

Para contar los latidos del corazón de *Daphnia sp.*

To Count the Heartbeats of *Daphnia sp.*



Texto recibido: 10 de septiembre de 2017
Texto aprobado: 29 de septiembre de 2017

Por: Marco Antonio Bautista Acevedo,
Luz Angélica Hernández Carbajal,
Celso Miguel Luna Román y
Eva Cristina Ramírez Aguilar

Resumen:

La presente propuesta es un trabajo realizado en el CCH Plantel Oriente, ejemplifica el uso de las TIC en el desarrollo de una actividad experimental realizada en el SILADIN; en la que los estudiantes ponen a prueba distintos dispositivos para medir los latidos del corazón de *Daphnia sp.*, sometida a distintas sustancias de limpieza de uso cotidiano. Esta actividad experimental promueve en los estudiantes el establecimiento y verificación de hipótesis, la obtención y elaboración de bases de datos, el análisis estadístico y su interpretación. La medición y la comparación son el punto medular, en el que las TIC se incorporan como herramientas en la recopilación y tratamiento de los datos que propicia que los estudiantes manipulen, cuenten y puedan valorar. Las TIC intervienen y condicionan los procesos de transmisión y construcción del conocimiento. Los resultados muestran que el mejor dispositivo para contar los latidos fue la cámara de video de alta velocidad, a diferencia de los contadores manual y digital (descargados a dispositivos móviles). En cuanto a la comparación de las diferentes sustancias utilizadas, no se observa diferencias significativas en el efecto de los latidos del corazón, a excepción de la Coca Cola®.

Palabras clave: TIC, *Daphnia sp.*, contadores, latidos cardiacos.

Abstract:

The following proposal is a work carried out at the CCH campus Oriente, which exemplifies the use of Information and Communication Technologies (ICT), in the development of an experimental activity carried out in the SILADIN; in this didactic strategy the students test different devices to measure the heartbeat of *Daphnia sp.*, subjected to different daily cleaning substances. This experimental activity promotes in students the establishment and verification of hypotheses, obtaining and elaboration of databases. Measurement and comparison are the core point, in which ICT incorporate as tools in the collection and processing of data that allows students to manipulate, count and value. ICT intervene and condition the processes of transmission and construction of knowledge. The results show that the best device to count the beats was the high-speed video camera, unlike manual and digital counters (downloaded to mobile devices). As for the comparison of the different substances used, no significant differences in the effect of the heartbeat are observed, except for Coca Cola®.

Keywords: ICT, *Daphnia sp.*, count the hearbeats.

Introducción

La capacidad que tienen las Tecnologías de la Información y Comunicación (TIC) para ampliar la relación espacio-temporal entre los estudiantes y el profesor, además de posibilitar el acceso a gran cantidad de información, propicia la creación de ambientes de enseñanza interactivos y experiencias de aprendizaje más dinámicas en los estudiantes. Promover el empleo de las TIC en las prácticas académicas de estudiantes y profesores depende de la capacidad y habilidades de todos los actores involucrados y de una articulación en los procesos de enseñanza-aprendizaje; en particular si lo que se quiere es una efectiva integración de las TIC, de tal manera que intervengan y condicionen los procesos de transmisión y construcción del conocimiento dentro del aula (Hernández et al., 2014).

Desde este enfoque, el docente requiere promover la participación activa del estudiante a través de la integración de las TIC, en el logro de los aprendizajes; por lo tanto, la incorporación de éstas depende de que el docente ponga atención en el tipo y calidad de las interacciones que desea que se propicien entre los estudiantes y las TIC, de tal manera, que el uso de estas herramientas y la información que se obtenga a través de ellas genere un aprendizaje significativo.

