato en los hígados de peces, alteraciones en el epitelio de las branquias y necrosis focal en los hepatocitos.m, en un tiempo de 42 días con concentraciones a 0.05% v/v y 0.1% v/v de exposición (Olurin, Mbaka, y Agbato, 2016), no obstante, el conocimiento sobre el resto de organismos que habitan los ríos es escaso, así como la presencia y cantidad en los distintos sistemas.

## **2.2 Situación Actual sobre el uso de glifosato en el Ecuador**

El uso del glifosato en Ecuador se da hace más de 35 años. Ingresó en el mercado como una alternativa de menor toxicidad como herbicida seguro y de rápida degradación. Debido a su amplio espectro como herbicida y eficiencia su uso está presente en las regiones de Costa, Sierra y Amazonia con diversas plantaciones como cacao, café, caña de azúcar, banano, tomate, palma africana, etc (Rios, 2013, p. 145).

Ecuaquímica, empresa que se dedica a la comercialización de insumos agrícolas, el consumo de glifosato es de 4 millones de litros anuales en el Ecuador, con un rendimiento de 3 litros/hectárea (Paz y Mino, 2015; Rios, 2013). Su uso como madurante en cultivos de caña azúcar para la acumulación de sacarosa se ha hecho una práctica habitual debido a su bajo costo en comparación del nitrato de potasio (Kouamé et al., 2017). Esto resulta en que las especies alrededor de cultivos estén expuestos a niveles estrés y

desarrollen un nivel moderado de resistencia al herbicida (Manalil, Busi, Renton, y Powles, 2011). La falta de capacitación técnica en el manejo de los herbicidas y las malas prácticas agrícolas, han provocado que un 49.1% de los agricultores sufran algún síntoma en contra de su salud relacionado con pesticidas, herbicidas e insecticidas (Hurtig et al., 2003).

En el año 2000, Colombia con Estados Unidos, en operación conjunta, ponen en marcha el plan Colombia, el cual entre sus objetivos tenía la erradicación de campos de cultivo de coca y amapola utilizados para producir cocaína y heroína respectivamente (Herrera, 2015). Estas fumigaciones se llevan a cabo por aviones que esparcían un cóctel de químicos que incluía al glifosato que duró hasta el año 2015. Las aspersiones cayeron en bosques, cuerpos hídricos, animales y personas de la zona. Se realizó un estudio en 24 individuos expuestos y 21 no expuesto, donde se concluyó que las personas expuesta al glifosato presentaron daños genotóxicos (Paz-y-Miño et al., 2007).

### **2.3 Macroinvertebrados como bioindicadores**

Dentro de los niveles de organización de estudio de comunidades bentónicas expuestas a xenobióticos tenemos dos macro niveles: los biomarcadores, donde hay una perturbación y el individuo presenta una respuesta fisiológica o etológica, y el segundo macro nivel es de bioindicadores, el cual se toma a los cambios a la exposición que sufre la comunidad y la respuesta al ecosistema (Adams, 2002).

Los macroinvertebrados bentónicos, especialmente los insectos acuáticos, representan un grupo de organismos de elección utilizado en los programas de monitoreo biológico (Phillips y Rainbow, 1994). Los macroinvertebrados dentro del mismo sistema pueden ser residentes durante varios meses a varios años, dependiendo de la vida del organismo en particular. Por lo tanto, las comunidades de macroinvertebrados residen en un sistema acuático el tiempo suficiente para reflejar los efectos crónicos de los contaminantes, sin embargo,

lo suficientemente cortos como para responder a los cambios relativamente agudos en la calidad del agua. A diferencia de los peces, estas poblaciones tienden a ser relativamente inmóviles, y como resultado están continuamente expuestas a los constituyentes de las aguas superficiales que habitan. Además, son herramientas excelentes para evaluar la calidad del agua porque son extremadamente diversos, lo que permite una amplia gama de sensibilidad y respuestas a factores estresantes como metales, nutrientes y sedimentos (Gamboa, Reyes, y Arrivillaga, 2008; Ladrera, 2012; Perez, 2003). Por lo tanto, debido a la movilidad limitada de los macroinvertebrados y su relativa incapacidad para alejarse de las condiciones adversas, la ubicación de las fuentes crónicas de contaminación a menudo se puede determinar mediante la comparación de las comunidades de estos organismos para conocer el estado ecológico de un río (Armanini, Horrigan, Monk, Peters, y Baird, 2011; Bagatini, Delariva, y Higuti, 2012; Milani, Reynoldson, Borgmann, y Kolasa, 2003).

Se han desarrollado varias metodologías que nos ayudan a ver los cambios ecológicos a nivel de comunidad, dentro de estas metodologías una de las más reconocidas es el índice *Biomonitoring Working Party* (BMWP) de origen inglés (Hawkes, 1998). Este asigna un valor a la tolerancia de los macroinvertebrados con relación a cambios en el medio en el que habitan, esta metodología asigna valores en un rango de 1 a 10, siendo 1 la valoración de los organismos más tolerantes, y 10 a los organismos más sensibles a estos cambios (Hawkes, 1998). A partir de este índice se han desarrollado metodologías con el principio de la sensibilidad de la comunidad hacia los contaminantes, con adaptaciones como la inclusión de especies endémicas en diferentes partes del mundo como: BMWP/Col con aplicación en Colombia (Perez, 2003); SIGNAL2, de uso australiano (Chapman, 1992); ABI, para ríos de zonas alto andinas para la evaluación de condición biológica del río (Ríos-Touma, Acosta, y Prat, 2014)

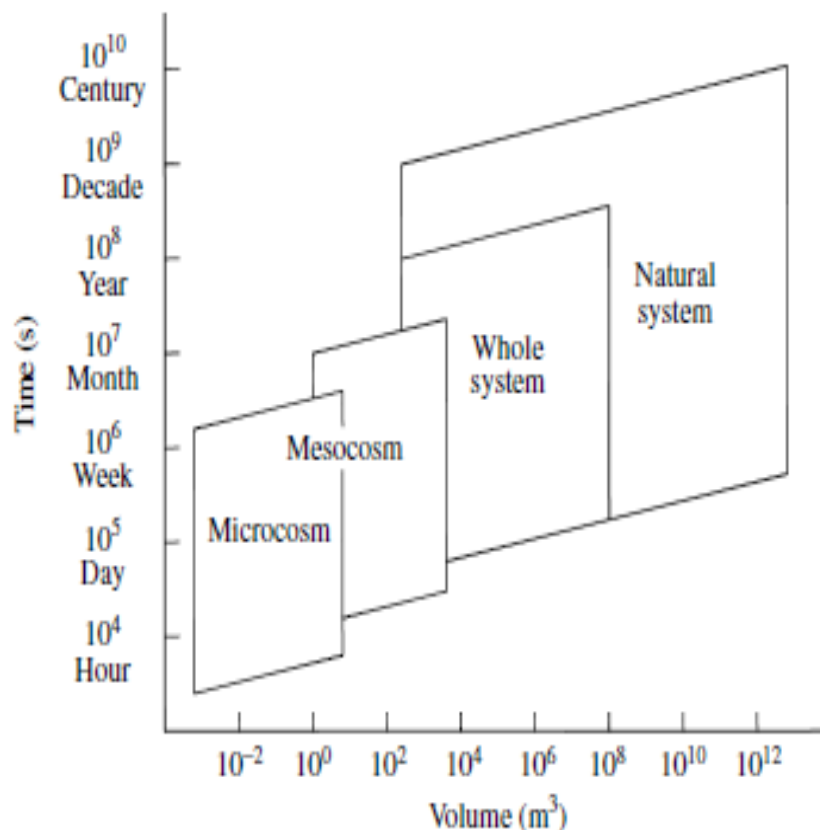
Las deformidades de los macroinvertebrados se han utilizado con frecuencia como puntos finales ecotoxicológicos en casos de problemas ambientales heredados (Sánchez-Montoya, Vidal-Abarca, y Suárez, 2010). En estudios

previos se ha utilizado biomarcadores moleculares para poder obtener una mejor resolución sobre el estrés que los individuos están sometidos a distintas permutaciones como la salinidad (Sala et al., 2016).

## **2.4 Métodos de experimentación con comunidades acuáticas**

El objetivo de una prueba ecotoxicológica es proporcionar información sobre el potencial impacto de una sustancia química en un ecosistema (Lamberti & Steinman, 1993). El enfoque de un modelo de ecosistema es imitar el sistema natural de una manera que la respuesta se puede observar en el sistema. Sin embargo, un modelo nunca puede ser idéntico al mundo real con respecto a todas las propiedades significativas (Ej: tamaño, escala de tiempo, condiciones de flujo, complejidad, composición, prehistoria) y, por lo tanto, deben ser aproximaciones al sistema natural. Mesocosmos y microcosmos, son diseños de ecosistemas que no buscan maximizar el realismo, sino asegurarse de que se pueda obtener información ecológicamente relevante (Landner, 1989).

Los dos enfoques principales para el modelo de pruebas de ecosistemas son útiles pero con propósitos algo diferentes: el "ecosistema completo" o el mesocosmo, tiene un enfoque cuando se necesita un alto grado de realismo ecológico en los estudios a largo plazo de destino y efectos de un contaminante; la comunidad extirpada o microcosmos, se enfoca cuando se requieren alta flexibilidad, simplicidad y alta capacidad de prueba, por ejemplo, para estudios explicativos del modo de acción de un contaminante (Bergen et al., 2016; Lamberti y Steinman, 1993; Odum, 1984).



*Figura 1.* Comparación de escalas en tiempo y volumen entre las diferentes unidades experimentales.

Tomado de Kangas, 2005, p. 118.

El sistema artificial, que alberga comunidades acuáticas para someterlas a experimentación en sistemas abiertos es llamado mesocosmos. Estos pueden ser ríos o arroyos artificiales que recrean condiciones naturales que se dan en un río (Odum, 1984; Petersen y Englund, 2005). Presentan ventajas como el cambio de variables o aislamiento de parámetros que busca el experimento extrapolando los resultados a situaciones reales, al igual la replicabilidad bajo las mismas condiciones (Lamberti y Steinman, 1993).

Los mesocosmos, como espacios experimentales funcionan en la comprensión de sistemas naturales de alto grado de realismo (Warren y Davis, 1971). Sus usos se han visto en estudios en la exploración de factores y procesos en

comunidades bentónicas como: determinación del grado de toxicidad de sustancias químicas y sus interacciones con sujetos no objetivos como por ejemplo pesticidas, fungicidas (Colville et al., 2008), salinidad, falta de oxígeno y su efecto en la cadena trófica (Grantham, Cañedo-Argüelles, Perrée, Rieradevall, y Prat, 2012). Las dimensiones de estos espacios artificiales de experimentación pueden variar en forma y tamaño (Figura 1); pueden estar localizados dentro de un laboratorio, o la proximidad de un río con toma de captación (Petersen y Englund, 2005). Las posibilidades de diseño se rigen al experimento, condiciones y variables que se requiere en la investigación, ya que por su escala se puede representar de mejor manera procesos en una forma más natural (Lamberti y Steinman, 1993).

Microecosistemas o microcosmos son relativamente pequeños, sistemas cerrados o semi cerrados en comparación a los mesocosmos. Estas diferencias, el tamaño reducido y su aislamiento, son las que hacen que estas herramientas formen parte de estudios en espacios reducidos (Kangas, 2005, p. 117). La primera vez que se menciona la palabra microcosmos proviene del uso como metáfora hacia las islas como unidades experimentales (Forbes, 1887). A inicio de la década de los 50, varios ecólogos comenzaron a replicar “piezas de la naturaleza” en sus laboratorios para sus estudios y manejar las condiciones de borde que se requerían (Kangas, 2005). Estos generalmente estaban contenidos en acuarios, recipientes o frascos, y fueron llamados ecosistemas artificiales o acuarios balanceados. Sin embargo, con el tiempo se llegó a conocer como microcosmos (Mitsch, Beyers, y Odum, 1995).

Los primeros estudios de microcosmos se ocuparon en aguas residuales y desechos industriales en un esfuerzo por mejorar el tratamiento del agua. Esto fue seguido usando microcosmos para estudiar el destino y la acción de los pesticidas, metales y otras toxinas en sistemas acuáticos y terrestres. Como ventaja técnica se menciona la no aplicación al medio ambiente y la facilidad de estudiar procesos simples en espacios reducidos (Mitsch et al., 1995). El rango de uso va desde experimentos simples como la aplicación de diferente energía



foto lumínica hacia plantas para cuantificar la biomasa que se produce, hasta el Ecotron®, que es una plataforma de 70 m<sup>2</sup> que se usa en dinámica de poblaciones y estudios no fotosintéticos creada en el 2014 (Montpellier European Ecotron, 2014). El número de artículos científicos sobre microcosmos se ha triplicado desde el año 1990, ilustrando la importancia que tiene como herramienta de investigación en diversos campos (Benton, Solan, Travis, & Sait, 2007; Culp, Podemski, Cash, & Lowell, 2000; Matamoros, Caselles-Osorio, García, & Bayona, 2008; Schulz, Thiere, & Dabrowski, 2002; Sperling & Lortie, 2010)

Tabla 1.

