

Biomonitoreo para evaluar impacto tóxico por contaminación ambiental con explosivos

Pablo G. Ross^{1,2} y Gerardo D. Castro^{3,4}

¹Facultad de Ingeniería del Ejército Gral. Manuel N. Savio, Universidad de la Defensa Nacional (UNDEF). Av. Cabildo 15, C1426AAA Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

²Departamento de Química Aplicada. ³Departamento de Investigaciones en Bioseguridad y Toxicología. Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas para la Defensa (CITEDEF). Juan Bautista de La Salle 4397, B1603ALO Villa Martelli. ⁴Unidad de Investigación y Desarrollo Estratégicos para la Defensa (UNIDEF, MINDEF-CONICET). E-mail: gcastro@citedef.gob.ar

Resumen. En nuestro instituto estamos desarrollando una capacidad para evaluar el impacto tóxico derivado de la contaminación ambiental con explosivos y sus productos de degradación. Para ello es relevante contar con medidas de biomonitoreo que puedan revelar el impacto en el ecosistema y predecir eventuales consecuencias para la población cercana (por ejemplo a través de la migración de contaminantes por aguas subterráneas). Resulta necesario desarrollar metodologías analíticas sensibles y específicas para la identificación y cuantificación de los tóxicos y sus productos de transformación y también contar con modelos biológicos para la evaluación del impacto tóxico *in situ* o en el laboratorio con muestras provenientes de los sitios contaminados. En estos ensayos se realizarían exposiciones crónicas para evaluar la toxicidad subletal y la absorción de los explosivos envejecidos desde esos suelos. Estos datos pueden utilizarse para definir criterios o valores de referencia para la gestión ambiental y las evaluaciones de riesgo particulares.

Palabras clave: Biomonitoreo, TNT, RDX, Contaminación ambiental, Explosivos

La evaluación del impacto tóxico provocado por la contaminación del ambiente con compuestos explosivos es un tema complejo, no solamente por la variedad de sustancias energéticas que pueden involucrarse si no también -y fundamentalmente- por las interacciones con las variables ambientales, que pueden modificar drásticamente el destino y la persistencia ambientales y por supuesto, la toxicidad para organismos distintos. Puede decirse que los explosivos más comunes hoy en uso no son sustancias muy estables en el ambiente o refractarias a la degradación, tanto por caminos abióticos como mediados por organismos vivos. Sin embargo, esto no debe interpretarse como una ventaja (respecto a otras sustancias más persistentes) ya que varios de sus caminos de transformación química conducen a compuestos con una toxicidad apreciable. Esta característica hace que, aún cuando la permanencia de la estructura química original en un ambiente no sea extensa, el aporte crónico del contaminante sumado a su conversión a especies más tóxicas lleve a un escenario de riesgo ambiental persistente y de complejidad cambiante.

En este contexto, el biomonitoreo se enfrenta a dos desafíos. En primer lugar, la necesidad de detectar de manera específica y sensible la presencia de sustancias derivadas de la degradación ambiental de los explosivos en matices variadas, que condicionan el tipo y cantidad de productos que pueden formarse. En segundo lugar, la identificación de bioindicadores y biomarcadores adecuados para cada situación,

desarrollando modelos biológicos para la evaluación del impacto tóxico *in situ* o al menos en el laboratorio con muestras (ej. aguas, suelos, sedimentos) provenientes de los sitios contaminados. Es así entonces que los problemas para establecer riesgos ambientales y objetivos de remediación en sitios contaminados existen generalmente debido al conocimiento incompleto del destino ambiental y de los efectos de los explosivos en los ecosistemas [1].

Los compuestos químicos explosivos se liberan al ambiente durante la fabricación, el manejo, el uso y la eliminación de municiones en sitios militares o en la industria que fabrica o utiliza explosivos, en todo el mundo. Las consecuencias para el ambiente y la salud humana derivan de la contaminación de aguas subterráneas y superficiales, suelos y sedimentos, a veces en concentraciones extremadamente altas. Los suelos están contaminados por estas sustancias debido a operaciones de su fabricación, actividades militares, conflictos de diferentes tipos, quema abierta/detonación abierta, vertido de municiones, etc. [2]. Los explosivos como el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) y la hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX) y sus productos de degradación suelen descomponerse lentamente en muchas matrices ambientales, por lo que producen contaminación a largo plazo en los sitios donde fueron liberados [3].