En particular, la presente estrategia didáctica, implementada en el CCH Plantel Oriente en el semestre 2017-2 (enmarcada en los nuevos programas de Biología I y II del PEA 2016) se caracteriza por ser una actividad experimental, en la cual los estudiantes de forma activa identificaron el efecto de algunas sustancias de limpieza de uso cotidiano sobre la pulga de agua (*Daphnia* sp.), el efecto se cuantificó a través de diferentes recursos tecnológicos para conocer la frecuencia cardíaca y comparar las variaciones observadas en cada una de las sustancias empleadas, además de contrastar las variaciones existentes entre diferentes formas de realizar una medición para este tipo de observaciones.

Los estudiantes realizaron hipótesis previas sobre la variación de la frecuencia cardíaca y su relación con el efecto de las sustancias a las que serían sometidas las pulgas de agua por lo que la medición de la frecuencia cardíaca fue la manera en la que se respaldarían tales afirmaciones. Bajo ese esquema, las hipótesis planteadas por los estudiantes no presentaban consenso. Cabe mencionar que varios autores, según la Dirección General de Educación y Cultura (EURYDICE, 2006), indican que en la realización de un experimento, alumnos de 9 a 14 años tienden a considerar sólo una variable y por consiguiente ignoran las fluctuaciones en las demás variables; además, no ven la necesidad de repetir una medición (experimento), parece que no cuestionan la

calidad de la medición ni la posibilidad de mejorar o emplear instrumentos más sensibles. Por ello la dispersión de los resultados de las mediciones presenta un problema, de ahí que en muchos de los experimentos los docentes nos sentimos obligados a intentar obtener el mismo resultado cuando se repite la medición (reproducibilidad).

En esta estrategia didáctica, la medición y la comparación son el punto medular, en el que las TIC se incorporan como herramientas en la recopilación y tratamiento de los datos experimentales, que propician que los estudiantes manipulen, cuenten y puedan valorar; es decir, las TIC intervienen y condicionan los procesos de transmisión y construcción del conocimiento, a través de la participación activa del estudiante en la tarea de contar y de interpretar los resultados, lo que genera un puente cognitivo entre la acción y el aprender. Por lo anterior, se hizo uso de contadores digitales (aplicaciones descargadas a sus dispositivos móviles) y manuales, para contar y registrar el número de latidos cardiacos de *Daphnia sp.* sometida a diferentes sustancias.

Las problemáticas a las que se enfrentaron en cuanto a la medición fue la exactitud, la cual describe qué tan cerca una medida está del valor verdadero; para poder valorar la exactitud de las mediciones realizadas por los estudiantes, se incorporó a través de una cámara de alta velocidad la videograbación de los eventos en cuestión, lo que permitió comparar las mediciones (manual y digital) y el conteo realizado a través del video reproducido a baja velocidad (slow motion). Otro factor al que se enfrentaron fue la precisión de la medición, misma que describe la reproducibilidad de la medición; al respecto, en cada evento observado y cuantificado cada estudiante, al medir la frecuencia cardiaca, observó cómo varió la medición entre sus compañeros de grupo, por lo que concluyó que la medición está en función del observador.

A continuación, se describe el contexto en el que se llevó a cabo la actividad experimental, así como el procedimiento y los resultados obtenidos.

El contexto

Esta actividad experimental obedece al programa de Biología II (PEA, 2016), a la segunda unidad: ¿Cómo interactúan los sistemas biológicos con su ambiente y su relación con la conservación de la biodiversidad?, El propósito de esta unidad es que el estudiante "describirá la estructura y funcionamiento del ecosistema, a partir de las interacciones que se presentan entre sus componentes, para que **reflexione sobre el efecto que el desarrollo humano ha causado en la biodiversidad** y las alternativas del manejo sustentable en la conservación biológica". El aprendizaje a lograr para la temática Impacto de la actividad humana en el ambiente es que:

- El alumno identifique el impacto de la actividad humana en el ambiente, en aspectos como: contaminación, erosión, cambio climático y pérdida de especies.