*Características de los Microcosmos y Mesocosmos.*

<b>Comparación entre Microcosmos y Mesocosmos</b>	
	<u>Ventajas</u>
Microcosmos	Pequeño, con más réplicas Usualmente usado en laboratorio con gran control del ambiente  Más fácil para análisis de las pruebas
	<u>Desventajas</u>
	Usado más con una sola especie Tiempo de experimentación cortos Baja confianza en la extrapolación de resultados
	<u>Ventajas</u>
Mesocosmos	Frecuentemente usado al aire libre con luz y temperatura ambiental Escala realística en factores ambientales Máxima confianza en extrapolación a sistemas de larga escala Provee resultados más reales al incorporar procesos complejos y largos
	<u>Desventajas</u>
	Pocas réplicas Espacio necesario en el laboratorio Costo operativo

Adaptado de Kangas, 2005, p. 119.

## 2.5 Orden Trichoptera, organismo que registra cambios en el medio

Actualmente hay 15000 especies descritas siendo el segundo grupo de animales acuáticos más diverso, superado solo por el clado Diptera (Malm, Johanson, y Wahlberg, 2013). Los trichopteros son insectos holometábolos que están relacionados con los lepidópteros y los adultos asemejan pequeñas polillas, con la diferencia en las piezas bucales (Springer, 2010). Este orden tiene la particularidad de desarrollarse en ecosistemas acuáticos en los cuales se encuentren con un nivel adecuado de oxigenación y son muy susceptibles a cambios antropogénicos como: aumentos/disminución de nutrientes, temperatura, pH. Por lo que se consideran indicadores biológicos en temas de calidad de agua en todo el mundo (Chang, Lawrence, Rios-Touma, y Resh, 2014).

Su ciclo de vida se comprende en 4 estadios: Huevos, larvas, pupas y adultos. El estado larvario y pupa son los de mayor tiempo toman, y se desarrollan en el medio acuático. Los adultos son terrestres, son activos por la noche y atraídas por la luz presentando colores de tonalidades como cafés, grises o amarillas, usualmente usadas como camuflaje (R.W. Holzenthal, Thomson, & Ríos-Touma, 2015). Sus huevos son puestos en hábitats húmedos o cerca de los ríos y eclosionan en periodos calientes (Holzenthal y Flint O.S., 1997). En algunas especies, por ejemplo, Rhyacophilidae, los huevos se ponen individualmente en grietas de rocas o madera sumergida (R.W. Holzenthal et al., 2015).

La categorización del grupo funcional alimenticio está basada en la morfología de la boca y la alimentación por su comportamiento. La clasificación de los organismos en grupos de alimentación funcionales a veces es compleja, ya que pocas especies se alimentan exclusivamente de un solo alimento. La mayoría de las especies utilizan una amplia gama de alimentos (Graf, Murphy, Dahl, Zamora-Munoz, y Lopez-Rodriguez, 2008) y muchas especies cambian su dieta durante sus estadios, mientras algunos son alimentadores oportunistas y otros presentan necesidades nutricionales no especificadas (Moog, Resources,

y Vienna, 2002). La clasificación propuesta por Moog (2002) de los grupos funcionales de alimentación de los tricópteros son: raspadores (Hydroptilidae, Glossosomatidae y Xiphocentronidae), mineros, trituradores (Leptoceridae), recolectores / colectores (Calamoceratidae, Lepidostomatidae), filtradores pasivos/activos (Hydropsychidae), predadores (Hydrobiosidae y Polycentropodidae) y Parásitos.

## 2.6 Género *Nectopsyche*

El género *Nectopsyche* (Leptoceridae: Trichoptera) (Figura 2) pertenece al grupo funcional de triturador (*shredders*) (Bode, Novak, y Abele, 1991; Moog et al., 2002). El cual definen como “Organismos que trituran principalmente grandes piezas de descomposición vascular Tejido vegetal (>1 mm de diámetro) junto con la microflora y fauna asociadas. Se alimentan directamente de macrófitos vasculares vivos, o de trocear madera en descomposición”. Ríos Touma, Encalada y Prat (2009) analizaron el contenido estomacal de estos organismos en zonas alto andinas, y encontraron que se alimentan de “partículas de materia orgánica gruesa (CPOM)”, siendo más activos en épocas secas. A este macroinvertebrado acuático se lo ha clasificado con una sensibilidad de 8 en una escala de 1 a 10 (Ríos-Touma et al., 2014).

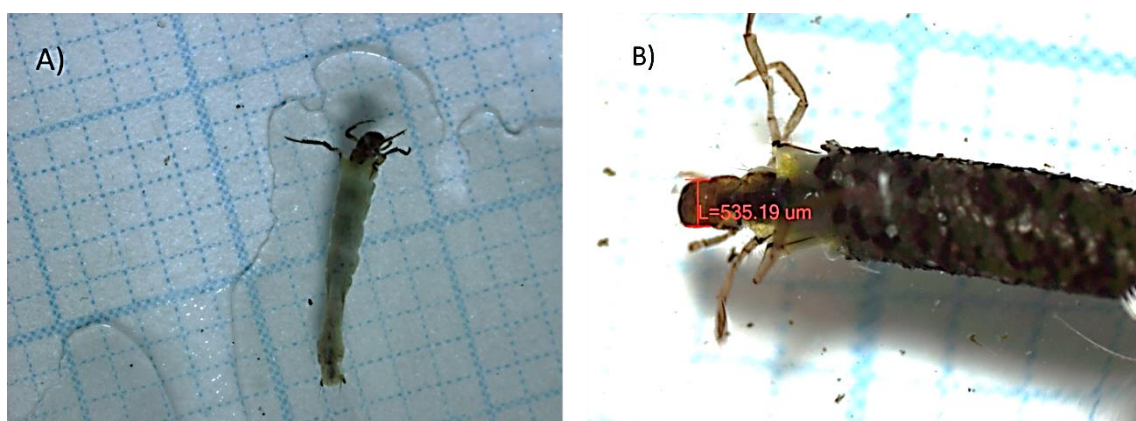


Figura 2. Macroinvertebrado acuático género *Nectopsyche* sp.

A) sin estuche de refugio

B) con estuche de refugio

## 2.7 Descripción de *Nectopsyche* sp. y su ciclo de vida

### 2.7.1 Huevos

Son ovales o esférico, tiene un rango de tamaño de 0.05 a 0.6mm, y generalmente son blancos o casi blancos. En la mayoría especies de huevos están envueltos en una capa gelatinosa, absorbente de agua compuesto de polisacáridos llamado spumalin y secretado después de la oviposición en grupos de 10-600 (Figura 3), y presentan una capa delgada de adhesivo químico o cemento, para poder adherirse a madera, rocas o grutas en los que son depositados (Holzenthal, Thomson, & Ríos-Touma, 2014).

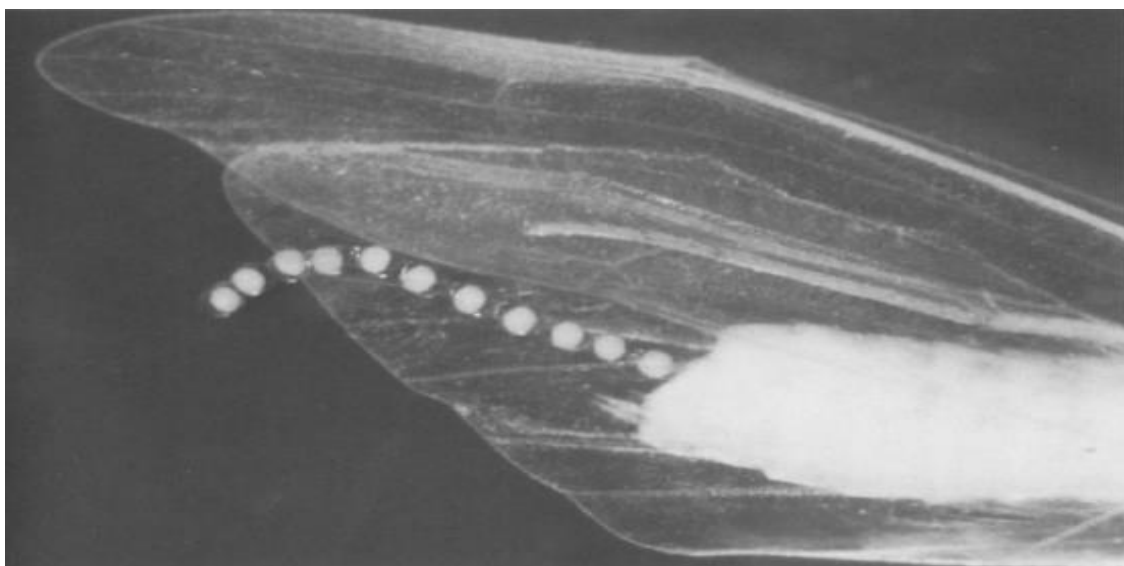


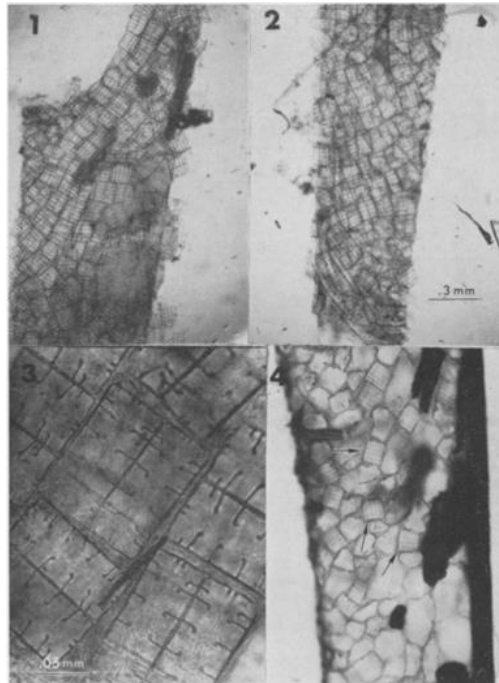
Figura 3. Hembra adulta *Nectopsyche* sp. depositando huevos.

Tomado de Tozer, Resh, y Solem, 1981.

### 2.7.2 Larva

Longitud de 8-12 mm, cabeza y pronotum de color marrón muy claro, moteado de pigmentación oscura, branquias metanotal ausentes. Piernas metatorácicas, cada una con dos filas dispersas de largas setas; ligeramente pigmentado, sin pigmentación oscura en las articulaciones. Las larvas de este género suelen construir refugios largos y esbeltos compuestos de plantas o fragmentos de

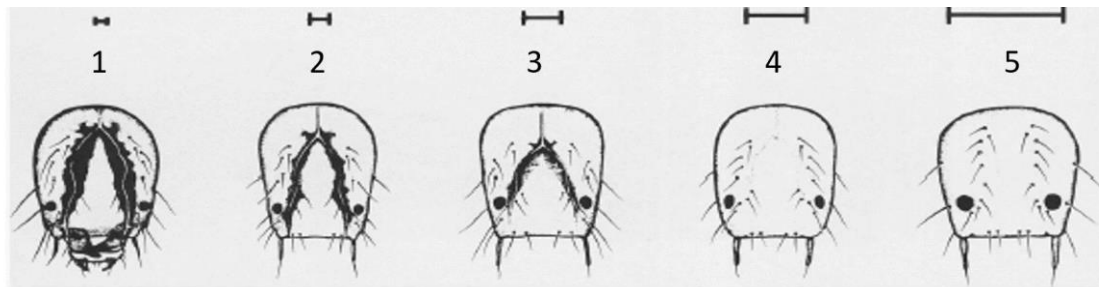
minerales. Las casas a menudo tienen ramas o agujas de coníferas que se extienden desde uno o ambos extremos (Figura 4) (Glover y Floyd, 2004).



*Figura 4.* Casas de *Nectopsyche* sp. a diferentes resoluciones.

Tomado de Tozer, Resh, y Solem, 1981.

Las larvas presentan sub estadios, el cual va variando de tamaño, sea de la cabeza que aumenta de tamaño, según la ley de Dyar que nos indica que son predecibles y regulares por un factor relativamente constante ( $f=1.6$ ) (Klingenberg y Zimmermann, 1992). Igualmente, presentando cambios de color en la parte superior de la capsula cefálica (Figura 5) (Tozer, Resh, & Solem, 1981).



*Figura 5.* Crecimiento de *Nectopsyche albia* y su diferenciación del tamaño de cabezas.

Tomado de Tozer, Resh, y Solem, 1981.

Nota: 1 es el estadio más joven y 5, el más adulto.

### 2.7.3 Pupa

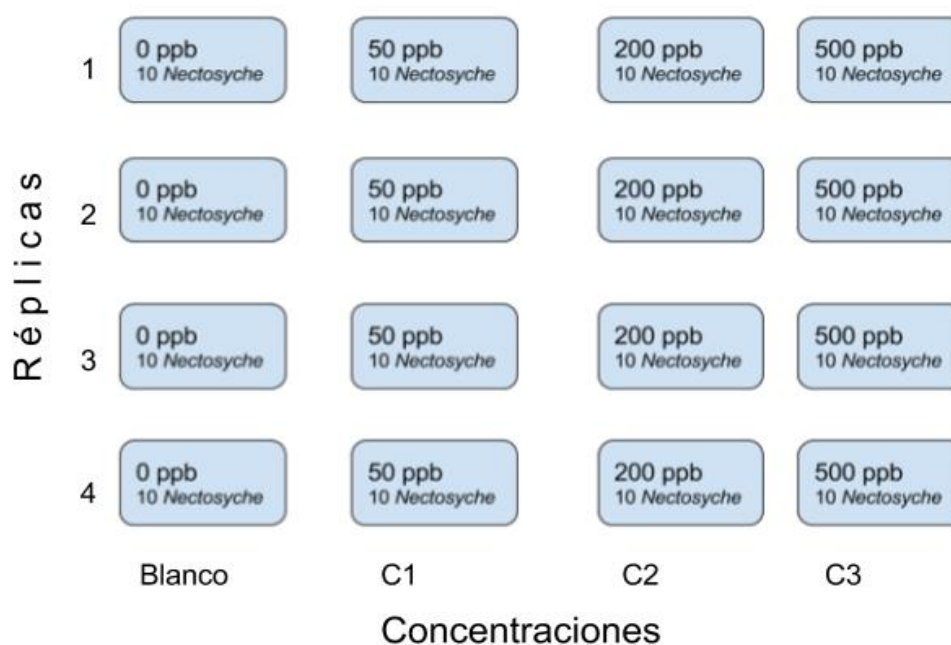
La larva secreta seda en forma de abanico para unir la porción anteroventral de su estuche a una superficie para estar sumergido. El organismo crea un cierre con una abertura respiratoria transversal, y este cierre es sellado y unido por una gruesa bisagra de seda al borde anteroventral de la caja. Después de unir y sellar el extremo posterior de la caja, la larva adopta la posición prepupal final con las piernas dobladas en las articulaciones. Este proceso de cierre requiere aproximadamente 4 horas. En este estudio en el laboratorio, el adulto emergió en 14 días después de sellar su estuche y dejando su caja y nadando activamente hacia la superficie (Tozer, Resh, y Solem, 1981).

