



**UNIVERSIDAD CATOLICA DE TEMUCO
FACULTAD DE CIENCIAS**

**“ENSAYO DE MICRONUCLEOS EN ERITROCITOS DE
Oncorhynchus mykiss COMO HERRAMIENTA PARA EVALUAR LA
EXPOSICION A PESTICIDAS POTENCIALMENTE
GENOTOXICOS EN EL RIO TRAIGUEN”.**

por

PAMELA SUSANA PALMA ACUÑA

Tesis presentada a la
Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de Temuco
Para Optar al Grado de Licenciado en Recursos Naturales

- Temuco, 2005 -

UNIVERSIDAD CATOLICA DE TEMUCO
FACULTAD DE CIENCIAS

COMISION EXAMEN DE GRADO.

Este Examen de Grado ha sido realizado en la Escuela de Ciencias Ambientales.

Presidente Comisión:
Osvaldo Rubilar Alarcón.
Decano de la Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante:
Francisco Encina Montoya.
Dr. en Ciencias Ambientales. Universidad Católica de
Temuco

Profesor Informante:
Rodrigo Palma Troncoso.
Magíster en Limnología. SAG, IX Región.

Profesor Informante:
Juan Gavilán Escalona.
Dr. en Ciencias Ambientales.
Universidad de Concepción.

Secretario Académico
de la Teresa Rueda Leighton.
Escuela. Biólogo Marino.

Coordinador de Tesis
Mario Ramírez Espinoza.
Master en Física

Temuco, Enero 2005.

DEDICATORIA

“Limpia la lluvia el azul eterno de nuestros antiguos...

Ven, la tierra pura nos espera”

A MIS PADRES,

A MI HIJO MATIAS.

AGRADECIMIENTOS

A mis papás y a mi Abuelita, que con sacrificio hicieron posible lo que hoy he logrado, el fin de una etapa de mi vida, pero el comienzo de otra igual de importante.

A mi hijo, que con toda su alegría me brindó apoyo y me hizo seguir adelante en los momentos difíciles y austeros, que con su sonrisa y caricias alegraba mis días desde el comienzo de esta carrera.

A mis hermanas Anne Marie y Bernardita, primos y tíos por el apoyo y cariño brindado.

A don Rodrigo Palma, por sus consejos y apoyo tanto emocional como profesional y científico, gracias por sus palabras.

A don Francisco Encina, por su apoyo brindado, aportes, contactos, observaciones para el desarrollo de este trabajo.

A don Francisco Gavilán por sus asertivas observaciones y su apoyo brindado.

A la Sra. Patricia Riquelme, por su incondicional ayuda logística.

A don Mario Vásquez, gracias por su paciencia, apoyo y recibimos día a día en su lugar de trabajo.

A mis compañeros y amigos, en especial Ximena, Fernando, Daniela y Carol, gracias por su amistad y apoyo en todo momento.

Muchas Gracias.

INDICE

DEDICATORIA

AGRACDECIMIENTOS

INDICE DE CONTENIDOS i

INDICE DE FIGURAS iv

INDICE DE TABLAS v

INDICE DE ANEXOS ix

RESUMEN 1

ABSTRACT 3

INDICE DE CONTENIDOS

1.- INTRODUCCION 5

1.1.- Hipótesis 34

1.2.- Objetivos 34

2.- METODOLOGÍA 36

2.1-Área de estudio 36

2.1.1.- Descripción de la Cuenca 36

2.1.2.- Clima. 39

2.1.3.- Datos Meteorológicos. 39

2.1.4.- Características prediales de la cuenca. 41

2.1.5.- Suelo. 41

2.1.6.- Uso actual del territorio.	42
2.2.- Caracterización del Hábitat.	43
2.3.- Muestreo.	43
2.3.1.- Puntos de muestreo.	43
2.3.2.-Medición de Parámetros físico químicos.	45
2.4.- Estimación de la Exposición.	47
2.4.1.- Análisis de pesticidas.	47
2.5.- Estimación de los efectos.	48
2.5.1.- Biomonitordeo.	48
2.5.2.-Bioensayos.	48
2.5.2.1.- Diseño experimental.	48
2.5.3.-Obtención del material biológico.	52
2.5.4.- Detección de Genotóxicos.	52
2.5.4.1.- Test de Micronúcleos (MN).	52
2.6.- Análisis estadísticos.	54
3.- RESULTADOS	56
3.1 Caracterización del Hábitat.	56
a) Dosel de vegetación.	56
b) Caudal.	56
3.2.- Muestreo.	58
3.2.1.- Parámetros físico químicos.	58
3.2.2.- Determinación del Análisis de pesticidas.	63
3.3.- Test de Micronúcleos (MN).	64

3.3.1.- Test de Micronúcleos in situ.	64
3.3.2.- Test de micronúcleos en laboratorio.	65
3.3.2.1.- Bioensayo de toxicidad	65
4.- DISCUSION	70
5.- CONCLUSIÓN	90
6.- BIBLIOGRAFÍA	92
ANEXOS	102

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Diagrama del Riesgo Ambiental Ecológico.	16
Figura 2.- Formación de células binucleadas.	28
Figura 3.- Mapa de la Subcuenca del Río Traiguén.	37
Figura 4.- Flujo metodológico.	38
Figura 5.- Pluviometría media mensual.	40
Figura 6.- Caudales medios mensuales.	40
Figura 7.- Puntos de Muestreo.	44
Figura 8.- Diseño experimental.	50
Figura 9.- Anova frecuencia MNC ‰ para 2,4-D a las 24 h.	67
Figura 10: Anova frecuencia MNC ‰ para 2,4-D a las 96 h.	67
Figura 11: Anova frecuencia MNC ‰ para Carbendazim a las 96 h.	68

Figura 12. Eritrocito micronucleado.	69
Figura 13. Análisis de Cluster parámetros fisicoquímicos de las Cuencas del Río Traiguén, Chillán y Damas.	75

INDICE DE TABLAS

Tabla I.- Pesticidas con mayor porcentaje de distribución en agua, persistencia en días y toxicidad.	11
Tabla II. Propiedades físico química de los pesticidas propuestos para el monitoreo químico.	11
Tabla III. Concentración de pesticidas en muestras de agua desde seis estaciones en el río Traiguén, IX Región, Chile.	13
Tabla IV. Valores de toxicidad para Algas, Microcrustáceos y Peces para cada uno de los pesticidas en estudio.	18
Tabla V. Resumen de métodos recomendados por el Working Group Biological Effects of Contaminants del International Council for the Exploration of the Sea.	25
Tabla VI. Caracterización agroclimática.	39
Tabla VII. Ubicación geográfica de las estaciones de muestreo.	44
Tabla VIII. Metodología análisis parámetros físico químicos.	46

Tabla IX. Metodología análisis parámetros microbiológicos.	46
Tabla X. Características de los pesticidas utilizados en el bioensayo.	49
Tabla XI. Condiciones generales utilizadas en la realización de ensayos de toxicidad aguda para peces (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).	51
Tabla XII: Caudales medios (m ³ /seg) mensuales registrados durante el período de muestreo del año 2003.	57
Tabla XIII: Velocidad del agua y Caudal medido en terreno durante el primer muestreo (Pre-Aplicación).	57
Tabla XIV: Velocidad del agua y Caudal medido en terreno durante el segundo muestreo (Post-Aplicación).	58
Tabla XV: Parámetros físicos y químicos medidos <i>in situ</i> .	59
Tabla XVI: Parámetros físicos y químicos medidos en el laboratorio, período de Pre-Aplicación.	60
Tabla XVII: Parámetros físicos y químicos medidos en el laboratorio, período de Post-aplicación.	60

Tabla XVIII: Resultado de los análisis de pesticidas durante el primer y segundo período de muestreo, Pre-Aplicación (26 Mayo 2003) y Post-Aplicación (1° de Octubre).	64
Tabla XIX: Resultados obtenidos en terreno del Ensayo de MN.	65
Tabla XX: Frecuencia de eritrocitos con Micronúcleo (‰) y numero de peces muestreados a cinco concentraciones de 2,4-D a las 24 y 96 hrs.	66
Tabla XXI: Frecuencia promedio de MNs inducidos por 2,4-D en laboratorio. PI calculado.	66
Tabla XXII: Frecuencia de MNs inducidos por Carbendazim en laboratorio. PI calculado.	68
Tabla XXIII: Frecuencia de eritrocitos con Micronúcleo (‰) y numero de peces muestreados en los controles positivo y negativo.	68

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ficha de los pesticidas propuestos para monitoreo.	102
Anexo 2. Pluviometría media (1999-2000).	108
Anexo 3. Caudales medios (1999-2000).	109
Anexo 4. Parámetros de la Subcuenca.	109
Anexo 5. Series de suelo.	111
Anexo 6. Caracterización del suelo según la formula 323.	111
Anexo 7. Caracterización capacidad de uso del suelo.	112
Anexo 8. Protocolo Micronúcleos (MN). Dr. Juan Gavilán E.	114

RESUMEN

La necesidad de evaluar y detectar el impacto de las actividades antrópicas sobre los organismos y su ecosistema, de forma mas clara, induce a considerar el uso de bioindicadores, los cuales proveen la posibilidad de obtener información sobre las moléculas contaminantes después de su vertido en el ambiente, directamente sobre sus receptores biológicos. Uno de los instrumentos metodológicos más desarrollados por el enfoque directo está representado por los biomarcadores, los que se definen como variaciones inducidas cuantificables de tipo bioquímico celular, fisiológico o de comportamiento correlacionables a la exposición y/o efecto de uno o más contaminantes químicos como es el caso de los de uso agrícola. En este contexto el objetivo del estudio es evaluar la respuesta de un receptor biológico, como un biomarcador, expresada en la formación de Micronúcleos (MN) en eritrocitos periféricos de peces (*Oncorhynchus mykiss*). El Test consiste en la determinación de alteraciones nucleares, las que se forman por piezas de ADN retrasadas después de la segregación de los cromosomas homólogos durante la anfase, dando lugar a MN. En terreno se evalúa la respuesta a la exposición de pesticidas genotóxicos, producto de las actividades agroforestales desarrolladas en la subcuenca del Río Traiguén, IX Región, aplicando el Test de (MN) como herramienta de diagnóstico y pronóstico, posteriormente corroborar en laboratorio la respuesta a través de bionesayos. El monitoreo químico de pesticidas en campo previamente propuestos por Olave (2001) fueron monitoreados por Palma *et al.* (2004) desde 2001 al 2003: 2,4-D, Carbendazim, Picloram, Simazina y Hexazinona. El monitoreo arrojó sólo la

presencia de 2,4-D y Carbendazim a concentraciones de 2,9 y 4,5 ug/l respectivamente realizado durante el segundo período de muestreo (Post-Aplicación en Septiembre 2003). Los resultados obtenidos mediante el Test de MN aplicado en terreno indican que los peces estudiados no presentan respuesta a la exposición de plaguicidas. Una forma de validación de la genotoxicidad de los pesticidas es a través de ensayos de laboratorio donde los peces fueron tratados por 96 horas, con su respectivo control, expuestos a soluciones frescas de los pesticidas genotóxicos en fórmulas comerciales: 2,4-D (0.8, 2.0, 5.0, 10 y 20 ppm) y Carbendazim (1.0, 4.0, 10, 15 ppm). Los peces expuestos a 2,4-D y Carbendazim presentaron una clara actividad genotóxica. La frecuencia de eritrocitos micronucleados comparados con el control negativo, muestran una respuesta estadísticamente significativa sólo en el caso de 2,4-D. se recomienda trabajar con una batería de biomarcadores a distintos niveles de complejidad biológica. El test de micronúcleos aplicado a biomonitoreo genotóxico de efectos clastogénicos de contaminantes resulta según diversos autores la más práctica herramienta en mutagénesis ambiental, discusión que se realiza en base a los resultados obtenidos en el presente estudio.

Palabras claves: Pesticidas, Biomonitoreo, Biomarcador, Genotoxicidad, Test de Micronúcleos, Subcuenca del Río Traiguén.

ABSTRACT

The necessity to evaluate and to detect the impact of the antrópicas activities on the organisms and their ecosystem, of clear form but, induces to consider the use of bioindicadores, which provide the possibility of obtaining data on polluting molecules after their spill in the atmosphere, directly on its biological receivers. One of the methodologic instruments more developed by the direct approach is represented by the biomarcadores, those that define as induced variations cuantificables of cellular, physiological type biochemical or of behavior correlacionables to the exhibition and/or effect of one or more polluting chemistries as it is the agricultural case of those of use. In this context the objective of the study is to evaluate the answer of a biological receiver, like a biomarcador, expressed in the formation of Micronúcleos (MN) in peripheral eritrocitos of fish (*Oncorhynchus mykiss*). The Test consists of the determination of nuclear alterations, those that form by delayed DNA pieces after the segregation of the homologous chromosomes during anfase it, giving rise to MN. In land the answer to the exhibition of genotóxicos pesticidas is evaluated, product of the agroforestales activities developed in the subriver basin of the Traiguén River, IX Region, applying the prognosis and Test (MN) like diagnosis tool, later to corroborate in laboratory the answer through bionesayos. The chemical monitoreo of pesticidas in field previously proposed by Olave (2001) was monitoreados by Palma *et al.* (2004) from 2001 to the 2003: 2,4-D, Carbendazim, Picloram, Simazina and Hexazinona. The monitoreo threw only the presence of 2,4-D and Carbendazim to 4.5 concentrations of 2.9 and ug/l respectively

made during the second period of sampling (Post-Application's in September 2003). The results obtained by means of the Test of MN applied in land indicate that the studied fish do not present/display answer to the exhibition of plaguicidas. A form of validation of the genotoxicidad of the pesticidas is through laboratory tests where the fish were treated by 96 hours, with their respective control, exposed to fresh solutions of the genotóxicos pesticidas in commercial formulas: 2,4-D (0,8, 2,0, 5,0, 10 and 20 ppm) and Carbendazim (1,0, 4,0, 10, 15 ppm). The fish exposed to 2,4-D and Carbendazim presented/displayed a clear genotóxica activity. The frequency of compared micronucleados erythrocytes with the negative control, shows a statistically significant answer only in the case of 2,4-D. it is recommended to work with a battery of biomarcadores at different levels from biological complexity. The test of micronuclei applied to genotóxico biomonitoreo of clastogenicos effects of polluting agents is according to diverse authors the most practical tool in environmental mutagenesis, discussion that is made the present on the basis of the obtained results in study.

Key words: Pesticidas, Biomonitoreo, Biomarcador, Genotoxicidad, Test of Micronúcleos, Subriver basin of the Traiguén River.

1.- INTRODUCCION

La importancia del agua, como ingrediente vital básico y como constituyente esencial del entorno, es indudable. Interviene de una manera o de otra en la mayoría de las actividades humanas tanto de explotación como de utilización de los recursos, convirtiéndose en un factor determinante para la organización del territorio (MOPT, 1992).

Al estar en movimiento permanente, debido a la acción de la gravedad y de la energía solar, el agua aparece en la tierra en las distintas fases o estados que conforman el ciclo hidrológico, cuya unidad conduce a que todas las manifestaciones del agua se consideren como parte integrante de un recurso único. Así las acciones humanas sobre el agua tienen una repercusión muy extendida e influyen física y socialmente, unas veces alterando el régimen hidrológico o dando lugar a cambios climáticos a escala regional al facilitar la evaporación. Las consecuencias de lo anterior son, en general, un aumento generalizado de la vulnerabilidad del recurso y el deterioro de la calidad del agua, que tienen repercusiones ecológicas en la flora y la fauna, comprometiendo la capacidad del recurso para satisfacer necesidades futuras (MOPT *op. cit.*).

La calidad del agua dice relación con el uso o actividad a que se destina: agua potable, riego, recreación etc., y su calidad debe ser medida a través de la identificación de su estado. Este uso, en definitiva determina el conjunto de

indicadores físicos, químicos y/ o biológicos a considerar para la medición de este factor (CONAMA-TESAM 1996).

Así a cada uso puede asimilarse una norma nacional o internacional, la cual contiene el conjunto de indicadores que definen la calidad asociada a ese uso. La Norma Chilena 1.333 Of. 78 indica los requisitos de calidad para diferentes usos: bebida de animales, riego, estética, recreación con y sin contacto directo y vida acuática. Mientras que la Norma Chilena 409 Of. 70 establece los requisitos de calidad para el agua potable (CONAMA-TESAM *op cit.*). No obstante esta calidad se ve afectada por las actividades antrópicas produciendo el fenómeno de la contaminación (MOPT 1992). Este último fenómeno constituye el principal impacto que el hombre produce en el recurso agua, el cual es el único habitante de la tierra que contamina su propia agua, y peor aún lo hace en forma deliberada y a una velocidad creciente. Aún cuando el agua posee una gran capacidad de autopurificación, tiene un límite que el ser humano ha sobrepasado (Muñoz 2000).

Según MOPT (*op. cit.*), el medio acuático está contaminado cuando la composición o el estado del agua están modificados, directa o indirectamente, por el hombre. En tanto la Ley 19.300, artículo 2 define contaminación como “La presencia en el ambiente de sustancias, elementos energía o combinación de ellos, en concentraciones o concentraciones y permanencia superiores o inferiores, según corresponda, a las establecidas en la legislación vigente (Zaror 1998).

En este contexto, el destino final de muchos contaminantes ambientales son las aguas y el suelo y aunque el agua y el suelo son usualmente considerados como sistemas ecológicos separados, la realidad es que las partículas suspendidas en el agua y el agua que cubre las partículas del suelo representan interfases entre estos dos sistemas y sirve como un mecanismo para la contaminación de uno por el otro (Barra 1999). De este modo, se debe considerar la interconexión en mayor o menor grado entre el medio acuático y el terrestre. Así, para comprender el funcionamiento ecológico de los ríos es necesario tener en cuenta el medio terrestre que lo circunda (Möller 1998).

Respecto al concepto de ríos, existen dos ideas interesantes: El concepto de *río continuo* (de Vannote *et al.* 1980) que relaciona la estructura y el funcionamiento de los ríos con las condiciones y procesos hidrológicos y geomorfológicos fluviales, así debido a la circulación de las aguas, la dinámica de aguas abajo depende de los procesos que se desarrollan aguas arriba. El segundo concepto es la *espiralización de nutrientes* (Elwood *et al.* 1983), que combina dos procesos: por un aparte, el uso del material orgánico que va a la deriva por los seres vivos del fondo del río, y por otra, la reutilización de este material río abajo después de la muerte de estos organismos (Möller *op. cit.*).

Desde el punto de vista de las fuentes de contaminación estas se pueden clasificar en dos grandes grupos: la contaminación puntual (típica de efluentes urbanos o industriales sobre los cursos de agua receptores) y la contaminación difusa (típicamente la producida por actividades agrícolas). Esta última incluye sustancias

dispersas como pesticidas, fertilizantes y otros químicos asociados con un uso en tierras suburbanas, los sedimentos derivados de la actividad minera, forestal o de construcción y, en áreas urbanas el amplio rango de contaminantes asociados con la escorrentía urbana desde las calles de las ciudades. A diferencia de la contaminación puntual, la contaminación difusa es controlada en mejor forma a través del mejoramiento de la actividad misma (e.g. mejores prácticas agrícolas, control de la erosión etc.) (Barra 1999).

