

Evaluación ecotoxicológica de arroyos de la reserva San Rafael y su zona de amortiguamiento mediante bioensayos con *Daphnia magna* y *Lactuca sativa*

López Arias, T. R.¹; Esquivel Mattos, A.²; Peris, S.³

¹Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción

²Wildlife Paraguay-Calle Benito Juárez N° 1160, Luque, Paraguay

³Departamento de Zoología, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, 37071 Salamanca, España

E mail del autor para correspondencia: tlopez@facen.una.py

Evaluación ecotoxicológica de arroyos de la Reserva San Rafael y su Zona de amortiguamiento mediante bioensayos con *Daphnia magna* y *Lactuca sativa*. Se evaluaron los efectos ecotoxicológicos de la actividad agrícola en arroyos de la Reserva San Rafael y zona de amortiguamiento, mediante bioensayos, determinación de plaguicidas y parámetros fisicoquímicos. Se realizaron siete campañas entre los años 2012 y 2013, tomando muestras de agua y sedimentos en 5 arroyos, de los cuales dos son nacientes en zonas de bosque nativo y 3 en agroecosistemas de la zona de amortiguamiento. Se realizaron tests de toxicidad aguda y crónica con *Daphnia magna*, además ensayos de toxicidad aguda con *Lactuca sativa*. No se registró toxicidad aguda en *D. magna* ni en *L. sativa*, pero se observaron efectos tóxicos crónicos leves sobre su tasa de reproducción. Los análisis de plaguicidas, cipermetrina y clorpirifós arrojaron resultados negativos. Parámetros fisicoquímicos indican que las aguas se encuentran en buenas condiciones, categorizadas dentro de Clase I según estándares de la SEAM. Sin embargo, se detectan incrementos principalmente en los niveles de Nitratos y Fósforo total, al comparar los controles con aguas de agroecosistemas.

Palabras clave: bioensayos toxicidad, plaguicidas

Ecotoxicological assessment of streams in the San Rafael Reserve and its buffer zone through bioassays with *Daphnia magna* and *Lactuca sativa*. The ecotoxicological effects of agricultural activity on streams of the San Rafael Reserve and its buffer zone were assessed through bioassays, determination of pesticides and physicochemical parameters. Seven sampling campaigns were carried out between the years 2012 and 2013, taking water and sediment samples from five streams, two of which are water springs in a primary forest zone; the remaining three samples were taken from agroecosystems located within the buffer zone. Acute and chronic toxicity tests were carried out with *Daphnia magna*, in addition to acute toxicity assays with *Lactuca sativa*. No acute toxicity was recorded in *D. magna* or *L. sativa*, but slight chronic toxic effects were observed on their rates of reproduction. The pesticide screening for chlorpyrifos and cypermethrin determined that neither was present in the samples. Physicochemical parameters indicate that the waters are in good condition, classified as Class I according to the standards of the Secretariat of the Environment (SEAM by its Spanish acronym). However, increases were detected mainly in the levels of nitrates and total phosphorus when comparing the controls to waters from agroecosystems.

Keywords: toxicity, bioassays, pesticide

Steviana, Vol. 7, 2015, pp. 102 – 115.

Original recibido el 22 de junio de 2015.

Aceptado el 12 de octubre de 2015.

INTRODUCCIÓN

La agricultura se ha convertido en la base para el desarrollo económico del Paraguay, aportando el 16% del PIB (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2010), y según los pronósticos a mediano y largo plazo seguirá el incremento de las tierras cultivadas, debido a la demanda mundial de alimentos. Este modelo de desarrollo, trae consigo el uso de extensas superficies de terreno, incluyendo bosques, pastizales, humedales, entre otros ecosistemas terrestres. Además la agricultura actual conlleva el uso de grandes cantidades de plaguicidas; estimaciones indican que en el año 2010 en el Paraguay se importaron 114.376 T., a esto se suma la débil gestión de plaguicidas, muchas de las cuales presentan características ecotoxicológicas, que pueden tener efectos adversos sobre medio ambiente.

El Departamento de Itapúa, está ubicado en la zona sur-este de la Región Oriental del Paraguay. Limita al norte con los Departamentos de Caazapá y Alto Paraná, al este y al sur con la República Argentina y al oeste con el Departamento de Misiones. Posee un clima tropical a moderado. El Departamento presenta seis ordenes de suelos, estos son los Ultisoles (72,52%), los Entisoles (16,66%), los oxisoles (6,26%), Alfisoles (3,75%), Inceptisoles (1,60%), y tierras misceláneas (0,21%). Actualmente el 56,65 % del Departamento Itapúa (936.067 has), se destina al cultivo agrícola mecanizado; esta ha tenido un modelo de desarrollo agrícola de corto plazo, sin una planificación con consecuencias negativas en los que concierne a sus recursos naturales. El remanente boscoso se

encuentra hacia el norte del departamento, principalmente en la zona correspondiente a la Reserva San Rafael, estimaciones indican que el área boscosa abarca 149.860 has., correspondiente al 9,07 % de la superficie total (Rojas Ozuna *et al.* 2014) Los cultivos de soja, trigo, maíz, girasol, y otros rubros agrícolas son los más utilizados en los sistemas de siembra directa y en forma rotativa realizados en la zona de Itapúa (MAG, 2010); zona en la que se ubica el área de estudio del presente trabajo. Se seleccionan los plaguicidas cipermetrina, clorpirifos y glifosato por ser los más utilizados en los cultivos (Peruzzo *et al.* 2008).