## 3. METODOLOGÍA

### 3.1 Diseño del plan experimental metodología

Se planteó un diseño de tres tratamientos y un blanco con cuatro réplicas cada uno. El periodo de observación fue de cada 6 horas durante 96 horas. Los tratamientos aplicados fueron de 0 (control), 50, 200 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 6). Las concentraciones 50 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  se determinaron mediante revisión de

bibliografía sobre la presencia residual en ríos o arroyos cerca de zonas de aplicación que por diversos factores ambientales el glifosato puede estar presente hasta 16 km del sitio de aplicación en los cuerpos hídricos (Bowmer, 1982; Comes et al., 1976; Newton et al., 1984; Peruzzo, Porta, y Ronco, 2008; Struger et al., 2008). La concentración de 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  se determinó según la legislación nacional en el Texto Unificado Legislación Secundaria, Medio Ambiente (TULSMA) que señala como límite máximo permisible de glifosato en agua domésticas sin previo tratamiento (Ministerio del Ambiente - Ecuador, 2012). El acondicionamiento se lo realizó en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental en la sede Queri de la Universidad de las Américas. La temperatura ambiental se mantuvo en un promedio de 15.5°C con la ayuda de dos aires acondicionados, y dentro de los microcosmos se usó paquetes de hielo para mantener una temperatura entre 12 y 15 °C para simular las condiciones del río Alambi. Además, las algas estuvieron en los microcosmos 7 días antes del ingreso de los organismos, con el fin de colonizar las cerámicas en los diferentes tratamientos.



*Figura 6.* Diseño Experimental, donde se explica las concentraciones usadas en el experimento y sus réplicas

## **3.2 Construcción e infraestructura**

### **3.2.1 Infraestructura para la experimentación**

Para controlar y simular las condiciones de temperatura junto con luminosidad, los microcosmos fueron ubicados en un cuarto climatizado con dos aires acondicionados LG inverter de 12000 y 24000 BTU, los cuales mantuvieron el cuarto (15 m<sup>2</sup>) a una temperatura ambiental promedio de 15.5°C las 24 horas durante todo el estudio. Para el control de la temperatura del agua de cada microcosmos se utilizó paquetes de hielo para obtener temperaturas entre 12 a 15 °C.

Se proporcionó luz fluorescente directa por 12 horas, y 12 horas sin luz, por medio de un temporizador conectado al suministro eléctrico simulando las condiciones naturales y periodos de luz.

El microcosmos está compuesto de una bandeja plástica de dimensiones 47x26x37 cm, con una base rugosa de poliestireno expandido y poliuretano para simular el fondo del río.

El sedimento fue obtenido del río Alambi, el cual se le realizó un pretratamiento que consistía en lavar el sedimento en sacos con granulometría de ½ mm para poder eliminar sedimento muy fino y no provocar stress en los organismos, posterior al lavado, se lo seco al sol por 48 horas.

Este sedimento se colocó sobre esta base se colocó arena y grava en forma de sedimento obtenida del río de donde provienen los organismos (Río Alambi). El agua se obtuvo directamente del río, y se simuló la corriente de agua con una bomba de acuario sumergible JAD SP-602 que proporciona un caudal de 320 litros/hora conectado a la manguera plástica de ¼" con T's de plástico para el direccionamiento de la corriente. Para el suministro de oxígeno, se usaron bombas de aire JAD SC-7500 con un caudal de 3 litros/minuto que permite



tener niveles de oxígeno disuelto óptimos en la unidad experimental (Figura 7A).

Para simular zonas de refugio se colocó estacas de madera con 3 cm de altura donde los organismos permanecieron y pudieron ser fácilmente localizados.

Se dispuso de una malla para evitar el paso de los individuos al área de la bomba, y así evitar que puedan ser absorbidos.



*Figura 7. Microcosmos en funcionamiento*

A) Sistema de circulación de agua

B) Disposición de los microcosmos

### **3.3 Experimentación**

#### **3.3.1 Área de muestreo**

El muestreo se lo realizó en el río Alambi (Figura 8), perteneciente a la subcuenca Guayllabamba, que se ubica en la parroquia de Nono de la provincia de Pichincha. Este río se encuentra dentro del corredor de conectividad biológica Tropi Andino que busca tener un manejo sostenible con la flora y fauna que atraviesa las provincias de Esmeraldas, Pichincha, Sucumbios y Napo, con pasos de vegetación nativa, que facilitan la permanencia, conectividad y

migración de especies de un remanente de bosque a otro (EcoFondo, 2016; Urgilés-verdugo, Jordan, Giordano, y Gallo, 2014).



*Figura 8.* Río Alambi, sitio de recolección de los macroinvertebrados acuáticos.

### 3.3.2 Toma de muestras de agua y adaptación de los productores primarios

El 31 de octubre del 2017, se recolectó 160 litros de agua en ocho envases de 20 litros para su utilización en los microcosmos (10 litros por unidad experimental). Además, se realizó la medición de Temperatura, pH, conductividad y turbidez del agua in situ para conocer las condiciones naturales como información basal del río Alambi con las sondas YSI PRO.

El agua recolectada fue almacenada en el laboratorio, en donde se hizo la adición del glifosato a las concentraciones 0, 50, 200 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Posteriormente, siguiendo la metodología de Lamberti, Gregory, Ashkenas, y Steinman (2013) se preparó una solución concentrada de algas que fueron obtenidas a partir de raspado de rocas que se colectaron del mismo río. El agua concentrada de algas se homogeneizó con la ayuda de una batidora HMD400 durante 1 minuto y una alícuota de 200 ml fue agregada en los

distintos tratamientos (0, 50, 200 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Se hizo un acondicionamiento durante 7 días previo al experimento, para permitir la colonización algas se colocó 12 pequeñas superficies cerámica de 6.5x2 cm (Figura 9) por tratamiento, con las cuales se hicieron mediciones de la clorofila  $\alpha$  en un espacio horario de 24,48 y 72 horas.



*Figura 9.* Cerámicas de 6.5x2 cm, usados para la cuantificación de clorofila  $\alpha$  de algas bentónicas.

### 3.3.3 Cuantificación de clorofila $\alpha$ de algas bentónicas

Para la obtención de la clorofila  $\alpha$  se raspo toda la superficie de la cerámica colocada previamente en el periodo de adaptación de algas, y el material removido se colocó en 20 ml de alcohol al 96%. Las muestras se conservaron en tubos Falcon de 50 ml cubiertos de papel aluminio, los cuales se

almacenaron a 4°C por 24 horas para romper la pared celular. Después de las 24 horas en refrigeración, se procedió a medir en el espectrofotómetro a longitudes de onda de 664 y 750 nm. Después de esta primera medición, como método de corrección, se acidificó con 0.1 mL de 0.1N HCL por 3 minutos y nuevamente se midió a 665 y 750 nm. La cantidad de clorofila  $\alpha$  fue estimada usando la siguiente formula:

$$\text{Clorofila } \alpha \text{ } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = 28 (E664b - E665a) \times V_{\text{ext}} / A \text{ (cm}^2) \times L$$

Ecuación 1

Ecuación 1. Donde 28 es el coeficiente de absorción para clorofila en 96% de etanol. E664b, es (absorbancia a 664 – absorbancia a 750) antes de la acidificación. E664a, es (absorbancia a 665 – absorbancia a 750) con la muestra acidificada.  $V_{\text{ext}}$ , es el volumen de extracto (20ml). A, es el área de las cerámicas (13 cm<sup>2</sup>) y L, es la longitud de la celda de cuarzo usada en el espectrofotómetro (1 cm) (Ríos-Touma y Encalada, 2015).

#### 3.3.4 Toma de individuos de experimento

Para la recolección de los organismos del género *Nectopsyche sp.*, se utilizó el método de patada usando una red D, que se utilizó en una longitud de 10 metros en las orillas del río y en zonas con presencia de vegetación y hojarasca. Después de finalizar la fase de muestreo se colocó el material del río en bandejas plásticas blancas para identificar y recolectar los individuos vivos.

En este estudio se usó larvas que represente un tamaño entre 5 y 10 mm para evitar un error al momento de las mediciones, especialmente para minimizar que las diferencias del tamaño o peso sean por efecto del contaminante y no una diferencia entre los estadios larvarios del género.

El transporte de los organismos se realizó en recipientes plásticos con agua, hojarasca del río y paquetes de hielo para mantener una temperatura entre 12 y 15 °C hasta su llegada al laboratorio de investigación de la Universidad de Las Américas (UDLA).



### 3.3.5 Peso del individuo

El peso del individuo se lo realizo con la balanza analítica OHAUS Adventurer con sensibilidad de 0.0001 gramos. El cual consistió en colocar los individuos en cajas Petri de manera individual con la balanza encerada y obtener el valor de la medición del peso al inicio y final del experimento para evidenciar cambios.

### 3.3.6 Ancho de la cabeza del individuo

La medición se lo hizo al inicio y final del experimento a toda la población con la ayuda del Estereoscopio trinocular OLYMPUS ZX6, el cual incorpora cámara y software para la medición, adicionalmente en el fondo se usó papel milimetrado para tener mejor resolución en la exposición de los resultados (Figura 10).



*Figura 10.* Medición del ancho de la cabeza que se relaciona con el crecimiento del tricóptero.

### 3.3.7 Mortalidad

La toma de datos se realizó mediante observación visual en el microcosmo que consistía verificar el estado (vivo/muerto) de los individuos y tomar apuntes en las tablas de mortalidad. El periodo fue cada 6 horas de todos los tratamientos durante las 96 horas totales del experimento.

### 3.3.8 Número de individuos que establecen pupas

Se recolectó datos del número de individuos que empupan cada 6 horas por tratamiento durante las 96 horas totales del experimento. La pupa se diferenciaba por estar adherida a estacas de madera o paredes del microcosmos, sin sacar la cabeza hacia el exterior y no presentar movimientos durante más de 24 horas.

### 3.3.9 Movilidad de los individuos

Esta variable fue medida a las 24, 48, 72 y 96 horas en todos los tratamientos. Los individuos fueron observados por 10 segundos en cajas Petri, y dependiendo del número de pasos se les clasificó en: Alta; mayor o igual a 10 pasos, Media; entre 5 y 9 pasos y Baja; menor a 5 pasos. En nuestro caso, no fue posible medir concentraciones abdominales como en estudios previos (Sala et al., 2016) debido a que nuestros individuos poseen casas, y por eso las mediciones se definieron por el número de pasos en un lapso.

## 3.4 Análisis de datos

Para el análisis de las variables peso y ancho de la cabeza de los individuos se usó el programa estadístico IBM SPSS Statistics Version 24 (IBM Corp, 2016) y STATISTICA 10, el cual realizó control de datos paramétricos por medio de prueba de Levene y análisis de varianza one-way ANOVA que compara las medias de la variable respuesta para determinar si hay diferencias significativas entre los diferentes niveles de factores (Heiberger & Neuwirth, 2009). En este estudio se empleó el análisis ANOVA para evidenciar las diferencias entre la

condición inicial y final de cada uno de los tratamientos a las diferentes concentraciones de glifosato (0, 50, 200 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Se obtuvieron gráficos de medios para evidenciar si hay un aumento o disminución de las variables respuesta.