Desde el punto de vista regulatorio, la contaminación puntual ha sido enfrentada estableciendo las normas de calidad ambiental para efluentes o cuerpos de agua receptor. Al menos desde el punto de vista teórico, la contaminación puntual es de fácil tratamiento y control, en cambio la contaminación difusa es muy compleja de tratar y desde el punto de vista regulatorio aún en Chile no existen normativas que tiendan a su fiscalización y control (Barra *op. cit.*).

Según Marcos (2002)¹ (Com. Pers.), dentro de los agentes contaminantes se presentan los agentes genotóxicos, es decir cualquier agente que actúe directa o indirectamente sobre el ADN y que produzca efectos detectables a concentraciones subtóxicas. Así también es necesario considerar un agente No genotóxico, el cual también puede inducir efectos genotóxicos, aunque su blanco no es el ADN (e.g. enzimas de reparación y replicación y proteínas del Huso), provocando segregación, aneuploidía (daño genético).

Existen diversos tipos y fuentes de agentes genotóxicos, entre ellas la contaminación, a través de las emisiones industriales o de motores y de fuentes difusas como los plaguicidas. Estos agentes causantes de la contaminación provenientes de los residuos agrícolas, a través de la utilización de fertilizantes y productos fitosanitarios, han permitido un desarrollo de la actividad agrícola (Parra 2003).

Por ello surge la necesidad de gestionar el ambiente como respuesta al explosivo crecimiento de la población y el cambio tecnológico, el que ha provocado una serie de conflictos derivados de la contaminación ambiental, uso intensivo y desordenado de los recursos naturales, lo que trae como principal consecuencia la degradación de los sistemas naturales y la disminución de la calidad de vida de las personas (Zaror 1998).

El área a estudiar corresponde a la subcuenca del río Traiguén, a que pertenece a la hoya hidrográfica del río Imperial, IX región. Abarca 10.176 hectáreas representando el 79.46% con respecto a la superficie total de la cuenca de 12804.9 ha. El uso actual del territorio se caracteriza por ser agrícola, forestal, renoval y de pradera distribuidos en distintas proporciones a lo largo de la cuenca, con el predominio de actividades agrícolas y forestal con un uso de 27 pesticidas de los cuales 25 se destinan para el uso agrícola el que representa el 50 % del área total de la subcuenca y 3 compuestos de uso forestal cuya superficie abarca el 25.8 % del total, estimándose que la subcuenca presenta una aplicación de 13.884,02 Kg. de pesticidas

(considera un periodo de aplicación) sobre una superficie de 3.844, hectáreas lo que en término medio corresponde a una carga 3.6 Kg/ha (Olave 2001).

Para determinar la afinidad ambiental de los pesticidas Olave (*op. cit.*) aplicó el modelo de fugacidad (Nivel I) propuesto por Mackay y Paterson (1981), el cual consiste en la simulación de un ambiente idealizado, obtuvo que de un total de 25 pesticidas, 16 compuestos presentan un porcentaje de distribución entre el 80 y 100 % en el medio acuático (Tabla I). Mediante la aplicación de este modelo no se simula una situación real, sino un equilibrio en todos los compartimentos y para su aplicación se requieren algunas propiedades físico- químicas básicas de la molécula que se investiga, tales como: peso molecular, presión de vapor, temperatura, solubilidad en agua, coeficiente octanol – agua y punto de fusión (Tabla II) (Barra, 1993; FAO, 1993; PNUMA/IPCS, 1999 en Briceño 2003).

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Tabla I.- Pesticidas con mayor porcentaje de distribución en agua, persistencia en días y toxicidad.

Ingrediente Activo	% en agua	t_{1/2} (días)	Toxicidad µg/l
Glifosato	100.00	37	8.60 E ⁴
Metsulfuron metil	100.00	30	1.50 E ⁵
Cloruro de clomequat	100.00	30	1.00 E ⁶
2,4 D	99.98	18	1.10 E ³
Triasulfuron	99.98	28	1.00 E ⁵
Picloram	99.98	325	1.93 E ⁴
Dicamba	99.69	31	1.34 E ⁵
Hexazinona	97.28	105	3.70 E ²
Metiltiofonato	97.21	-	-
Carbendazim	96.24	120	8.30 E ²
Pirimicarb	95.66	10	2.90 E ⁴
Tirad	93.55	30	128.00
Tralkoxydym	89.76	25	7.20 E ³
Simazina	89.76	180	1.00 E ⁵
Carboxina	88.18	3	2.00 E ³
Clopiraldid	83.77	70	1.03 E ⁵

Fuente: Olave (2001)

Tabla II. Propiedades físico químicas de los pesticidas propuestos para el monitoreo químico.

Ingrediente Activo	Peso molecular (g/mol)	Presión de vapor (Pa)	Solubilidad en agua (g/m³)	Temperatura (°C)	Coefficiente Octanol-agua (Log Kow)	Punto de fusión (°C)
2, 4 – D	221.04	19 E ⁻⁶	231 E ⁺⁴	25	-0.75	136.5
Picloram	241.48	6 E ⁺⁶	43 E ⁺⁴	25	-0.05	215
Simazina	201.66	3 E ⁻⁶	6200	22	2.10	226
Hexazinona	252.2	8500	698 E ⁺⁵	25	1.17	116
Carbendazim	191.19	9 E ⁻⁶	8000	20	1.635	304.5

Fuente: Sánchez (2002).

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Considerando esta información, Olave (2001) propuso un programa de monitoreo en el río Traiguén de cuatro pesticidas, los cuales fueron seleccionados tomando en cuenta los mayores puntajes de una clasificación que se obtuvo luego de integrar parámetros como: porcentaje de distribución en agua, carga, toxicidad y persistencia.

Así Palma *et al.* (2004) seleccionaron según el índice de clasificación de riesgo cinco pesticidas que se muestrearon durante 2001 y 2003 en la Cuenca del Río Traiguén correspondiendo a los herbicidas Simazina, Hexazinona, 2,4-D, Picloram y el fungicida Carbendazim (Tabla III).

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Tabla III. Concentración de pesticidas en muestras de agua desde seis estaciones en el río Traiguén, IX Región, Chile.

Pesticide ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Station					
	1	2	3	4	5	6
<i>6 March 2001</i>						
2,4-D	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Picloram	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Simazine	n.d.	n.d.	3.0	0.9	0.7	n.d.
Hexazinone	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.0	n.d.
Carbendazim	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.8
<i>27 August</i>						
2,4-D	1.3	0.8	0.8	1.9	9.7	n.d.
Picloram	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.3	n.d.
Simazine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hexazinone	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Carbendazim	n.d.	0.4	0.2	n.d.	n.d.	n.d.
<i>26 December</i>						
2,4-D	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Picloram	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Simazine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hexazinone	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Carbendazim	n.d.	1.2	0.4	n.d.	n.d.	n.d.
<i>26 May 2003</i>						
2,4-D	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-
Picloram	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-
Simazine	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-
Hexazinone	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-
Carbendazim	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-
<i>01 October</i>						
2,4-D	-	-	2.9	n.d.	n.d.	-
Picloram	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-
Simazine	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-
Hexazinone	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-
Carbendazim	-	-	1.4	1.0	4.5	-

Detection limit: $0.10 \mu\text{g l}^{-1}$; n.d.: no detection.

Fuente: Palma *et al.* (2004).

Cuando se evalúan las fuentes de contaminación y sus efectos en los ecosistemas acuáticos, es necesario definir los estresores y receptores de la exposición. De este modo los ecosistemas y sus complejas interacciones, destacándose las interacciones biológicas en relación a su rol en la mantención de los ecosistemas, los que se ven afectados por el ingreso de plaguicidas u otros agentes tóxicos. Por lo tanto, los efectos de los agentes tóxicos sobre las interacciones biológicas necesitan ser

estudiadas en investigaciones ecotoxicológicas (CENTRO-EULA 1999). La ecotoxicología estudia los efectos tóxicos de un agente químico físico sobre los organismos vivos, en particular sobre las poblaciones y comunidades, comprende también el estudio de la modalidad de difusión e interacción de los agentes químicos en el ambiente (Truhaut 1977, Vighi 1989, Maughan 1993, Larraín 1995 en Encina y Díaz 2001).

La aproximación más importante para la evaluación del efecto se realiza por medio de técnicas bioanalíticas conocidas como bioensayos de toxicidad aguda y crónica (Larraín *op cit.*), siendo la toxicidad una propiedad inherente de un agente químico que produce efectos dañinos a un organismo cuando es expuesto durante cierto tiempo a determinadas concentraciones. En cuanto a la evaluación de la exposición, se realiza principalmente a través de la identificación y cuantificación de las concentraciones ambientales de los contaminantes, las que son resultantes de las emisiones puntuales y difusas, modificadas por los procesos físicos, químicos y biológicos del cuerpo receptor (Lovett *et al.* 1995 en CENTRO-EULA *op cit.*).

La estimación de los efectos se puede realizar por observaciones de campo y/o mediante ensayos ecotoxicológicos, los cuales permiten establecer una relación causal entre las concentraciones ambientales y los efectos sobre las poblaciones y eventualmente extrapolar estos resultados hasta el nivel de comunidad y ecosistema (Encina & Díaz *op cit.*). La cuantificación de la relación concentración-respuesta (o efecto) de especies químicas conocidas o mezclas complejas por medio de estas

respuestas se hacen mediante los bioensayos de toxicidad, los cuales se pueden definir como la: cuantificación de la relación concentración- respuesta de un xenobiótico o una combinación de ellos, que causan efecto adverso o lesión sobre un sistema biológico determinado, bajo condiciones controladas de terreno o laboratorio (Larraín 1995).

La evaluación respecto a la presencia de sustancias contaminantes se realiza con diferentes procedimientos que van desde las modelizaciones, a los cálculos de previsión, desde el análisis de contaminantes en los sectores abióticos, hasta la medición de los contaminantes y sus efectos en los organismos (Leonzio 2002).

Según USEPA (1992) y Brusick, (1994) en Pastor (2002) la evaluación del riesgo ecológico comprende la “evaluación de los efectos ecológicos adversos que pueden ocurrir como un resultado de la exposición a uno o más estresores”. La evaluación del riesgo es un proceso para organizar y analizar datos y para examinar los efectos adversos EPA 1998) (Figura 1).

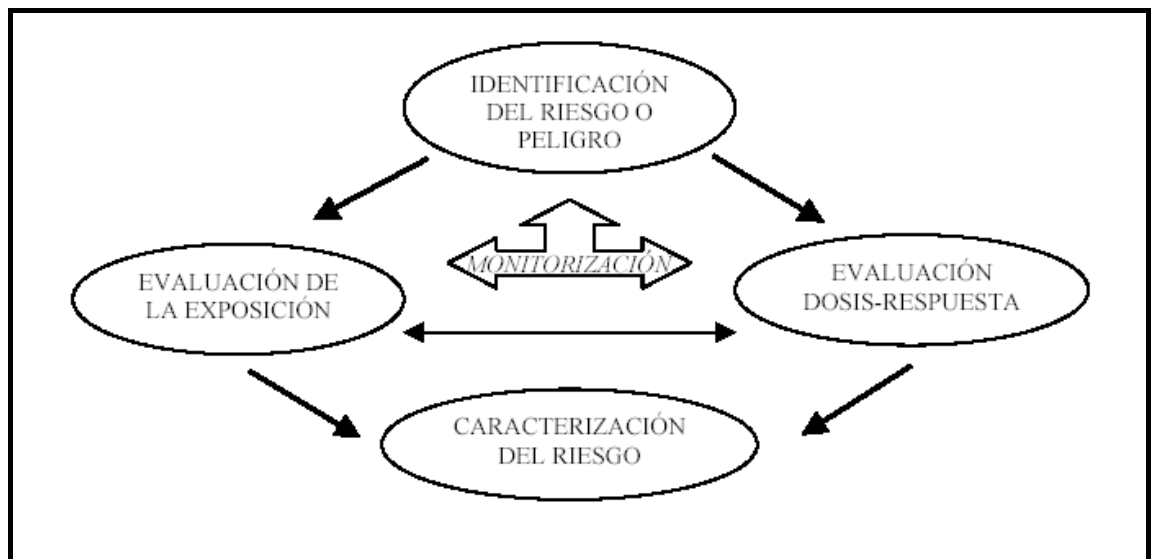


Figura 1. Proceso de la evaluación del riesgo (Brusick, 1994 en Pastor 2002).

La evaluación de riesgo, es un proceso que permite evaluar la probabilidad de que se produzcan efectos ecológicos adversos (impacto en algún nivel de organización del ecosistema) actuales y/o potenciales como resultado de la exposición a uno o más factores estresantes, producto de las múltiples actividades realizadas por el hombre (Cairns, 1980; EPA, 1998; PNUMA/IPCS, 1999; Mejía *et al*, 2002; Encina & Díaz, 2001; Moraes, 2002 en Briceño 2003), esta evaluación se basa en la integración de dos elementos esenciales: caracterización de los efectos y caracterización de la exposición a través de la estimación del riesgo ecológico, metodología propuesta por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA 1992), la que posteriormente fue propuesta y adaptada por países como Canadá, Nueva Zelanda y Australia, Estados Unidos y Brasil (Moraes, 2002 en Briceño *op. cit.*).

Los bioensayos constituyen una herramienta de valoración del riesgo, detectando la contaminación acuática en determinados organismos, ofreciendo ventajas de manejo

en condiciones de laboratorio, en estados embrionarios, larvales, juveniles y adultos (*Sensu* Gavilán y Hermosilla 1984). Según Brown & Thompson, (1986) en Larraín (1995) éstos se definen como la medición experimental de cualquier perturbación de un sistema biológico determinado causado por un agente químico o físico. Éstos han sido desarrollados y estandarizados por agencias internacionales de normalización y protección ambiental y se caracterizan por ser reproducibles, rápidos y fácilmente interpretables (EPA 1991; CEE 1984; ISO 1989 en CENTRO-EULA 1999).

Sánchez y García (1999) señalan que los bioensayos consisten en la investigación experimental que se realiza cuando se somete a un organismo ciertas concentraciones de sustancias tóxicas, para evaluar la respuesta fenológica, morfológica o conductual de ese elemento sensible. Los daños observados, proporcionan un índice independientemente de las condiciones ambientales. En suma estos factores, forman parte de los métodos para evaluar la calidad e indirectamente la pérdida y disponibilidad del recurso agua, suministrando información sobre las fuentes de contaminación.

En la actualidad una gran variedad de bioensayos de toxicidad estandarizados, utilizan plantas, invertebrados y vertebrados acuáticos para evaluar los efectos biológico-ambientales de efluentes complejos sobre cuerpos acuáticos receptores (Larraín *op cit.*).

La selección de estos organismos se basa en varios factores, tales como: sensibilidad a una variedad de sustancias, disponibilidad, representatividad en una variedad de

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

ecosistemas y factibilidad de ser mantenidos y cultivados bajo condiciones de laboratorio, EPA (1994) en Briceño (2003) ha estandarizado tres especies de peces entre ellos *Oncorhynchus mykiss*, mientras que en invertebrados al Anfípodo *Hyaella sp.*, a los microcrustáceos *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia sp.*, a los Ephemeropteros *Hexagenia limbata*, *Hexagenia bilineata* y al Díptero *Chironomus sp.*

En Chile se esta trabajando en la estandarización de especies para su utilización en bioensayos de toxicidad siendo consecuencia de ello la promulgación de las NCh 2083 Of .1999 y la NCh 2706 Of. 2002, para *Daphnia* y Algas respectivamente (Tabla IV).

Tabla IV.- Valores de toxicidad para Algas, Microcrustáceos y Peces para cada uno de los pesticidas en estudio y referencia.

Pesticidas	Algas EC ₅₀ µg/l	Microcrustaceo LC ₅₀ µg/l	Peces LC ₅₀ µg/l	Autor/Año
Carbendazim	340.0 ⁽¹⁾	460.0 ⁽¹⁾	24.0 ⁽¹⁾⁽²⁾	Canton J (1976) / Palawski D & C Knowles (1986).
Hexazinona	9.0 ⁽¹⁾	85.000 ⁽¹⁾	100.000 ⁽²⁾	Peterson <i>et al.</i> , (1997)/ Office of Pesticides programs (2000)/ Johnson W & M Finley (1980).
Picloram	36.790 ⁽¹⁾⁽²⁾	50.700 ⁽²⁾	3.100 ⁽²⁾	Office of Pesticides programs (2000)/ Mayer m & D Dill (1984)/ Mayer f & R Ellersieck (1986).
Simazina	2.24 ⁽¹⁾	10.000 ⁽¹⁾	10.000 ⁽²⁾	Turba K <i>et al.</i> , (1986)/ Mayer f & R Ellersieck (1986)/ Office of Pesticides programs (2000).
2, 4 D	24.2 ⁽¹⁾	25.000 ⁽¹⁾	1.400 ⁽²⁾	Laurant D & C Blaise (1992)/ Alexander H <i>et al.</i> , (1985)/ Johnson W & M Finley (1980).

Fuente: Briceño (2003)

(1)PAN Pesticides Database (2002); (2) ECOTOX Database USEPA (2003).

La necesidad de evaluar y detectar el impacto de las actividades antrópicas sobre los organismos y su ecosistema, a través de nuevas metodologías provoca la aplicación de criterios biológicos, a través del enfoque directo, los cuales según la EPA (1998), en un contexto regulatorio permiten el manejo de importantes funciones incluyendo: a) evaluación de la efectividad de manejo de prácticas, b) plan regional, c) plan de aguas, d) determinación de manejo prioritario para múltiples cuerpos de agua, e) clasificación y calificación relativa de calidad de agua en cuerpos de agua, f) caracterización de la vida acuática en riesgo y g) provee un medio para evaluar impactos no a través de métodos de evaluación tradicionales.

Los biocriterios proveen una evaluación directa de la condición del recurso. Impactos acumulativos en la biota pueden ser medidos, revelando degradación de sinergismo que puede ocurrir en condiciones específicas (EPA *op cit.*).

La aplicación de este enfoque se realiza por medio de biomonitoreos o monitoreos biológicos. Sánchez & García (1999) definen un biomonitoreo como el uso sistemático de sensores biológicos, a distintos niveles de complejidad, para evaluar cambios en el ambiente y fundamentar medidas para mejorar la calidad del agua y el hábitat circundante.

En este contexto los bioindicadores proporcionan un instrumento que permite el estudio, a través de un enfoque más “directo”, de los efectos de los contaminantes en el ecosistema a través de una serie de respuestas moduladas e integrables,

indispensable para la evaluación del bienestar del individuo, de la población y de la comunidad. De este modo un bioindicador se puede considerar como un sistema abierto, expuesto a un medio ambiente en el que un cierto flujo de contaminantes o su suma entran en el organismo. Generalmente por bioindicadores se entienden todos aquellos organismos que mediante reacciones identificables (bioquímicas, fisiológicas, morfológicas) proporcionando información sobre la calidad del medio ambiente o de una parte del mismo. El concepto que está en la base de los bioindicadores proveen la posibilidad de obtener información sobre las moléculas contaminantes después de su vertido en el ambiente, directamente sobre sus receptores biológicos (Leonzio 2002).

La evaluación de los efectos o las respuestas en los organismos constituye el tema principal de este estudio, para la definición de la calidad medio ambiental a través del uso de peces como indicadores, lo que concuerda con lo señalado por el CENTRO-EULA (1999).