El escenario de uso extensivo de los agroquímicos hace necesario conocer los riesgos que implican el uso de los mismos sobre organismos no blanco, así como determinar el destino ambiental de estos compuestos en aguas y suelos. Actualmente este tipo de evaluación se enmarca dentro de lo ciencia denominada Ecotoxicología. En el Paraguay, no se disponen de datos de evaluación del impacto de agroquímicos sobre la biodiversidad, siendo desconocido los posibles impactos en los ecosistemas.

Para la determinación de los niveles de toxicidad aguda y crónica de las aguas actualmente se disponen de una serie de pruebas con diversos organismos modelos. Estos ensayos están concebidos para determinar los efectos inmediatos y tardíos de la exposición química sobre una serie de criterios de valoración, como la supervivencia, la reproducción, y las respuestas bioquímicas y fisiológicas (Castillo Morales *et al.* 2004)

Los ensayos de toxicidad con *Daphnia magna* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras

(Guilhermino *et al.* 2000), aguas residuales domésticas e industriales (Baral *et al.* 2006), lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros. (Wernersson & Dave, 1997; Rodríguez, *et al.* 2006).

Para estimar los efectos sobre la comunidad vegetal, se disponen de organismos modelos como *Lactuca sativa*, *Allium cepa*, *Lemna sp.* entre otros. *L. sativa* se utiliza para realizar bioensayos de toxicidad aguda, lo que permite evaluar los posibles efectos fitotóxicos de las aguas, sedimentos e inclusive de sustancias puras y mezclas, en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas. Se establece como punto final para la evaluación de los posibles efectos tóxicos, la inhibición de la prolongación del crecimiento de la radícula (Castillo Morales *et al.* 2004; Dutka *et al.* 1991)

En el presente trabajo se evalúan los efectos ecotoxicológicos de la actividad agrícola en arroyos de la Reserva para Parque Nacional San Rafael, y zonas de amortiguamiento, mediante parámetros químicos determinantes de calidad de los sistemas acuáticos y ensayos de toxicidad aguda y toxicidad crónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de agua y de los sedimentos, fueron colectadas en cinco puntos de la reserva, en el área a cargo de la Fundación Pro Cosara, y zonas periféricas a la misma (Fig. 1). La ubicación geográfica de los cinco puntos de muestreo se resume como sigue:

- Punto 1 (P1): 26°36'59.30"S, 55°39'58.70"O Arroyo de sendero

Chachi. Ubicada en la reserva, en zona boscosa.

- Punto 2 (P2): 26°37'11.10"S, 55°35'12.60"O; Arroyo Pirapó. Zona de cultivos agrícolas.
- Punto 3 (P3): 26°34'47.10"S, 55°37'2.70"O; Arroyo Taguató. Zona de cultivos agrícolas.
- Punto 4 (P4): 26°38'3.50"S, 55°39'44.60"O; Laguna artificial en Pro Cosara.
- Punto 5 (P5): 26°39'56.10"S, 55°43'08.26"O; Arroyo Perlita. Zona de cultivos agrícolas.

Recogida, traslado y procesamiento de muestras

Las muestras de agua fueron colectadas y mantenidas hasta su estudio según criterios establecidos en APHA (1998). Para los ensayos toxicológicos y para la determinación de los parámetros fisicoquímicos las aguas fueron almacenadas en envases de polipropileno de 5 L de capacidad, a excepción de las utilizadas para la determinación de fosforo total y las destinadas para la determinación de plaguicidas, para las que se utilizaron frascos de vidrio color ámbar de 200 ml, y 1 L de capacidad respectivamente. Los sedimentos se recogieron en bolsas plásticas de 1L. En todos los casos, inmediatamente a la toma de las muestras, estas fueron depositadas en conservadoras a 4° C.

Previo a cada bioensayo se realizaron extracciones acuosas de los sedimentos. Se prepararon elutriados de los sedimentos de cada punto, manteniendo una proporción 1:4 de sedimento y agua dura reconstituida (Ramírez Romero & Mendoza Cantú 1998).

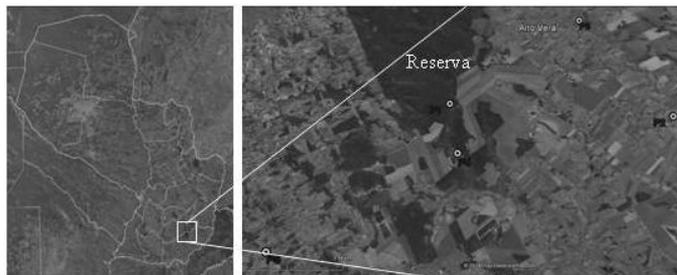


Fig. 1: Área de estudio, y sitios de colecta

Prueba de sensibilidad de *D. magna* y *L. sativa* frente a los plaguicidas cipermetrina, clorpirifos y glifosato.

En las pruebas de toxicidad con *D. magna*, se utilizan neonatos menores de 24 h de edad, que son expuestos a los tratamientos, por un periodo de 48 h (OECD 1998). Los test agudo en *D. magna* fueron ensayados dentro de los siguientes rangos de concentraciones medidas: 0,0001- 0,1 mg.L⁻¹ para el clorpirifos, 0,0005 - 0,02 mg.L⁻¹ para la cipermetrina, y entre 1-100 mg.L⁻¹ para el glifosato formulado. Este último también fue evaluado con *L. sativa* entre 0,01-100 mg.L⁻¹. Las concentraciones de los plaguicidas no fueron verificadas analíticamente.