Previo a la realización de la actividad experimental, los estudiantes se encuentran familiarizados con algunas causas y problemáticas ambientales, como el crecimiento poblacional, y la consecuente generación de residuos sólidos, aguas residuales y emanaciones contaminantes a la atmósfera derivados del estilo de vida y los patrones de consumo de los individuos. De forma implícita, reconocen que el impacto ambiental negativo derivado de estas conductas podría mitigarse si los ciudadanos toman conciencia de que el estilo de vida que practican tiene repercusiones ambientales a nivel global. Se plantea la siguiente pregunta: ¿Cómo medir el impacto que nuestro estilo de vida tiene para el planeta? Una manera de hacerlo es a través de un indicador ambiental; la huella ecológica. Este concepto propuesto por Wackernagel y Rees en 1996 es “una medida de cuánta tierra y agua productivas requiere un individuo, una ciudad, un país o la humanidad, para producir los recursos que consumen y para absorber los desechos que generan”. Este es un indicador cuantitativo del impacto ambiental; y sus unidades son hectáreas globales por individuo (Ibarra-Cisneros y Monroy-Ata, 2014, p. 148).

El impacto ambiental derivado de estos patrones de conducta, o estilo de vida, de acuerdo con López, “viene determinado por las características individuales de la persona, el entorno microsocioal (familia, profesores, amigos...), macrosocioal (publicidad, cultura, sistema socio-económico) y el medio geográfico” (2009, p. 5). Así, la manera de ocupar su tiempo libre, el consumo, las costumbres alimentarias, los hábitos higiénicos y en particular el consumo de productos para satisfacer necesidades reales o generadas repercuten en el medio ambiente. Un ejemplo es el uso de sustancias para la limpieza del hogar que desde su producción y consumo representan aportes de contaminantes al medio ambiente.

Varios autores (Hirsch *et al.*, 1999; Christian *et al.*, 2003; Diwan *et al.*, 2010; Uchida *et al.*, 2016; U.S. Geological Survey, 2017) han documentado la presencia de diversos residuos químicos en escorrentías y drenaje, estos residuos son trasladados a cuerpos de agua de mayor tamaño por el escurrimiento superficial; ya que diversos residuos químicos (fertilizantes, petróleo, pesticidas, herbicidas, antibióticos, entre otros) son transportados por el agua de lluvia y drenaje a cuerpos de agua, lo que provoca eutrofización o toxicidad y pérdida de la biodiversidad; llega a encontrarse en tejidos animales, lo que ocasiona efectos adversos por la presencia e interacción, con ecosistemas acuáticos.

Los efectos tóxicos de estos contaminantes dependen de su biodisponibilidad y persistencia, de la capacidad de los organismos para acumularlos o excretarlos y de la interferencia de tales compuestos con procesos fisiológicos o ecológicos específicos. Muchos contaminantes al ser vertidos en cuerpos de agua disminuyen su concentración y/o se degradan. Otros, sin embargo, permanecen en el ambiente por mucho tiempo (Ramírez y Mendoza, 2008).

Para poder caracterizar a un contaminante, evaluar su impacto y establecer medidas de protección al ambiente se realizan estudios toxicológicos sobre los seres vivos, uno de ellos son los bioensayos o pruebas biológicas, que permiten evaluar cómo reaccionan los organismos en cuestión a las condiciones ambientales. Se utiliza cualquier tipo de organismos o partes de ellos (células, tejidos cultivados in vitro), según el tipo de efecto o respuesta que se requiera estudiar. Los más utilizados son los crustáceos, debido a que son consumidores primarios que ocupan un lugar clave en los ecosistemas acuáticos. Particularmente, los crustáceos del género *Daphnia* sp. son los más utilizados en pruebas de toxicidad ya que tienen una amplia distribución geográfica y juegan un importante papel al interior de la comunidad zooplanctónica (Damásio et al., 2008).



Estos organismos miden de 0.2 a 6 mm, presentan un ciclo de vida corto, de aproximadamente 25 días, se reproducen por partenogénesis, producen un alto número de crías, además son fáciles de cultivar y mantener en el laboratorio (Castillo 2004, Ramírez y Mendoza 2008). Por estas cualidades son utilizados para determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, entre otros (idem, 2004, p. 52).