Las respuestas de los organismos se pueden encontrar prácticamente en todos los niveles de expresión biológica: la variación de los parámetros bioquímicos, fisiológicos o de comportamiento son los llamados biomarcadores, la bioacumulación de contaminantes, la presencia/ ausencia de algunas especies, llamadas bioindicadoras (Leonzio *op cit.*).

El uso de peces como bioindicadores de la calidad del ecosistema acuático se fundamenta en que representan un recurso visible desde el punto de vista económico

y recreacional. Además pueden integrar condiciones ambientales, son útiles para establecer relaciones causales entre agentes estresores y efectos en distintos niveles de organización biológica (e.g. evaluación de las respuestas biológicas, a través de biomarcadores, resultantes de la exposición a sustancias contaminantes) y son integradores de la salud en la cadena alimenticia (*Sensu* CENTRO-EULA 1999).

Las ventajas de usar peces como organismos modelo incluyendo la facilidad de uso de los teleósteos, especialmente en acuario, pues pueden ser manipulados en laboratorio y expuestos a químicos tóxicos, respondiendo de una manera similar a los altos vertebrados. Ellos pueden ser usados como indicadores de químicos que son potenciales causantes de efectos teratogénicos y carcinogénicos en humanos. Sin embargo, la principal aplicación para sistemas modelo con peces se relaciona con determinar la distribución y efectos tóxicos de contaminantes químicos en el ambiente acuático (Al-Sabti & Metcalfe 1995).

Los peces pueden actuar como organismos “centinelas” para indicar el potencial de exposición para poblaciones humanas de químicos genotóxicos y agua de bebida. El alimento es la mayor ruta de exposición de poblaciones humanas para químicos tóxicos, y peces y moluscos han sido reconocidos como mejores vectores para transferir contaminantes a humanos (Al-Sabti & Metcalfe *op cit.*). Esto debido a la facilidad de los peces que pueden ser manipulados en el laboratorio y expuestos a químicos, es de interés continuo en el desarrollo de ensayos de toxicidad in vivo con peces como sistemas modelo para evaluar el riesgo en la salud de altos vertebrados (Powers 1989 en Al-Sabti & Metcalfe, *op cit.* y Ayllón & García-Vázquez, 2001).

Todas las características anteriormente mencionadas, han permitido el desarrollo de metodologías que permitan evaluar los riesgos de contaminantes ambientales sobre la fauna íctica (CENTRO-EULA 1999).

Uno de los instrumentos metodológicos más desarrollados por el enfoque directo está representado por los biomarcadores, definidos como variaciones inducidas cuantificables de tipo bioquímico celular, fisiológico o de comportamiento correlacionables a la exposición/ efecto de uno o más contaminantes químicos (Depledge 1994 en Leonzio 2002; Peakall & Walke 1993 en CENTRO-EULA *op cit.*). Estas variaciones o respuestas pueden ser buscadas a niveles crecientes de complejidad y/ o organización biológica. En general, las respuestas relativas a los biomarcadores de exposición señalan una interacción temprana entre la molécula y un receptor biológico. Con este objetivo pueden ser utilizados biomarcadores como alteraciones al ADN, la actividad enzimática de las monooxigenasas de función mixta (Sistema MFO) o bien, las metalotioneínas como señales de exposición a compuestos organoclorados y a metales pesados respectivamente (Gavilán 2003).

Según Adams (2002), los biomarcadores son considerado suna medida funcional de exposición a estresores ambientales, los cuales son usualmente expresados a un nivel de organización suborganismal. Según el propósito se pueden definir biomarcadores de exposición y biomarcadores de efecto. Los primeros son respuestas que indican la exposición a químicos, pero no provee conocimiento de los efectos adversos en algún nivel del organismo, por ejemplo mediciones de Citocromo P450 monooxygenasa, una gran familia de enzimas encontradas en todos los organismos, Porfirinas, etc. En

cambio los de efecto son respuestas que indican ambos exposición y efectos adversos, incluyendo efectos tóxicos. Esto incluye deterioro de la condición reflejada debido a exposición a químicos, producción de macromoléculas dañinas, lesiones celulares y de tejidos y reducción de la capacidad de crecimiento, reproducción y sobrevivencia (Peakall & Shugart 1997).

Los biomarcadores pueden ser usados para determinar la exposición y efectos en varias importantes vías. Estas incluyen a) evaluación efectos químicos de la agricultura o actividad industrial, b) aguas de alcantarilla municipales o efluentes industriales, c) determinación de distribución geográfica de efectos químicos en el ambiente y sus cambios en el tiempo, d) identificación y origen de contaminantes químicos, y e) establecer enlaces entre causa y efecto (Peakall & Shugart *op cit.*).

Los biomarcadores de efecto señalan que un organismo, una población o una comunidad están sometidas a un efecto tóxico por parte de uno o más contaminantes, como ejemplo se encuentra la inhibición de la Acetilcolinesterasa en los vertebrados después de una exposición a insecticidas organofosforados y carbamatos o la cuantificación de aductos de ADN derivados de la exposición a hidrocarburos policíclicos aromáticos (CENTRO-EULA 1999).

Los contaminantes a menudo consisten en mezclas químicas, integrando las respuestas de muchos químicos en un activo biomonitorio. Las respuestas genotóxicas son a menudo correlacionadas con una variedad de otros efectos (daño tisular, inhibición enzimática, peroxidación de lípidos, etc.) debido a múltiples modos de acción de estas mezclas o sus genotóxicos constituyentes. Además cada

genotóxico produce diferentes lesiones al ADN, incluyendo aductos, oxidación base, quiebres de ADN y efectos citogenéticos (Adams 2002). La interpretación de los biomarcadores muestra la salud del organismo, su interpretación es beneficiosa para biomonitoreos de gradientes de contaminación o durante mediciones difusas (Peakall & Shuhgart 1997). Factores intra específicos que pueden afectar la respuesta de ensayos de micronúcleos incluyen edad, sexo, dieta, salud, estatus reproductivo y raza genética (Al-Sabti & Metcalfe 1995).

Una cantidad de investigaciones hoy en día se dedican al desarrollo, validación y aplicación de biomarcadores para evaluar la exposición a agentes genotóxicos. El objetivo general de estas metodologías es para evaluar la dosis interna y/o predicción temprana de alteraciones biológicas de efecto en la salud de largo-término, tal como cáncer y posiblemente otras condiciones crónicas degenerativas (De Flora *et al.* 1993).

La Tabla V muestra una variedad de métodos en peces, moluscos y equinodermos, incluyendo biomarcadores y bioensayos.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Tabla V. Resumen de métodos recomendados por el Working Group Biological Effects of Contaminants del International Council for the Exploration of the Sea.

Método	Organismo	IC	Contaminantes	Significado biológico
Formación de DNA-aductos, MN	Peces	+++	PAHs, pesticidas	Efectos genotóxicos
Inhibición AchE	Peces Bivalvos	+ +	Organofosforados, carbamatos y tóxicos algales	Medida de exposición
Inducción de metalotioneínas	Peces <i>Mytilus sp.</i>	+++ +	Metales (Zn, Cu, Cd, Hg,...)	Medida de exposición y perturbación a metales
Inducción de EROD o P450IA	Peces	+++	PAHs, PCBs, Dioxinas,..	Indicador de exposiciones pasadas o actuales. Predictor de patologías
ALA-D inhibición	Peces	+++	Pb	Índice de exposición
Metabolitos de PAHs	Peces	++	PAHs	Medida de exposición y metabolismo de PAHs
Estabilidad lisosomal	Mejillón Ostra Peces	+ -	Amplia variedad de contaminantes. Respuesta no específica	Medida de daños celulares y buen predictor de patologías. Posible indicador de inmunodepresión en células sanguíneas.
Histopatología de lesiones toxicopáticas, preneoplasias y neoplasias en hígado	Peces	-	PAHs y otros xenobióticos (pesticidas nitroorgánicos, triazinas,...)	Medida de cambios patológicos asociados a exposiciones de compuestos carcinogénicos genotóxicos y no-genotóxicos.
Bioensayos con sedimentos	<i>Corophium</i> , <i>Echinocardium</i> , <i>Arenicola</i> , <i>Leptocheirus</i> , <i>Grandidierella</i> , <i>Rhepoxynius</i> , <i>Ampelisca</i>	+++	Contaminación no específica. Amplio rango de contaminantes.	Toxicidad aguda (letal o subletal) actual. Permite interpretaciones retrospectivas de cambios en la comunidad
Agua intersticial de los sedimentos	Organismos de la columna de agua (embrión de erizo, embrión de bivalvos, <i>Acartia</i> , etc.) Microtox	-	Contaminación no específica. Amplio rango de contaminantes	Toxicidad aguda (letal o subletal) y genotoxicidad actual. La toxicidad de contaminantes hidrofóbicos puede ser subestimada en el agua intersticial.
Elutriados de sedimentos con agua de mar	Idem	-	Contaminación no específica. Amplio rango de contaminantes. Utilizada en valoración de dragados, resuspensión de sedimentos,...	Toxicidad aguda (letal o subletal) y genotoxicidad actual
Bioensayos con agua	Idem	+++	Contaminación no específica. Amplio rango de contaminantes. Utilizada en aguas costeras y estuarios.	Toxicidad aguda (letal o subletal) y genotoxicidad actual
Reparto energético (scope for growth)	Moluscos bivalvos (mejillón, ostra,...)	++	Contaminación no específica. Amplio rango de contaminantes.	Respuesta integrada subletal
Deformidad de la concha	<i>Crassostrea gigans</i>	-	Específica de organoestánicos	Disruptor de la formación de la concha
Imposex	Moluscos neogasterópodos (<i>Nucella lapillus</i> , <i>Buccinum undatum</i>)	+++	Idem	Disruptores hormonales <i>Nucella lapillus</i> en estuarios y litoral costero, y <i>Buccinum undatum</i> aguas libres
Intersex	<i>Littorina littorea</i>	+++	Idem	Interferencia en la reproducción en aguas del litoral costero.
Suceso reproductor en peces	<i>Zoarces viviparus</i>	+++	Contaminación no específica. Amplio rango de contaminantes.	Medida sobre la capacidad de reproducción y supervivencia de huevos. Restringida al período de reproducción, cuando la hembra porta los juveniles.

IC: Intercalibración internacional con diferentes grados de desarrollo.

Fuente: Caballeira (2002)

Una de las metodologías existentes para el análisis de biomarcadores a través de la evaluación de respuestas biológicas ante algún contaminante o la suma de estos es el Test o Ensayo de micronúcleos, fenómeno que ocurre como respuesta ante la perturbación a nivel celular durante la mitosis (*Sensu* Arcand-Hoy & Metcalfe 2000).

La perturbación puede ser causada por variados factores entre los que encontramos la exposición a residuos contaminantes, la que genera respuestas a distintos niveles en los organismos vivos, tal como pesticidas con conocidas propiedades genotóxicas y clastogénicas. Es así como para el 2,4-D Farah *et al.* (2003) y Marcos ¹, Venegas² & Barra ³ (2002) (Com. Pers.) señalan su condición de agente genotóxico. Es decir provoca daño a la molécula de ADN alterando su normal comportamiento. Es así como estos compuestos químicos pueden estar generando una alteración o perturbación en los ecosistemas acuáticos impactados en la subcuenca por las actividades agroforestales.

Además, Mohammed & Ma (1999) estudiaron los efectos clastogénicos y mutágenos de los herbicidas Atrazina, Simazina (Princep), Dicamba (Banvel D) y Picloram (Tordon) usando el análisis de micronúcleos. Los ensayos arrojaron que la mutación fue elevada para el tratamiento líquido con Picloram en la concentración de 100 ppm. Mientras que para Simazina era suavemente positiva la elevación de las

(1) Marcos R. 2002. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Ciencias Biológicas.

(2) Venegas W. 2002. Universidad de Concepción. Depto. Biología Molecular.

(3) Barra R. 2002. Universidad de Concepción. CENTRO EULA. Biomarcadores.

frecuencias de micronúcleos en el radio de acción de la dosis de 5 a 200 ppm (dosis líquidas).

El Dicamba y Picloram indujeron un aumento en las frecuencias de micronúcleos relacionado con dosificación. Sumado a esto Carbendazim, según McCarroll (2002) produce aneuploidía, permitiendo la formación de micronúcleos. Así es como se respalda la justificación en la elección de los pesticidas genotóxicos aplicados en la Subcuenca del Río Traiguén, como respuestas a nivel citogenético ante la exposición a niveles variables de agentes genotóxico.

La perturbación a nivel molecular expresado a través de los micronúcleos, que se forman por condensación de fragmentos cromosomales o cromosomas enteros que no son incorporados en el núcleo hijo durante la mitosis (anafase). Estos se observan en el citoplasma separados del núcleo principal, (Heddle *et al.* 1991; Gudi *et al.* 1992 en Palm & Krause 1995; Al-Sabti & Metcalfe 1995; Gauthier *et al.* 1998; Chung *et al.* 2002; Alay *et al.* 1994 en Gavilán 2003, Adams 2002). Además Heddle (1973) y Schmidt (1975) en Al-Sabti & Metcalfe (*op cit.*) expusieron que los micronúcleos son formados en el citoplasma a través de los siguientes eventos:

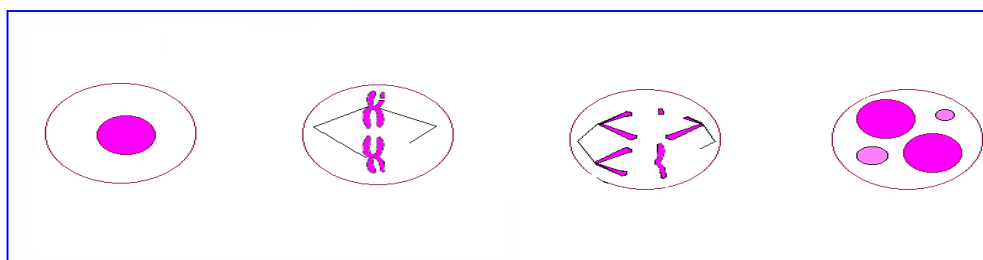
i) En la anafase, una cromátida céntrica y fragmentos cromosomales rezagados con retraso cuando los elementos céntricos van hacia los polos del huso. Los micronúcleos se presentan de fragmentos cromosomales o cromosomas acéntricos

que no son incorporados en el núcleo hijo en la mitosis porque carecen de centrómero.

ii) Los elementos rezagados pueden ser incluidos en el núcleo de las células hijas, pero una proporción de una o varios núcleos secundarios los cuales son mucho más pequeños que los núcleos principales (1/5 o 1/20), y son por lo tanto llamados micronúcleos. Los que no pueden ser observados hasta después del primer ciclo celular.

Así también Venegas *et al.* (2002) señala que los micronúcleos (MN) son masas de cromatina que tienen un aspecto similar al del núcleo principal y se ven como pequeños núcleos en el citoplasma de las células interfásicas. Se generan tanto por rupturas cromosómicas como por mala segregación de cromosomas enteros durante la división celular, quedando en ambos casos, una cantidad de DNA fuera de los núcleos hijos y dando el aspecto de pequeños núcleos o MN.

Figura 2. Formación de células binucleadas con micronúcleo.



Estos micronúcleos envueltos en la membrana nuclear, se forman por piezas de ADN retrasados después de la segregación de los cromosomas homólogos durante la anafase, además no poseen centrómero (e.g. fragmentos cromosomales o cromosomas acéntricos), los agentes que provocan este proceso se denominan clastogénicos o porque la formación del huso o enlace es interrumpido producto de la intervención de un agente aneugénico (Adams 2002; Com. Pers. Marcos¹ 2002).

Gudi *et al.* (1992) en Palm & Krause (1995) señalan que agentes que inducen aneuploidía (venenos de huso mitótico) inducen micronúcleos con centrómeros, mientras clastógenos inducen micronúcleos sin centrómeros. Así Nepomuceno *et al.* (1997) señalan que los micronúcleos son indicadores de efectos clastogénicos y aneugénicos. Los micronúcleos pueden ser detectados por examinación en microscopio óptico o por fluorescencia de porta objetos con ADN teñido. Las ventajas de esta técnicas que provee índices de genotoxicidad, requiere no más de un microscopio, ni complejos laboratorios, sin embargo la enumeración al microscopio de muchas células consume tiempo (Adams *op cit.*).

Según la investigación bibliográfica, varias técnicas han sido usadas para monitorear la frecuencia de micronúcleos en proliferación celular para evaluar *in situ* la exposición en humanos (Al Sabti *et al.*, 1992; Sinúes *et al.*, 1991 en Arcand-Hoy & Metcalfe 2000) y otros mamíferos (Cristaldi *et al.* 1990 en Al Sabti & Metcalfe 1995). Siendo el ensayo de micronúcleos originalmente desarrollado con especies de mamíferos, ha sido ampliamente usado para testar actividad genotóxica de químicos (Heddle *et al.* 1983 en Al-Sabti & Metcalfe *op cit.*). La técnica fue subsecuentemente

modificada por Hooftman y de Raat (1982) en Carrasco *et al.* (1990). para la aplicación a peces en laboratorio. Esta modificación, conocida como “test de micronúcleos en piscinas”, ha sido recientemente propuesto como un potencial rápido y barato indicador biológico *in situ* de contaminación química en peces silvestres. Hose *et al.* (1987) en Carrasco *et al.* (*op cit.*); Nepomuceno *et al.* (1997); y Bahari *et al.* (1994), Campana *et al.* (1999), Sánchez-Galán *et al.* 1999 en Ayllón & García-Vázquez (2001) e invertebrados (Brunetti *et al.*, 1988). En vertebrados acuáticos, este test puede ser usado para evaluar la influencia de la contaminación en el ambiente acuático (Koppe & Starling 2001). En este contexto según Mitchell & Kennedy (1992), Park *et al.* (1993) en Plhares y Koppe (2002) los peces son útiles como modelos genéticos para evaluación de la contaminación en ecosistemas acuáticos.

La exposición en el laboratorio de peces a agentes físicos y químicos con la subsecuente enumeración de micronúcleos y otras lesiones genotóxicas significativas en el núcleo de eritrocitos periféricos fue apoyado por Hooftman & de Raat (1982); Manna *et al.* (1985), Al-Sabti (1986 a -1986 b), Das & Nanda (1986), Metcalfe (1988) en Carrasco *et al.* (1990) y Bahari *et al.* (1994), Nepomuceno *et al.* (*op cit.*), Campana *et al.* (1999), Sánchez-Galán *et al.*, 1999 en Ayllón & García-Vázquez (*op cit.*).

El Test de Micronúcleos aplicado a biomonitoreo genotóxico de efectos clastogénicos de contaminantes resulta la más práctica herramienta en mutagénesis

ambiental (Koppe 2002). Esta entrada es ampliamente usada en organismos acuáticos tal como moluscos bivalvos como almejas (*Mytilus galloprovincialis*), (*Crassostrea gigas* y *Chamelea galina*), rana (*Rana perezi*), Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), peces salmoniformes (*Umbra pigmaea*), Carpa prusiana (*Carassius auratus gibelio*) y Tilapias (*Oreochromis mossambica*) (Hooftman y Raat 1982, Manna *et al.* 1985, Hose *et al.* 1987, Metcalfe, 1988, Brunetti *et al.* 1988 en Carrasco *et al.* (1990) y Rodríguez-Ariza 1992, Al-Sabti 1994, Al-Sabti y Metcalfe, 1995, Vernier *et al.* 1997 en Koppe 2002).