Para *D. magna*, se siguieron los delineamientos propuestos por la OECD (2004). Los ensayos se realizaron aplicando el diseño DBCA n×3. Como medio de dilución de los plaguicidas se utilizó agua dura reconstituida (para la cipermetrina y el glifosato), y agua dura más metanol (para el clorpirifos); se trabajaron con diferentes concentraciones y dos controles, cada una con 3 réplicas de 10 neonatos del cladóceros. Los estudios se extendieron por 24 horas, y al final se registraron los individuos muertos para cada tratamiento. Se estimó la dosis letal 50 (DL50) mediante el método Probit

utilizando el Software SPSS 15.0. Solo se aceptaron los resultados si la supervivencia en el control negativo era superior al 90 %, y si la DL50 con el dicromato se encuentra entre 2.5 a 0.3 mg. L⁻¹

Para la prueba de toxicidad aguda por inhibición del crecimiento radicular en *Lactuca sativa*, frente al glifosato de formulación comercial, las semillas fueron expuestas a 5 concentraciones diferentes del plaguicida y dos controles, todo por duplicado. Se utilizaron cápsulas de Petri de plástico descartables, con papel filtro Qualy, de 14 micras de poro y 12.5 cm de diámetro. Se colocaron 20 semillas por placa. Cada preparado fue embebido con 4 ml de del tratamiento, envueltas en bolsas plásticas, y colocadas en cajas cerradas para evitar el contacto con la luz (Castillo Morales *et al.* 2004). Posteriormente se incubaron los preparados en una estufa LAB-LINE, modelo AMBI-HI-LO, a 20 ± 2 °C, por un periodo de 120 horas. Al transcurrir el tiempo se procedió a la medición de la variable respuesta, que consistió en el porcentaje de inhibición del crecimiento radicular de los plantines, para posteriormente estimar la DL50 por el método Probit (Dutka, *et al.* 1989)

Parámetros químicos

La determinaciones de los parámetros fisicoquímicos se realizaron en el

Laboratorio de Calidad de Agua, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, aplicando Los criterios mencionados en el *Stándar Methods for the examination of wáter and wast-wasters* (APHA,1998); se midieron la DBO₅ (SM, 5210 B), dureza total (SM, 2340 C), nitrato (reducción con cinc), fósforo total (SM, 4500-P E), sulfato (turbidimétrico), pH (SM, 4500-H B) y Oxígeno disuelto (electrométrico- SM, 4500-O G).

Para la determinación de los biocidas Cipermetrina y Clorpirifos, se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) de la marca Shimadzu, con detector UV, visible modelo SPD-M20/M10AVI. El equipo cuenta con una bomba isocrática para fase móvil (LC-20AT), un horno para columnas (CTO-20A), un detector UV/Visible (SPD-20A) y un inyector automático (SIL-20A). El sistema es controlado a través del software LC solution versión 2.2.

Bioensayos de toxicidad con aguas y sedimentos

Para *D. magna* se realizaron dos tipos de ensayos, agudo y crónico. El test agudo se realizó aplicando el diseño DBCA 7×3 (OECD 2004), con dos controles y cinco concentraciones de las muestras de agua y elutriados de sedimento de cada punto: 100 %, 50 %, 25 %, 12.5 % y 6,25 % (tratamientos), las diluciones fueron preparadas con agua dura reconstituida (APHA, 1998). Se utilizaron los mismos criterios de aceptación seguidos en los ensayos agudos con los plaguicidas.

Para los ensayos crónicos se empleó un diseño semi-estático las pruebas se realizaron acorde a la guía propuesta por la OECD (1998). Se utilizaron 10 neonatos menores a 24 horas de nacidas (uno por

recipiente) para el control y para cada muestra de agua. A cada recipiente se le adicionó 100 mL de la muestra en cada caso. Se evaluaron los efectos sobre la supervivencia y reproducción por 21 días. Durante el periodo de estudio, los individuos fueron alimentados con *Chlorella sp.* cada dos días y el recambio de agua se realizó dos veces por semana. Se contabilizaban y retiraban los neonatos cada 3 días, durante el tiempo de duración del test. El criterio de validación de los resultados fue en lo referente a las condiciones biológica: la supervivencia ($\geq 80\%$) y número promedio de neonatos ≥ 60 en los controles negativos, no producción de epifias; y respecto a las variables ambientales, variación del pH en una unidad y concentración de OD $>60\%$ (Liu *et al.* 2012; OECD 1998). Los resultados biológicos fueron expresados como promedios \pm S.D, y se analizaron estadísticamente usando el análisis de varianza (ANOVA de una vía), seguido de la comparación múltiple de Dunnett.

La fitotoxicidad de las aguas fue determinada mediante ensayos con *Lactuca sativa* Se trabajó con un control negativo, y cuatro concentraciones diferentes por cada muestra, y un factor de dilución de 0,5; a partir de la muestra se prepararon soluciones al 50 %, 25 % y 12.5 % (% v/v). Posteriormente se siguieron los procedimientos propuestos por Dutka, *et al.*, (1989) y Castillo (2004).

RESULTADOS Y DISUSIÓN

Toxicidad aguda del clorpirifos, cipermetrina y glifosato.

Los bioensayos arrojaron resultados que están dentro del rango mencionado en otros estudios. Para *D. magna* la toxicidad

aguda con el clorpirifos fue de 2,18 mg.l⁻¹, 3,18 mg.l⁻¹ para la cipermetrina, y 39,05mg.l⁻¹ para el glifosato (Tabla 1). Guilhermino *et al.*, (2000), testaron el clorpirifos para *D. magna*, y reportan valores de CL₅₀-24h de 0,344 mg.l⁻¹, en otro estudio se menciona un valor de CL₅₀ de 0,0001 mg.l⁻¹ 48 horas, respectivamente (PPDB 2014a). Así mismo, Demetrio (2012), informa valores de CL₅₀-48h de 0,30 g.l⁻¹ para un formulado comercial, y 1,22 g.l⁻¹ para el ingrediente activo del clorpirifos.