Es conocido que los explosivos y otros compuestos relacionados causan una variedad de efectos adversos en los animales. Se han informado efectos a nivel de organismo en un número relativamente pequeño de especies acuáticas. El destino de estas sustancias en peces e invertebrados acuáticos es poco conocido [4]. Los explosivos tienen un potencial de bioacumulación bajo en animales, como podría esperarse debido a su poca hidrofobicidad. Además, investigaciones recientes revelaron que el TNT que ingresa a los animales sufre transformaciones químicas importantes y que la bioacumulación de los productos de descomposición en los tejidos generalmente excede la del compuesto original [5], [6], [7].

El TNT se descompone por biodegradación en el agua pero a velocidades mucho más lentas que con la fotólisis. En aguas superficiales, el TNT se degrada por fotólisis y tiene una vida media de media hora a muchas horas, generando productos oxidados y algún compuesto azoico. La vida media biológica del TNT es mucho más larga, variando desde varias semanas a seis meses. Los productos de la degradación biológica del TNT en agua, suelo o sedimentos incluyen compuestos parcialmente reducidos (aminas aromáticas). La absorción se produce en superficies de sustancias húmicas, iones metálicos (óxidos e hidróxidos) y microbios. La interacción puede ocurrir principalmente mediante partición hidrófoba, enlaces de hidrógeno, intercambio iónico y quimisorción. El grado de partición entre soluto y sorbente depende de las propiedades fisicoquímicas y de factores ambientales [7]. Respecto al RDX y otras ciclonitraminas, también existe información interesante sobre su degradación en aguas [8], [9] y por acción de la luz [10]. Pero degradación no significa necesariamente la pérdida de toxicidad. De hecho, se conocen efectos tóxicos derivados del “envejecimiento” de los explosivos en condiciones experimentales y de campo [11].

La mayor parte de la bibliografía enfoca su interés en aquellos explosivos de uso más extensivo y con más historia en el ambiente, como el TNT y las nitraminas [5], [6]. No debe ignorarse sin embargo que otras fórmulas químicas están siendo desarrolladas o utilizadas desde hace algunos años y que, como es de esperar, comienzan a generar algún impacto de toxicidad en el ambiente. Tal es el caso de las denominadas

municiones insensibles [12], [13]. Tampoco es menor la preocupación por el impacto sobre el ambiente y la salud humana derivado de la enorme cantidad de material bélico hundido en los mares del mundo desde que los explosivos se utilizan en los grandes conflictos bélicos [14].

Respecto al impacto sobre microorganismos del suelo, se ha estudiado la capacidad de varias especies y consorcios para degradar al TNT [15], [16], [17], [18]. Pero es interesante tener en cuenta que hay un efecto recíproco, esto es, la toxicidad observada en muchos de ellos y la modificación del destino ambiental de los compuestos por esta causa. Se ha descrito la inhibición por TNT de la degradación anaeróbica de RDX y HMX en suelos contaminados que contienen poblaciones microbianas autóctonas [19]. Se propuso que el mecanismo de inhibición de TNT implica un efecto citotóxico sobre la población microbiana que degrada a las nitraminas RDX y HMX. Por lo tanto, la inhibición causada por el TNT en el suelo más activo biológicamente puede iniciar un transporte rápido de RDX y HMX hacia el subsuelo y el agua subterránea, menos activos [19].

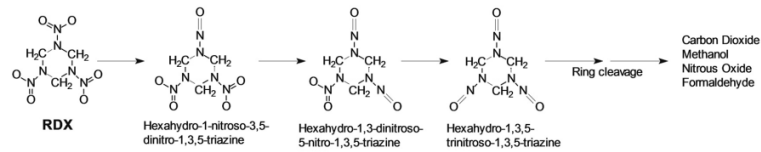
Es claro entonces que las transformaciones de estos explosivos por acción de los microorganismos en suelos o sedimentos no conducirán solamente a una variedad importante de productos (muchos de ellos activos biológicamente) si no que algunos, por su toxicidad, podrán modificar los consorcios en esas mismas matrices, lo cual hará que cada muestra difiera de otra según su procedencia. Los demás organismos del suelo o en contacto con él (o con sedimentos) se expondrían así a mezclas de composición variable de los productos de degradación (ver Figuras 1 y 2). Es de esperar entonces que la toxicidad y los biomarcadores para revelarla puedan variar según sea el caso.