En toxicología acuática los componentes de sangre periférica de peces han sido encontrados el reflejo de la contaminación ambiental (Nikinmaa 1992 en Palm & Krause 1995), es considerado como uno de los más promisorios, no costosa y rápida técnica proyectada convenientemente para evaluar la exposición a contaminantes en este caso de peces marinos y de agua dulce (Landolt y Kockan 1983 en Palm & Krause *op cit.*).

Plhares & Koppe (2002) hacen una diferencia entre micronúcleos del riñón, principal tejido hematopoyético, y los de sangre periférica, que para biomonitoreos de mutágenos en el agua, ambos grupos de eritrocitos son de similar sensibilidad, siendo los primeros más fácil de muestrear. El Test de eritrocitos micronucleados ha sido usado con diferentes especies de peces para monitorear los contaminantes acuáticos exhibiendo características mutagénicas (De Flora *et al.* 1993), además puede ser usado para examinar muchos tipos de respuestas simultáneamente (e.g.

retardo mitótico, apoptosis, y quiebre cromosomal, pérdida y no disyunción (Kirsch-Volders *et al.* 1997 en Adams 2002).

Hay muchos ejemplos para señalar en los cuales se utilizan los micronúcleos como indicador de efectos genotóxicos en los organismos acuáticos, donde las respuestas genotóxicas son inducidas por una variedad de contaminantes, incluyendo Hidrocarburos poliaromáticos, nitroaromáticos, y clorados (Huang *et al.* 1995; Fu & Herreno-Saenz 1999; Fu *et al.* 1999; Pickering en Adams 2002), metales pesados (Snow 1992 en Adams *op cit.*), y Pesticidas (Vijayaraghavan & Nagarajan 1994; Campana *et al.* 1999). Los tejidos utilizados para este propósito incluyen la sangre (Al-Sabti & Metcalfe 1995; Gauthier 1996), hígado (Rao *et al.* 1997) y Branquias (Campana *et al.* 1999) (Adams *op cit.*).

Según Fossi & Leonzio (1994) la elección del material biológico a analizar debe ser de preferencia fácilmente disponible y cuya intervención de colecta sea no destructiva. Los principales materiales biológicos utilizados en la vía no destructiva son: el tejido sanguíneo, excretas, biopsia de hígado, biopsia de piel, huevos, cáscara de huevos, plumas y alas, pelo, cornamentas, leche. Sin embargo el tejido sanguíneo, posee una amplia gama de rangos de expresión desde un biomarcador a un análisis de residuos químicos.

Hayashi *et al.* (1998) y Al Sabti & Metcalfe (*op cit.*) han realizado varios estudios en eritrocitos, donde se han reportado alta frecuencia de micronúcleos en especies de peces desde áreas contaminadas en comparación a las de referencia o control

(Arcand-Hoy & Metcalfe 2000; Palm & Krause 1995). Así, el Test de micronúcleos es una de las técnicas de registro rápidas para la evaluación de la exposición a contaminantes (Landolt & Kockan 1983 en Palm & Krause *op cit.*).

Los análisis de micronúcleos en peces han demostrado ser técnicas *in vivo* útiles para probar la genotoxicidad, demostrando el potencial para supervisar *in situ* la calidad del agua (Al-Sabti & Metcalfe 1995).

Los micronúcleos también pueden dar una indicación de riesgo carcinogénico debido a que Dopp *et al.* (1996) en Adams (2002) estudiaron almejas de hábitat contaminados encontrando un aumento en la frecuencia de leucemia y aumento de micronúcleos.

Este ensayo es fácilmente adaptable para monitoreos *in situ*. Sin embargo hay muchos factores biológicos que influyen las respuestas genotóxicas: especies, edad, sexo, estatus reproductivo, salud y temperatura del agua, pues juegan un rol importante en la expresión de efectos genotóxicos en peces (Hayashi *et al.* 1998, Al Sabti & Metcalfe 1995 en Arcand-Hoy & Metcalfe 2000).

En este contexto, el objetivo de este estudio es evaluar la respuesta a través de un biomarcador, expresado en la inducción de micronúcleos en eritrocitos periféricos de peces de la especie *Oncorhynchus mykiss*, como medida de actividad clastogénica ante la exposición de pesticidas genotóxicos, derivado de las actividades agroforestales desarrolladas en Subcuenca del Río Traiguén, IX Región, aplicando el Ensayo de Micronúcleos como herramienta de diagnóstico y pronóstico.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

1.1.- HIPOTESIS DE TRABAJO

- Existe una respuesta a nivel citogenética expresado en la formación de eritrocitos micronucleados en *Oncorhynchus mykiss* por la exposición a potenciales pesticidas genotóxicos, procedentes de las actividades agroforestales en la Subcuenca del Río Traiguén.

1.2.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

“Evaluar la respuesta de a través de la utilización de biomarcadores como herramienta de biomonitoreo, resultado de la exposición a pesticidas genotóxicos, producto de las actividades agroforestales en la Subcuenca del Río Traiguén”.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.- Determinar la respuesta de *Oncorhynchus mykiss*, a través de la formación de eritrocitos micronucleados como resultado de la exposición a pesticidas genotóxicos.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

2. Contribuir a la elaboración de una base de datos de calidad de agua en la Subcuenca del Río Traiguén.

3. Proponer los biomarcadores, a través de la aplicación del Test de Micronúcleos, como herramienta de diagnóstico y monitoreo de calidad ambiental en la Subcuenca del Río Traiguén.

2.- MATERIALES Y METODOS

2.1 Área de estudio

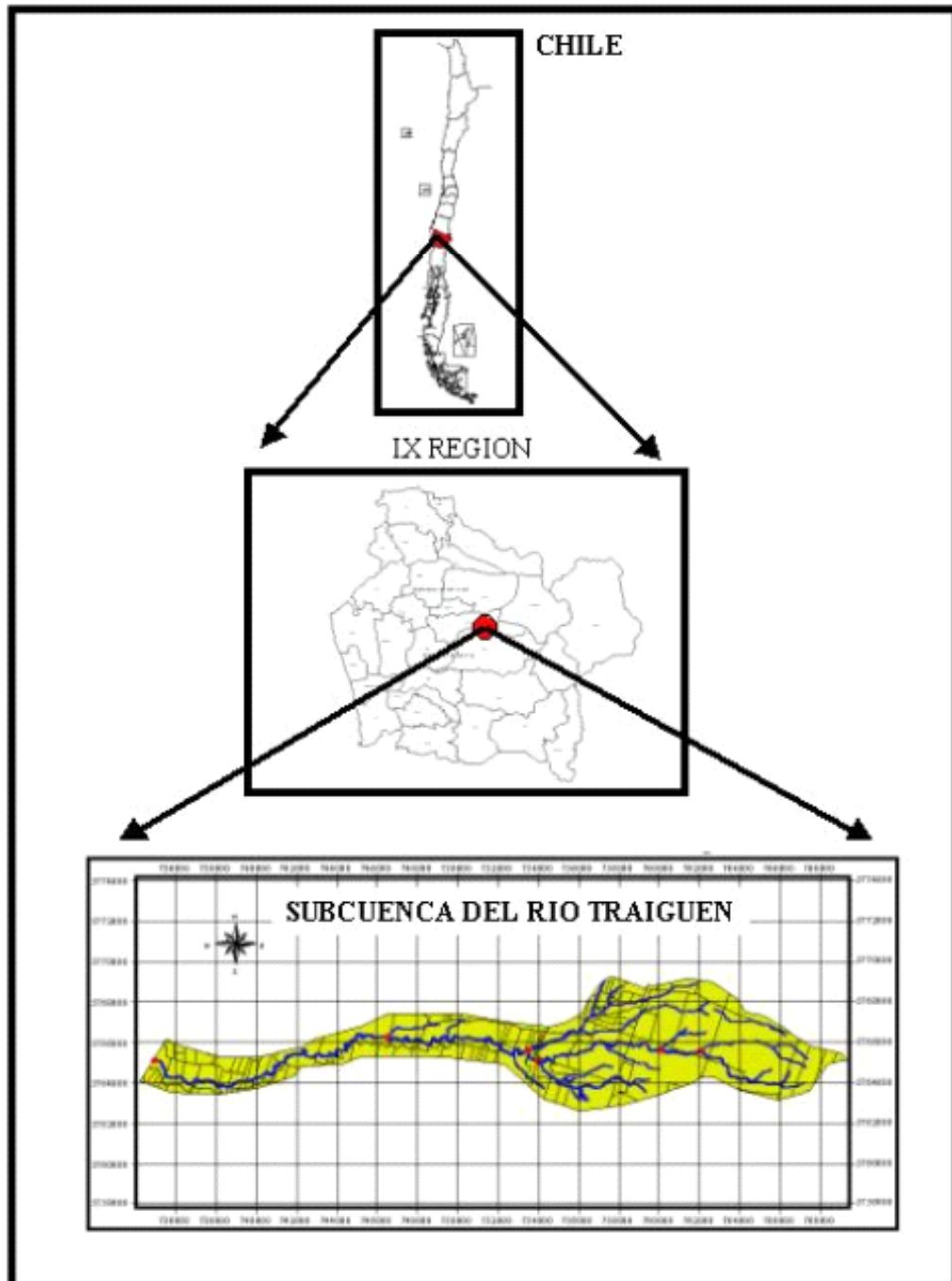
2.1.1.- Descripción del área de estudio.

El área de estudio se sitúa en la Cuenca del Río Traiguén perteneciente a la Hoya Hidrográfica del Río Imperial de la IX región y abarca 10.176 ha., lo que representa el 79.46% de la superficie total de la cuenca de 12804.9 ha. (Figura 3). Según su morfología la cuenca presenta dos formas bien diferenciadas en sentido oeste-este: en su parte baja es alargada y angosta en el que predomina el cauce principal de 50.4 Km., el cual en su parte media se ramifica en una serie de cauces de orden menor dando a la cuenca una forma arbórea (Olave 2001).

El río Traiguén recorre la parte media y baja de la cuenca (situada a una altura de 350 m.s.n.m) presenta un régimen estacional con caudal medio máximo de 43.8 m³/s invierno y caudal mínimo de 0.21 m³/s en verano (DGA 2001 en Sánchez 2002).

El río Traiguén es preandino, a 20 Km se origina al oriente de Victoria, de la unión de dos esteros (las Mariposas y el Collahue). En este tramo la Dirección General de Aguas ha otorgado derechos de aprovechamiento consuntivos (aguas empleadas en el riego agrícola, que no obliga a restituir las aguas después de usadas) del río Traiguén de los cuales 1.790 l/s son para riego y 200 l/s para ser utilizados como abastecimiento de agua potable, por ESSAR (DGA 1998 en Weisser 2003.).

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

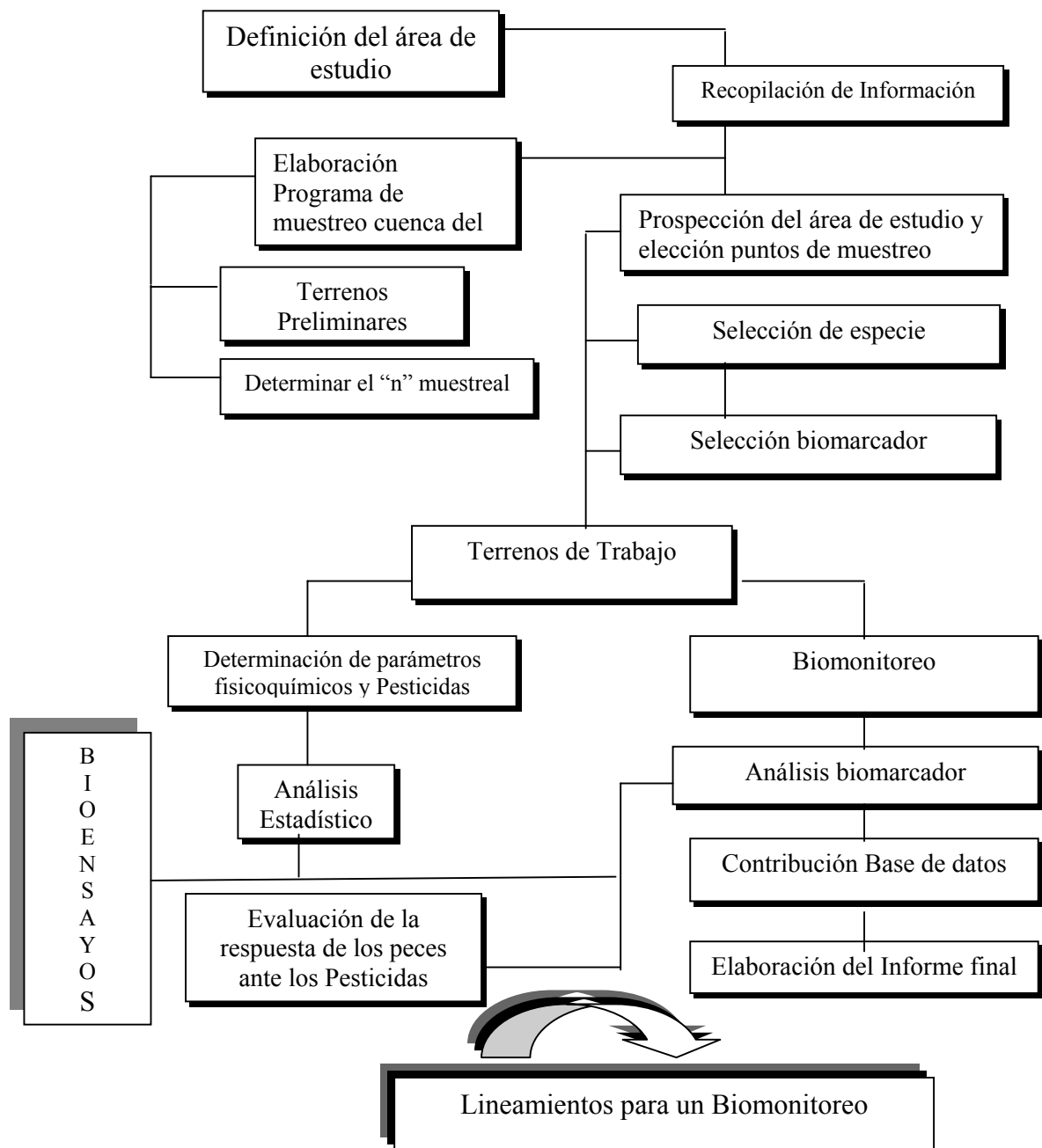


Fuente: Olave (2001).

Figura 3. Ubicación general del área de estudio.

La metodología utilizada para el cumplimiento de los objetivos planteados se encuentra en la figura 4.

Figura 4. Flujo metodológico



“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

2.1.2.- Clima.

Las características agroclimáticas de la cuenca del río Traiguén, se encuentran resumidas en la Tabla VI.

Tabla VI. Caracterización agroclimática.

Parámetros	Valores
T° Máxima mes de enero (°C)	23
T° Mínima mes de julio (°C)	8
Pluviometría anual (mm)	1660
Días grados acumulados	121
Horas frío mayo-septiembre	457
Días libres de heladas (50% prob)	150-180
Meses de receso vegetativo	5
Meses húmedos	7-8
Meses secos	3-4

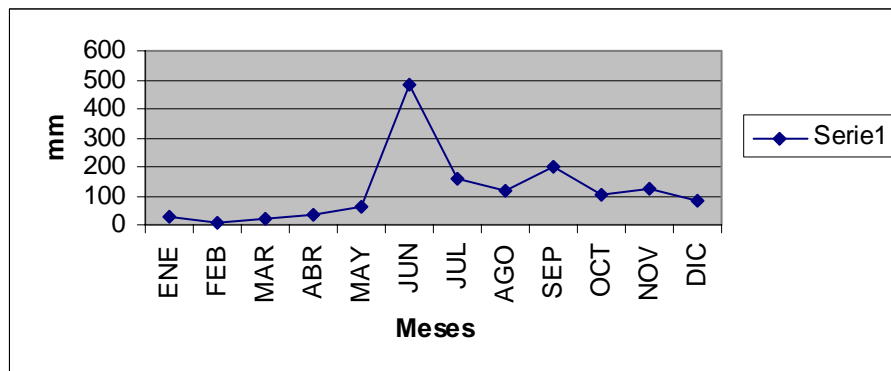
Fuente: CONAF 1990 en Sánchez 2002.

2.1.3.- Datos Meteorológicos.

Los datos de precipitaciones medias mensuales y caudales medios recogidos en la estación de Traiguén en Victoria y Las Mercedes, por la Dirección General de Aguas (DGA 2004), se observa que los mayores valores de precipitaciones fueron

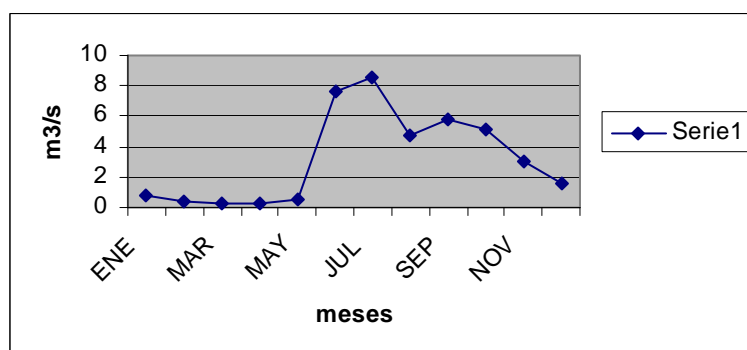
registradas en el mes de junio y julio (Figura 5), en estos meses también se registró un aumento de caudal, cuya máxima se observa entre los meses de junio y julio (Figura 6), las bajas precipitaciones se caracterizaron en los meses de enero a mayo, los cuales también se encontraron dentro de los períodos de mínimo caudal.

Figura 5: Pluviometría media mensual, Estación Las Mercedes Victoria.



Fuente: DGA (2004).

Figura 6: Caudales medios mensuales del Río Traiguén en Victoria.



Fuente: DGA (2004).

2.1.4.- Características prediales de la cuenca

El área de estudio definida en la cuenca del río Traiguén incluye un total de 111 predios, la información se obtuvo mediante la consulta a 3 ortofotomosaicos del centro de información de recursos naturales (CIREN CORFO 1994 en Olave 2001), correspondientes a Victoria, San Gregorio y Estero Coló escala 1:20.000, la información generada permitió caracterizar el total de predios en función de una base de datos general a nivel predial (rol avalúo, nombre del predio, nombre del propietario, suelos, capacidad del suelo, superficie total del predio) y de superficie cultivable y aplicación de pesticidas (área del predio dentro de la subcuenca, uso y superficie del predio dentro de la subcuenca, tipo y superficie de cultivo, tipo y dosis de pesticidas aplicado a cada cultivo, carga de aplicación, época de siembra y cosecha, forma de aplicación) (Olave *op cit.*).

2.1.5.- Suelo

Según la caracterización del suelo a través de mosaicos de suelo (CIREN CORFO, 1989 en Olave *op cit.*) el área de estudio se encuentra definida por las series Victoria (Vc) y Barros Arana (Ba) (Anexo 4). De acuerdo a la fórmula predominante (323) (Anexo 5), los suelos de este sector presentaron un horizonte A, bien definido, buen drenaje y textura media, franco arenosa muy fina, franco arcillosa y limo (Olave *op cit.*).