Demetrio (2012), reporta valores de toxicidad de un formulado comercial de cipermetrina igual a 2,81 g.l⁻¹, y de 3,73 g.l⁻¹ para el ingrediente activo tras 48 h de

exposición. Se informan valores de 0,0003 mg.l⁻¹ (PPDB 2014b), y 2 g.l⁻¹ (WHO 1989).

La toxicidad aguda del glifosato F frente a *D. magna* obtenida en este estudio, arrojó un valor de CL₅₀ superior a los obtenidos en otros trabajos. Demetrio (2012), informa valores de CL₅₀-48 h de 9,34 para el glifosato F, y de 199,61 mg.l⁻¹ para su ingrediente activo; en el mismo estudio se indica que la CE₅₀-48 h para el surfactante POEA es de 1,80 mg.l⁻¹. Otros estudios reportan valores de CL₅₀-48h comprendidos entre 5,3 y 37 mg.l⁻¹ (WHO 1994) para formulados comerciales, y de 700 mg.l⁻¹ para el ingrediente en grado técnico.

Tabla 1. CL_x e intervalos de confianza al 95 % para *D. magna* y *L. sativa* para los plaguicidas clorpirifos, cipermetrina y glifosato obtenidos. Se informan los valores de x² y tabulados (α=0,05)

CL _x	Clorpirifos (µg.l ⁻¹) ¹⁾	Cipermetrina (µg.l ⁻¹) en	Glifosato F (mg.l ⁻¹) en	Glifosato F (mg.l ⁻¹) en
	en <i>D. magna</i>	<i>D. magna</i>	<i>D. magna</i>	<i>L. sativa</i>
1	0,31 (0,04- 0,70)	0,43 (0,09-0,86)	7,03 (1,48-12,75)	0,02
5	0,55 (0,10- 1,04)	0,77 (0,24-1,35)	11,61 (3,77-18,42)	0,20
10	0,75 (0,18- 1,28)	1,05 (0,39-1,73)	15,18 (6,14-22,66)	0,66
25	1,24 (0,47- 1,87)	1,78 (0,89-2,67)	23,75 (13,31-33,34)	4,91
50	2,18 (1,27- 3,01)	3,18 (2,02-4,75)	39,05 (27,20-59,27)	45,96
75	3,83 (2,76- 5,97)	5,70 (3,87-9,96)	64,21 (44,96-130,24)	429,96
90	6,35 (4,43- 13,89)	9,62 (6,19-21,78)	100,46 (64,54-289,67)	3.216,59
99	15,15 (8,51- 69,73)	23,67 (12,60-92,51)	217,04 (113,34- 1216,27)	102.694,93
X ² cal	2,83	0,619	0,796	0,599
X ² _{0,05stab}	9,49	9,49	9,49	7,015

En un estudio de la toxicidad aguda del ingrediente activo glifosato como sal de isopropilamina, y del formulado Roundup (Cuhra *et al.* 2013) realizado con diferentes clones y edades de *D. magna*, se reportan valores de CE₅₀-48 h entre 1,4 y 7,2 mg.l⁻¹ para el ingrediente activo,

valores entre 3,7-10,6 mg.l⁻¹ para el Roundup, esto con individuos juveniles. En el trabajo también se discute la inconsistencia y diferencias extremas en relación a los resultados de toxicidad del glifosato; algunos investigadores como Forbis y Boudreau (1981) mencionado por

Cuhra *et al.* (2013) reportan una CE_{50} -48 h de 930 mg/l en *D. magna*, en otras bases de datos igualmente se reportan altos valores (WHO, 1994b; EPA, 1994), y concluyen que las diferencias se deben al tipo de compuesto utilizado, antes que a la variabilidad clonal de los individuos (Cuhra *et al.* 2013)

Al graficar la relación entre el Probit calculado con el \log_{10} de la concentración de cada compuesto (Fig. 2), se aprecia que existe una relación lineal, entre ambas variables. De esta forma la toxicidad de los plaguicida de mayor a menor queda como sigue: clorpirifos > cipermetrina > glifosato.

En lo que respecta a *L. sativa*, el glifosato F, presentó una CE_{50} -120 h de 45,95 $mg.l^{-1}$ con *L. sativa* (Tabla 1). Otros

estudios, con una formulación del herbicida glifosato (formulación líquida soluble de sal amónica de la N-fosfonometil glicina al 40,5% eq. ac. glifosato 36,9 % p/v) mediante bioensayo de germinación con semillas de lechuga y de trigo, reportan valores de 0,01650 $L.ha^{-1}$ para *L. sativa* y de 0,02325 $L.ha^{-1}$ para *Triticum aestivum* L. (Lallana *et al.* 2015); demostrando que ambas plantas son sensibles al compuesto. Martin & Ronco (2006), estudiaron los efectos de mezclas de pesticidas en *L. sativa*, *Brasica napus*, *Allium cepa*, *Medicago sativa* y *Lolium perenne*; obteniendo valores de CI_{50} de 9,89 $mg.l^{-1}$ para *L. sativa*, siendo la más sensible, y 1.164 $mg.l^{-1}$ para *M. sativa*, que es la menos sensible.