Por lo anterior, y utilizando las pulgas de agua (*Daphnia* sp.) como modelo de estudio, los objetivos de esta actividad experimental son:

- Cuantificar los latidos cardiacos de *Daphnia* sp. en presencia de diferentes productos de limpieza doméstica.
- Utilizar dos tipos de contadores para medir la frecuencia cardiaca.
- Comparar los resultados obtenidos con ambos contadores (manual y digital) y el promedio de frecuencia cardiaca real obtenida mediante una grabación de alta velocidad.

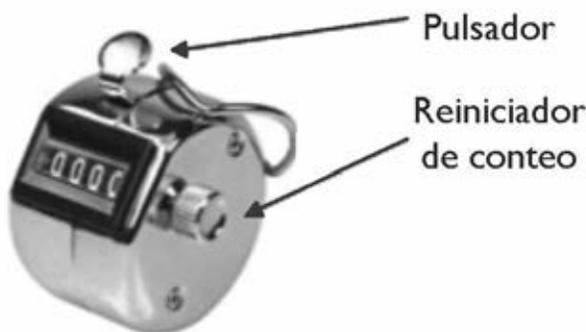
Procedimiento

Los estudiantes descargaron la siguiente aplicación a su celular: Contador con Pulsador¹ Aplicación Android: [≤https://play.google.com/store/apps/details?id=com.pra.counter>](https://play.google.com/store/apps/details?id=com.pra.counter). Se familiarizaron con la aplicación antes de iniciar la actividad experimental. Observaron las estructuras anatómicas de *Daphnia sp.* proyectadas a través del microscopio² y realizaron ejercicios de sincronización con respecto al latido del corazón de la pulga de agua abriendo y cerrando su puño durante un minuto. Una vez realizado lo anterior, se dividió al grupo de estudiantes; la mitad de ellos utilizó la aplicación digital en su dispositivo móvil y la otra utilizó un contador manual para cuantificar los latidos durante un minuto.

Una vez que ambos grupos de estudiantes se familiarizaron con el uso de los contadores para la medición de los latidos, realizaron la actividad experimental.

Se utilizaron diluciones al 50% de cada uno de los productos de limpieza: Cloralex®, Fabuloso®, Harpic®, desengrasante de cocina Roma® (detergente para ropa), y refresco Coca Cola®. Se colocó y observó al microscopio una muestra con pulgas de agua (control), se seleccionó una pulga para su observación y se proyectó en pantalla; los estudiantes observaron la pulga y contabilizaron el número de latidos cardiacos, utilizando los contadores, se registraron los resultados y de manera paralela se realizó la videograbación a alta velocidad del evento.

Se adicionó a la pulga una dilución de Cloralex® (50%) de la siguiente manera: a un costado del cubreobjetos se coloca papel absorbente y en el lado contrario de este se agrega gota a gota la dilución para hacer fluir el producto entre el portaobjetos y el cubreobjetos. Los estudiantes contabilizaron el número de latidos durante un minuto y registraron los resultados. Se repitió el mismo procedimiento para cada una de las diluciones restantes, todas al 50%, con diferentes organismos.

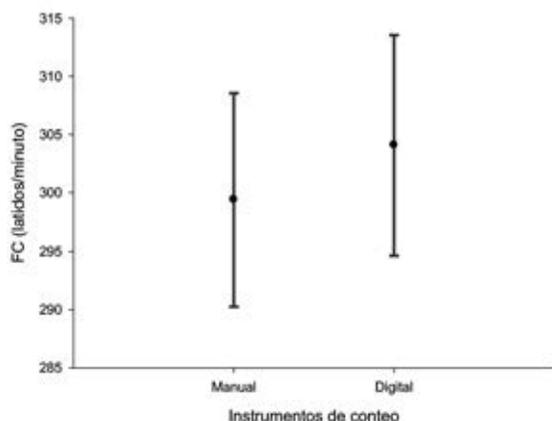


¹ En caso de otros sistemas operativos se instaló una aplicación similar.