De acuerdo a la clasificación del suelo a través de mosaicos de capacidad de uso se constato que casi la totalidad del área pertenece a la capacidad de uso III los suelos de esta clase presentan moderadas limitaciones en su uso, debido principalmente al relieve moderadamente inclinado a suavemente ondulado, permeabilidad muy lenta en el subsuelo, baja capacidad de retención de agua entre otras (CIREN CORFO 1989 en Olave 2001).

2.1.6.- Uso actual del territorio.

El suelo de la Subcuenca del Río Traiguén se caracteriza por su uso agrícola, forestal, renoval, pradera y urbano los que se distribuyen en distintas proporciones a lo largo de la cuenca.

El uso agrícola presenta una mayor frecuencia a nivel predial y en términos de superficie representa el 50.05% del área total. El porcentaje de predios caracterizados por la presencia de renovales y de uso urbano es menor y la superficie dentro de la cuenca alcanza al 19.39% y 0.19% de la superficie total de la cuenca (Olave *op cit.*).

El área de uso agrícola presenta cuatro tipos de cultivos: trigo, raps, cebada y avena los que son cultivados simultáneamente en la mayoría de los predios. El trigo tiene la mayor frecuencia a nivel predial lo que también coincide con una mayor superficie (41.99%), raps (10.14%), avena (19.12 %), por otra parte el cultivo de cebada es

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

menos frecuente en los predios, y abarca también una menor superficie dentro de la subcuenca (3.21%) (Olave 2001).

2.2- CARACTERIZACION DEL HABITAT

La calidad del hábitat se caracterizó usando diversas variables donde los parámetros clave del hábitat consisten en dosel de vegetación, flujo de corriente y profundidad.

Se registraron también variables estructurales del hábitat, tales como profundidad media y máxima, ancho del cauce.

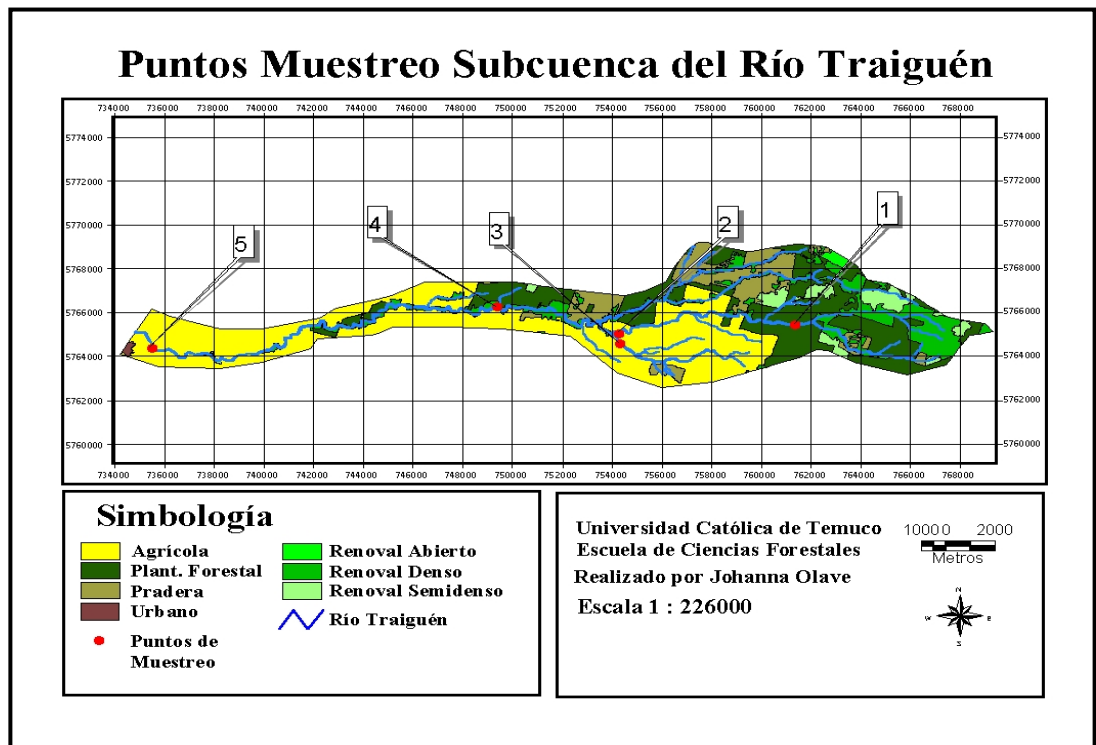
2.3.- MUESTREO

2.3.1.- Puntos de Muestreo

Se muestrearon 5 estaciones del río, muestras de agua en botellas muestreadoras para determinar parámetros físico químicos y pesticidas en laboratorio. Mientras que para la aplicación del Test de Micronúcleos se escogieron tres estaciones representativas. La figura 7 muestra las cinco estaciones de muestreo y los usos del suelo del área en estudio.

En la Tabla VII se señalan las coordenadas de las estaciones de muestreo de la Subcuenca del Río Traiguén.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”



Fuente: Weisser (2003).

Figura 7.- Ubicación de los puntos de muestreo de la Subcuenca del Río Traiguén.

Tabla VII. Definición de los puntos de muestreo.

Nº puntos de muestreo	Coordenadas en UTM		Tipo de subcuenca o lugar
	N	E	
1	5.765.260	761.305	Forestal
2	5.764.950	754.304	Agrícola-Forestal
3	5.764.573	754.248	Agrícola-Forestal
4	5.766.096	749.461	Intermedio
5	5.764.212	735.716	Salida este de la ciudad de Victoria (Bocatoma ESSAR)

Fuente: Weisser (2003).

En tres de las cinco estaciones (2, 3 y 4), se utilizó como único arte de pesca para el muestreo de peces un equipo de pesca eléctrica. Para estandarizar las capturas, se recorrieron 50 m de largo en cada estación de muestreo, barriendo todo el ancho del cauce. La unidad de esfuerzo considerada fue de 50 m de longitud del estero y 30 minutos de pesca. Los peces capturados fueron mantenidos vivos en recipientes y fueron identificados in situ hasta nivel de especie. A cada ejemplar se le midió la longitud total, longitud estándar y el peso total.

Las fechas de cada muestreo se adecuaron a dos períodos: un período de pre-Aplicación de pesticidas (Mayo-Junio 2003) y un segundo muestreo a un período de post-Aplicación de pesticidas (Septiembre-Octubre 2003).

2.3.2.- Medición de parámetros Físico-Químicos

Al mismo tiempo de tomar las muestras de peces se determinó pH, temperatura, turbidez, conductividad, Sólidos Disueltos Totales, Sólidos Suspendidos Totales (SST), Sólidos Suspendidos Fijos (SSF), Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), Sólidos Totales (ST), Sólidos Totales Fijos (STF), Sólidos Totales Volátiles (STV), Alcalinidad, Color, Dureza Total, Oxígeno Disuelto, DBO₅, Fosfato, Nitrato, Nitrito, Coliformes Fecales y Coliformes Totales. Estos fueron medidos en superficie (0-30 cm). En terreno la temperatura y el pH fueron medidos con pHmetro Orión modelo 250 A el cual tiene incorporado un termómetro. La conductividad y Sólidos

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Disueltos Totales (TDS), fueron medidos con un Conductímetro Orión modelo 115.

El resto de parámetros fueron determinados en laboratorio.

Tabla VIII: Metodología de análisis Químico:

(NCh 1805 Of. 80; NCh 2313)

Parámetro	Metodología
DBO ₅	Método volumétrico
Amonio	Método Djendhal
Fósforo	Espectrofotometría visible. Ac. Vanadomolibdofosfórico
Nitrito	Método colorimétrico
Nitrato	Método colorimétrico
Dureza	Volumetría complexométrica con EDTA
Sólidos Suspendidos	Gravimetría directa

Tabla IX: Metodología utilizada para análisis Microbiológicos:

NCh 1620/1 Of 84; NCh 1620/2 Of 84.

Parámetro	Metodología
Coliformes Fecales	Método de los tubos múltiples Unidad NMP/100 ml
Coliformes Totales	Método de los tubos múltiples Unidad NMP/100 ml

2.4.- ESTIMACION DE LA EXPOSICIÓN

2.4.1.- Análisis de Pesticidas

la exposición se determinó mediante un monitoreo químico de pesticidas anteriormente propuestos por Olave (2001) de acuerdo al modelo de Fugacidad Nivel I, el cual integra las características físico químicas y el uso de ciertos parámetros como son toxicidad, porcentaje en agua, carga total y persistencia de los pesticidas usados en la subcuenca. Los análisis para determinar los pesticidas (Herbicidas) Picloram, 2,4-D, Simazina, Hexazinona y el Fungicida Carbendazim presentes en las aguas del Río Traiguén, se realizaron en el Laboratorio de Química de la Universidad de la Frontera. El tratamiento de las muestras fue por Extracción en fase sólida, SPEC (LC-18, 500 mg). Para la determinación de los pesticidas utilizaron análisis cromatográfico multiresiduo, empleando cromatógrafo líquido HPLC detector UV. El porcentaje de recuperación fue de 90-98%.

2.5.- ESTIMACION DE LOS EFECTOS

2.5.1.- Biomonitorio:

Los organismos a monitorear corresponden a individuos de la especie *Oncorhynchus mykiss*, los que capturados mediante pesca eléctrica con equipo electro-Fidefanggerat durante dos períodos de muestreo Pre y Post Aplicación de pesticidas, fueron medidos y pesados en terreno. Además se les extrajo una muestra de sangre de la vena caudal, la cual fue extendida en portaobjetos limpios para su posterior fijación, tinción y conteo. Con el fin de aplicar el biomarcador escogido: Test o Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de peces.

2.5.2.- Bioensayos de Toxicidad:

Para validar los resultados obtenidos en terreno se procedió a realizar bioensayos en laboratorio, aplicando el mismo biomarcador. Los ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Escuela de Ciencias Ambientales, de la Universidad Católica de Temuco, entre los meses de junio-octubre de 2004.

2.5.2.1.- Diseño Experimental: Descripción tratamientos.

Los peces son tratados por 96 horas con soluciones frescas de dos pesticidas en su fórmula comercial bajo condiciones de laboratorio: 2,4-D (0.8, 2.0, 5.0, 10 y 20 ppm)

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

y Carbendazim (1.0, 4.0, 10, 15 ppm), los que fueron controlados a las 24 y 96 horas. Se consideraron tres réplicas por cada concentración. En cada acuario de 20 Litros, lavados previamente con yodo al 0,3 %, se colocaron 2 individuos. Para evitar algún sesgo en los resultados, dos grupos controles fueron testeados, un control positivo, representado por Mitomicina C (CAS N° 50-07-7), inhibidor de la síntesis de DNA, división nuclear, testeados a una concentración de 1 y 2 mg/kg, inyectado intraperitonealmente con una solución salina (NaCl 0,9%), testado a las 24 y 96 horas y un control negativo utilizando sólo agua de pozo (Ayllón & García, 2001; Koppe 2002).

Tabla X: Características de los pesticidas utilizados para el testeo.

Compuesto	N. Comercial	Ingrediente Activo	Concentración
Carbendazim	Duett	Epoxiconazol+Carbendazim	125 g/l + 125 g/l
2,4-D	2,4-D 480 x 01	2,4-D Sal Dimetilamina	480 g/l

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Figura 8: Esquema del diseño experimental.

CONTROLES	TRATAMIENTOS
<p>Control Positivo: <u>MITOMICINA C</u></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px;">2 individuos</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px;">2 individuos</div> </div> <p>C: 1 mg/kg 2mg/k</p>	<p><u>CARBENDAZIM</u></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px; width: fit-content; margin: auto;">2 individuos</div> <p>C: 1.0, 4.0, 10, 15 ppm</p>
<p>Control Negativo: <u>Agua de pozo</u></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px; width: fit-content; margin: auto;">2 individuos</div>	<p><u>2,4-D</u></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px; width: fit-content; margin: auto;">2 individuos</div> <p>C: 0.8, 2.0, 5.0, 10 y 20 ppm</p>

C= Concentración, Control: 24 y 96 horas, N° de Replicas: 3

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Tabla XI.- Condiciones generales utilizadas en la realización de ensayos de toxicidad aguda para peces (*Oncorhynchus mykiss*) (modificado de Tortorelli *et al.*, 1994 en Briceño 2003) aplicables al ensayo de micronúcleos.

ITEM	CONDICION
Tipo de test	Estático
Duración del test	96 horas
Variable respuesta	Inducción de Micronúcleos
Temperatura	15 +/- 1 °C
pH	6.5 - 8.5
Calidad de luz	Iluminación ambiente laboratorio
Intensidad de luz	Niveles ambiente laboratorio
Fotoperíodo	Iluminación natural
Alimentación	Ninguna
Talla de los organismos	100 – 300 gramos.
Nº de organismos por concentración	2
Nº replicas	3
Nº de concentraciones	4 - 5
Tamaño del recipiente	20 litros.
Agua de dilución	Agua de pozo
Expresión de los resultados	Frecuencia de MN‰ en 2000 células
Aceptabilidad del Test	100% Supervivencia

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

2.5.3.- Obtención del material biológico

Se realizó el ensayo, utilizando la variable respuesta representado en la formación de eritrocitos micronucleados, en peces inmaduros de Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), con un peso promedio de 100 a 300 g, obtenidos de la Escuela de Acuicultura de la Universidad Católica de Temuco. Posterior al transporte fueron mantenidos en reposo y climatizados por 24 horas sin alimentación, en estanques con agua bien aireada (pH 6.5-8.5 y T 15° C) para su posterior utilización. Los peces no fueron alimentados durante el período experimental.

2.5.4.- DETECCION DE GENOTOXICOS IN SITU Y EX SITU

Luego los individuos fueron analizados mediante el Ensayo de Micronúcleos, aplicado tanto en condiciones de campo como en laboratorio.

2.5.4.1.-Test de Micronúcleos

Los Micronúcleos (MN) son fragmentos de ADN encerrados en pequeñas envolturas de membrana nuclear. La ventaja de esta técnica es que provee un índice de genotoxicidad, y no requiere más que un microscopio y no es complejo (Adams 2002). El tejido usado incluye sangre por lo cual a los peces se les extrajo sangre periférica por punción de la vena caudal, dos muestras por individuo son tomadas y esparcidas en portaobjetos limpios. Los frotis se secaron al aire por 24 horas. En

laboratorio se fijaron con Metanol: Ácido Acético (3:1), luego se tiñen con Giemsa al 5% en tampón fosfato pH 6.7; se lavan con agua destilada y se dejan secar al aire (Gavilán 2003).

El conteo de los micronúcleos se hace según lo indicado por Racine y Matter (1984) en Alay *et al.* (1995). Se cuentan 2.000 células por portaobjeto, examinando dos por cada ejemplar con un total de 137.160 eritrocitos contados con 50 individuos en terreno y un total de 417.000 eritrocitos con 81 individuos en laboratorio. La observación se hizo en un microscopio con 1000x de magnificación con aceite de inmersión para así determinar la frecuencia de micronúcleos. Los portaobjetos fueron numerados y los conteos se hicieron a “ciegas” por un solo observador.

Se calculó la cantidad de micronúcleos expresados en MNC ‰, el cual expresa la frecuencia de células micronucleadas por 1000. Además se calculó el índice PI que se aplica al MNC ‰ del control negativo respecto al MNC ‰ calculado de las muestras.

Lo anterior se aplica los peces muestreados de cada Estación del Río Traiguén tanto para cada Tratamiento y Control hecho en laboratorio.

La MNC ‰ y el índice de PI fueron calculados como sigue:

$$\text{MNC } \text{‰} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de Células Conteniendo MN}}{\text{N}^{\circ} \text{ Total de Células contadas}} * 1000 \text{ ‰}$$

$$PI = \frac{\text{MNC } \text{‰ de Muestras}}{\text{MNC } \text{‰ del Control Negativo}}$$

Los Criterios de Identificación de Micronúcleos (MN) se aplicaron según Majone *et al.* (1987), Carrasco *et al.* (1990), Fenech *et al.* (1996) en *Annales de Biologie Clinique* (2000) y Koppe (2002), donde:

- El diámetro del MN debe ser menos de una mitad del núcleo principal.
- Los MN se debe estar separado del núcleo principal, debe haber una identificación clara del límite nuclear.
- Los MN no son más refractivos y tienen un color e intensidad como la del núcleo principal.
- Los MN son casi redondos.
- Los MN deben estar incluidos en el citoplasma celular.

2.6.- ANALISIS ESTADISTICO

Todo resultado analítico debe ser acompañado de un nivel de confianza que muestre el rango dentro del cual con gran probabilidad estarán incluidos el resultado y el valor real, a través de límites estadísticos.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

El primer paso es determinar la desviación estándar de los resultados obtenidos en una serie de réplicas, donde:

$$S = \sqrt{1/n-1 \sum (x_i - X)^2}$$

Ecuación 1

Como X como la media de los resultados

$$X = 1/n \sum x_i$$

Ecuación 2

Los resultados obtenidos del ensayo de micronúcleos aplicado serán tabulados en una planilla de cálculo Excel 5.0. La frecuencia de formación de micronúcleos, tanto entre los sitios muestreados como en laboratorio, se comparadas mediante un análisis de varianza ANOVA no paramétrica mediante el programa estadístico Statgrafics.

El Test Tukey fue usado para determinar diferencias significativas entre cada punto experimental y su respectivo control en el bioensayo.

Los parámetros físico químicos obtenidos del Río Traiguén se comparan con los obtenidos desde la Cuenca del Río Chillán y Damas a través de un análisis de Cluster.

3.- RESULTADOS

3.1.- CARACTERIZACION DEL HABITAT

a) DOSEL DE VEGETACIÓN

En las riberas del Río Traiguén, se presenta muy poca vegetación introducida dentro del área que se realizó el muestreo, la mayor cantidad es nativa. Las especies de *Eucalyptus globulus* (Eucaliptus) y *Pinus radiata* (Pino) no se presentaron en esta área, la cual es de 20 m desde la ribera. En las Estaciones 1, 2, 3 y 4 se encuentran una diversidad mayor de especies arbóreas y arbustivas, en las dos riberas del río, lo que ayuda a proteger la erosión del lugar. En la estación 5 existe una menor diversidad vegetal en ambas riberas (Weisser 2003).

b) CAUDAL

Los caudales fueron obtenidos de la Estación Río Traiguén en Victoria (Tabla XII) y directamente en las respectivas estaciones durante el primer período de muestreo (Tabla XIII) y segundo período de muestreo (Tabla XIV). Se observa que durante el primer muestreo (Mayo) se presentó un caudal menor que durante el segundo muestreo (Septiembre-Octubre).

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Tabla XII: Caudales medios (m³/seg) mensuales registrados durante el período de muestreo del año 2003. Coordenadas: UTM Norte: 5.766.669 mts. UTM Este: 734.925 mts.

AÑO	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT
2003	0,29	0,3	0,48	7,6	8,61	4,79	5,82	5,09
PROMEDIO	0,29	0,3	0,48	7,6	8,61	4,79	5,82	5,09

Fuente: DGA (2004).

Tabla XIII: Velocidad del agua y Caudal medido en terreno durante el primer muestreo (Pre-aplicación).