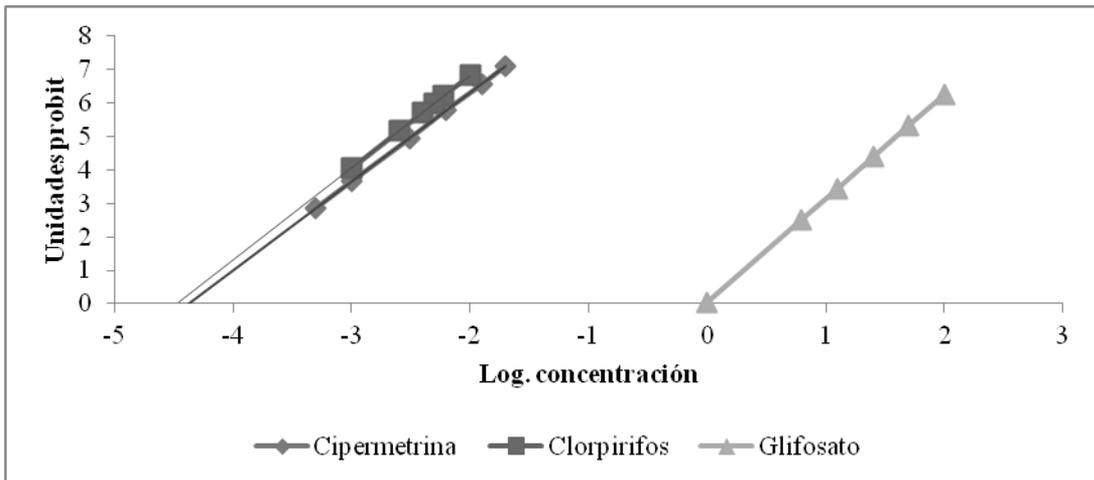


Fig. 2: Rectas de regresión para el modelo Log-Probit sobre *D. magna* 24 horas, para cada uno de los plaguicidas ensayados

Parámetros químicos

El conocimiento de las características fisicoquímicas de las aguas, es un requisito importante a fin de determinar si las condiciones son apropiadas para realizar los ensayos toxicológicos. Paralelamente los datos se compararon con el padrón

nacional de calidad de aguas, establecidas en la Resolución N° 222/02 de la SEAM (SEAM 2002), esto a fin de determinar si las corrientes hídricas reunían las características para aguas de su clase.

Las determinaciones fisicoquímicas realizadas indican que en la mayoría de los

casos, las aguas pertenecen a la Clase I y la Clase II según los parámetros de la SEAM; determinaciones que sobrepasaron los valores la Clase I, son: la DBO₅; en una ocasión (AP4) los niveles de fósforo orgánico total durante tres muestreos en AP1 y en una ocasión en AP4 (Tabla 2), ambos pertenecientes a la zona control dentro de la reserva.

Para los fines estadísticos, los valores que caen bajo la denominación menor al límite de detección (<), se asume dicho valor como tal para el analito en cuestión. El análisis estadístico de los resultados, permitió determinar que existen diferencias respecto al punto control (AP1). En relación a la los niveles de pH, a lo largo de las siete campañas de muestreo se aprecia una diferencia significativa ($p < 0,001$) al comparar el punto AP1 con los demás sitios (AP2, AP3, AP4 y AP5). AP1, posee aguas más ácidas (pH 6,69 \pm 0,11) respecto a los demás puntos (Tabla 2). Esta diferencia puede atribuirse a la presencia de material húmico en el agua, considerando que el área de muestreo se encuentra en un bosque. Rojas & Díaz (2014) reportan valores de pH en aguas de pozo de ciudades aledañas: 7,23 (UpH) en Itapúa Poty; 7,55 (UpH) en San Rafael del Paraná y de 6,53 (UpH) en Alto Verá.

Al comparar las concentraciones de nitrato de las muestras provenientes de los agroecosistemas AP2 ($p = 0,023$) y AP5 ($p < 0,001$), las diferencias respecto al punto control (AP1) fueron significativamente superiores a un nivel de $p < 0,05$ al comparar los siete muestreos (Tabla 2). Estas diferencias se pueden asociar al uso intensivo de fertilizantes a base de nitratos, que llegaría hasta las aguas de los arroyos mediante las escorrentías. Rojas & Díaz (2014) reportan

valores de N-Nitrato en aguas de pozo para la Ciudad de Encarnación 0,93 mg.l⁻¹; Hoenau 1,33 mg.l⁻¹, 0,47 mg.l⁻¹ para Edelira; y San Juan del Paraná 1,76 mg.l⁻¹; estos datos, indican que los valores de N-Nitrato de las aguas, son similares, e inclusive menores a los reportados para aguas de pozos profundos.

El tercer parámetro que mostró diferencias significativas respecto al punto AP1, fue la dureza medida en AP5 (Tabla 2). No obstante el valor promedio de $48 \pm 15,51$ mgCaCO₃.l⁻¹ es similar a las concentraciones reportadas por Rojas & Díaz (2014), para pozos profundos de las siguientes ciudades aledañas: Edelira 47,63 mgCaCO₃.l⁻¹ y Tomás Romero Pereira 42,2 mg. CaCO₃.l⁻¹.