Muy interesante también es el impacto de la contaminación con explosivos sobre la vegetación. La bibliografía consultada da cuenta que efectivamente, las fracciones biodisponibles en el suelo son absorbidas por el cuerpo del vegetal. Una vez en el cuerpo de la planta, los compuestos explosivos resultan altamente fitotóxicos e inducen una gama amplia de respuestas, tanto morfológicas como fisiológicas [20], [21]. Se conocen bien las respuestas morfológicas de las plantas a los contaminantes explosivos, no siendo lo mismo para los impactos fisiológicos. Las respuestas al estrés de las plantas expuestas a explosivos reflejan la acumulación de toxinas en los tejidos. La nitroglicerina y el RDX se mueven rápidamente hacia las hojas, dañando significativamente los tejidos y estructuras de las mismas y afectando negativamente la fotosíntesis y el intercambio de gases. En cambio, el TNT se acumula fuertemente en los tejidos de las raíces causando daños físicos significativos e interrumpiendo tanto la función fotosintética como las relaciones hídricas. Lo que es único de los compuestos explosivos en comparación con otros xenobióticos, o incluso con factores estresantes naturales, es que las respuestas al estrés que inducen no siempre siguen el patrón típico. El trinitrotolueno es muy tóxico para las plantas terrestres, afectando la tasa de germinación, la disminución de la biomasa vegetal y provocando el crecimiento anormal; teniendo estas características una correlación positiva con el aumento de la concentración del explosivo [7]. Con el avance de herramientas analíticas como la teledetección, las investigaciones futuras podrán obtener una mayor comprensión de estas y otras interacciones de las fábricas de explosivos con su ambiente, teniendo una valoración más comprehensiva. Este enfoque resultará necesario para comprender las diversas respuestas de estrés fisiológico y morfológico que la vegetación puede exhibir en presencia de RDX y TNT [7]. Parece claro que las respuestas al estrés actúan como

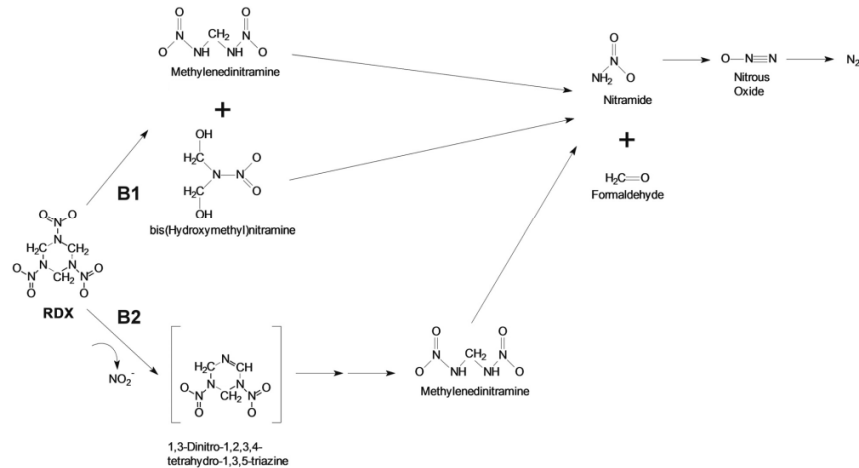
filtros fisiológicos que facilitan la proliferación de especies tolerantes y la extirpación de especies intolerantes. Los contaminantes alteran entonces la composición de la comunidad a medida que afectan de manera diferente a las plantas en cada etapa de la vida (ej. germinación, juvenil, adulto), modificando posteriormente los procesos del ecosistema a mayor escala.

Anaerobic Pathways

A. Nitro-reduction



B. Ring cleavage



Aerobic Pathway

C. Denitration

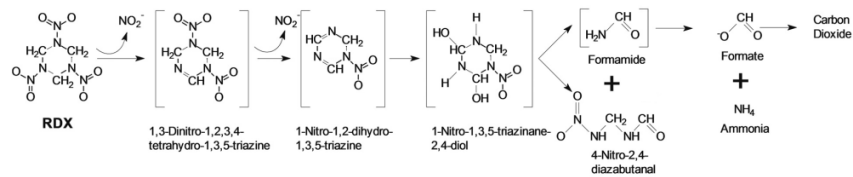


Figura 1. Vías metabólicas para el RDX en microorganismos, en condiciones anaeróbicas y aeróbicas. Adaptado de [18]. Algunos de los metabolitos que pueden formarse, como las N-nitrosaminas (vía anaeróbica reductiva) son potenciales mutágenos a través del metabolismo oxidativo de otros organismos que se expongan a estas nitrosaminas desde suelos o sedimentos.