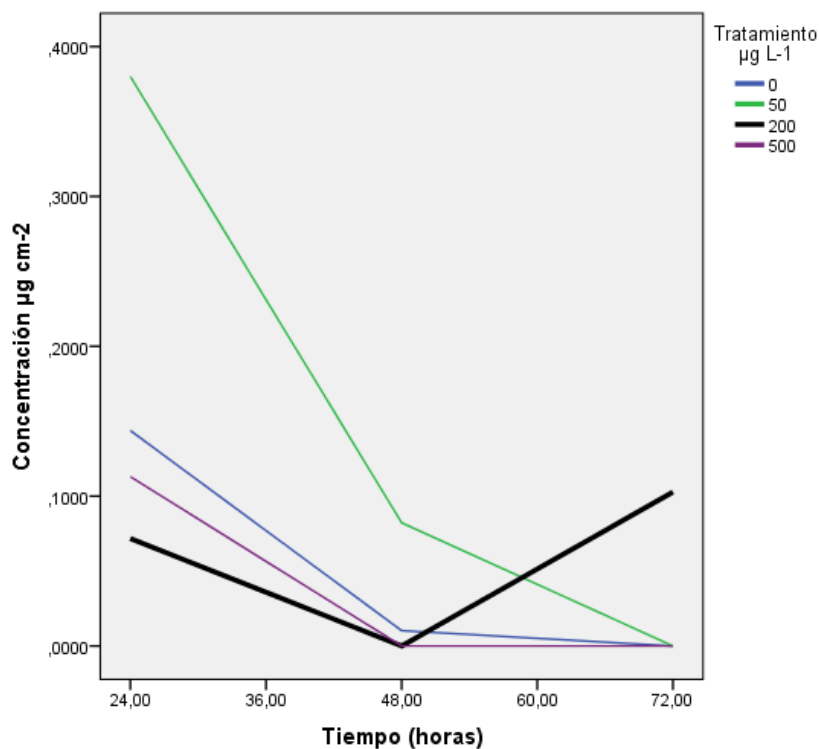
A su vez, se realizó la medición de tasa de supervivencia por medio del análisis de Kaplan Meier. Este análisis considera tiempo (horas), estado del individuo (Vivo o muerto) y tratamiento (concentración de glifosato) aplicado en función de la supervivencia del individuo. El resultado final es la probabilidad que tiene cada tratamiento de sobrevivir al final del estudio (Kishore, Goel, y Khanna, 2010).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Resultados

#### 4.1.1 Efectos sobre la producción primaria: Mediciones de Clorofila $\alpha$

Se analizaron los resultados de concentración de clorofila  $\alpha$ , los cuales se observó que a las 24 horas el tratamiento de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  es el que presentaba la mayor concentración de clorofila  $\alpha$ , pero presenta una disminución drástica de la misma a las 48 horas, al igual que los demás tratamientos (Figura 11). La medición realizada a las 72 horas muestra una mayor concentración de feofitina (clorofila degradada) en los tratamientos de 0, 50 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , y en el tratamiento de 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  aumenta la concentración de clorofila  $\alpha$ .



*Figura 11.* Concentración de clorofila  $\alpha$  en diferentes tratamientos a las 24, 48 y 72 horas de muestreo.

En la tabla 2 se puede observar el comportamiento de la feofitina, considerando una mayor concentración clorofila degradada cuando se registran valores de e665a mayores a los de e664b (Ver ecuación 1), lo que significa que la muestra contiene más feofinita que clorofila  $\alpha$ . Se puede observar que las 48 horas en los tratamientos de 200 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  la presencia de feofitina es mayor, y a las 72 horas todos los tratamientos presentan mayor concentración de feofitina con excepción del tratamiento de 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Tabla 2), el cual hay un aumento de clorofila  $\alpha$ .



Tabla 2.

*Resultados de clorofila  $\alpha$  de los diferentes tratamientos (0, 50, 200 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) a las 24, 48 y 72 horas.*

Conce ntraci ón $\mu\text{g L}^{-1}$	24 horas			48 horas			72 horas		
	e664b	e665a	Clorofil a $\mu\text{g cm}^{-2}$	e664b	e665a	Cloro fila $\mu\text{g cm}^{-2}$	e664b	e665a	Clorofi la $\mu\text{g cm}^{-2}$
0	0,0020	- 0,001 0	0,143 8	0,00 13	0,0038	0,01 03	0,001 5	0,018 3*	0,000 0
50	0,0088	0,000 5	0,380 0	0,00 13	0,0055	0,08 23	0,000 8	0,003 5*	0,000 0
200	0,0028	0,002 0	0,071 8	0,00 13	0,0168 *	0,00 00	0,000 3	0,000 0	0,102 8
500	0,0068	0,005 0	0,113 0	0,00 25	0,0080 *	0,00 00	0,000 5	0,006 0*	0,000 0

Nota: En la columna e665a, \* representa mayor concentración de feofitina (clorofila degradada) que clorofila  $\alpha$ .

#### 4.1.2 Turbidez

Los niveles de turbidez aumentaron a las 48 horas en los tratamientos de 200 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Y cuya tendencia se mantuvo hasta las 96 horas. La comparación entre tratamientos al final del estudio (Anexo 2) nos indicó que a las 96 horas el tratamiento de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  fue el de mayor turbidez seguido por el de 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ , y donde los tratamientos de 0 y 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  no tuvieron variaciones representativas en el turbidímetro (Figura 12).

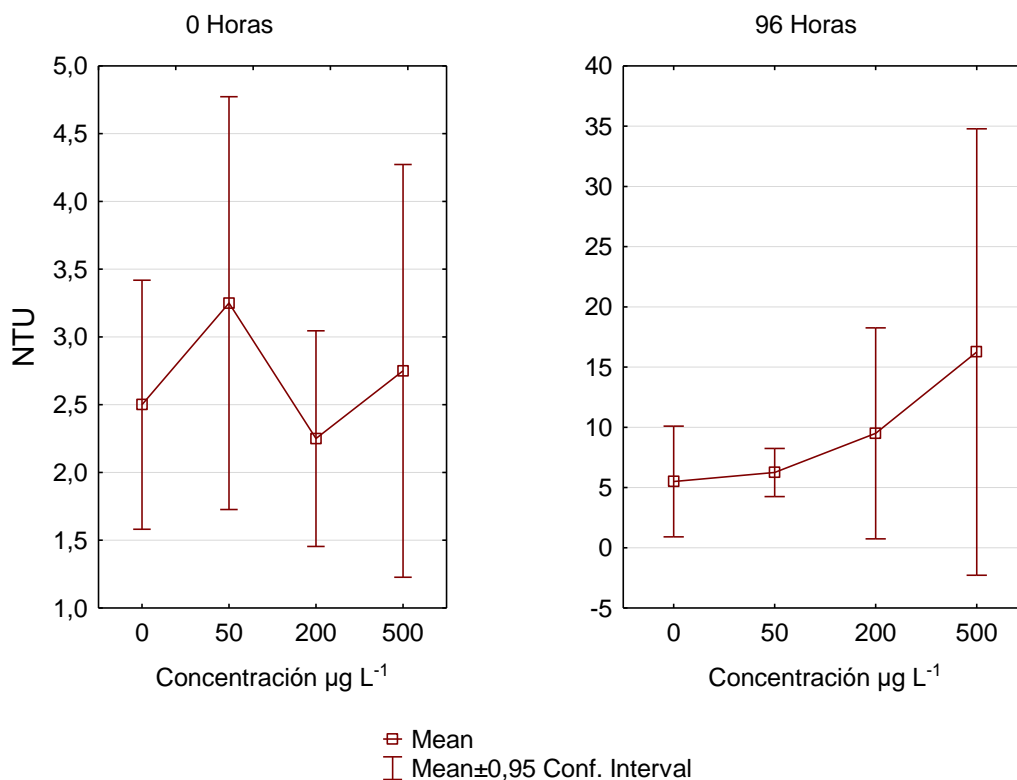
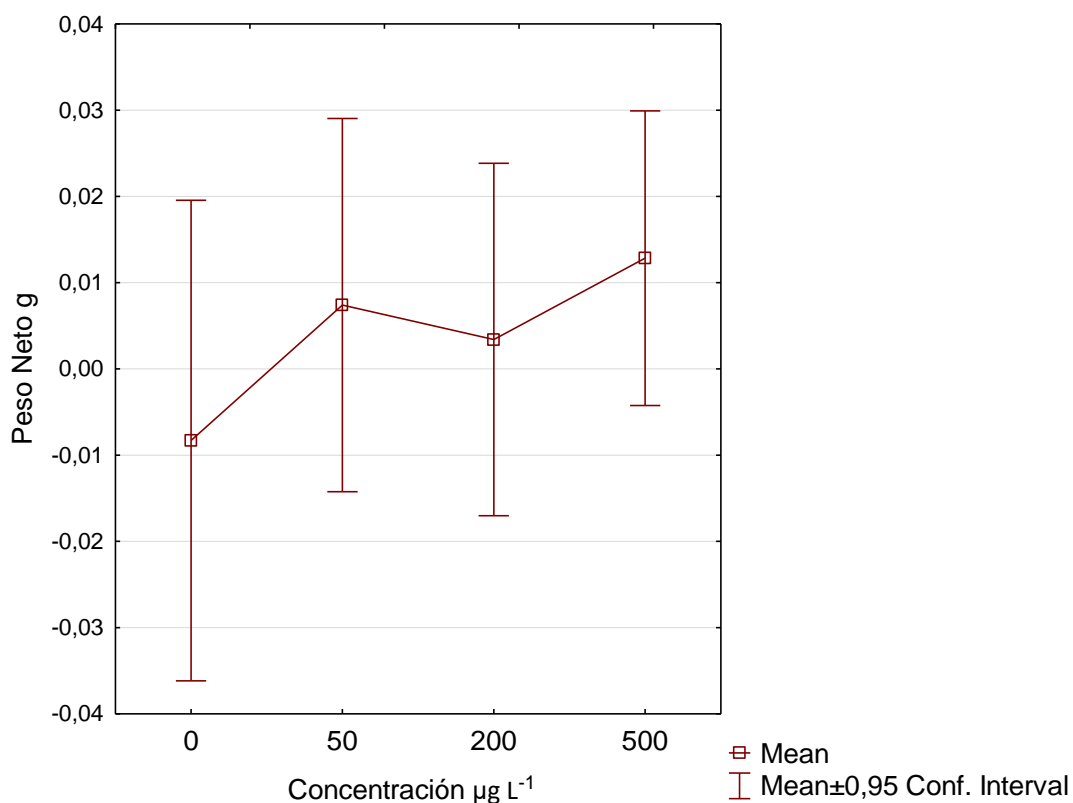


Figura 12. Turbidez de los tratamientos a las 0 y 96 horas.

#### 4.1.3 Efectos sobre el consumidor primario *Nectopsyche sp.*

##### 4.1.3.1 Peso del individuo

Se analizó los resultados de la diferencia del peso registrado de los *Nectopsyche sp.* del experimento, se identificaron diferencias significativas en el peso de los individuos del tratamiento de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $F=5,176$ ;  $p=0,0259$ ) (Anexo 2).



*Figura 13.* Peso neto de los tratamientos

Se puede observar que el tratamiento de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  se registró el mayor aumento de peso neto en comparación con los demás tratamientos. En los tratamientos de  $50$  y  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ , no hubo una diferencia significativa en el peso de los individuos (Figura 13), a pesar de que registraron un aumento en el peso neto. Pero se destaca que en el tratamiento de  $0 \mu\text{g L}^{-1}$  hubo una ligera disminución de peso neto pero que no fue estadísticamente significativa ( $F=1,8035$ ;  $p=0,1836$ ) (Anexo 2).

#### 4.1.3.2 Ancho de la cabeza del individuo

Los valores del ancho de la cabeza en todos los tratamientos presentan resultados estadísticamente significativos. En el tratamiento de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  se observa una mayor diferencia estadística entre los valores registrados del

ancho de la cabeza (F: 33,83;  $p$ : 0,000), seguido por los tratamientos de 50, 500 y 0  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 14).

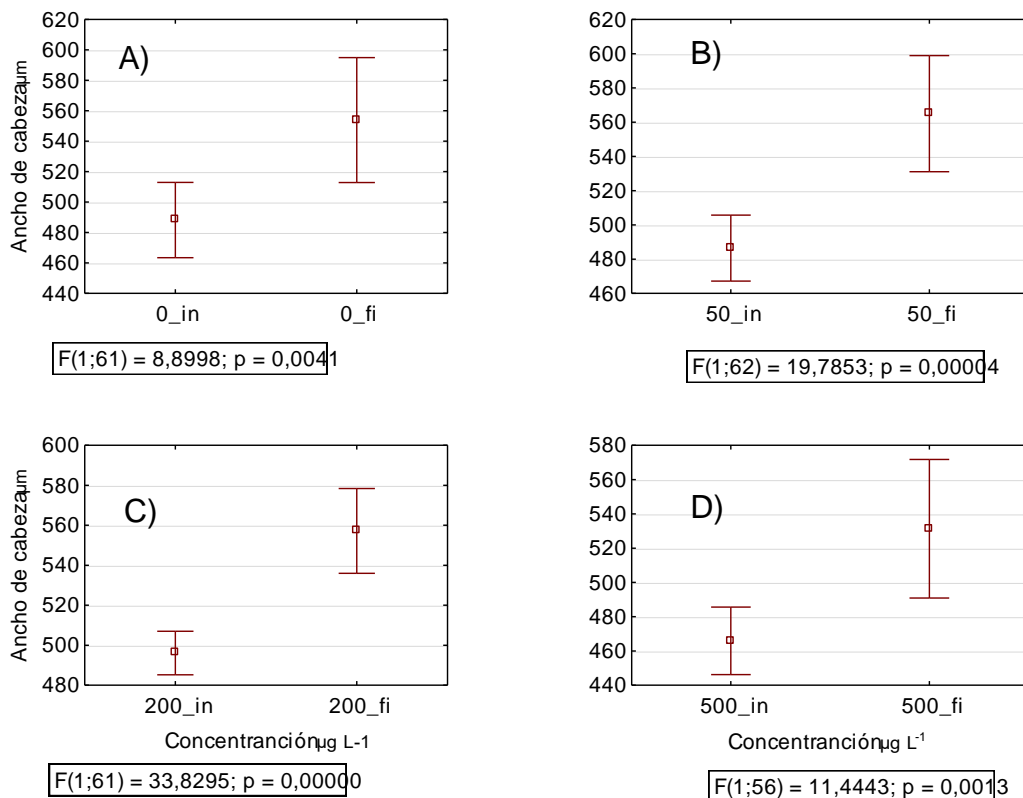


Figura 14. Mean box del ancho de la cabeza del individuo

A) 0  $\mu\text{g L}^{-1}$

B) 50  $\mu\text{g L}^{-1}$

C) 200  $\mu\text{g L}^{-1}$

D) 500  $\mu\text{g L}^{-1}$

Nota: Donde \_In es la medición inicial y \_Fi es la medición final después de 96 horas.