En ninguna de las muestras se encontraron cantidades detectables de los biocidas clorpirifos y cipermetrina. En el Paraguay, y más específicamente en el Departamento de Itapúa, se disponen de escasos registros de estudios de niveles de insecticidas y herbicidas en agua. Entre los pocos estudios, se cuenta un trabajo realizado entre los meses de octubre y noviembre de 2009, desarrollado en el marco del Análisis de agroquímicos en aguas superficiales y subterráneas en la cuenca hídrica del Arroyo Capiibary, Dpto. Itapúa (Houben *et al.* 2010), se realizaron colectas de tres cuerpos de aguas de zonas agrícolas, antes y después de la siembra. Se analizaron 598 principios activos y metabolitos incluyendo glifosato, cipermetrina y clorpirifos, en laboratorios de la empresa SOFIA GmbH de Berlín, Alemania. En el informe reportan que no se encontraron concentraciones de los analitos buscados, que estén por encima de los límites de detección, y afirman que las aguas estudiadas están libres de estos

contaminantes. Los mismos autores explican que la ausencia de agroquímicos en las aguas estudiadas se debe principalmente al clima, que favorece la actividad microbiana, ayudando así a la descomposición de los contaminantes; además la granulometría muy fina del suelo retrasa la infiltración del agua; a esto se sumaría el elevado contenido de humus y óxidos de hierro en las capas superiores del suelo, lo que retrasaría su propagación.

A nivel regional; es posible encontrar estudios realizados en la Cuenca del Paraná. Peruzzo, (2008) reportan niveles de glifosato entre 0,1 y 0,7 mg.l⁻¹ en aguas, y 0,5-5 mg.kg⁻¹ en sedimentos de arroyos asociados a cultivos de soja en la región norte de la Pampa Argentina. En otro trabajo realizado en la misma región (Jergentz *et al.* 2005) determinaron la presencia de plaguicidas utilizados en la producción de soja, en muestras de aguas,

sedimentos y en escorrentía de lluvias; encontraron picos de concentración en aguas de 0.45 mg.l⁻¹ de clorpirifos y de 0.71 mg.l⁻¹ de cipermetrina, además informan presencia en las aguas y los sedimentos de las escorrentías tras episodios de lluvias post aplicación de los productos, reportando niveles de clorpirifos de 0,28 µg.l⁻¹ y 30,3 µg.kg⁻¹ en agua y sedimento respectivamente.

Otro punto a considerar al buscar plaguicidas en agua, es la concentración de la muestra, proceso que no fue realizado para este estudio; otros investigadores (Mugni *et al.* 2010; Carriquiriborde *et al.* 2007; Demetrio 2012; Jergentz *et al.* 2005) mencionan extracción con solventes orgánicos, concentración por roto-evaporación, entre otros métodos realizados previo a la determinación en HPL.

Tabla 2. Valores promedios de los parámetros fisicoquímicos analizados durante los siete muestreos

Parámetros	AP1		AP2		AP3		AP4		AP5		^a Ref.- Res. SEAM
	µ	S.D	µ	S.D	µ	S.D	µ	S.D	µ	S.D	
PH (UpH)	6,69	0,11	7,55*	0,14	7,36*	0,10	7,47*	0,35	7,83*	0,43	6,0 - 9,0
N-Nitrato (mgN/L)	0,18	0,07	0,86*	0,41	0,75	0,44	0,25	0,38	1,39*	0,88	10
Fósforo total (mg/L)	0,05	0,01	0,04	0,01	0,03	0,01	0,04	0,02	0,04	0,01	0,05
Sulfato (mg/L)	1,76	0,83	1,09	0,71	0,93	0,75	1,82	0,67	1,83	1,09	250
Dureza (mgCaCO3/L)	20,91	2,33	21,70	2,61	28,40	6,02	23,68	12,28	48,0*	15,51	300
O.D (mgO2/L)	7,77	1,03	8,83	0,98	8,49	1,13	8,61	0,91	8,13	1,53	>5
D.B.O.5(mgO2/L)	1,83	1,64	1,58	1,05	1,47	1,14	3,37	2,26	1,88	1,05	≤5

Nota: valor promedio (µ)± desviación estándar (S.D). *Las diferencias son significativas para p<0,05 (Método de Dunnett). ^aClase 2.Establecida por la Resolución N° 222/02 de la SEAM

Toxicidad aguda de aguas y sedimentos en *D. magna* y *L. sativa*

Los resultados de los bioensayos con *D. magna* confirman que no se presentaron efectos letales importantes sobre el

microcrustáceo (Tabla 3), solo en algunos casos puntuales se llegó hasta una CL_{10} o como máximo a una CL_{20} al 100% de la concentración, como ser las muestras de agua AP2 y AP3 en el sexto muestreo. Igualmente en los análisis de los elutriados no se detectaron efectos agudos. En general, tras las 48 horas de duración de cada ensayo, se observó un mejor crecimiento en los individuos expuestos a las muestras de agua y a los elutriados de los sedimentos; según Sánchez Arguello (2002) esto puede explicarse por la presencia de materia orgánica que sirve de alimentos a los neonatos.

En un estudio similar, realizado en agroecosistemas relacionados a cultivo de soja de la región pampeana Argentina, Demetrio (2012) reportó resultados similares en lo referente a la toxicidad aguda en *D. magna* e *Hidra attenuata*; en el trabajo se monitoreó un tributario del Arroyo el Pescado, no detectándose efectos agudos superiores a CL_{10} con los organismos modelos. Según el mismo autor, los escenarios de exposición a plaguicidas se presentarían en forma discontinua, a modo de pulsaciones tóxicas, esto como resultado del arrastre de los contaminantes hasta los arroyos, causadas por sucesos como: escorrentías superficiales que se presentan por las lluvias que suceden tras las aplicaciones de los plaguicidas a los cultivos; además de otras condiciones como ser los procedentes de derrames, accidentes o mal manejo por parte de los productores.