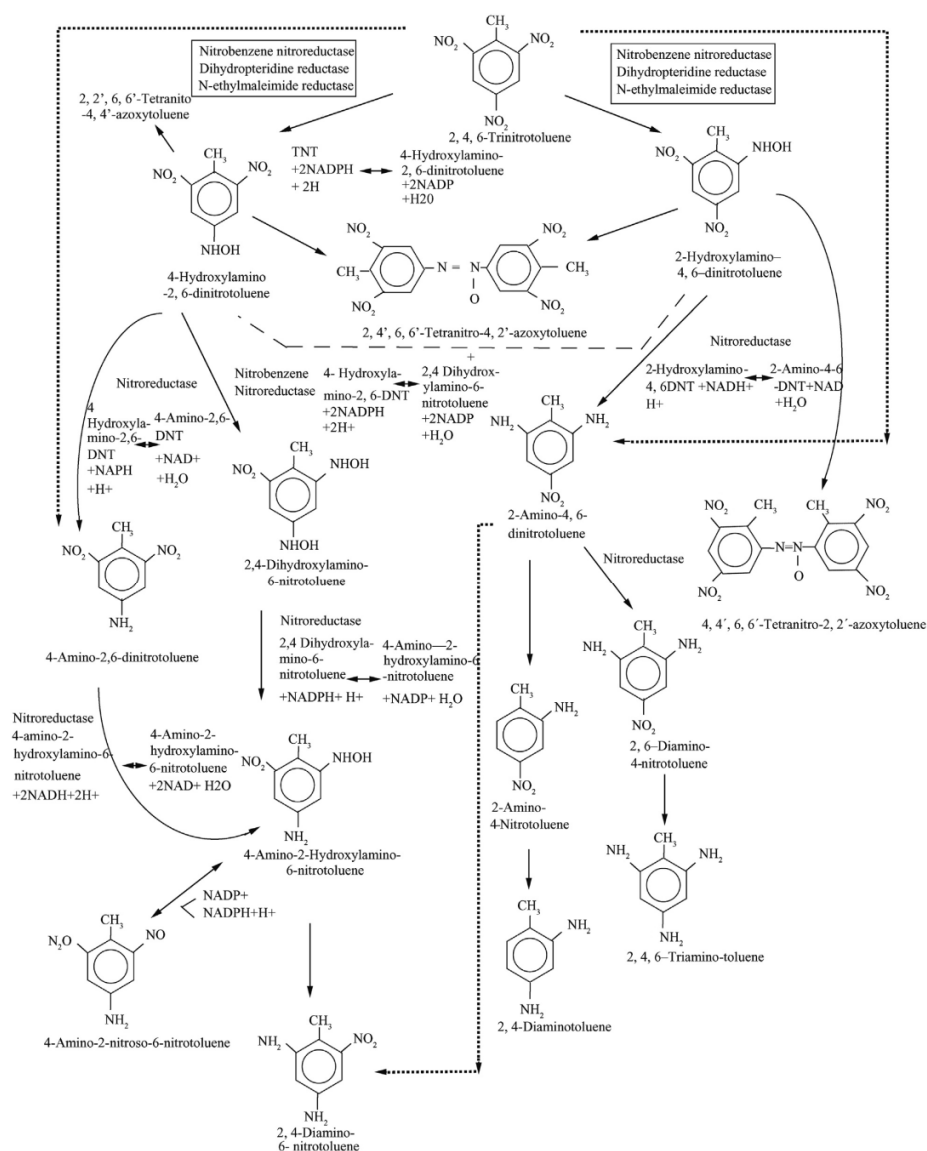


Figura 2. Vías metabólicas para la degradación aeróbica del TNT por microorganismos. Adaptado de [16]. La mayoría de los metabolitos derivados de la reducción de los grupos nitro aromáticos conduce a productos con probable o conocida acción mutagénica o tóxica en animales (aminas aromáticas, compuestos nitroso, hidroxilamino o azoxi).

A partir del caso testigo de la Fábrica Militar de Pólvoras y Explosivos “Azul” (FANAZUL), surgió en CITEDEF la inquietud de realizar estudios más detallados para evaluar el impacto ambiental de ésta y otras instalaciones similares o de campos de tiro en distintos sitios del país. En tal contexto es relevante realizar medidas de biomonitoring que puedan revelar algún impacto en el ecosistema del lugar y por supuesto, eventuales consecuencias para la población cercana (a través por ejemplo de la migración de contaminantes por las napas de donde se surten las fuentes de agua potable) [22], [23], [24], [25]. Un enfoque posible para la evaluación del pasivo ambiental (desde lo toxicológico) comprendería el estudio de los efectos por la exposición al TNT y otros explosivos envejecidos en el suelo en organismos blanco que