□

En los valores del ancho de cabeza neto, se observa que los tratamientos de 50 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  son los que tienen un crecimiento mayor a las demás concentraciones (Figura 15).

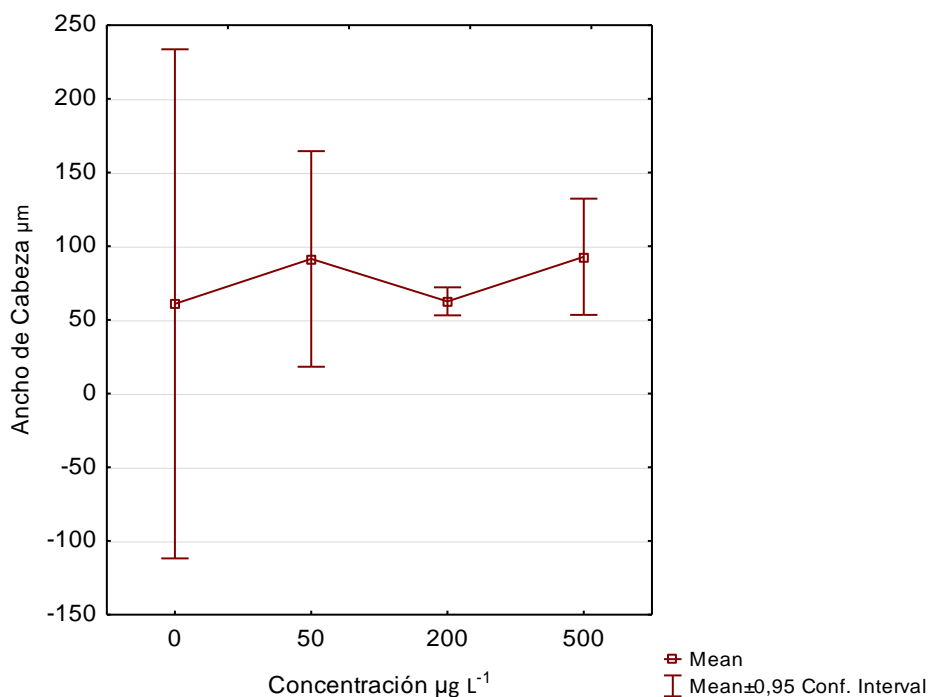


Figura 15. Crecimiento neto del ancho de la cabeza de los tratamientos

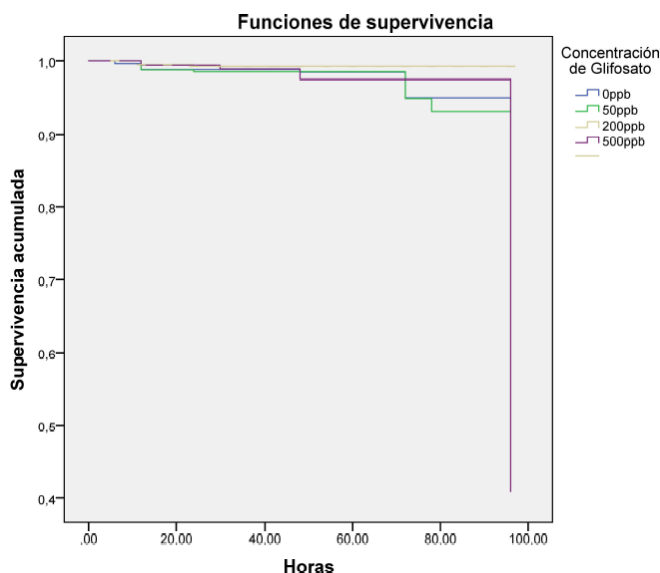
#### 4.1.3.3 Individuos que empupan

En nuestro diseño experimental se contempló esta variable, ya que debido al estrés al cual se sometió a los *Nectopsyche sp.* se analizó la posibilidad que los organismos formaran pupas. Al final del estudio se obtuvo 0 pupas en todos los tratamientos. Para saber el tiempo en el cual los organismos empupan y emergen, se dispusieron varios individuos con agua y alimento. Las emergencias de los adultos de *Nectopsyche* empezaron a los dos meses de la recolección, por lo tanto, en una semana era difícil poder llegar a registrar este variable.

#### 4.1.3.4 Mortalidad

La tasa de mayor mortalidad se registró en las primeras 12 horas, donde se encontró individuos muertos en todos los tratamientos que lo catalogamos

como periodo de adaptación (Figura 16). En el tratamiento de  $0 \mu\text{g L}^{-1}$ , después de las 12 horas, no se registraron individuos muertos hasta las 72 horas, con 32,5% de mortalidad.



*Figura 16.* Gráfico de supervivencia de los 160 individuos en horas en función de su supervivencia acumulada.

En el tratamiento de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  se registraron muertes a las 12, 72 y 78 horas, este tratamiento presentó una mortalidad del 35%. En el tratamiento de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  no se presentaron eventos pasadas las 24 horas y es el tratamiento que menor mortalidad presentó con 3,33%. En el tratamiento de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  la revisión de los individuos muertos se la realizó en dos fases, de 0 a 48 horas y de 54 a 96 horas. Esto fue debido al aumento de turbidez en la última fase del experimento que impedía localizar a los individuos en el microcosmos. Hasta las 48 horas se identificaron 9 individuos muertos, y en el siguiente periodo (de 54 a 96 horas) se registraron 19 individuos muertos. El tratamiento de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  presentó una tasa de mortalidad final del 67.5%.

#### 4.1.3.5 Movilidad

En nuestro estudio, los individuos que presentaron menor movilidad a las 96 horas fueron los del tratamiento de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ , con resultados de movilidad baja

y seguido por el tratamiento de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ , con una movilidad media-baja. Se destaca que todos los tratamientos con presencia de glifosato tuvieron resultados menores con respecto al control (Figura 17).

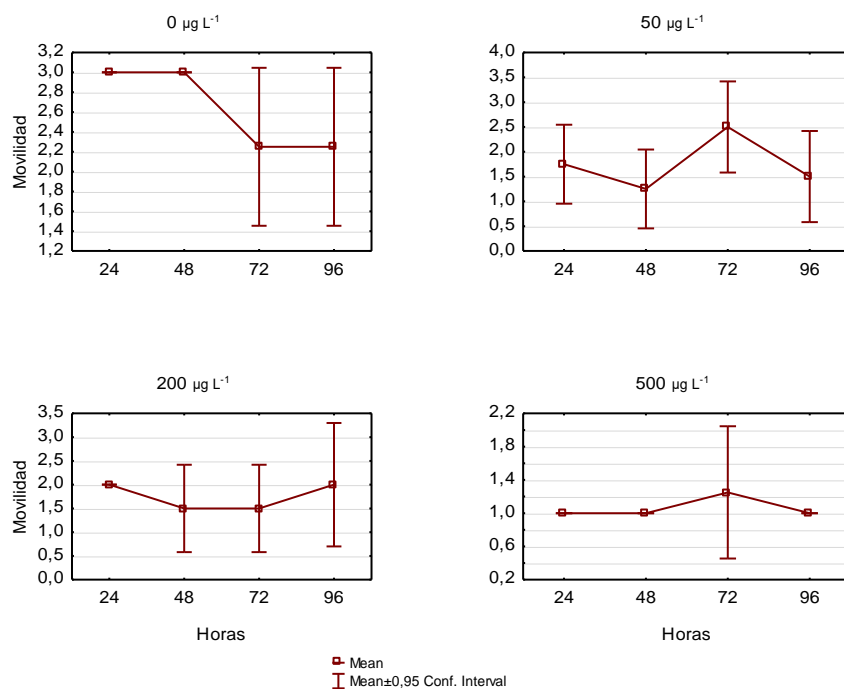


Figura 17. Movilidad de los individuos en los diferentes tratamientos.

Nota: 3 es una movilidad Alta, 2; Media y 1; Baja en el eje Y.

## 4.2 Discusión

Los resultados de la producción primaria demuestran una disminución de clorofila  $\alpha$  a medida que la concentración de glifosato aumenta, tal como se ha visto en otros estudios (Goldsborough y Brown, 1988). Estos cambios evidenciaron patrones como en el tratamiento de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  donde la disminución de producción primaria fue mayor, a diferencia de los tratamientos de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  donde la cantidad de materia orgánica aumentó y produjo un efecto en la turbidez del agua. Austin et al. (1991) y Magbanua (2012) mencionan que el incremento de glifosato en concentraciones de 1 –

370  $\mu\text{g L}^{-1}$  en los ecosistemas acuáticos genera una disponibilidad de fósforo en el agua, por lo que asumimos que la concentración de materia orgánica aumentó en estos últimos tratamientos y posteriormente la turbidez. No obstante, las mediciones de clorofila de los tratamientos indicaron que la turbidez estaba principalmente determinada por la presencia de clorofila degradada (feofitina), que concuerda con el estudio realizado por Vera et al. (2010), que evidencio alta turbidez en los tratamiento con una concentración 8  $\text{mg L}^{-1}$  de glifosato .

En nuestra hipótesis plateábamos que, a mayor concentración de glifosato la producción primaria iba a disminuir y se esperaba que esta reducción de producción primaria afectara a *Nectosyche* sp., por sus hábitos alimenticios. Además, esperábamos que produzca alteraciones en el aspecto físico como el peso y/o el ancho de la cabeza. Sin embargo, no encontramos evidencia de esto, al contrario, se encontró aumentos significativos de peso en 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  y del ancho de cabeza en todos los tratamientos.

El peso de la población, no mostro diferencias estadísticamente significativas en los dos primeros tratamientos y el control (50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), a diferencia del último tratamiento (500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) donde la diferencia de peso fue evidente mayor. Este comportamiento de los pesos podría deberse a la cantidad de materia orgánica disponible (Hove-Jensen, Zechel, y Jochimsen, 2014), ya que en el tratamiento de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  fue donde la disminución de producción primaria fue mayor, a diferencia del tratamiento de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  donde la turbidez aumento, y podría estar relacionado con aumento de materia orgánica como se ha visto en otros trabajos (Austin, Harris, y Lucey, 1991).

A su vez, el aumento del ancho de la cabeza fue significativo en todos los tratamientos (50, 200 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), lo que muestra que los organismos crecieron en todos los tratamientos. Magbanua (2012) describió que existe una relación en el aumento de la disponibilidad de fósforo con la presencia de glifosato. Este autor menciona que el incremento del fósforo influyó en el crecimiento del tamaño del cuerpo en *Chironomidae* a una concentración de 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Esto es similar al que se registró en el presente experimento



realizado con *Nectopsyche* sp. El género *Nectopsyche* (Leptoceridae: Trichoptera) pertenece al grupo funcional triturador (Bode et al., 1991; Wallace & Webster, 1996), por lo que a pesar de que las mediciones de producción primaria se componían mayormente de feofitina, los organismos se pudieron alimentar de la materia orgánica muerta acumulada, independientemente de si esta tiene o no clorofila. Esto nos indica que los organismos podrían haber aumentado de peso y cabeza a medida que la concentración del glifosato se incrementaba por la cantidad de materia orgánica disponible, aumentando la fuente de alimento, que podrían estar relacionados al incremento de turbidez en los tratamientos de 200 y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Al final de nuestro estudio, la mayor tasa de mortalidad (67.5%) fue en el tratamiento de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , que podría estar relacionado al inicio de un proceso de eutrofización, y la falta de oxígeno por un posible aumento de materia orgánica como se ha visto en otros experimentos (Pérez, Vera, & Miranda, 2011).

En relación a la formación de pupas, al inicio del experimento se lo considero como posible variable ante el estrés que podría ocasionar el glifosato, como se ha observado en otros insectos acuáticos (Alexander, Heard, y Culp, 2008; Palmquist, Jepson, y Jenkins, 2008). Durante el desarrollo del estudio no se formaron pupas en los tratamientos, y las emergencias se dieron a los dos meses de iniciado el experimento de los tratamientos de 0, 50 y 200. Esto se pudo deber a que los individuos no se les indujo el suficiente nivel de estrés para provocar la formación de pupas (Jimenez, 2010; Koscinczuk, 2014). Otros estudios sobre el glifosato en poblaciones como en *Deleatidium* (Ephemeroptera), las cuales emergían más rápido en los controles (0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) que en las concentraciones más altas (370  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) donde el tiempo era mayor, atribuyéndose posiblemente a que el herbicida ralentizó el desarrollo del individuo en el experimento (Magbanua, 2012; Magbanua et al., 2013). No obstante, no se determinó una relación de causa-efecto entre el glifosato y cambios fisiológicos del organismo, que podría deberse a la plasticidad alimenticia.