² Se adaptó un videoflex, conectado a un videoprojector, al microscopio óptico.

Resultados y discusión

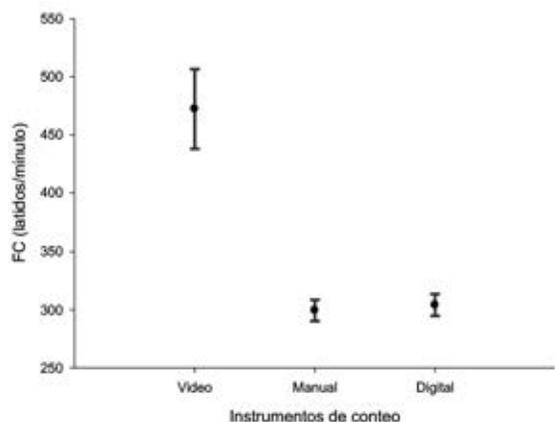
Esta estrategia didáctica se realizó con 199 estudiantes de cuarto semestre de la asignatura de Biología II, del turno vespertino. Con los datos de la frecuencia cardiaca de pulgas de agua sin tratamiento (manual y digital) y al cumplirse los supuestos estadísticos, se realizó una prueba t de Student. Los resultados muestran que no existen diferencias significativas ($t= 0.358$; $p=0.72$) entre las mediciones realizadas entre contadores manuales y digitales, ver gráfica 1.



Gráfica 1. Se analizaron los promedios de los latidos del corazón registrados con ambos contadores y no se encontraron diferencias significativas ($t= 0.358$; $p=0.72$).

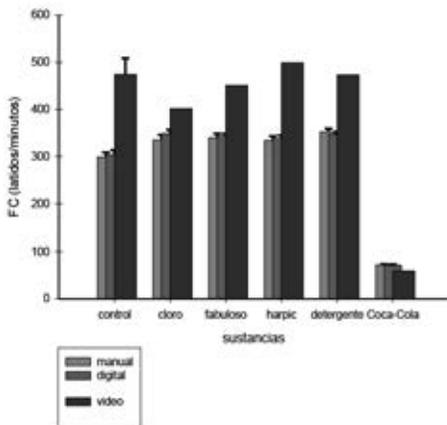
Al utilizar ambos contadores se puede observar, por los resultados de la gráfica 1, la dificultad que presentan los estudiantes para seguir el ritmo de los latidos del corazón de la pulga proyectada en pantalla. De acuerdo con Corotto et al. (2010), registran un rango de variación que va desde 91 a 521 latidos por minuto, con un promedio de 354 latidos.

En un inicio, pensaban que por el simple hecho de tener un dispositivo electrónico (digital) en sus manos, sus resultados serían más confiables, precisos y exactos; de hecho, manifestaron su descontento aquellos que emplearon un contador manual. Además, al finalizar la actividad experimental y comparar los resultados de ambos dispositivos, percibieron diferencias entre los contadores. Sin embargo, el análisis estadístico muestra que estas diferencias no son significativas (Gráfica 1). En contraste, cuando se analizaron videograbaciones de alta velocidad (240 cuadros por segundo), se contabilizó en los grupos control de pulgas el número de latidos real por minuto, lo que permitió analizar y comparar con los resultados obtenidos de los contadores (manual y digital). Para ello, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), la cual muestra que existen diferencias y que éstas son significativas ($F=8.55$; $p<0.05$), ver Gráfica 2.



Gráfica 2. El conteo de los latidos del corazón obtenidos por la videograbación a alta velocidad, permitió obtener la frecuencia cardiaca real, la cual en promedio es diferente significativamente ($F=8.55$; $p<0.05$) a la registrada por los alumnos con ambos contadores (digital y manual). Cabe señalar que el promedio obtenido de la frecuencia, utilizando este recurso, fue de 474.2 y la $SD=76.79$, esta cifra corresponde a lo registrado por Corotto et al. (2010), quienes utilizando la misma técnica de conteo reportan un rango de 91 a 521 latidos por minuto y un promedio de 354 latidos por minuto.