representen por ejemplo dos niveles tróficos (ej. una especie vegetal local o modelo y algún invertebrado del suelo). Estos datos pueden utilizarse para definir criterios o valores de referencia para la gestión ambiental y la realización de evaluaciones de riesgo específicas. Por ejemplo, las lombrices son organismos esenciales para el ecosistema suelo. Se encargan de preservar la textura y estructura del mismo mediante el incremento de la aireación y el drenaje por medio de la degradación de la materia orgánica, ayudando a su descomposición por parte de los microorganismos, lo que hace que los nutrientes sean más asimilables para las plantas. Estos anélidos se utilizan ampliamente como organismos para el monitoreo de sistemas terrestres, como indicadores sensibles de la calidad de suelos frente a un amplio espectro de xenobióticos y por ello decidimos ensayar el impacto tóxico de los explosivos en este organismo [26], [27], [28]. En estos ensayos se realizarán exposiciones crónicas para evaluar la toxicidad subletal y la absorción de los explosivos envejecidos de esos suelos. Los organismos serán evaluados a través de medidas variadas, la mayor parte en manos de nuestros laboratorios (como la histología/histoquímica y las determinaciones bioquímicas relacionadas con el estrés oxidativo o el daño genético) así como la identificación y cuantificación de especies químicas presentes en sus tejidos, las muestras de agua y de suelo [29], [30]. Los ensayos ya realizados en nuestro laboratorio reflejan las diferencias esperables entre TNT y RDX en su acción tóxica en este organismo por exposición externa (dérmica), en función de su liposolubilidad y reactividad química (ver Figura 3).

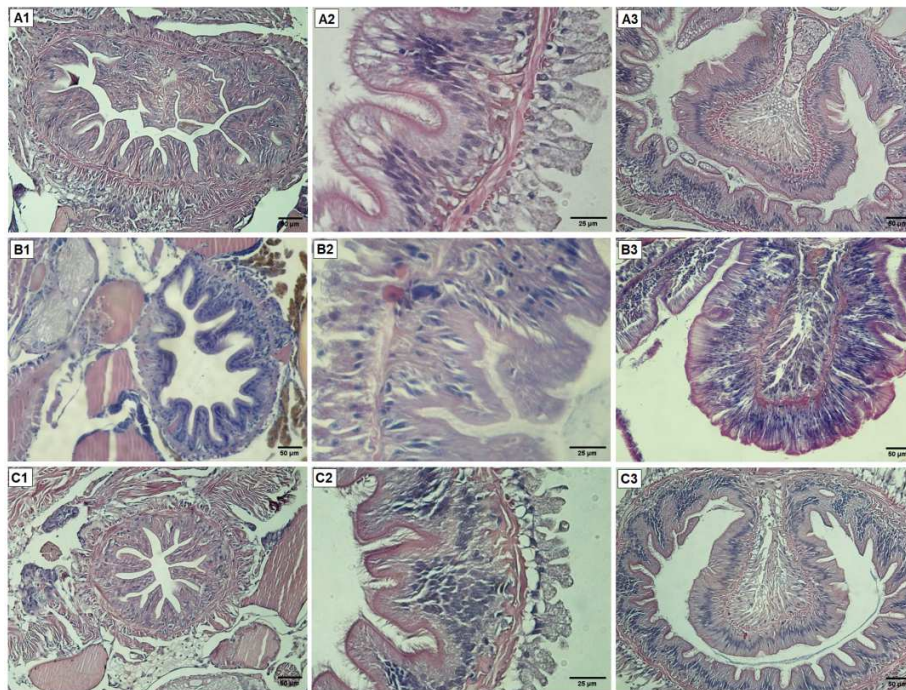


Figura 3. Alteraciones histológicas en la lombriz de tierra (*Eisenia foetida*) por exposición externa (método de ensayo de papel de filtro OECD 207) a TNT o RDX. Los daños observados son coherentes con una mayor liposolubilidad del TNT, que favorece la absorción y distribución del compuesto hasta zonas más internas del organismo (ej. tubo digestivo).

A. Control. **1.** Corte transversal de la primera sección del tubo digestivo: aspecto normal (Hematoxilina-eosina 200X). **2.** Corte transversal de la zona clitelar: aspecto normal del epitelio intestinal, la membrana basal y el tejido cloragógeno (600X). **3.** Corte transversal de la zona post-clitelo: aspecto normal del tiflosol, epitelio intestinal y tejido cloragógeno. (200X).