Estación	Ancho (m)	Superficie de muestreo (m ²)	Ribera de muestreo	Veloc. del agua (m/s)	Caudal (m ³ /s)	Profundidad Promedio (cm)
1	9,4	680	Ambas	0,317	44,82	12,2
2	9,15	400	Ambas	0,168	15,41	13,2
3	4	350	Ambas	0,136	5,46	11,2
4	9,34	810	Sur	0,174	24,43	22,6
5	13,2	750	Ambas	-	-	-

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Tabla XIV: Velocidad del agua y Caudal medido en terreno durante el segundo muestreo (Post- Aplicación).

Estación	Ancho (m)	Superficie de muestreo (m ²)	Ribera de muestreo	Veloc. del agua (m/s)	Caudal (m ³ /s)	Profundidad Promedio (cm)
1	5,6	680	Ambas	0,6	43,68	41,3
2	10,4	400	Ambas	0,78	105,450	27,900
3	6	350	Ambas	0,624	48,67	18,5
4	18,2	810	Sur	0,8	168,48	50,4375
5	14	120	Sur	-	-	-

Nota: Para la Estación 5 no fue posible determinar el caudal, en ninguno de los muestreos.

3.2.- MUESTREO

3.2.1.- Parámetros físico-químicos

En terreno se realizó la medición de parámetros físico químicos del agua superficial in situ, como son pH, temperatura, conductividad, Sólidos disueltos totales entre otros. En la Tabla XV se observan los datos físicos químicos obtenidos y medido in situ, considerando pH, Conductividad, Turbiedad, Temperatura, Sólidos Totales Disueltos, donde sus valores se encuentran dentro de los rangos para ríos sureños de la depresión intermedia.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Tabla XV: Parámetros físicos y químicos medidos *in situ*.

PARAMETROS	Estación 1		Estación 2		Estación 3		Estación 4		Estación 5	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
pH	6,7	7,35	6,77	6,86	6,48	6,9	6,75	6,92	7,05	6,98
Conductividad (uS/cm)	22,1	22,1	24,8	19,1	24,3	16,3	27	16,9	24,48	15,3
Turbiedad	1,92	84,2	3,15	32,05	2	98	2,29	62,03	2,28	47,2
Temperatura(°C)	6,7	8,7	7,4	8,6	7,6	9,7	7,1	10	9,45	9,1
Sólidos totales disueltos mg/l	10	10	12	9	24,3	8	14	8	12	3

A: Pre-aplicación de pesticidas, B: Post-aplicación de pesticidas.

La Tablas XVI y XVII muestran los parámetros medido en el laboratorio en forma paralela a los anteriores.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Tabla XVI: Parámetros físicos y químicos medidos en el laboratorio, período de Pre- Aplicación.

		PRE APLICACION		Mayo -Junio 2003											
Estación	T° (°C)	pH	Turbidez	SST (mg/l)	Alcal. (ppm)	Color	Dureza T (ppm)	O ₂ . (mg/l)	DBO ₅ (mg/l)	P-PO ₄ (ug/L)	Nitróg. Amon. (ug/L)	NO ₃ -N (ug/l)	NO ₂ -N (ug/l)	Col. Fec.	Col. Tot.
T1	9,7	7	2,28	1,75	39,94	11	48,14	9,16	1,12	<0,02	0,0	0,39	<0,01	17	350
T2	7,1	6,77	2,29	1,67	31,88	16	23,27	8,9	1,22	<0,2	0,1	0,49	<0,01	17	330
T3	7,6	6,48	2	2,5	39,31	19	31,94	8,6	1,6	<0,2	0,1	0,37	<0,01	49	1100
T4	7,4	6,75	3,15	1,67	35,63	23	37,68	8,23	1,87	<0,2	0,1	0,62	<0,01	130	350
T5	6,7	6,71	1,92	0,835	35,63		49,55	8,48	1,98	nd	0,0	0,2	<0,01	130	700
Promedio	7,7	6,74	2,328	1,685	36,478	17,3	38,116	8,674	1,55	0,155	0,1	0,414	0,01	68,6	566

Tabla XVII: Parámetros físicos y químicos medidos en el laboratorio, período de Post- Aplicación.

		POST APLICACIÓN		Sep- Octubre 2003											
Estación	T° (°C)	pH	Turbidez	SST (mg/l)	Alcal. (ppm)	Color	Dureza T (ppm)	O ₂ (mg/l)	DBO ₅ (mg/L)	P-PO ₄ (ug/L)	Nitróg. Amon. (ug/L)	NO ₃ -N (ug/L)	NO ₂ -N (ug/L)	Col. Fec.	Col.Tot.
T1	9,5	6,9	31,02	11,67	0,01	8	86,09	10	0,9	<0,2	0,1	0,46	<0,01	17	220
T2	8,6	6,8	nm	6,67	0,01	7	64,06	13,3	2,1	<0,2	0,1	0,56	<0,01	21	790
T3	9,8	6,9	32,32	16	0,01	5	61,06	12,2	1,1	<0,2	0,1	0,53	<0,01	21	330
T4	10,01	6,8	32,05	6,67	0,01	7	60,06	11,8	1,9	<0,2	0,1	0,74	<0,01	33	790
T5	9,1	7,4	20,01	42,67	0,01	12	84,08	11,8	0,9	<0,2	0,1	0,86	<0,01	230	790
Promedio	9,402	6,9	28,85	16,736	0,01	7,8	71,07	11,82	1,37	0,2	0,1	0,63	0,01	64,4	584

Respecto a los parámetros físicos y químicos (Tabla XV, XVI y XVII) medidos durante ambos períodos de muestreo tenemos que las mediciones realizadas en las Estaciones del río Traiguén fluctúan entre 6,7 -9,45 °C en el primer período de muestreo y 8,6-10 °C en el segundo muestreo. En relación al pH las aguas del río Traiguén presentaron variaciones desde 6.5 a 7.35, siendo la Estación 5 la que presentó el valor más alto con un pH de 7.35.

Los valores durante el primer muestreo de 9.95 y 17.64 mg/l CaCO₃ en las Estaciones 3 y 4 respectivamente y de 10.51 y 20.02 mg/l CaCO₃, en las Estaciones 1 y 3 respectivamente durante el segundo período de muestreo.

Los valores de oxígeno disuelto, obtenidos en aguas del río Traiguén son de 8,23 mg/l como mínimo (Estación 4) durante el primer muestreo y de 13.3 mg/l el máximo (Estación 2) en el segundo muestreo.

El ión fosfato como nutriente en las aguas del río Traiguén presentó un valor mínimo en la Estación 1 durante el primer muestreo con < 0.02 mg/l y máximo de < 0.2 mg/l en el resto de las estaciones, en ambos períodos de muestreo.

Las aguas del río Traiguén presentaron para el nitrógeno amoniacal un valor igual en las 5 Estaciones de < 0.1 mg/l en el primer y segundo período de muestreo, sin embargo en el primer muestreo la Estación 1 se registró el valor mínimo alcanzando <0.01 mg/l.

Las aguas del río Traiguén mostraron un valor < 0.01 mg/l de nitrito en todas las Estaciones.

Las agua del río Traiguén presentaron un máximo de nitrato de 0.6 mg/l en la Estación 4 y un mínimo de 0.21 mg/l en la Estación 5 durante el primer muestreo, mientras que durante el segundo muestreo se registró un valor máximo de 0.9 mg/l en la Estación 5 y un mínimo de 0.46 mg/l en la Estación 1.

La Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5) en las aguas del río Traiguén alcanza valores que oscilaron entre 1.12 y 1.98 mg/l en las Estaciones 1 y 5 respectivamente durante el primer muestreo y entre 0.9 mg/l (Estación 1) y 2.1 mg/l (Estación 2) durante el segundo muestreo, encontrando en general baja demanda bioquímica de oxígeno.

Las aguas del río Traiguén presentaron para las Coliformes totales, expresadas como NMP/100 ml (Número más Probable), valores entre 350 a 1100 en las Estaciones 1 y 3 respectivamente y durante el segundo muestreo varió de 330 a 7.9×10^2 NPM/100 ml de Coliformes totales.

Las Coliformes fecales, expresadas como NMP/100 ml (Número más Probable), los valores obtenidos en las aguas del río Traiguén varió de 17 a 130 NPM/100 ml de Coliformes fecales en las Estaciones 1 y 5 respectivamente durante el primer muestreo, y durante el segundo muestreo varió de 17 a 2.3×10^2 NPM/100 ml de Coliformes fecales en las Estaciones 1 y 5 respectivamente.

3.2.2.- Determinación del Análisis de Pesticidas

En el laboratorio de la UFRO se realizó el análisis de los herbicidas propuestos por Olave (2001) según el Modelo de Fugacidad (Nivel I) de Mackay & Paterson (1981). Los pesticidas propuestos para el muestreo se obtuvieron a partir del porcentaje de distribución en agua, carga total, toxicidad y persistencia de los pesticidas, los cuales correspondieron a Simazina, Hexazinona, Carbendazim, 2,4-D y Picloram. En las muestras de agua obtenidas de las cinco estaciones establecidas en el río Traiguén durante el primer período de muestreo no se detectaron ninguno de los cinco pesticidas analizados, sin embargo durante el segundo muestreo (período de post-aplicación de pesticidas) se encontraron concentraciones de dos de estos pesticidas: 2,4-D y Carbendazim en las Estaciones 2 y 2, 3, 4 respectivamente. La Tabla XVIII muestra los resultados obtenidos durante el período de pre y post aplicación.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Tabla XVIII: Resultado de los análisis de pesticidas durante el primer y segundo período de muestreo, Pre-Aplicación (26 Mayo 2003) y Post-Aplicación (1° de Octubre).

PESTICIDA	Estación 2		Estación 3		Estación 4	
	A	B	A	B	A	B
2,4-D	nd	2.9	nd	nd	nd	nd
Picloram	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Simazina	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hexazinona	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Carbendazim	nd	1.4	nd	1.0	nd	4.5

A: Pre-aplicación, B: Post-aplicación. Concentración expresada en μgL^{-1}

Límite de detección: $0,10 \mu\text{gL}^{-1}$

nd: no detectado

3.3.-Test de Micronúcleos

3.3.1.-Test de Micronúcleos in situ

Para la aplicación del Test de Micronúcleos en eritrocitos de peces (*Oncorhynchus mykiss*) muestreados en las aguas del Río Traiguén, en tres puntos de muestreo representativos de la cuenca, mediante pesca eléctrica. Se les extrajo la sangre por punción de la vena caudal. Los frotis se secaron al aire, se fijan y se tiñen con

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Giemsa 5% en Buffer Sörensen, se lavan con agua destilada y se dejan secar al aire. (Gavilán 2003).

La MNC ‰ fue calculado para la Estación 2, 3 y 4 para ambos períodos de muestro, y a continuación se presentan:

La Tabla XIX muestra la inexistencia de inducción de eritrocitos microucleados en el biomonitoreo en la Subcuenca del Río Traiguén, el MNC‰ calculado alcanza a 0.

Tabla XIX: Resultados obtenidos en terreno del ensayo de MN.

ESTACION	Pre- Aplicación			Post- Aplicación		
	Cel/MN	Nº de peces	MNC‰	Cel/MN	Nº de peces	MNC‰
2	0	9	0	0	6	0
3	0	8	0	0	10	0
4	0	8	0	0	8	0

3.3.2.-Test de Micronúcleos en laboratorio

3.3.2.1- Bioensayos de Toxicidad:

La incidencia de micronúcleos en los bioensayos a concentraciones conocidas con su respectivo control positivo y negativo se observa en la Tabla XX y XXI para 2,4-D y en la Tabla XXII para Carbendazim y los controles positivo y negativo en la Tabla XXIII.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Tabla XX: Frecuencia de eritrocitos con micronúcleo (‰) y número de peces muestreados a cinco concentraciones de 2,4-D a las 24 y 96 hrs.

mg/l	Cel/MN	N° de peces	MNC‰ (24 H)	MNC‰ (96 H)
0,8	3	6	0	0,135
2	0	6	0	0
5	2	6	0,125	0
10	9	6	0,291	0,1
20	0	6	0	0

Tabla XXI: Frecuencia promedio de MNs inducidos por 2,4-D en laboratorio. PI calculado. Se contaron 2000 células. C(-)= Control Negativo; C(+)= Control positivo

CONCENTRACION	PROMEDIO DE MN POR 1000 SE	PI	N° PECES
C(-)	0,041		6
0,8 mg/l	0,0677	1,65121951	6
2 mg/l	0	0	6
5 mg/l	0,0625	1,52439024	6
10 mg/l	0,195	4,75609756	6
20 mg/l	0	0	6
C(+)	0,125	3,04878049	6

Figura 9: Anova frecuencia MNC %o para 2,4-D a las 24 h.

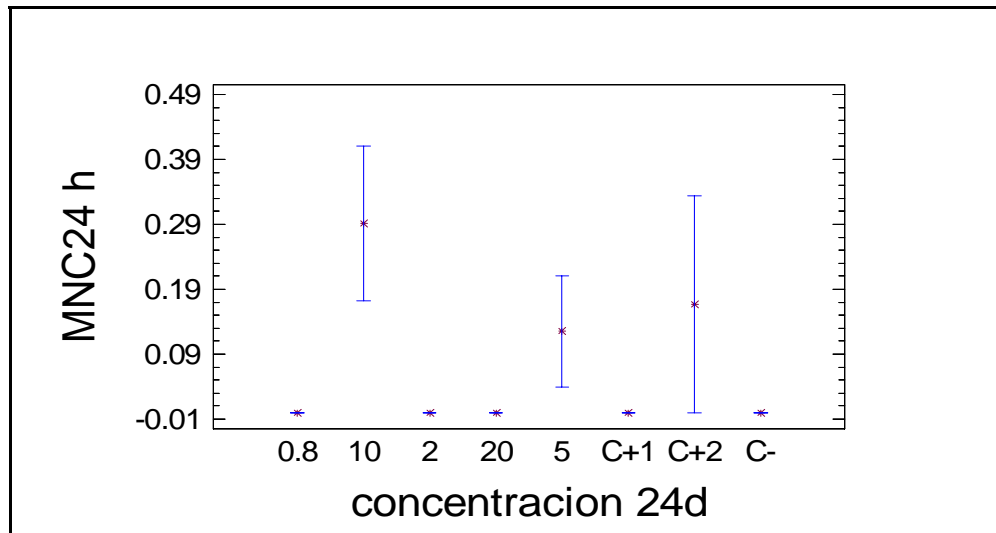
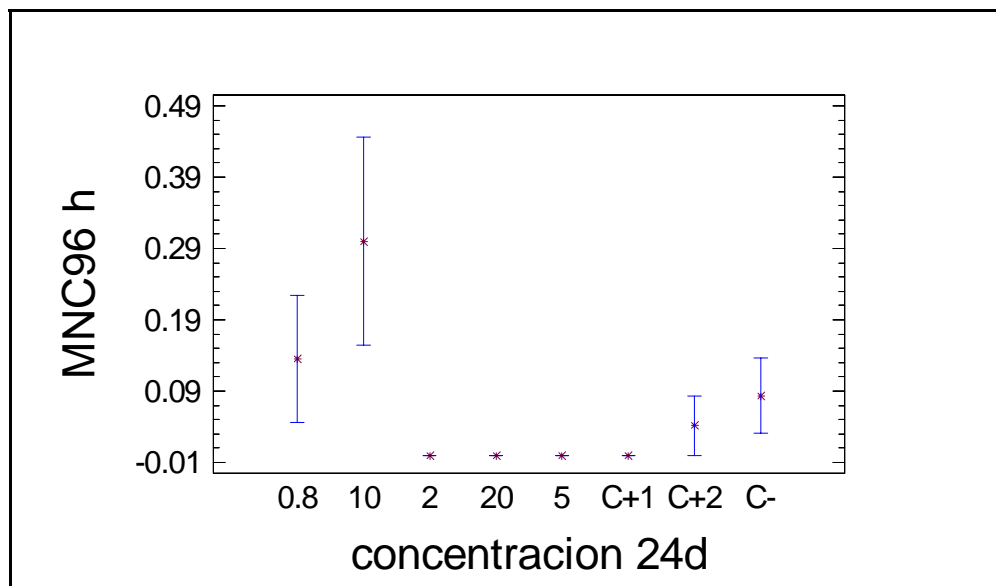


Figura 10: Anova frecuencia MNC %o para 2,4-D a las 96 h.



“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Tabla XXII: Frecuencia de MNs inducidos por Carbendazim en laboratorio. Se contaron 2000 células. C(-)= Control Negativo; C(+)= Control positivo.

CONCENTRACION	PROMEDIO DE MN POR 1000 SE	PI	Nº PECES
C(-)	0,041		6
1 mg/l	0	0	6
4 mg/l	0	0	6
10 mg/l	0,25	6,09756098	6
15 mg/l	0	0	6
C(+)	0,125	3,04878049	6

Figura 11: Anova frecuencia MNC ‰ para Carbendazim a las 96 h.

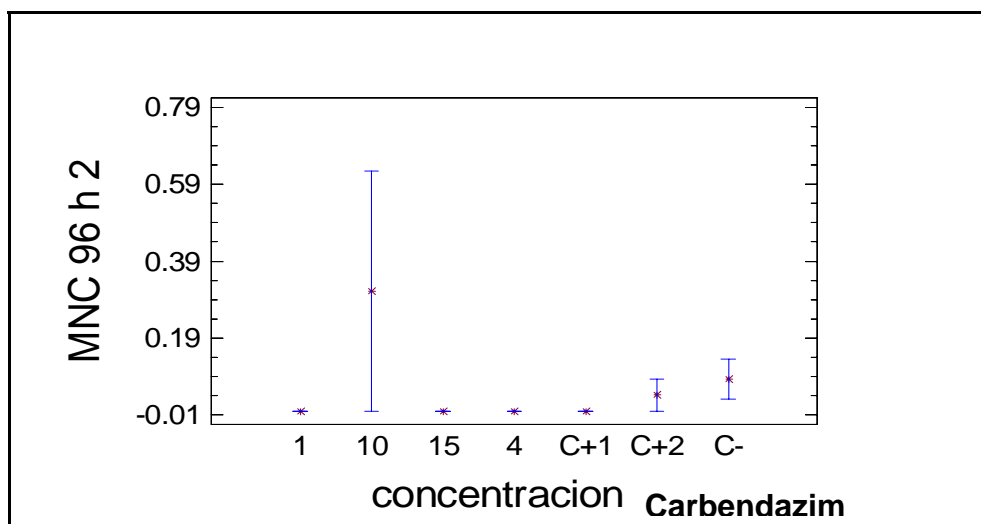
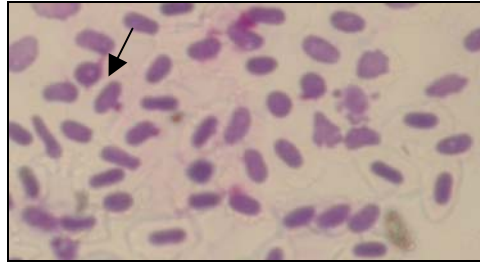


Tabla XXIII: Frecuencia de eritrocitos con Micronúcleo (‰) y número de peces muestreados en los controles positivo y negativo. C1(+): 1 mg/kg Mitomicina C (MMC), C2(+): 2 mg/kg MMC, C(-): Control negativo.

CONTROL	Cel/MN (‰)	Nº de peces	MNC‰
C1(+)	0	6	0
C2(+)	5	6	0,125
C(-)	2	6	0,041

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Figura 12. Eritrocito micronucleado indicado por la flecha, aumento 40x.