En nuestro estudio, los resultados demuestran que, al aumentar la concentración y el tiempo en los microcosmos, la movilidad se veía reducida en comparación con los de control. La movilidad de *Nectopsyche sp* está relacionada con la búsqueda de sitios de forrajeo, de empupamiento, refugio o la evasión de depredadores (Holzenthall, Thomson, & Ríos-Touma, 2014), lo que podemos decir que se relaciona con la supervivencia del organismos y que nos indicaría que la presencia de glifosato podría afectar los niveles de supervivencia de los organismos en el ecosistema, como fue observado en el tratamiento de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Para finalizar, aclaramos que la concentración máxima usada en este estudio (500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) está por debajo de niveles tóxicos para las comunidades de macroinvertebrados acuáticos (Pérez, Vera, y Miranda, 2011), porque el fin de esta investigación fue obtener datos de efectos subletales a concentraciones residuales de zonas de aplicación cercanas a ríos o arroyos que se obtuvo por revisión de literatura.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

Como resultado de la investigación presentada, es posible concluir que la construcción de microcosmos permitió realizar la experimentación con control de las variables, obtener un alto grado de replicabilidad y generar datos sobre las afecciones que podría estar expuesto el ecosistema ante concentraciones de glifosato.

Por otro lado, en la producción primaria se dieron disminuciones a menores concentraciones ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y se vio un comportamiento contrario a partir de las 48 horas en las concentraciones altas (200 y  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ) donde se registró un aumento de turbidez, que podría estar relacionado con la disponibilidad de fósforo que aportó el glifosato al medio, donde esta turbidez estaba compuesta más por feofitina que por clorofila  $\alpha$ .

En relación con los cambios físicos, se determinó aumento de peso y ancho de cabeza en los tratamientos de mayor concentración, que podrían disponer de una mayor fuente de alimento.

Finamente, se concluye que el glifosato a concentraciones no tóxicas podría ser usado como fuente de fósforo en el ecosistema acuático, lo cual puede desencadenar procesos de eutrofización; aumentando turbidez, reduciendo el oxígeno disuelto y probablemente afectando a procesos de fotosíntesis.

### 5.2 Recomendaciones

Durante la etapa de construcción del microcosmos, se recomienda tener más espacio entre las estacas de madera para facilitar su ubicación, debido a que durante el tiempo de experimentación se dificultó la visualización de los individuos.

Es necesario tener un 10% de agua reservada, debido a que la evaporación en los microcosmos es casi de 1.5 litros por cada 48 horas, A su vez, el control de temperatura tanto del ambiente como del agua debe ser constante, para que esta variable no influya en el experimento con aportación de estrés.

También se recomienda incluir estudios complementarios para futuros estudios. La aplicación de morfometría geométrica para poder obtener mejores resultados al momento de la determinación en partes del cuerpo del individuo (cabeza, mandíbulas, tórax, etc.) ayuda en la reducción del error humano y se obtiene datos con una resolución superior, ya que este método excluye la edad, posición o rotación, y solo se toma los hitos que el investigados crea que son los más relevantes en la forma. La aplicación de biomarcadores moleculares como herramienta para la tamización de trastornos que pueden verse influidos por la exposición al glifosato podría incluirse como complemento para la obtención de datos a niveles bioquímicos y sus posteriores efectos en estadios adultos.

## REFERENCIAS

- Adams, S. M. (2002). *Biological indicator of aquatic ecosystem stress*. American Fisheries Society.
- Alexander, A. C., Heard, K. S., & Culp, J. M. (2008). *Emergent body size of mayfly survivors*. *Freshwater Biology*, 53(1), 171–180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01880.x>
- Armanini, D. G., Horrigan, N., Monk, W. A., Peters, D. L., & Baird, D. J. (2011). *Development of a benthic macroinvertebrate flow sensitivity index for Canadian rivers*. *River Research and Applications*. <https://doi.org/10.1002/rra.1389>
- Arregui, M. C., Lenardón, A., Sanchez, D., Maitre, M. I., Scotta, R., & Enrique, S. (2004). *Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean*. *Pest Management Science*, 60(2), 163–166. <https://doi.org/10.1002/ps.775>
- Atwood, D., & Paisley-Jones, C. (2017). *Pesticides industry sales and usage 2008-2012 Market estimates*. U.S. Environmental Protection Agency. Recuperado el 23 de agosto de 2017 de [https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016\\_0.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016_0.pdf).
- Austin, A. P., Harris, G. E., & Lucey, W. P. (1991). *Impact of an organophosphate herbicide (GlyphosateR) on periphyton communities developed in experimental streams*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(1), 29–35. <https://doi.org/10.1007/BF01689449>
- Bagatini, Y. M., Delariva, R. L., & Higuti, J., (2012). *Benthic macroinvertebrate community structure in a stream of the north-west region of paraná state, Brazil [Estrutura da comunidade de macroinvertebrados bentônicos em um riacho da região noroeste do paraná, Brasil]*.

*Biota Neotropica*, 12(1), 308–317. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032012000100023>

Benbrook, C. M. (2016). *Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally*. *Environmental Sciences Europe*. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>

Benton, T. G., Solan, M., Travis, J. M. J., & Sait, S. M. (2007). *Microcosm experiments can inform global ecological problems*. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(10), 516–521. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.08.003>

Bode, R. W., Novak, M. A., & Abele, L. E. (1991). *Work Plan for Biological Stream Monitoring in New York State*. Recuperado el 10 de agosto de 2017 de [http://eighteenmilerap.com/BIO3\\_QAPP%20for%20Biological%20Stream%20Monitoring%20in%20NYS.pdf](http://eighteenmilerap.com/BIO3_QAPP%20for%20Biological%20Stream%20Monitoring%20in%20NYS.pdf)

Boerboom, C. M., & Wyse, D. L. (1988). *Influence of Glyphosate Concentration on Glyphosate Absorption and Translocation in Canada Thistle (Cirsium arvense)* *Influence of Glyphosate Concentration on Glyphosate Absorption and Translocation in Canada Thistle (Cirsium arvense)*1. *Source: Weed Science Weed Science*, 36(36). Recuperado el 12 de octubre de 2017 de <http://www.jstor.org/stable/4044637>

Boerboom, C., Vangessel, M., Sikkema, P., Hager, A., Nordby, D., Hartzler, B., Young, B. (2013). *The Glyphosate, Weeds, and Crops Series Glyphosate- Resistant Weeds The Glyphosate, Weeds, and Crops Series Glyphosate, Weeds, and Crops The Glyphosate, Weeds, and Crops Series The Glyphosate, Weeds, and Crops Series Glyphosate- Resistant Weeds*, 8. Recuperado el 12 de octubre de 2017 de <https://www.extension.purdue.edu/extmedia/BP/GWC-11.pdf>

- Bowmer, K. H. (1982). *Residues of glyphosate in irrigation water*. *Pesticide Science*, 13(6), 623–638. <https://doi.org/10.1002/ps.2780130609>
- Bruggen, V., & Jr, J. (2017). *Environmental and health effects of the herbicide glyphosate*. *Science of the Total Environment*, 616617, 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>
- Cedergreen, N., & Streibig, J. C. (2005). *The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: Assessment of predictive factors and hazard*. *Pest Management Science*, 61(12), 1152–1160. <https://doi.org/10.1002/ps.1117>
- Chang, F. H., Lawrence, J. E., Rios-Touma, B., & Resh, V. H. (2014). *Tolerance values of benthic macroinvertebrates for stream biomonitoring: Assessment of assumptions underlying scoring systems worldwide*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(4), 2135–2149. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3523-6>
- Chapman, D. (1992). *Water Quality Assessments -A Guide to Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring - Second Edition* (pp. 0–419). PB. Recuperado el 25 de octubre de 2017 de [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/resourcesquality/watqual assess.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/watqual assess.pdf)
- Colville, A., Jones, P., Pablo, F., Krassoi, F., Hose, G., & Lim, R. (2008). *Effects of chlorpyrifos on macroinvertebrate communities in coastal stream mesocosms*. *Ecotoxicology*, 17(3), 173–180. <https://doi.org/10.1007/s10646-007-0181-x>
- Comes, R. D., Bruns, V. F., & Kelley, A. D. (1976). *Residues and Persistence of Glyphosate in Irrigation Water*. *Weed Science*, 24(1), 47–50. <https://doi.org/10.1017/S0043174500065395>
- Culp, J., Podemski, C., Cash, K., & Lowell, R. (2000). *A research strategy for microcosms in ecotoxicology: integrating experiments at different levels organization with field data*. *Journal of Aquatic Ecosystem*

*Stress and Recovery*, 7, 167–176.  
<https://doi.org/10.1023/A:1009927631955>

De Andréa, M. M., Peres, T. B., Luchini, L. C., Bazarin, S., Papini, S., Matallo, M. B., & Tedeschi Savoy, V. L. (2003). *Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003001100012>

Dill, G. M. (2005). *Glyphosate-resistant crops: History, status and future. Pest Management Science*, 61(3), 219–224.  
<https://doi.org/10.1002/ps.1008>

Dill, Sammons, Feng, Kohn, Kretzmer, Mehrsheikh, Hauptfear. (2010). *Glyphosate: Discovery, Development, Applications, and Properties. In Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management* (pp. 1–33).  
<https://doi.org/10.1002/9780470634394.ch14>

Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). *Glyphosate: A once-in-a-century herbicide. In Pest Management Science* (Vol. 64, pp. 319–325).  
<https://doi.org/10.1002/ps.1518>

EcoFondo. (2016). Proyecto: “Consolidación de la Conectividad entre las Reservas Cayambe Coca y Antisana al Nor- Oriente ecuatoriano” mediante el Corredor de Conectividad Biológica Tropi-Andino., 1–10. Recuperado el 19 de noviembre de 2017 de [http://www.ecofondoecuador.com/index.php?option=com\\_joomdoc&ask=document.download&path=Proyectos/Corredor%20de%20conectividad%20Bilologica%20Tropia-Andino%20Napo/Informe%20Sensibilizaci%C3%B3n%20Proyecto%20Napo/Informe%20Final%20Educaci%C3%B3n%20Ambiental.pdf&Itemid=111](http://www.ecofondoecuador.com/index.php?option=com_joomdoc&ask=document.download&path=Proyectos/Corredor%20de%20conectividad%20Bilologica%20Tropia-Andino%20Napo/Informe%20Sensibilizaci%C3%B3n%20Proyecto%20Napo/Informe%20Final%20Educaci%C3%B3n%20Ambiental.pdf&Itemid=111)

Forbes, S. A. (1887). *The lake as a microcosm. Bull. of the Scientific*



*Association*, 77–87. <https://doi.org/10.1353/rcr.2007.0015>

Frank, P. A., & Hodgson, R. H. (1967). *Residues of Two Herbicides in Water in Irrigation Canals*. *Comes Source: Weeds*, 15(4), 353–355. Recuperado el 23 de agosto de 2017 de <http://www.jstor.org/stable/4041007>

Gamboa, M., Reyes, R., & Arrivillaga, J. (2008). Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de salud ambiental, 2. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 48(2), 109-120. Recuperado el 23 de agosto de 2017 de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1690-46482008000200001](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482008000200001)

Garzón, C., Valenzuela, P. M., Olmedo, J. M., Román, H., & Proaño, C. (2017). Aves de Tobar Donoso, frontera noroccidental de Ecuador, (January). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34405.81128>

Glover, J., & Floyd, M., (2004). *Larvae of the genus Nectopsyche (Trichoptera:Leptoceridae) in eastern North America, including a new species from North Carolina*. *Journal of the North American Benthological Society*, 23(3), 526–541. [https://doi.org/10.1899/0887-3593\(2004\)023<0526:LOTGNT>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1899/0887-3593(2004)023<0526:LOTGNT>2.0.CO;2)

Goldsborough, L. G., & Brown, D. J. (1988). *Effect of glyphosate (Roundup® formulation) on periphytic algal photosynthesis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/BF01705439>

Govindarajulu, P. P. (2008). *Literature review of impacts of glyphosate herbicide on amphibians : What risks can the silvicultural use of this herbicide pose for amphibians in B . C . Environment*. Recuperado el 19 de junio de 2017 de <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.314.3577&rep=rep1&type=pdf>

- Graf, W., Murphy, J., Dahl, J., Zamora-Munoz, C., & Lopez-Rodriguez, M. J. (2008). *Distribution and ecological preferences of European freshwater organisms. Volume 1. Trichoptera. Pensoft Bulgaria* (Vol. 1). Recuperado el 11 de noviembre de 2017 de <http://www.pensoft.net/newreleases/14279-toc.html>
- Grantham, Cañedo-Argüelles, M., Perrée, Rieradevall, & Prat. (2012). *A mesocosm approach for detecting stream invertebrate community responses to treated wastewater effluent. Environmental Pollution, 160*(1), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.09.014>
- Grube, A., Donaldson, D., Kiely, T., & Wu, L. (2011). *Pesticides Industry Sales and Usage: 2006 and 2007 Market Estimates. U.S. Environmental Protection Agency*, 1–41. Recuperado el 22 de agosto de 2017 de [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/market\\_estimates2007.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/market_estimates2007.pdf)
- Hawkes, H. (1998). *Origin and development of the biological monitoring working party score system. Water Research, 32*(3), 964–968. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00275-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00275-3)
- Heiberger, R. M., & Neuwirth, E. (2009). One-Way ANOVA, 165–191. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0052-4>
- Herrera, H. (2015). AIDA celebra decisión histórica de suspender fumigaciones con glifosato en Colombia. *Asociación Interamericana Para La Defensa Del Ambiente*, p. 3. Recuperado el 03 de junio de 2017 de <http://www.aida-americas.org/es/release/aida-celebra-decision-historica-de-suspender-fumigaciones-con-glifosato-en-colombia>
- Holzenthal, R. W., & Flint O.S., J. (1997). *Proceedings of the 8th International Symposium on Trichoptera* (Vol. 49). <https://doi.org/10.1615/ICHMT.1995.RadTransfProc.410>
- Holzenthal, R. W., Thomson, R. E., & Ríos-Touma, B. (2014). *Order Trichoptera. Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates: Ecology*