B. TNT ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). **1.** Corte transversal de la primera sección del tubo digestivo: Se observa tejido levemente inflamado (200X). **2.** Corte transversal de la zona clitelar: Se observan cuerpos de Russell, inflamación y lisis celular en tejido cloragógeno (600X). **3.** Corte transversal de la zona post-clitelo: Cambios histopatológicos en lombrices tratadas, se observa congestión e inflamación (200X).

C. RDX ($8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). **1.** Corte transversal de la primera sección del tubo digestivo: Tejido epitelial conservado con presencia de células inflamatorias (200X). **2.** Corte transversal de la zona clitelar: Hiperplasia de enterocitos, tejido cloragógeno con edema y lisis celular leve (600X). **3.** Corte transversal de la zona post-clitelo: Arquitectura conservada con inflamación leve (200X).

Como muestran los resultados obtenidos en este ensayo, la exposición a los explosivos por la vía dérmica revela una diferencia clara en la toxicidad entre RDX y TNT, que puede interpretarse en términos de su distinta solubilidad en los tejidos como también por una reactividad química diferente (Figura 3). Este experimento constituye un primer paso para evaluar rápidamente (desde la histología) la acción tóxica de ambos. Será importante continuar con estudios que permitan identificar la presencia de los explosivos o de sus metabolitos en los tejidos como así también analizar la influencia de una toxicocinética diferente sobre los daños observados, si es que los tóxicos ingresan al organismo a través del tubo digestivo. En este caso, se considerarán las variables relacionadas con el tipo de suelo donde la lombriz habita y del que se alimenta. Todo este trabajo experimental está en desarrollo en nuestros laboratorios. Una etapa posterior en el proyecto de investigación permitirá evaluar el impacto tóxico con suelos obtenidos en escenarios reales de sitios contaminados, donde las condiciones bióticas y abióticas jugarán seguramente como condicionantes de lo que pueda encontrarse. Serán de esperar concentraciones más bajas y la presencia de productos de la degradación de los explosivos. Esto puede llevar a efectos tóxicos que se revelen con medidas (biomonitoreo) más específicas y sensibles de un daño subletal (por ejemplo la alteración de actividades enzimáticas relacionadas con los mecanismos de defensa o en biomoléculas críticas para la viabilidad de procesos celulares).

Conclusiones y perspectivas futuras

La comprensión de los mecanismos de la toxicidad de las sustancias químicas constituye una herramienta poderosa para reconocer una intoxicación en curso así como también para anticipar un riesgo durante el desarrollo o el uso de un producto. El problema cuando se estudia el mecanismo de la acción tóxica de una sustancia es que no siempre el sitio blanco del daño es definido o único, y que, entre las alteraciones evidentes en la bioquímica celular no todas tienen una vinculación directa con las consecuencias [31]. Dicho de otro modo, la ocurrencia de fenómenos medibles en el entorno celular no significa necesariamente que éstos tengan la misma relevancia en relación con la injuria tóxica [32]. La comprensión de un proceso tóxico en un ambiente donde sean varias las especies impactadas es mucho más difícil y es entonces cuando se

hace clara la necesidad de un biomonitoreo a la vez específico pero abarcador para caracterizar el caso [5], [6], [32]. Una estrategia como la que propone nuestro proyecto de investigación cumple con esta premisa ya que plantea objetivos dirigidos a la comprensión del impacto tóxico desde distintos enfoques. En primer lugar, medidas que permiten ubicar el daño dentro del organismo al tiempo que distinguen su tipo, como la histología o la histoquímica. Otras medidas que buscan revelar la relación entre lo observado microscópicamente con la naturaleza de las especies químicas derivadas de los tóxicos estudiados (los explosivos). Aquí entran a jugar la analítica instrumental y la bioquímica de enzimas. Por último podemos mencionar a los ensayos de campo, que además de relacionar el mundo real con lo estudiado en el laboratorio permiten evidenciar la relevancia de variables que no se pueden reproducir fácilmente en la mesada pero que pueden cambiar la comprensión del problema.

Decir que algo es plausible significa que es coherente con el conocimiento acumulado en el dominio pertinente al fenómeno que se intenta explicar, con independencia de si existe o no, evidencia directa que lo confirme. El aporte que puede hacerse desde la toxicología experimental y el biomonitoreo contribuye al esclarecimiento de estas cuestiones y los temas que se analizan en este trabajo no son la excepción [33]. El ambiente presenta varias situaciones reconocidas y bien estudiadas donde la contaminación impacta seriamente en la salud del ambiente y la calidad de vida humana. El caso presente es uno más. En otras palabras, se trata de contribuir para identificar los problemas, dimensionarlos y buscar las soluciones.