4.- DISCUSION

Las metodologías orientadas a la medición de la calidad del agua son numerosas, debido a la existencia de un gran número de parámetros que la determina, poseen un alto grado de normalización debido a la necesidad de contar con mediciones a través de análisis para los indicadores físicos, químicos y biológicos de la calidad del agua. Para ello es necesario llevar a cabo el proceso de toma y conservación de muestras, de modo correcto, considerando para ello principalmente el tipo de sistema acuático. Esto apunta al diseño de un buen programa de muestreo y así cumplir con los objetivos propuestos (Zaror 1998).

La calidad del agua de los ríos se evalúa a menudo de acuerdo a su composición física, química o microbiológica. Esta evaluación también puede efectuarse comparando las cantidades o concentraciones de sustancias presentes con las que se expresan en las distintas normas chilenas e internacionales de calidad de agua (Vargas 1992 en Duran 2000). Además esta evaluación también puede efectuarse comparando las cantidades de sustancias tóxicas presentes con las que se sabe nocivas para la vida de los peces (Vighi *et al.* 1993).

Parra (2003) realiza una comparación entre metodologías físicas, químicas y biológicas donde señala que el método físico y químico se basa sobre el análisis de varios parámetros de una muestra. Tal método individualiza la calidad del agua en el momento de la toma de la muestra, sobre la base de una frecuencia temporal

(mensual, estacional o anual); implicando campañas analíticas de muestras repetidas para condiciones extremas diferentes. El costo de tal método es de por sí relevante, donde las ventajas de esta metodología consisten, sobre todo en la posibilidad de distinguir la tipología de la contaminación y la concentración de cada agente contaminante con óptimas posibilidades y características de reproductibilidad analítica. El problema de las determinaciones fisicoquímicas que se obtienen de las muestras es que sólo indican las condiciones de la calidad del agua para ese momento, mientras que el caso de los bioindicadores muestra una condición más estable para un período mayor (Sánchez & García 1999).

El conocimiento de la concentración de los contaminantes es indispensable para los servicios públicos y su labor de control y fiscalización, los cuales deben expresar un juicio de calidad o compatibilidad en relación a los estándares de leyes o reglamentos sectoriales para cada uso específico (potabilidad, recreación, riego, etc), y por otra parte, indispensable para los entes o agentes de gestión y programación que deben establecer los estándares o las licencias o los permisos de descargas sobre los recursos hídricos (Parra 2003).

En Chile, las principales fuentes de aprovechamiento de agua potable son los ríos, que en la mayoría de los casos son también cursos de agua que reciben aguas servidas urbanas e industriales, como es lo que ocurre con el río Traiguén en la Comuna de Victoria. Este, además de ser la principal fuente de abastecimiento de agua potable para la ciudad de Victoria, sustenta otros usos en la Comuna, como el riego agrícola, recreación (Duran 2000).

Respecto a los parámetros físico-químicos medidos durante el muestreo, la temperatura del agua es un parámetro importante, ya que de ella dependen los valores de otros parámetros por ejemplo la conductividad o la variación del pH. El pH es otro parámetro importante que indica la concentración de protones (iones hidrógeno H⁺) presentes en una disolución acuosa. Se relaciona directamente con la dureza y la alcalinidad por su aptitud moderadora del agua. El rango óptimo del pH para la mayoría de especies está entre pH 6.5 y 8.5; fuera de este rango los efectos tóxicos directos pueden ocurrir y los niveles de estrés serán altos (Brown 1993).

Según Blanco (1995) la dureza de las aguas depende de su contenido en sales minerales, especialmente de calcio y magnesio y se expresa en mg/l de CaCO₃. Los valores obtenidos indican que las aguas del río Traiguén son blandas, aptas para la vida acuática.

El oxígeno es el más importante gas disuelto para más especies. El principal origen son las plantas y su fotosíntesis y difusión a la atmósfera (Brown *op cit.*). La presencia de actividad biológica en la muestra obtenida puede alterar sustancialmente la cantidad de oxígeno disuelto en el agua (CONAMA-TESAM 1996). La concentración de oxígeno disuelto disminuye al elevarse la temperatura (Bernabé 1996). Los valores de oxígeno disuelto, obtenidos en aguas del río Traiguén son aptos para la vida acuática.

La Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅) expresa la cantidad de oxígeno necesaria para biodegradar la materia orgánica presente en el agua, por acción

bacteriana, encontrando en general en las aguas del Río Traiguén una baja demanda bioquímica de oxígeno, parámetro encontrado en forma óptima para la biota acuática. El Ion fosfato (PO_4) según (Brown 1993) no es usualmente tóxico, es esencial para el crecimiento de los organismos y puede ser el nutriente que limita la productividad de un cuerpo de agua dulce. Además es un significativo componente de aguas fecales, el que se encuentra en bajas concentraciones.

Los productos metabólicos en agua más importantes son el Amonio y los Nitritos. El amonio es probablemente el segundo más importante parámetro de calidad de agua después del oxígeno disuelto; los nitritos son un producto del proceso de nitrificación. El amonio es el producto metabólico primario nitrogenado de peces, pero es también formado por descomposición de la materia orgánica. Esto puede estar presente en flujos de agua, especialmente derivadas de la agricultura o los altos niveles pueden simplemente indicar sobredosis de sobrealimentación (Brown 1993).

El Nitrógeno Amoniacal, los Nitritos y el Nitrato, son indicadores típicos de contaminación orgánica. Los nitratos son generalmente considerados ser no tóxicos a peces, pero los nitritos son altamente tóxicos. Si se hace presente a suficientes niveles, los nitritos pueden causar la producción de metahemoglobina con consecuente hipoxia y cianosis (Brown *op cit.*).

El material fecal puede ser significativo porque puede causar desoxigenación del agua si es degradado aeróbicamente. Si es degradado por bacterias anaerobias puede elevar el metano y sulfuro de hidrógeno (Brown *op cit.*).

Los plaguicidas propuestos por Olave (2001) se encuentran ausentes o en muy bajas concentraciones a lo largo de toda la subcuenca, encontrándose presencia de los pesticidas 2,4-D y Carbendazim por medio del monitoreo químico de pesticidas realizado en ambos períodos de muestreo. Las concentraciones registradas corresponden a 2,9 y de 1,0 a 4,5 ug/l respectivamente, sólo durante el segundo período de muestreo Post-Aplicación, siendo ambos pesticidas de conocidas características clastogénicas.

El estudio de la ictiofauna efectuado contemporáneamente al estudio de la evaluación de la exposición a pesticidas genotóxicos en la Subcuenca del Río Traiguén por Gutiérrez ⁴ (2005) Comp. Pers., muestran que la composición faunística consta de tres especies nativas *Percilia gillissi* (Girard, 1855), *Trichomycterus areolatus* (Valenciennes, 1840) y *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842); y dos introducidas, *Salmo trutta* (Linnaeus, 1758) y *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792).

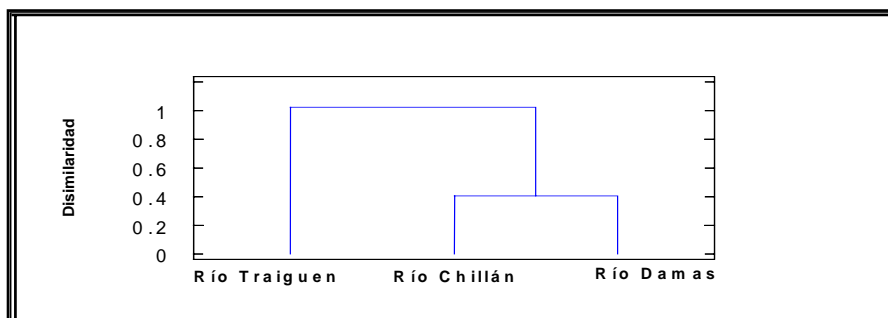
Algunos de los valores obtenidos de la toma de los parámetros en las aguas del río Traiguén fueron comparados con cuencas de similares características determinadas por el uso del territorio, como lo son la Cuenca del Río Damas y la del Río Chillán. Según Figueroa *et al.* (2003) la Cuenca Hidrográfica del Río Damas (40°39' S, 72°23'O) presenta una intensa actividad agrícola y ganadera en un 78,2 % de su superficie. Usos que coinciden con los de la cuenca del Río Chillan, el cual también

(4) Gutiérrez J. 2005. Tesista Universidad Católica de Temuco. Facultad de Ciencias.

presenta predominancia del uso agrícola con 26.035,51 ha (34,4%), luego le siguen el bosque nativo renoval y bosque adulto cubriendo una superficie de 16.733,86 ha (22%), seguido de las plantaciones forestales con una superficie de 9.053,53 ha (11,9%) (CENTRO-EULA 2002).

El análisis de cluster jerárquico aglomerativo de los parámetros físico químicos como Temperatura, pH, Conductividad, Oxígeno Disuelto, Nitrógeno Total y Fósforo Total de las tres cuencas antes mencionadas poseen usos similares donde predomina el agrícola, con su respectiva aplicación de pesticidas, donde la disimilaridad se evidencia según el Método Ward, Euclidean, el que muestra que la Cuenca del Río Chillán y Damas se diferenciándose en un 40% y se parecen en un 60%, mientras que en relación a las tres cuencas se diferencian en un 100%. Donde se desprende que la Cuenca del Río Traiguén a pesar de poseer el mismo uso los parámetros de calidad del agua presentados para esta cuenca se acercan a condiciones de calidad optima para la vida acuática (Tabla XV, XVI y XVII) , obteniendo valores promedio de Temperaturas de 8,5°C, pH igual a 6,8, Oxígeno Disuelto de 10 mg/l, conductividad de 20 uS, etc.)

Figura 13. Dendrograma. Método Ward, Euclidean. Índice de Disimilaridad respecto a parámetros físico químicos de las Cuencas del Río Traiguén, Chillán y Damas.



Para llevar a cabo el cumplimiento de los objetivos de estudio se utilizó el método biológico, el cual se basa sobre la determinación de los efectos que ejercen los contaminantes sobre las comunidades biológicas o elementos de éstos de un cuerpo acuático, el cual se basa en métodos directos de evaluación de la calidad ambiental a través de sensores biológicos, utilizando organismos biológicos (Parra 2003).

El monitoreo biológico ha recibido considerable atención entre ecólogos y toxicólogos, como un potencial poderoso enfoque para evaluar la salud ambiental particularmente en aquellos ambientes impactados por contaminación y en la necesidad de remediación. El concepto básico es que respuestas biológicas seleccionadas (biomarcadores) medidos en organismos y a diversos niveles de complejidad biológica, pueda proveer índices sensitivos de exposición y estrés. A menudo, estos índices están correlacionados con consecuencias nocivas por tales exposiciones (Parra *op cit.*).

Dentro de los problemas más relevantes en una cuenca de uso agrícola se encuentra la contaminación de sus cursos de agua, luego que plaguicidas son transportados desde los sitios de uso hacia las aguas superficiales por escorrentía superficial (Barra, 1993). Diversos autores señalan la condición de pesticidas como genotóxicos, los que son indispensables en agricultura y que sin embargo, exhiben algún efecto genotóxico positivo en sistemas de test convencionales evaluados en bioensayos específicos de acuerdo a su futura destinación y comportamiento en el ambiente (Koppe 2002).

Una forma de aplicar el método directo de evaluación, es a través de ensayos ya sea *in vitro* e *in vivo* con peces, usados como sistemas modelo para toxicología, bioquímica y otros estudios desarrollados (Powers 1989 en Al-Sabti & Metcalfe 1995). Las especies de peces tal como Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y Medaka japonesa (*Oryzias latipes*) han sido usados extensamente para test en organismos para estudios de carcinogénesis (Metcalfé 1989 en Al-Sabti & Metcalfe *op cit.*).

El Ensayo de Micronúcleos con peces puede ser un sistema útil para detección *in situ* de agentes genotóxicos en el ambiente acuático. El ensayo de micronúcleos con peces muestra el potencial como técnica de monitoreo para detectar agentes de genotoxicidad en agua en el laboratorio y en el campo (De Flora *et al.*, 1993; Al-Sabti & Metcalfe, *op cit.*; Koppe & Starling, 2001 y Koppe 2002). Los eritrocitos de peces, que son nucleados, han sido usados como medida de actividad clastogénica (Al-Sabti y Metcalfe *op cit.*).

Varios estudios han mostrado que los eritrocitos de peces tienen una alta incidencia de micronúcleos después de la exposición a distintos contaminantes bajo condiciones de campo y laboratorio (Hooftman & de Raat, 1982; Al-Sabti, 1986 a,b; Das & Nanda, 1986; Cross & Hose, 1986; Hose *et al.* 1987; Metcalfe, 1988; Al-Sabti & Hardig, 1990; Al-Sabti, 1991; Hughes & Hebert, 1991; Ueda *et al.* 1992; Schultz *et al.* 1993; Al-Sabti *et al.* 1994; en Al-Sabti & Metcalfe (*op cit.*) y Hayashi *et al.* (1998).

Varios autores apoyan el uso del Test de Micronúcleos como indicador biológico de la exposición a contaminantes químicos genotóxicos (Hoofman & de Raat, 1982; Manna *et al.* 1985; Hose *et al.* 1987; Brunetti *et al.* 1988; Metcalfe 1988; Long & Buchman 1989 en Carrasco *et al.* 1990 y Koppe & Starling 2001).

El Test de Micronúcleos corresponde a un biomarcador de exposición y se fundamenta en la acción clastogénica que sobre el DNA cromosómico tienen algunos compuestos químicos (Alay *et al.* 1995).

Las afirmaciones anteriores se contraponen a los resultados obtenidos del estudio de campo en la Cuenca del Río Traiguén, pues, el Test de Micronúcleos aplicado a peces capturados en el río, no arrojaron respuestas positivas, es decir, inducción de eritrocitos micronucleados, existiendo el factor exposición. Los eritrocitos no muestran una inducción producto de los pesticidas de conocidas propiedades genotóxicas, evidenciado a través del monitoreo químico de pesticidas efectuado paralelamente al biomonitoreo, donde se registra la presencia de 2,4-D a una concentración de 2,9 ug/l y Carbendazim de 1,0 a 4,5 ug/l ambos durante el segundo período de muestreo (Post-Applicación).

Sin embargo la utilidad para establecer respuestas de referencia con peces expuestos a agentes genotóxicos en laboratorio por comparación a monitoreos de peces in situ se refleja en este ejemplo, donde Al-Sabti *et al.* (1994) en Al-Sabti & Metcalfe (1995) comparó las frecuencias de micronúcleos en peces colectados desde el río Ljubljanica (Eslovenia) con datos de exposición en laboratorio, y concluyó que la

frecuencia de eritrocitos micronucleados inducido *in situ* son equivalentes a las respuestas genotóxicas en peces inducidos por concentraciones de Cromo en agua.

La genotoxicidad es un término general referido a la alteración de la estructura gruesa o contenido de cromosomas (clastogenicidad) por exposición a agentes tóxicos. Los efectos tóxicos de algunos contaminantes pueden ocurrir a concentraciones celulares bajas causando gruesa toxicidad. El ensayo de micronúcleos utiliza algún tipo de célula de una fracción sustancial de la población celular, la cual es tratada con agentes genotóxicos, luego de la experimentación de mitosis los fragmentos inducidos durante el primer ciclo celular son visibles como micronúcleos en el citoplasma durante el segundo o subsiguiente ciclo celular (Tates *et al.* 1980 en Al-Sabti & Metcalfe 1995).

De acuerdo a los resultados obtenidos, los organismos analizados en terreno no presentan respuesta ante la exposición. El Test utilizado no muestra una tendencia a la aparición de eritrocitos con micronúcleos. Esto puede ser debido a las bajas concentraciones de los pesticidas, lo cual es respaldado por el monitoreo químico de pesticidas, donde sólo durante el segundo período de muestreo (post- aplicación), se registró la presencia de dos de los cinco pesticidas analizados: 2,4-D y Carbendazim en las aguas. Las concentraciones registradas en el agua no producen respuesta. Las concentraciones registradas corresponden a 2.9 ug/l para 2,4-D en la Estación 2 y Carbendazim con concentraciones de 1.4, 1.0 y 4.5 ug/l en las Estaciones 2, 3 y 4 respectivamente.

Sin embargo, Bushra *et al.* (2002), Farra *et al.* (2003), Marcos¹ Com. Pers., Venegas² Com. Pers. y Barra³ Com. Pers., para el 2,4-D señalan la condición de agente genotóxico para el pesticida 2,4-D, es decir provoca daño a la molécula de ADN, aumentando significativamente la frecuencia de células micronucleadas, lo que no se registró en los peces muestreados en el campo a los cuales se les aplicó el Test de Micronúcleos.

Además McCarroll *et al.* (2002), Vanhauwaert *et al.* (2001) y Stoppelaar *et al.* (1999) señalan que Carbendazim produce aneuploidía, permitiendo la formación de micronúcleos. Stoppelaar *et al.* (*op cit.*) señalan que Carbendazim a concentraciones de 2.5 ug/ml (0.0025 mg/l) en fibroblastos primarios de piel induce alta frecuencia de aneuploidía.

Además, Mohammed & Ma (1999) señalan la condición de compuestos clastogénicos y mutágenos de los herbicidas Atrazina, Simazina (Princep), Dicamba (Banvel D) y Picloram (Tordon) usando el análisis de micronúcleos. Los ensayos arrojaron que la mutación fue elevada para el tratamiento líquido con Picloram en la concentración de 100 ppm. Mientras que para Simazina era suavemente positiva la elevación de las frecuencias de micronúcleos en el radio de acción de la dosis de 5 a 200 ppm (dosis líquidas). El Dicamba y Picloram indujeron un aumento en las frecuencias de micronúcleos relacionado con dosificación. Dos de los cuales señalados anteriormente formaban parte de los propuestos por Olave (2001), los que

sin embargo durante el monitoreo químico de pesticidas en el Río Traiguén durante los dos períodos del estudio (Pre y Post Aplicación) no fueron registrados en el agua.

En un estudio hecho en el Río Bío-Bío por Alay *et al.* (1995), los resultados obtenidos indican que todas las especies analizadas muestran una tendencia al aumento en la frecuencia de eritrocitos micronucleados a medida que se desciende de las zonas no contaminadas, ubicadas en la parte alta del río a las zonas contaminadas situadas en la parte baja del mismo río. Donde para la zona alta (Lago Galletué, Icalma y Laja) en *Oncorhynchus mykiss* se tiene una frecuencia calculada de 0,25 y para la zona media (Nacimiento) una frecuencia de 0,32. Si comparamos los valores obtenidos en este estudio a lo largo de toda la cuenca desde la parte alta a la baja de la cuenca de Río Bío-Bío se asemejan a los obtenidos por el estudio de laboratorio, a través de bioensayos, donde la frecuencia media de eritrocitos micronucleados para 2,4- D alcanza un máximo de 0,195 a la concentración de 10 mg/l, a la vez con Carbendazim 0,25 a la concentración de 10 mg/l.

En este sentido la ausencia en la frecuencia de eritrocitos micronucleados de los individuos de la especie *Oncorhynchus mykiss* analizados en la Subcuenca del Río Traiguén muestran que no están siendo sometidos a un tratamiento clastogénico crónico en relación a las bajas concentraciones de pesticidas registradas. Esto puede ser debido a varios factores, como el anteriormente mencionado relacionada a las bajas concentraciones de pesticidas registradas en el agua, al tamaño muestral utilizado (“n”) o a la mayor resistencia de las especies introducidas respecto a las

nativas, según la evidencia genotóxica obtenida por Alay *et al.* (1995), donde los últimos no fueron objetivo del estudio en desarrollo.