Al igual que en el ensayo anterior, los test con *L. sativa* no detectaron efectos que inhiban el crecimiento radicular de esta planta vascular. Al comparar el crecimiento relativo, de las raicillas de *Lactuca sativa*, expuestas a las aguas y los

elutriados de sedimentos, se observa, que en general se produjo un estímulo en el crecimiento respecto al control. La inhibición (IP) que superen el 5% solamente se registró en el 11% de las muestras de agua. Los elutriados de sedimentos presentaron inhibiciones entre 5-15% en el 28% de las muestras. No obstante en ninguno de los caso se llegó a una IP de - 50%.

Toxicidad crónica

El análisis estadístico de los resultados puso de manifiesto diferencias significativas ($p < 0,05$); entre el control de laboratorio y los tratamientos en AP2 y AP5 en el segundo muestreo; en AP3 y AP5 en el quinto muestreo y en las muestras tomadas de los puntos AP2, AP3 y AP5 del séptimo muestreo (Tabla 3). En todos los casos en que se encontraron diferencias medias significativas respecto al control de laboratorio, las muestras de aguas provenían de los arroyo de los agroecosistemas. El sitio ubicado en una zona boscosa de la Reserva San Rafael y considerado como punto control de campo (AP1), no presentó en ningún caso efectos crónicos medibles sobre *D. magna*, ratificando las buenas condiciones del agua de este lugar, que se encuentra próxima a su nacimiento.

Los test de reproducción son considerados parámetros muy sensibles a la presencia de tóxicos a bajas concentraciones (Liu *et al* 2012; Zalizniak y Nugeoda, 2006). Para los ensayos crónicos las muestreas no se filtraron para eliminar algas y otras partículas, de tal forma a que se pueda observar los efectos indirectos por exposición a través del alimento, considerando que de esta forma se puedan ejercer los efectos de ciertos

contaminantes. Algunos autores resaltan el papel de la alimentación de los cladóceros durante el ensayo de reproducción, las características del agua y el efecto de la filtración, y que su importancia podría ser mayor, que los propios efectos tóxicos del agua (Sánchez Arguello 2002). No se pudo

asociar el descenso en la fecundidad observada con la presencia de plaguicidas en las muestras. Por lo tanto la toxicidad pudo deberse al efecto de otros pesticidas no blanco, a los componentes naturales, o a la combinación de estos.

Tabla 3. Resumen de los ensayos ecotoxicológicos.

Test/especie	Toxicidad	
	Agua (campana de muestreo / sitio)	Extracto de sedimento(campana de muestreo/ sitio)
Agudo / <i>D. magna</i>	N. d	N. d
Agudo / <i>L. sativa</i>	N. d	N. d
Crónico / <i>D. magna</i>	2 (AP2 y AP5)	-
	5 (AP3 y AP5)	
	7 (AP2, AP3 y AP5)	

N.d: Toxicidad no detectada

CONCLUSIONES

Los valores de CE₅₀ de la cipermetrina y el clorpirifos obtenidos con *D. magna* fueron similares a los reportados por otros estudios; mientras que la CE₅₀ del glifosato fue superior, es decir menos tóxica que lo reportado por otros trabajos. El orden de toxicidad de los plaguicidas frente al cladóceros queda como sigue: clorpirifos>cipermetrina>glifosato.

Resultados similares se obtuvo al evaluar la toxicidad del glifosato F, frente a *L. sativa*; de esta forma se puede reforzar la idea de evaluar los efectos ecotoxicológicos de los plaguicidas, mediante los ingredientes activos, para evitar subestimar efectos.

Los análisis fisicoquímicos convencionales de aguas arrojan información relevante sobre la mayor presencia de nutrientes en aguas de los arroyos que circundan por los agroecosistemas, este fue el caso para el nitrógeno en forma de nitrato, cuyo

comportamiento se debería al uso de fertilizantes en las zonas de cultivos.

No se detectó la presencia de plaguicidas, en un total de 10 muestras de aguas analizadas, de las cuales 6 corresponden a agroecosistemas.

Las pruebas de toxicidad aguda en los organismos de prueba, tanto en *D. magna* y *L. sativa*, no evidenciaron la presencia de muestras de agua y sedimentos que puedan producir efectos adversos. Las tasas de mortalidad de *Daphnia*, o la inhibición del crecimiento observados en algunos tratamientos de *Lactuca*, se encuentran dentro de márgenes tolerables, y difícil de atribuir a la presencia de contaminantes en el agua o los sedimentos. En general, se observó en los resultados un estímulo positivo del crecimiento de las raíces de *L. sativa*.

Se corroboró la sensibilidad del ensayo crónico de 21 días de exposición con *D. magna*. Las muestras de agua de los agroecosistemas AP2, AP3 y AP5 presentaron efectos crónicos determinados

mediante la fecundidad promedio durante el tiempo de estudio.

AGRADECIMIENTOS

Para Andrea Weiler de Albertini, por gestionar la beca en el marco del Proyecto 11-CAP2-1434: Cátedra UNESCO “Educación para el Desarrollo Sostenible: Fortalecimiento de líneas de investigación locales en el área de biodiversidad y de la vinculación con la sociedad”; mediante la cual pudo realizarse el estudio. A Francisco Ferreira y Abelardo Duarte, por colaborar con la determinación de los biocidas por HPLC. A Nidia Benítez, por la revisión del inglés.