*and General Biology: Fourth Edition* (Fourth Edi, Vol. 1). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00038-3>

Holzenthal, R. W., Thomson, R. E., & Ríos-Touma, B. (2015). *Order trichoptera. In Ecology and General Biology: Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates* (Vol. 1, pp. 965–996). [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1783-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1783-1_2)

Hove-Jensen, B., Zechel, D. L., & Jochimsen, B. (2014). *Utilization of Glyphosate as Phosphate Source: Biochemistry and Genetics of Bacterial Carbon-Phosphorus Lyase. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(1), 176–197.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-13>

Hurtig, A. K., Sebastián, M. S., Soto, A., Shingre, A., Zambrano, D., & Guerrero, W. (2003). *Pesticide Use among Farmers in the Amazon Basin of Ecuador. Archives of Environmental Health: An International Journal*, 58(4), 223–228. <https://doi.org/10.3200/AEOH.58.4.223-228>

IBM Corp. (2016). *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0*. Armonk, NY: IBM Corp. Recuperado el 15 de agosto de 2017 de [ftp://public.dhe.ibm.com/software/analytics/spss/documentation/statistics/24.0/es/client/Manuals/IBM\\_SPSS\\_Statistics\\_Core\\_System\\_Users\\_Guide.pdf](ftp://public.dhe.ibm.com/software/analytics/spss/documentation/statistics/24.0/es/client/Manuals/IBM_SPSS_Statistics_Core_System_Users_Guide.pdf)

International Agency for Research on Cancer. *IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides*, 112 Environmental Health § (2014).  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.104>

Jimenez, C. (2010). Adaptaciones fisiologicas de los animales acuaticos (principalmente los peces y crustáceos ) frente a los estresores físicos , químicos , geológicos y biológicos en sistemas marinos y dulceacuícolas ., 1–38. Recuperado el 15 de octubre de 2017 de [http://intranet.sisal.unam.mx/material\\_apoyo\\_files/2%20Ensayo%20p](http://intranet.sisal.unam.mx/material_apoyo_files/2%20Ensayo%20p)

redoctoral%20sobre%20adaptaciones%20fisiologicas.pdf

- Kangas, P. (2005). *ECOLOGICAL ENGINEERING: Principles and Practice*. CRC Press. Recuperado el 07 de noviembre de 2017 de [http://www2.hcmuaf.edu.vn/data/quoctuan/Ecological%20Engineering%20-%20Principles%20and%20Practice\(1\).pdf](http://www2.hcmuaf.edu.vn/data/quoctuan/Ecological%20Engineering%20-%20Principles%20and%20Practice(1).pdf)
- Kishore, J., Goel, M., & Khanna, P. (2010). *Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate*. *International Journal of Ayurveda Research*, 1(4), 274. <https://doi.org/10.4103/0974-7788.76794>
- Klingenberg, C. P., & Zimmermann, M. (1992). *Dyar's rule and multivariate allometric growth in nine species of waterstriders (Heteroptera: Gerridae)*. *Journal of Zoology*, 227(3), 453–464. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1992.tb04406.x>
- Koller, V. J., Fürhacker, M., Nersesyan, A., Mišík, M., Eisenbauer, M., & Knasmueller, S. (2012). *Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells*. *Archives of Toxicology*, 86(5), 805–813. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0804-8>
- Koscinczuk, P. (2014). Ambiente, adaptación y estrés. *Revista Veterinaria*, 25(1), 67–76. Recuperado el 10 de junio de 2017 de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1669-68402014000100015](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-68402014000100015).
- Kouamé, K. D., Péné, B. C., N'guessan, A. C., Boua, B. M., Ouattara, Y., & Zouzou, M. (2017). *Effect of glyphosate used as a sugarcane chemical ripener in Cte dlvoire*. *African Journal of Plant Science*, 11(8), 341–350. <https://doi.org/10.5897/AJPS2017.1570>
- Ladrera, R. (2012). *Los macroinvertebrados acuáticos como indicadores del estado ecológico de los ríos*. *Páginas de Información Ambiental*, 24–29. Recuperado el 12 de junio de 2017 de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4015812.pdf>

- Lamberti, G. A., Gregory, S. V., Ashkenas, L. R., & Steinman, A. D. (2013). *Productive Capacity of Periphyton as a Determinant of Plant-Herbivore Interactions in Streams*, 70(6), 1840–1856. <http://dx.doi.org/10.2307/1938117>
- Lamberti, G. A., & Steinman, A. D. (1993). *Research in Artificial Streams: Applications, Uses, and Abuses*. *Journal of the North American Benthological Society*, 12(4), 313–384. <https://doi.org/10.2307/1467618>
- Landner, L. (1989). *Chemicals in the aquatic environment. Advanced hazard assessment*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-61334-0>
- Magbanua, F. S. (2012). *Agricultural intensification and stream health: combined impacts of pesticide and sediment*, (February). Recuperado el 02 de junio de 2017 de <https://ourarchive.otago.ac.nz/bitstream/handle/10523/2326/MagbanuaFrancisS2012PhD.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Magbanua, F. S., Townsend, C. R., Hageman, K. J., Lange, K., Lear, G., Lewis, G. D., & Matthaei, C. D. (2013). *Understanding the combined influence of fine sediment and glyphosate herbicide on stream periphyton communities*. *Water Research*, 47(14), 5110–5120. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.046>
- Malm, T., Johanson, K. A., & Wahlberg, N. (2013). *The evolutionary history of Trichoptera (Insecta): A case of successful adaptation to life in freshwater*. *Systematic Entomology*, 38(3), 459–473. <https://doi.org/10.1111/syen.12016>
- Manalil, S., Busi, R., Renton, M., & Powles, S. B. (2011). *Rapid Evolution of Herbicide Resistance by Low Herbicide Dosages*. *Weed Science*, 59(2), 210–217. <https://doi.org/10.1614/WS-D-10-00111.1>
- Matamoros, V., Caselles-Osorio, A., García, J., & Bayona, J. M. (2008). *Behaviour of pharmaceutical products and biodegradation*

*intermediates in horizontal subsurface flow constructed wetland. A microcosm experiment. Science of the Total Environment*, 394(1), 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.01.029>

Mesnager, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., & Séralini, G. E. (2015a). *Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>

Mesnager, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., & Séralini, G. E. (2015b). *Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>

Milani, D., Reynoldson, T. B., Borgmann, U., & Kolasa, J. (2003). *The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment. Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 22(4), 845–854. <https://doi.org/10.1002/etc.5620220424>

Ministerio del Ambiente - Ecuador. (2012). Texto Unificado Legislación Secundaria, Medio Ambiente (TULSMA), 1–319. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Mitsch, W. J., Beyers, R. J., & Odum, H. T. (1995). *Ecological Microcosms. Ecology* (Vol. 76). <https://doi.org/10.2307/1939367>

Montpellier European Ecotron. (2014). *Microcosms platform data sheet*, (December 2013), 0–1. Recuperado el 23 de agosto de 2017 de <http://www.ecotron.cnrs.fr/images/stories/pdf/Fiche%20Microcosm.pdf>

Moog, O., Resources, N., & Vienna, L. S. (2002). *Fauna Aquatica Austriaca - Catalogue for autecological classification of Austrian aquatic A Comprehensive Species Inventory of Austrian Aquatic Organisms with Ecological Notes*, (January 2002). Recuperado el 22 de junio de

2017 de  
[https://www.researchgate.net/profile/Otto\\_Moog/publication/271515361\\_Inventory\\_of\\_sensitive\\_taxa\\_of\\_Austrian\\_rivers\\_and\\_streams/links/54ca5dd90cf2517b755e02ef/Inventory-of-sensitive-taxa-of-Austrian-rivers-and-streams.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Otto_Moog/publication/271515361_Inventory_of_sensitive_taxa_of_Austrian_rivers_and_streams/links/54ca5dd90cf2517b755e02ef/Inventory-of-sensitive-taxa-of-Austrian-rivers-and-streams.pdf)

- Myers, J. P., Antoniou, M. N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L. G., Benbrook, C. M. (2016). *Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. Environmental Health, 15(1), 19.* <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>
- Newton, M., Howard, K. M., Kelsas, B. R., Danhaus, R., Marlene Lottman, C., & Dubelman, S. (1984). *Fate of Glyphosate in an Oregon Forest Ecosystem. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 32(5), 1144–1151.* <https://doi.org/10.1021/jf00125a054>
- Odum, E. P. (1984). *The Mesocosm. BioScience, 34(9), 558–562.* <https://doi.org/10.2307/1309598>
- Olurin, K. B., Mbaka, G. O., & Agbato, O. A. (2016). *Histopathological effect of sublethal concentration of aluminum phosphide (phostoxin) on Clarias gariepinus juveniles. Pesquisa Veterinaria Brasileira.* <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700002>
- Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S. L., & Carrasco, A. E. (2010). *Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. Chemical Research in Toxicology, 23(10), 1586–1595.* <https://doi.org/10.1021/tx1001749>
- Palmquist, K. R., Jepson, P. C., & Jenkins, J. J. (2008). *Impact of aquatic insect life stage and emergence strategy on sensitivity to esfenvalerate exposure. Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC, 27(8), 1728–1734.* <https://doi.org/10.1897/07-499.1>
- Paz-y-Mino, C., & López-Cortés, A. (2015). *Glifosato: Genética, Salud y*

*Ambiente*. Quito - Ecuador: Hojas y Signos. Recuperado el 10 de julio de 2017 de [https://www.researchgate.net/profile/Andres\\_Lopez-Cortes3/publication/282184424\\_Glifosato\\_Genetica\\_Salud\\_y\\_Ambiente/links/5606a4c908ae8e08c08fe9a3/Glifosato-Genetica-Salud-y-Ambiente.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Andres_Lopez-Cortes3/publication/282184424_Glifosato_Genetica_Salud_y_Ambiente/links/5606a4c908ae8e08c08fe9a3/Glifosato-Genetica-Salud-y-Ambiente.pdf)

- Paz-y-Miño, C., Muñoz, M. J., Maldonado, A., Valladares, C., Cumbal, N., Herrera, C., López-Cortés, A. (2011). *Baseline determination in social, health, and genetic areas in communities affected by glyphosate aerial spraying on the northeastern Ecuadorian border*. *Reviews on Environmental Health*, 26(1), 45–51. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2011.007>
- Paz-y-Miño, C., Sánchez, M. E., Arévalo, M., Muñoz, M. J., Witte, T., De-la-Carrera, G. O., & Leone, P. E. (2007). *Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate*. *Genetics and Molecular Biology*, 30(2), 456–460. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000300026>
- Pérez, G. L., Vera, M. S., & Miranda, L. A. (2011). *Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems*. *Herbicides and the Environment*, 343–368. <https://doi.org/ISBN:978-953-307-476-4>
- Perez, R. (2003). Bioindicación de la calidad del agua en Colombia. Uso del método BMWP/Col. Universidad de Antioquia. Recuperado el 02 de junio de 2017 de [http://www.academia.edu/attachments/32303106/download\\_file?st=MTUyMDQ0NjUxNSwxODEuMTk4Ljk4LjI5&s=swp-splash-paper-cover](http://www.academia.edu/attachments/32303106/download_file?st=MTUyMDQ0NjUxNSwxODEuMTk4Ljk4LjI5&s=swp-splash-paper-cover)
- Peruzzo, P. J., Porta, A. A., & Ronco, A. E. (2008). *Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina*. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.01.015>



- Petersen, J. E., & Englund, G. (2005). *Dimensional approaches to designing better experimental ecosystems: A practitioners guide with examples*. *Oecologia*, 145(2), 216–224. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0062-z>
- Phillips, D. J. H., & Rainbow, P. S. (1994). *Environmental Management Series: Biomonitoring of trace aquatic contaminants*. Chapman & Hall, 371. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(94\)90162-7](https://doi.org/10.1016/0025-326X(94)90162-7)
- Popp, M., Hann, S., Mentler, A., Fuerhacker, M., Stinger, G., & Koellensperger, G. (2008). *Determination of glyphosate and AMPA in surface and waste water using high-performance ion chromatography coupled to inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometry (HPIC-ICP-DRC-MS)*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2037-5>
- Rico, D., Scopetta, O., Alzate, J. P., & Ferro, A. G. (2016). *Verdades científicas sobre glifosato y salud pública* (Vol. 1). Series Informes 25. Recuperado el 03 de octubre de 2017 de <http://cdn.ideaspaz.org/media/website/document/57d74f694aa95.pdf>
- Ríos-Touma, B., Acosta, R., & Prat, N. (2014). *The Andean biotic index (ABI): Revised tolerance to pollution values for macroinvertebrate families and index performance evaluation*. *Revista de Biología Tropical*. <https://doi.org/10.15517/rbt.v62i0.15791>
- Ríos-Touma, B., & Encalada, A. (2015). Biomasa de algas bentónicas en ríos de páramo. In C. Larrea, F. Cuesta, A. López, N. Greene, P. Iturralde, G. Maldonado, & D. Suárez-Duque (Eds.), *Propuesta de Indicadores Nacionales de Biodiversidad: una contribución para el sistema nacional de monitoreo del patrimonio natural y para la evaluación del impacto de la implementación de la Estrategia Nacional de Biodiversidad y su Plan de Acción 2015-2* (1st ed., pp. 131–133). Quito - Ecuador: MAE, CONDESAN, GIZ, PNUD-FMAM, USAB. Recuperado el 22 de abril de 2017 de