Agradecimientos: Proyecto de Investigación PDTS 2024-2025 (FIE-UNDEF). Al soporte de financiación de CITEDEF y UNIDEF (MINDEF-CONICET).

Referencias

1. Fernández-López, C., Posada-Baquero, R., Ortega-Calvo, J.J.: Nature-based approaches to reducing the environmental risk of organic contaminants resulting from military activities. *Sci. Total Environ.* 843, 157007 (2022)
2. United States Army Environmental Command under contract with the United States Army Corps of Engineers: Final Fourth Five-Year Review Report. Former Joliet Army Ammunition Plant Will County, Illinois (2019)
3. Pichtel, J.T.: Distribution and fate of military explosives and propellants in soil: A review. *Appl. Environ. Soil Sci.* 2012, 1--33 (2012)
4. Houston, J.G., Lotufo, G.R.: Dietary exposure of fathead minnows to the explosives TNT and RDX and to the pesticide DDT using contaminated invertebrates. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2, 286--292 (2005)
5. Bannon, D.I., Williams, L.R.: Wildlife Toxicity Assessment for 1,3,5-Trinitrohexahydro-1,3,5-Triazine (RDX). En: Williams, M.A., Reddy, G., Quinn Jr., M.J., Johnson, M.S. (eds.) *Wildlife Toxicity Assessments for Chemicals of Military Concern*, pp. 53--86. Elsevier, Amsterdam (2015)

6. Johnson, M.S., Reddy, G.: Wildlife Toxicity Assessment for 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT). En: Williams, M.A., Reddy, G., Quinn Jr., M.J., Johnson, M.S. (eds.) *Wildlife Toxicity Assessments for Chemicals of Military Concern*, pp. 25--51. Elsevier, Amsterdam (2015)
7. Chatterjee, S., Deb, U., Datta, S., Walther, C. y Gupta, D.K.: Common explosives (TNT, RDX, HMX) and their fate in the environment: Emphasizing bioremediation. *Chemosphere* 184, 438--451 (2017)
8. Ariyaratna, T., Ballentine, M., Vlahos, P., Smith, R.W., Cooper, C., Böhlke, J.K., Fallis, S., Groshens, T.J., Tobias, C.: Degradation of RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine) in contrasting coastal marine habitats: Subtidal non-vegetated (sand), subtidal vegetated (silt/eel grass), and intertidal marsh. *Sci. Total Environ.* 745, 140800 (2020)
9. Crocker, F., Thompson, K., Szecsody, J., Fredrickson, H.: Biotic and abiotic degradation of CL-20 and RDX in soils. *J. Environ. Qual.* 34, 2208--2216 (2005)
10. Singh, S.K., Vuppuluri, V., Son, S.F., Kaiser, R.I.: Investigating the photochemical decomposition of solid 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX). *J. Phys. Chem. A* 124, 6801--6823 (2020)
11. Best, E.P.H., Tatem, H.E., Geter, K.N., Wells, M.L., Lane, B.K.: Effects, uptake, and fate of 2,4,6-trinitrotoluene aged in soil in plants and worms. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 2539--2547 (2009)
12. Kennedy, A.J., Poda, A.R., Melby, N.L., Moores, L.C., Jordan, S.M., Gust, K.A., Bednar, A.J.: Aquatic toxicity of photo-degraded insensitive munition 101 (IMX-101) constituents. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 2050--2057 (2017)
13. Qin, C., Abrell, L., Troya, D., Hunt, E., Taylor, S., Dontsova, K.: Outdoor dissolution and photodegradation of insensitive munitions formulations IMX-101 and IMX-104: Photolytic transformation pathway and mechanism study. *Chemosphere* 280, 130672 (2021)
14. Barbosa, J., Asselman, J., Janssen, C.R.: Synthesizing the impact of sea-dumped munition and related chemicals on humans and the environment. *Mar. Pollut. Bull.* 187, 114601 (2023)
15. Marín Catacora, C., Duran Ramírez, Y., Ramírez Roca, P., Castillo Cotrina, D.: Degradación aeróbica de TNT (2,4,6-trinitrotolueno) por un consorcio bacteriano aislado de ambientes contaminados. *Ciencia & Desarrollo* 16, 20--28 (2017)
16. Serrano-González, M.Y., Chandra, R., Castillo-Zacarías, C., Robledo-Padilla, F., Rostro-Alanis, M. de J., Parra-Saldivar, R.: Biotransformation and degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by microbial metabolism and their interaction. *Def. Technol.* 14, 151--164 (2018)
17. Villegas Plazas, S.M.: Aislamiento de microorganismos degradadores de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) a partir de ambientes contaminados con explosivos. Tesis de grado en Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia, Pontificia Universidad Javeriana (2014)
18. Fuller, M., Heraty, L., Condee, C., Vainberg, S., Sturchio, N., Bohlke, J., Hatzinger, P.: Relating carbon and nitrogen isotope effects to reaction mechanisms during aerobic and anaerobic degradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) by pure bacterial cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 3297--3309 (2016)
19. Sagi-Ben Moshe, S., Ronen, Z., Dahan, O., Weisbrod, N., Groisman, L., Adar, E., Nativ R.: Sequential biodegradation of TNT, RDX and HMX in a mixture. *Environ. Pollut.* 157, 2231--2238 (2009)