BIBLIOGRAFÍA

- APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2nd. ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Baral, A.; Engelken, R.; Stephens W.; Farris, J.; Hannigan, R. 2006. Evaluation of Aquatic Toxicities of Chromium and Chromium-Containing Effluents in Reference to Chromium Electroplating Industries. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50 (4): 496–502.
- Carrquiriborde, P.; Díaz, J., Mugni, H.; Bonetto, C.; Ronco, A. 2007. Impact of cypermethrin on stream fish populations under field-use in biotech-soybean production. *Chemosphere* 68: 613–21.
- Castillo Morales, G.; Díaz Báez, M.; Granado, Y.; Ronco, A.; Sobrero, C.; Bulus, G.; Feola, G.; Forget, G.; Sánchez-Bain, B. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Gabriela Castillo, M (ed.). México: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo.
- Cuhra, M.; Traavik, T.; Bøhn, T. 2013. Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 22 (2): 251–62.
- Demetrio, P. 2012. Estudio de efectos biológicos de plaguicidas utilizados en cultivos de Soja RR y evaluación de impactos adversos en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampeana. Tesis presentada a la Universidad Nacional de la Plata. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/18139/Documento_completo.pdf?sequence=1.
- Dutka, B.; Kwan, K.; Rao, S.; Jurkovic, A.; McInnis, R.; Palmateer, G.; Hawkins, B. 1991. Use of bioassays to evaluate river water and sediment quality. *Environmental Toxicology & Water Quality* 6 (3): 309–27.
- EPA. 1994. *Reregistration Eligibility Decision RED. Glyphosate*. <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>.
- Guilhermino, L.; Diamantino, T.; Silva, M.; Soares, A. 2000. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: An alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46 (3): 357–62.
- Houben, G.; Eisenkölbl, A.; Larroza, F. 2010. Informe técnico sobre análisis de agroquímicos en aguas superficiales y subterráneas en la cuenca del Arroyo Capiibary, Departamento Itapua, Paraguay.
- Jergentz, S.; Mugni, H.; Bonetto, C.; Schulz, R. 2005. Assessment of

- insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61 (6): 817–26.
- Lallana, M.; Foti, M.; Lallana, V.; Elizalde, J.; Billard, C. 2015. Determinación de reducción del crecimiento radical (CE50) por una formulación de glifosato utilizando lechuga y trigo como especies bioindicadoras. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo* 45 (1). Acceso Junio 6. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1853-86652013000100013&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
- Liu, Y.; Qi, S.; Zhang, W.; Li, X.; Qiu, L.; Wang, C. 2012. Acute and chronic toxicity of buprofezin on *Daphnia magna* and the recovery evaluation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 89 (5): 966–69.
- Martin, M.; Ronco, A. 2006. Effect of Mixtures of Pesticides Used in the Direct Seeding Technique on Non target Plant Seeds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 77 (2): 228–36.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2010. Producción de Soja en el Paraguay: Zafra 2008/2010. <http://www.mag.gov.py/dgp/PARAGUAY ISA 2008 2010 14 06 10.pdf>.
- Mugni, H.; Demetrio, P.; Marino, D.; Ronco, A.; Bonetto, C. 2010. Toxicity persistence following an experimental cypermethrin and chlorpyrifos application in pampasic surface waters (Buenos Aires, Argentina). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 84 (5): 524–28.
- OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) 1998. *Daphnia magna* Reproduction Test N° 211. September: 1–21.
- _____. 2004. *Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test, N° 202. April: 1–12.
- Peruzzo, P.; Porta, A.; Ronco, A. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in North Pampasic Region of Argentina. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)* 156 (1): 61–66.
- PPDB. 2014a. Chlorpyrifos. Pesticide Properties. Data Base- University of Hertfordshire. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/154.htm>.
- _____. 2014b. Cypermethrin. *Pesticide Properties Data Base*. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/24.htm#none>.
- Ramírez Romero, P.; Mendoza Cantú, A. 1998. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. 1ra. ed. México: Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).
- Rodríguez, P.; Martínez-Madrid, M.; Cid, A. 2006. Ecotoxicological assessment of effluents in the Basque Country (Northern Spain) by acute and chronic toxicity tests using *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology* 15 (7): 559–72.
- Rojas, H.; Díaz, T. 2014. Calidad de agua subterránea. Perforaciones entubadas profunda de abastecimiento público de la Región Oriental. San Lorenzo: Universidad Nacional de

- Asunción/Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Rojas Ozuna, A.; Rolón, P.; Galeano S., M. 2014. Caracterización taxonómica del suelo y uso actual de la tierra del Departamento Itapua. Bases para la planificación del uso de la tierra. En: Causarano, H.; Leguizamón, C. *III Congreso Nacional de Ciencias Agrarias*. San Lorenzo: Facultad de Ciencias Agrarias. 283–284.
- Sánchez Arguello, P. 2002. Valoración ecotoxicológica de la contaminación de origen agrario: Incorporación de bioensayos en los protocolos de evaluación de riesgo ambiental. Universidad Complutense de Madrid. <http://eprints.ucm.es/4596/>.
- SEAM (Secretaria del Ambiente). 2002. Resolución N° 222. Por el cual se establece el padrón de calidad de las aguas del territorio Nacional. Paraguay.
- Wernersson, A.; Dave, G. 1997. Phototoxicity Identification by Solid Phase Extraction and Photoinduced Toxicity to *Daphnia magna*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 273: 268–73.
- WHO. 1989. ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 82: Cypermethrin. *World Health Organization*. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc82.htm>.
- _____. 1994. ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 159: GLYPHOSATE. *World Health Organization*. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm>.
- Zalizniak, L.; Nugegoda, D. 2006. Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of *Daphnia carinata*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 64: 207–214.