En cuanto al efecto de las sustancias de limpieza sobre los latidos cardiacos de las pulgas analizadas, no se encontraron diferencias significativas entre la mayoría de los tratamientos como se puede observar en la Gráfica 3; sin embargo, con la Coca Cola la diferencia sí es significativa (ANOVA $F=14.438$; $p<0.005$). Con esta sustancia de acuerdo con los registros se detuvo el corazón del organismo en un rango de 15 a 20 segundos de exposición (Tabla 1 y Gráfica 3).



Gráfica 3

Tabla 1. Comparación de las medias de los latidos de corazón (FC) obtenidas para las sustancias empleadas en la estrategia didáctica.

	Manual	Digital	Video
Control	299.38	304.09	474.20
Cloro	335	348.92	402
Fabuloso	339.85	342.83	451
Harpic	334.08	337.83	499
Detergente	352.31	346.17	473
Coca-Cola	72.15	71.25	59

Conclusiones

La estrategia es novedosa ya que el uso de los dispositivos de conteo promueve la participación activa de los estudiantes, la cual se vio reflejada en la acción de contar, en el planteamiento de hipótesis respecto al uso y eficacia de los contadores, así como el efecto de las sustancias en los latidos cardiacos de la pulga. La introducción de diferentes herramientas para contar fue determinante, en particular, la cámara de grabación a alta velocidad permitió mayor exactitud y precisión, ya que los estudiantes al no estar familiarizados y no tener la habilidad para contar con esa rapidez, requerían de esta tecnología para percibir y registrar el fenómeno, por lo que esto puede ser aprovechado desde el punto de vista del diseño experimental y ser utilizado en la comprobación de las hipótesis a través de los resultados obtenidos. Además, es un ejercicio que muestra la necesidad de integrar las tecnologías para realizar un experimento de esta naturaleza.

El tratamiento estadístico de los datos es de suma importancia para demostrar a los estudiantes que aunque ellos perciban diferencias (entre contadores), la realidad es que pueden no ser significativas, de ahí la necesidad de promover diferentes habilidades; una de ellas el pensamiento lógico matemático para comprender e interpretar un fenómeno biológico y las variables implicadas en su análisis, que los lleva a contrastar sus hipótesis. Por lo tanto, el

docente debe tener la habilidad del uso de las herramientas de análisis estadístico como parte de su formación, que le permita dar sustento a la interpretación de un fenómeno y con ello dirigir en su comprensión del mismo con el uso de las TIC. Por lo anterior, los estudiantes también son conscientes de la necesidad de realizar repeticiones que permitan que un experimento sea confiable, ya que no basta con que un solo observador cuente los latidos del corazón de las pulgas.

Aunque esta estrategia didáctica busca que el alumno identifique el impacto de sus actividades cotidianas en el medio ambiente y que genere un aprendizaje significativo, esto se observó de forma cualitativa al percibir asombro en los estudiantes cuando éstos observaron que la Coca Cola®, una sustancia que consideraban inofensiva por tratarse de una bebida, presenta un efecto fulminante en las pulgas en aproximadamente 20 segundos de estar expuestas. En algunos casos los estudiantes manifestaron sus conocimientos previos acerca del uso de esta bebida como producto de limpieza, de ahí que esto generó una reflexión no sólo sobre su consumo, que en muchos casos está relacionado con la salud del individuo, sino sobre su efecto en el medio ambiente como una sustancia tóxica.

Finalmente, los resultados obtenidos hacen evidente que para la medición e interpretación de algunos fenómenos se requiere de herramientas de registro y análisis que involucren el uso de las TIC, para el éxito y reproducibilidad de un experimento que favorece el proceso de enseñanza aprendizaje.