20. Via, S.M., Manley, P.V.: Effects of major munitions compounds on plant health and function. En: Husen A. (ed.) *Plants and Their Interaction to Environmental Pollution*, pp. 309--332. Elsevier, Amsterdam (2023)
21. Via, S.M., Zinnert, J.C.: Impacts of explosive compounds on vegetation: A need for community scale investigations. *Environ. Pollut.* 208 (Pt B), 495--505 (2016)
22. Ares, M.G., Chagas, C.I., Varni, M.: Respuesta hidrológica de cuencas de diferentes tamaños ubicadas en la pampa serrana y en la pampa ondulada. *Cienc. Suelo* 32, 117--127 (2014)
23. Barranquero, R.S., Varni, M.R., Pardo, R., Vega, M., Zabala, M.E., Ruiz de Galarreta, V.A.: Propuesta para el estudio comparativo del recurso hídrico subterráneo. Ejemplo de caso: cuencas de los arroyos Languyú y Del Azul. *Revista de Geología Aplicada a la Ingeniería y al Ambiente* 37, 45--56 (2016)
24. CITEDEF: Informe final. ESTUDIO AMBIENTAL FM AZUL. OT 03 NAC 032/18 (2019)
25. CITEFA: FANAZUL: Evaluación de impacto ambiental (1999)
26. Robidoux, P.Y., Svendsen, C., Caumartin, J., Hawari J., Ampleman, G., Thiboutot, S., Weeks J.M., Sunahara, G.I.: Chronic toxicity of energetic compounds in soil determined using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1764--1773 (2000).
27. Fuchs, J., Piola L., González, E.P., Oneto, M.L., Basack, S., Kesten, E., Casabé, N.: Coelomocyte biomarkers in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Environ. Monit. Assess.* 175, 127--137 (2011)
28. Fuchs, J.S., Oneto, M.L., Casabé, N.B., Gómez Segura, O., Tarulla, R., Vaccarezza, M., Sánchez-Rivas, C., Kesten, E.M., Wood, E.J.: Ecotoxicological characterization of a disposal lagoon from a munition plant. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 696--703 (2001)
29. Fuchs, J.S., Formosa Lemoine, F., Castro, G.D.: Cambios histológicos y morfométricos en la lombriz de tierra inducidos por la exposición al explosivo TNT (2,4,6-trinitrotolueno). *Acta Toxicol. Argent.* 31(Suple), 102 (2023)
30. Crouch, R.A., Smith J.C., Stromer B.S., Hubley C.T., Beal S., Lotufo G.R., Butler A.D., Wynter M.T., Rosado D.A., Russell A.L., Coleman J.G., Clausen J.L., Bednar A.J. Preparative, extraction, and analytical methods for simultaneous determination of legacy and insensitive munition (IM) constituents in aqueous, soil or sediment, and tissue matrices. Report Number: ERDC TR-21-12. US Army Engineer Research and Development Center (2021)
31. Castro, G.D.: Dependencia de la dosis en los mecanismos de toxicidad y la evaluación de riesgo en toxicología. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 47, 561--585 (2013)
32. Castro, G.D.: El aporte de la toxicología experimental a la evaluación de riesgo tóxico y el desarrollo de tratamientos para las intoxicaciones. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 57, 107--120 (2023)
33. Navarro, Á.R., Costantini, M.H., Castro, G.D.: El impacto de la contaminación ambiental en la salud pública. En: Bidiña, A., Blesa, M.A., Fernández Niello, J., Gutti, P., Jacovkis, P., Semorile, L. (eds.) *¿En qué conurbano queremos vivir?*, pp. 218--253. Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias, Buenos Aires (2023)