[http://www.ec.undp.org/content/dam/ecuador/docs/documentos%20proyectos%20ambiente/pnud\\_ec%20ENB\\_LIBRO%20INDICADORES%20FINAL.pdf](http://www.ec.undp.org/content/dam/ecuador/docs/documentos%20proyectos%20ambiente/pnud_ec%20ENB_LIBRO%20INDICADORES%20FINAL.pdf)

- Rios-Touma, B., Encalada, A. C., & Prat, N. (2009). *Leaf litter dynamics and its use by invertebrates in a high-altitude tropical andean stream. International Review of Hydrobiology, 94(4), 357–371.* <https://doi.org/10.1002/iroh.200811161>
- Rios, A. (2013). *Viabilidad del glifosato en sistemas productivos sustentables. Inia, 8–12. Recuperado el 22 de agosto de 2017 de* [http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos compartidos/18429080413103109.pdf](http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429080413103109.pdf)
- Sala, M., Faria, M., Sarasa, I., Barata, C., Bonada, N., Brucet, S., Cañedo-Arguelles, M. (2016). *Chloride and sulphate toxicity to *Hydropsyche exocellata* (Trichoptera, Hydropsychidae): Exploring intraspecific variation and sub-lethal endpoints. Science of the Total Environment, 566–567, 1032–1041.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.121>
- Sánchez-Montoya, M. M., Vidal-Abarca, M. R., & Suárez, M. L. (2010). *Comparing the sensitivity of diverse macroinvertebrate metrics to a multiple stressor gradient in Mediterranean streams and its influence on the assessment of ecological status. Ecological Indicators. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2010.01.008*
- Schulz, R., Thiere, G., & Dabrowski, J. M. (2002). *A combined microcosm and field approach to evaluate the aquatic toxicity of azinphosmethyl to stream communities. Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC, 21(10), 2172–2178.* <https://doi.org/10.1002/etc.5620211021>
- Sihtmäe, M., Blinova, I., Künnis-Beres, K., Kanarbik, L., Heinlaan, M., & Kahru, A. (2013). *Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. Applied Soil Ecology. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.07.005*

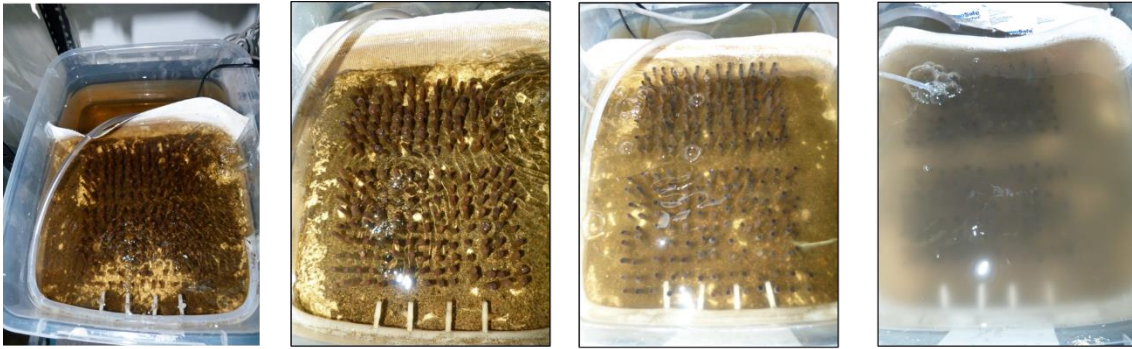
- Sperling, C. D., & Lortie, C. J. (2010). *The importance of urban backgardens on plant and invertebrate recruitment: A field microcosm experiment. Urban Ecosystems*, 13(2), 223–235. <https://doi.org/10.1007/s11252-009-0114-y>
- Springer, M. (2010). Capítulo 7 : Trichoptera. *Revista de Biología Tropical*, 58(August), 151–198. Recuperado el 22 de octubre de 2017 de [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-77442010000800007](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442010000800007)
- Struger, J., Thompson, D., Staznik, B., Martin, P., McDaniel, T., & Marvin, C. (2008). *Occurrence of glyphosate in surface waters of southern Ontario. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80(4), 378–384. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9373-1>
- Tozer, W. E., Resh, V. H., & Solem, J. O. (1981). *Bionomics and adult behavior of a lentic caddisfly, Nectopsyche albida (Walker). American Midland Naturalist*, 106(July), 133–144. <https://doi.org/10.2307/2425143>
- U.S. EPA. (1993). *Reregistration Eligibility Decision (RED): Glyphosate. Recuperado el 29 de junio de 2017 de* <http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/901A0500.PDF?Dockey=901A0500.PDF>
- Urgilés-verdugo, C., Jordan, C., Giordano, A., & Gallo, F. (2014). CAPACITACIÓN AMBIENTAL - ICCA Metodología Adaptativa Diferenciada para el “ Programa de Monitoreo de Fauna a lo Largo del Corredor de Conectividad Tropi-Andino .” Recuperado el 22 de junio de 2017 de [http://www.ecofondoecuador.com/index.php?option=com\\_joomdoc&task=document.download&path=Programas/ICCA%20Monitoreo%20en%20ejecuci%C3%B3n,%202013/Programa%20Monitoreo%20Fauna%20Corredor/INFORMES%20Y%20OTROS/Metotologia%20Unificada%20PMCC.pdf&Itemid=112](http://www.ecofondoecuador.com/index.php?option=com_joomdoc&task=document.download&path=Programas/ICCA%20Monitoreo%20en%20ejecuci%C3%B3n,%202013/Programa%20Monitoreo%20Fauna%20Corredor/INFORMES%20Y%20OTROS/Metotologia%20Unificada%20PMCC.pdf&Itemid=112)

- Valdiviezo-rivera, J. (2017). Peces de la frontera nororiental de Ecuador. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.29132.62083>
- Van Bruggen, A. H. C., He, M. ., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. ., & Morris, J. G. J. (2018). *Science of the Total Environment Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. Science of The Total Environment*, 617(January), 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>
- Vera, M. S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G. L., Rodríguez, P., Mugni, H., Pizarro, H. (2010). *New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. Ecotoxicology*, 19(4), 710–721. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0446-7>
- Vila-Aiub, M. M., Vidal, R. A., Balbi, M. C., Gundel, P. E., Trucco, F., & Ghersa, C. M. (2008). *Glyphosate-resistant weeds of South American cropping systems: An overview. In Pest Management Science*. <https://doi.org/10.1002/ps.1488>
- Wallace, J. B., & Webster, J. R. (1996). *The role of macroinvertebrates in stream ecosystem function. Annual Review of Entomology*, 41(5322), 115–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.000555>
- Warren, C. E., & Davis, G. E. (1971). *Laboratory stream research: Objectives, Possibilities, and constraints. Annual Review of Ecology and Systematics*, 2(1971), 111–144. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.02.110171.000551>
- Williams, G. M., Kroes, R., & Munro, I. C. (2000). *Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31(2), 117–165. <https://doi.org/10.1006/rtph.1999.1371>
- Woodburn, A. T. (2000). *Glyphosate: Production, pricing and use worldwide. Pest Management Science*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-)

4998(200004)56:4<309::AID-PS143>3.0.CO;2-C

- World Health Organization. (2010). *The Who Recommended Classification of Pesticides By Hazard and Guidelines To Classification 2009*. World Health Organization, 1–60. [https://doi.org/ISBN 978 92 4 154796 3](https://doi.org/ISBN%20978%2092%204%20154796%203)
- Yáñez-Muñoz, M., Altamirano, M., & Oyataga, L. (n.d.). Diversidad de la herpetofauna de tobar donoso, prov. Carchi, Ecuador. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4638.5687>
- Zaranyika, M. F., & Nyandoro, M. G. (1993). *Degradation of Glyphosate in the Aquatic Environment - an Enzymatic Kinetic-Model That Takes Into Account Microbial-Degradation of Both Free and Colloidal (or Sediment) Particle Adsorbed Glyphosate*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 838–842. <https://doi.org/10.1021/jf00029a030>
- Zouaoui, K., Dulaurent, S., Gaulier, J. M., Moesch, C., & Lachâtre, G. (2013). *Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication*. *Forensic Science International*. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.12.010>

## **ANEXOS**



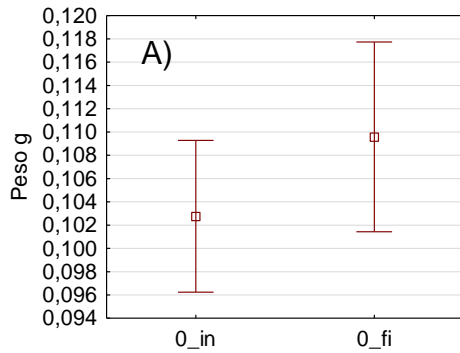
A)

B)

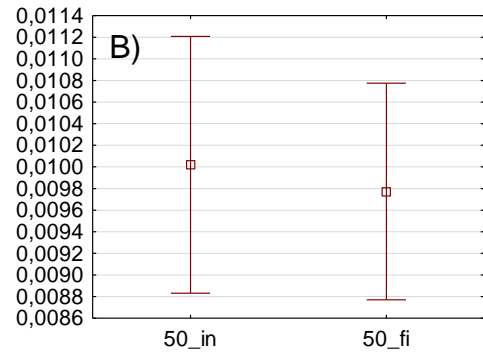
C)

D)

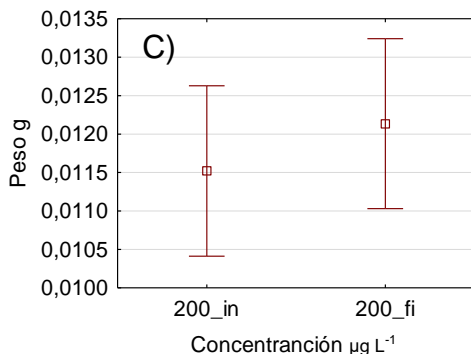
Anexo 1. Diferentes niveles de turbidez entre tratamientos a las 96 horas. A) 0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , B) 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , C) 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  y D) 500  $\mu\text{g L}^{-1}$



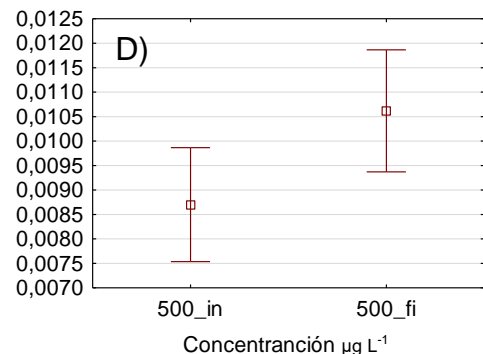
$F(1;70) = 1,8035; p = 0,1836$



$F(1;75) = 0,1019; p = 0,7505$



$F(1;69) = 0,794; p = 0,3760$



$F(1;72) = 5,1761; p = 0,0259$

□ Mean  
 ┆ Mean  $\pm$  0,95 Conf. Interval

Anexo 2. Mean box peso inicial y final de los individuos correspondiente a A) 0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , B) 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , C) 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  y D) 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Donde \_In es la medición inicial y \_Fi es la medición final después de 96 horas.

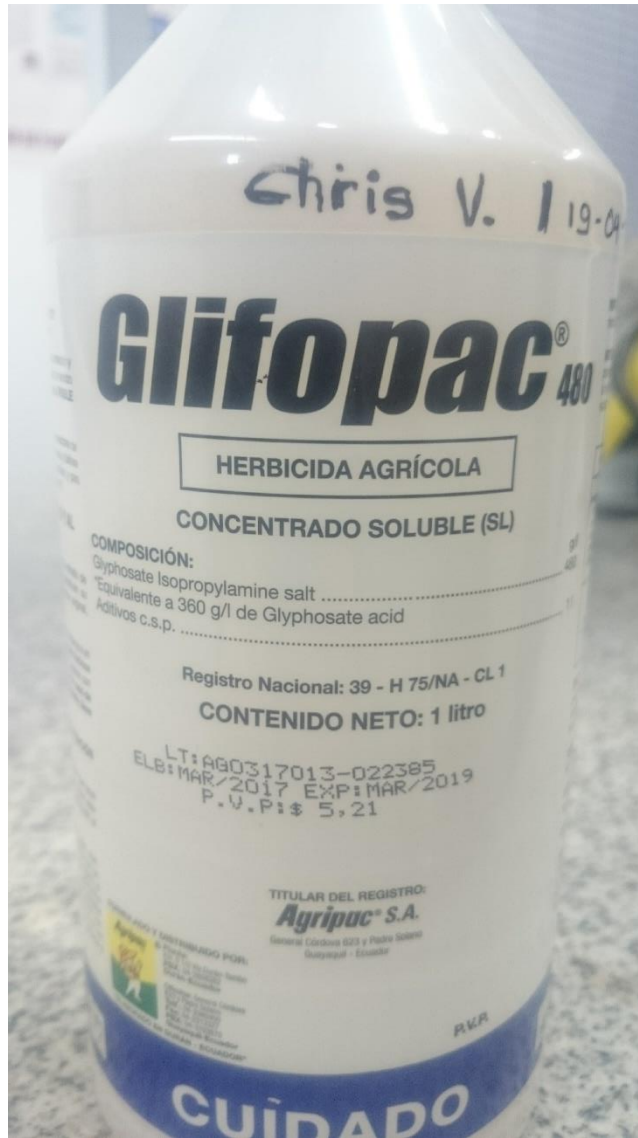








Anexo 5. Monitoreo de los organismos



Anexo 6. Formulación de glifosato usado para el estudio