Agradecimientos

Al Ing. Químico Ramón Pérez Vega por facilitar el equipo de videograbación de alta velocidad y al SILADIN por los recursos proporcionados para la realización de la actividad experimental.

Referencias:

- Castillo, M. (ed.). (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. México: Centro internacional de investigaciones para el desarrollo/ Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- Corotto, F., Ceballos, D., Lee A., y Vinson. (2010). Making the Most of the Daphnia Heart Rate Lab: Optimizing the Use of Ethanol, Nicotine & Caffeine. *The American Biology Teacher*, Vol.72, (3), 176-179.
- Christian, T., Schneider, R. J., Färber, H. A., Skutlarek, D., Meyer, M. T., y Goldbach, H. E. (2003). *Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters*. *CLEAN Soil, Air, Water*, 31(1), 36-44.

- Damáso, J., Tauler, R., Teixió, E., Rieradevall, M., Prat, N., Riva M. C., Soares, A. & Barata, C. (2008). *Combined use of Daphnia magna in situ bioassays, biomarkers and biological indices to diagnose and identify environmental pressures on invertebrate communities in two Mediterranean urbanized and industrialized rivers (NE Spain)*. *Aquatic Toxicology*, 87(4), 310-320.
- Diwan, V., Tamhankar, A.J., Khandal, R.K., Sen, S., Aggarwal, M., Marothi, Y., Iyer, R.V., SundbladTonderski, K., & Stålsby-Lundborg, C. (2010). Antibiotics and antibiotic-resistant bacteria in waters associated with a hospital in Ujjain, India. *BMC Public Health*, 10(1), 414.
- EURYDICE. (2006). La enseñanza de las ciencias en los centros escolares de Europa: políticas e investigación. Ministerio de Educación y Ciencia. Recuperado de <https://publications.europa.eu/es/publication-detail/-/publication/1dc3df34-acdf-479e-bbbf-c404fa3bee8b>
- Hernández, L., Acevedo, J. A., Martínez, C., y Cruz, B. C. (2014). El uso de las TIC en el aula: un análisis en términos de efectividad y eficacia. Recuperado de Congreso Iberoamericano de Ciencia, Tecnología, Innovación y Educación. Sitio web: www.oei.es/congreso2014/memoriactei/523.pdf
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., & Kratz, K. L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 225(1), 109-118.
- Ibarra-Cisneros J. M. y Monroy-Ata A. (2014). Cuestionario para calcular la Huella Ecológica de estudiantes universitarios mexicanos y su aplicación en el Campus Zaragoza de la Universidad Nacional. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(2), 147-154.
- López-Miñarro, P. A. (2009). Salud y actividad física. Efectos positivos y contraindicaciones de la actividad física en la salud y calidad de vida. Recuperado de <https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/5151/1/Actividad%20f%C3%ADsica%20y%20salud.pdf>
- Ramírez R. P. y Mendoza C. A. (comps). (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. SEMARNAT*. México: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. Recuperado de <http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/573.pdf>
- Simmons, S. E. y Leyva, J. J. (1994). *Presence of soil-applied herbicides in three rights-of-way infiltration basins in San Joaquin County, California*. *Environmental Protection Agency*. Recuperado de <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/ehapreps/eh9401.pdf>
- Uchida, K., Konishi, Y., Harada, K., Okihashi, M., Yamaguchi, T., Do, M.H.N., Thi Bui, L., Duc Nguyen, T... & Yamamoto, Y. (2016). Monitoring of antibiotic residues in aquatic products in urban and rural areas of Vietnam. *Journal of Agriculture and Food Chem.* 64 (31), 6133-6138.
- USGS. (2017). National Reconnaissance of Pharmaceuticals, Hormones and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams is Making an Impact. *The U.S. Geological Survey Toxic Substances Hydrology Program*. Recuperado de <https://toxics.usgs.gov/highlights/impact.html>
- Wackernagel, M., & Rees, W. (1996). *Our ecological footprint: Reducing human impact on the Earth*. Canada: New Society Publishers.