La frecuencia de Micronúcleos en la evaluación de la contaminación ambiental es limitada a situaciones en las cuales las estaciones permanecen dentro de un rango de condiciones ambientales que no inducen mortalidad (Brunetti *et al.* 1988), por lo cual las concentraciones ensayadas en el estudio de laboratorio se someten a esta afirmación, considerando un amplio rango de concentraciones que van desde los 0,8 mg/l a los 20 mg/l para 2,4-D y de 1 mg/l a 15 mg/l para Carbendazim.

En relación a la toxicidad aguda expresada a través del LC₅₀ para peces según ECOTOX Database USEPA en Briceño (2003) para 2,4-D y Carbendazim corresponde a 1.400 ug/l y 24.0 ug/l respectivamente en ingredientes activos, considerados sólo como una referencia, pues estos no consideran la fórmula comercial. Esto permite explicar que a las dosis testadas en laboratorio no se registrara mortalidad del 50% de la población estudiada a las 96 horas, es decir no se encontraron respuestas de tipo agudas de acuerdo al LC₅₀ durante la exposición a ambos pesticidas, mientras que se registró una respuesta de tipo crónica en directa relación a la concentración aplicada, evidenciada en la inducción de Micronúcleos como variable respuesta.

Si consideramos lo anteriormente señalado en el caso de la exposición registrada en las aguas del Río Traiguén con las correspondientes concentraciones de 2,4-D y Carbendazim, las respuestas negativas están asociadas a las concentraciones, de los pesticidas anteriormente nombrados registradas durante el segundo período de muestreo (Septiembre-Octubre 2003) el cual coincide con el período de

Postaplicación. El muestreo fue realizado con posterioridad al primer evento de lluvia caída. Otra justificación de la falta de respuesta tiene relación a los altos caudales registrados entre los meses de Agosto- Octubre presentaron un promedio de 12,3 m³/seg, los que ayudaron a la dilución y transporte de las sustancias de forma eficiente. Sumado esto a que se registró en el mismo período un promedio de 139 mm de precipitaciones. Lo anteriormente señalado ayuda a la dilución y escurrimiento de las cargas de pesticidas luego del primer evento de lluvia posterior a la aplicación.

Los resultados obtenidos en el estudio de laboratorio, aplicando el Ensayo de Micronúcleos, a través de bioensayos con Trucha Arcoiris expuestos a los dos tratamientos 2,4-D y Carbendazim muestran que ambos producen respuestas de tipo clastogénicas crónicas, representadas por la inducción de eritrocitos micronucleados. Donde 2,4-D induce la formación de eritrocitos con micronúcleo, encontrando respuesta desde la menor a la mayor concentración (0,8 a 10 mg/l), el índice MCN ‰ calculado alcanza a 0.125 y 0.29 a las 24 horas respectivamente, mientras que a las 96 horas a las concentraciones de 0,8 y 10 mg/l se registraron índices de frecuencia de 0.1354 y 0.1, presentando un MCN‰ promedio de 0.065 para las cinco concentraciones. Sin embargo a la mayor concentración utilizada para 2,4-D de 20 mg/l no hubo respuesta, esto puede deberse a factores tales como inhibición de la hematopoyesis o a la acción de las enzimas de reparación del ADN que a una reducción del daño genotóxico como mecanismo de reparación (Tates *et al.* 1983; Das & Nanda 1986 en Majone *et al.* 1987 y Das & Nanda 1986 en De Flora *et al.*

1993). En el caso del ensayo con Carbendazim también se presenta inducción de Micronúcleos con una frecuencia representado por el índice MCN‰, igual a 0.25 a la concentración de 10 mg/l. Encontrando como respuesta a las 96 hrs promedio de las cuatro concentraciones con un MCN‰ calculado de 0.0625. Al comparar el índice MCN‰ con su respectivo control por medio del índice PI encontramos una mayor variación entre los tratamientos respecto al control negativo para 2,4-D para el cual se alcanzan PI entre 1.5 y 4.7 a medida que aumenta la concentración testada. El control negativo registró un MNC‰ de 0.041. Mediante el análisis estadístico se no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones y su respectivo control negativo para 2,4-D a las 96 horas según el Test Tukey a un 95% de confianza. Mientras que para Carbendazim, se registro un PI de 6.09 sólo a la concentración de 10 mg/l, se encontraron diferencias estadísticamente significativas, según el mismo Test Tuckey, siendo un valor en si como MNC‰ alto, en comparación al control negativo.

Los resultados del estudio entonces, muestran que el aumento en la frecuencia de eritrocitos con micronúcleos parece estar relacionado con los mayores niveles y/o concentraciones de pesticidas, esto corroborado en los ensayos de laboratorio, donde los peces expuestos tanto a 2,4-D como Carbendazim presentaron inducción de eritrocitos micronucleados a las concentraciones anteriormente nombradas.

Con el fin de testar y validar las respuestas a nivel experimental se aplicó un respectivo control utilizando Mitomicina C (MMC), donde Majone *et al.* (1987) indica que Mitomicina C es un bien conocido agente genotóxico, con efectos mutagénicos y clastogénicos (Majone *et al.* 1987 y Majone *et al.* 1990), usado in

vitro (Rudd *et al.* 1991; Schuler *et al.* 1997 en Ayllón & García-Vázquez (2001). Han sido reportados en mamíferos (Latt 1974; Perry & Evans 1975; Perry 1980; Kliesch *et al.* 1981 en Majone *et al.* 1987) y en organismos marinos (Dixon & Clarke 1982; Harrison y Jones 1982; Krishnaja & Rege 1982; Das & Nanda 1986 en Majone *et al.* 1987). Además es inductor de aberraciones cromosómicas en distintos tejidos de peces (Krishnaja & Rege 1982 en Majone *et al.* 1987). Muchos estudios muestran la genotoxicidad de MMC para especies de peces, además de su capacidad para inducir la formación de micronúcleos en eritrocitos periféricos de muchas especies de peces ha sido reportada (Van der Hoeven *et al.* 1982; Ueda *et al.* 1992; Hooftman y de Raat 1982; Bahari *et al.* 1994; Campana *et al.* 1999 en Ayllón & García-Vázquez 2001).

El control positivo con Mitomicina C (MMC), inyectado intraperitonealmente en los peces tratados en los bioensayos de este estudio, a dos concentraciones 1 y 2 mg/kg, muestran en los frotis extraídos, la inducción de eritrocitos micronucleados, arrojando un MCN‰ igual a 0.125 para la concentración de 2mg/kg, encontrando que el índice esta dentro de los rangos encontrados para 2,4-D y Carbendazim. En este sentido el control positivo actúa como un buen inductor para corroborar los resultados obtenidos.

Koppe (2002) encontró inducción de Micronúcleos en la especie de pez *Tilapia rendalli*, para Mitomicina C a las dosis de 1.0 y 5.0 mg/kg, pero no a mayores dosis, mientras que en rata no encontró inducción de Micronúcleos con MMC.

Sin embargo Ayllón & García-Vázquez (2001) señalan que Mitomicina C inyectada intraperitonealmente a una concentración de 20 mg/kg a individuos inmaduros de

Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) no indujo micronúcleos a la dosis ensayada, pero sí produce aumento significativo de otras anomalías o lesiones nucleares, siendo consideradas posteriormente indicadores de genotoxicidad, al menos como indicador de actividad clastogénica, en adición a las formas típicas de micronúcleos.

Una razón por la cual a la concentración anteriormente señalada no se haya encontrado Micronúcleos es pues sólo pueden ser detectados en células que sufren mitosis, así las bajas frecuencias de micronúcleos en células tratadas pueden ser debido a la inhibición de la actividad mitótica que a una reducción del daño genotóxico (Tates *et al.* 1983, Das & Nanda 1986 en Majone *et al.* 1987), tal cual ocurrió a la concentración de 20 mg/l de 2,4-D ensayada y 15 mg/l para Carbendazim, a las cuales no se registró respuesta.

Un similar efecto ha sido observado en peces expuestos a efluentes de papelera bajo condiciones de laboratorio, y tentativamente atribuido a efectos inhibitorios en la eritropoyesis (Das & Nanda 1986 en De Flora *et al.* 1993).

A través del Ensayo de Micronúcleos dentro del contexto de campo no es posible encontrar una relación con las cargas de pesticidas en la Subcuenca del Río Traiguén, esto no significa que al no haber encontrado inducción de micronúcleos en los eritrocitos de peces no hay alteraciones de tipo clastogénicas crónicas en los peces.

En tanto la inducción de eritrocitos micronucleados obtenidos de sistemas experimentales con exposición a pesticidas de conocidas características clastogénicas dieron como resultado respuestas positivas en cuanto a la respuesta evidenciada por la inducción de eritrocitos micronucleados, como medida de alteración, rol que cumple como biomarcador de exposición.

Los resultados o respuestas negativas obtenidas del estudio de campo en la Subcuenca del Traiguén ante la exposición a 2,4-D y Carbendazim se relacionan con factores como la dilución, acción que ejerce el agua sobre la carga de pesticidas, ya que durante el segundo período de muestreo se presentan los mayores caudales y precipitaciones. Sumado esto a la forma oblonga de la cuenca que facilita el movimiento del agua del cauce de forma eficiente. Sin dejar de considerar, la capacidad propia del sistema debido a su capacidad resiliencia, es decir de reaccionar ante los impactos, encadenando distintos procesos de estabilización del sistema.

En relación a la caracterización del riesgo ecológico al nivel testado, a través de la integración de la exposición (Monitoreo químico, modelización/simulación) con el efecto o respuesta esperada (biomarcador), es posible señalar que los peces de la Subcuenca del Río Traiguén no presentan un riesgo ecológico, expresado por la falta de respuestas ante la presencia de dos de los pesticidas propuestos de conocidas características genotóxicas como son 2,4-D y Carbendazim, registrados según el monitoreo químico de pesticidas. En este sentido, el riesgo de pesticidas en ecosistemas acuáticos es calculado por la razón PEC/PNEC (Comisión of the European Communities 1996; USEPA 2004 en Palma *et al.*, 2004), el cual es usado

como un indicador del riesgo y llamado cociente del riesgo (RQ). La valoración del riesgo producto del cociente entre PEC/PNEC, es decir exposición versus efectos, en este caso inducción de Micronúcleos es inferior a 1, por lo tanto no hay riesgo en el nivel estudiado, en cuanto a la variable respuesta testada.

Sin embargo, paralelo a un programa de monitoreo de calidad de agua físico químico de un cuerpo acuático, se deben realizar estudios o programas de vigilancia sobre los efectos ambientales específicos de las comunidades biológicas, a través del monitoreo biológico. Considerando básicamente respuestas biológicas seleccionadas (biomarcadores) medidos en organismos y a diversos niveles de complejidad biológica.

En el presente trabajo se aplicó un biomarcador expresado en la inducción de micronúcleos en eritrocitos periféricos de peces en terreno, dando como resultado la inexistencia de respuesta, no obstante la validación del Ensayo a través de ensayos de laboratorio donde si hubo respuestas en relación a la inducción de Micronúcleos, relacionada con la naturaleza y/o concentración de la exposición.

Para próximos estudios de biomarcadores se recomienda utilizar una batería de biomarcadores tanto de exposición como de efectos, integrando preferiblemente respuestas rápidas tales como análisis de Metabolitos biliares, enzimas antioxidantes, Acetilcolinesterasa (ACHE) y Proteínas de estrés, etc., sin olvidar la existencia de respuestas de tipo intermedia a nivel individual o respuestas de largo

plazo a nivel poblacional o comunitario. En relación a los últimos niveles recomendados, se pueden realizar evaluaciones de efectos a través de microcosmos, los que consisten en una simplificación del ecosistema, planteándose su empleo como intermediario entre pruebas de toxicidad realizadas en laboratorio y los trabajos en Terreno (Moraes, 2002 en Briceño 2003), los que han sido ampliamente utilizados par afines de evaluar el riesgo, ya que permiten incorporar los procesos de partición y disipación de pesticidas, medir la respuesta aguda o crónica de varias taxas, observar la respuesta al nivel de poblaciones, comunidad y ecosistema; y finalmente observar la recuperación ecológica (EPA 1994; Dunkel & Richards 1998; Pascoe *et al.*, 2000; Schulz & Liess 2001 en Briceño *op cit.*).

En este sentido se recomienda la aplicación de una gama de biomarcadores a distintos niveles tróficos y de diversa complejidad para obtener respuestas integradas que permitan tomar decisiones para una adecuada gestión de los recursos hídricos.

5.- CONCLUSIONES

En base a los antecedentes y resultados aportados en el siguiente estudio, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- Existiendo presencia de pesticidas 2,4-D y Carbendazim, a bajas concentraciones, en las aguas del Río Traiguén y habiendo utilizado el Test de Micronúcleos como biomarcador de exposición no se registraron respuestas a las concentraciones determinadas por el monitoreo químico.
- Ensayos de laboratorio utilizando *Oncorhynchus mykiss* permiten señalar que existe inducción de eritrocitos micronucleados asociado a la naturaleza y/o concentración de la exposición de pesticidas de uso agroforestal, de conocidas propiedades genotóxicas.
- Es posible señalar que los peces expuestos a las concentraciones registradas en terreno no hay riesgo ecológico trabajando a este nivel, según la metodología empleada.
- En próximos estudios se debe utilizar una batería de biomarcadores y en lo posible trabajar a distintos niveles de organización biológica para entender las relaciones causa y/o efecto, que permitan tomar decisiones para una adecuada gestión de los recursos hídricos.

- Se recomienda trabajar a nivel de microcosmos, los que consisten en una simplificación del ecosistema, que permitan observar la respuesta al nivel de poblaciones, comunidad y ecosistema; y finalmente observar la recuperación ecológica.

6.- BIBLIOGRAFIA

ADAMS M (2002) Biological indicators of aquatic ecosystem stress. Environmental Sciences Division Oak Ridge National Laboratory. American Fisheries Society Bethesda, Maryland. 625 pp.

ALAY F, H CAMPOS, J GAVILAN, F GONZALEZ, P BISOL & J CABELLO (1995) Criterios para Evaluar Apropiadamente las Alteraciones del Ambiente y Establecer los parámetros: desde el punto de vista de la genética. Cienc. Tec. Mar (n° especial): 23-27 pp.

AL-SABTI K & C METCALFE (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutat. Res. Jun;343(2-3):121-35.

ANNALES DE BIOLOGIE CLINIQUE (2000). Estudio de los efectos genotóxicos del hígado a partir de tres especies de los tiburones recogidos en aguas mediterráneas por medio de la prueba in vitro de micronúcleos usando linfocitos humanos. Edición 5. Septiembre – Octubre. Vol. 58

ARCAN-HOY & C METCALFE (2000) Hepatic micronuclei in brown bullheads (*ameiurus nebulosus*) as a biomarker for exposure to genotoxic chemicals. J. Great lakes res. 26(4):408-415.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

AYLLON F & GARCÍA-VÁZQUEZ (2001) Micronuclei And Other Nuclear Lesions As Genotoxicity Indicators In Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss*. *Ecotoxicology And Environmental Safety* 49:221-225.

BARRA R (1999) Evaluación y monitoreo de la contaminación acuática. Centro de ciencias ambientales EULA-Chile. Universidad de Concepción. 16 pp.

BERNABE G (1996) Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura. Editorial Acribia. 519 pp.

BLANCO C (1995) La Trucha, Cría Industrial. Mundi-prensa. 2ª ed. 503 pp.

BUSHRA A, FARRA A, ALI N & A WASEEM (2002) Induction of micronuclei and Erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic and butaclor. *Mutation Research/General Toxicology & Environmental Mutagenesis*. Jul, Vol 518.Issue 2.10 pp.

BRICEÑO G (2003) Estimación del riesgo ecológico asociado a pesticidas en la subcuenca del río Traiguén, IX Región. Tesis presentada a la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de Temuco para optar al grado de Licenciado en Recursos Naturales. 109 pp.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

BROWN L (1993) Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine. Pergamon. 447 pp.

BRUNETTI R, F AJONE, I GOLA & C BELTRAME (1988) The micronucleus test: examples of application to marine ecology. Mar. Ecol. Prog. Ser. 44:65-68.

CARBALLEIRA A. (2002) Consideraciones para el diseño de un programa de monitorización de efectos biológicos del Vertido de Prestige. Universidad Santiago de Compostela. Ciencia Marinas (En prensa). 21 pp.

CARRASCO K, L TIBURY & M MYERS (1990) Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical effects. Canadian journal of fisheries and aquatic sciences. Vol. 47, n° 11: 2123-2136.

CENTRO-EULA (1999) Informe Proyecto Fondo Ejecución SAG VIII. Desarrollo Metodológico. Versión preliminar.

CENTRO-EULA (2002) Desarrollo de una Metodología para la Evaluación y Mitigación de la Contaminación de Aguas y Suelos: Aplicación a la Cuenca del Río Chillán. Parte II: Resultados. 114 pp.

CONAMA - TESAM (1996) Metodologías para la Caracterización de la Calidad Ambiental. Conama-birf. 1° Edición. 242 pp.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

DE FLORA S, L VIGANO, F D’AGOSTINI, A CAMORIANO, M BAGNASCO, C BENNICELLI, F MELODIA & A ARILLO (1993) Multiple Genotoxicity Biomarkers in Fish Exposed in situ to polluted river water. *Mutat. Res.* 319:167-177.

DURAN R (2000) Diagnóstico de Calidad del Agua del Río Traiguén, Comuna de Victoria, IX Región. Tesis presentada a la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de Temuco para optar al grado de Licenciado en Recursos Naturales. 170 pp.

DGA (2003) DIRECCIÓN GENERAL DE AGUAS, IX REGIÓN.

ENCINA F & DÍAZ O (2001) Contaminación, estimación del riesgo ecológico y protección asociado de algas bentónicas marinas. *Sustentabilidad Ambiental*. K. Alveal & Antezana Editores. Universidad de Concepción. 336-357pp

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1998) Lake and Reservoir Bioassessment and Biocriteria. Technical guidance document. Office of water Washington, dc. 376 pp.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

FARAH M, B ATEEQ, M ALI & W AHMAD (2003) Evaluation of genotoxicity of pcp and 2,4-d by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 54 (1):25-9.

FIGUEROA R, VALDOVINOS C, E ARAYA & O PARRA (2003) Macroinvertebrados bentónicos como indicadores de calidad de agua de ríos del sur de Chile. Revista Chilena de Historia Natural. 76:275-285.

FOSSI M & LEONZIO C (1994) Nondestructive Biomarkers in Vertebrates. Department of Environmental. Universidad Siena, Siena Italia. 29 pp.

GAVILAN J (2003) Evaluación y Monitoreo de la Contaminación Acuática a través del uso de Biomarcadores. Biomarcadores. Universidad de Concepción. Centro EULA-CHILE. Escuela de Verano en Medo Ambiente. 13 pp.

GAVILAN J & I HERMOSILLA (1984) Técnica experimental para realizar bioensayos toxicológicos en animales acuáticos. Bol. Soc. Biol. Concepción, Chile. Tomo 55. 155-160 pp.

HAYASHI M, T UEDA, K UYENO, K WADA, N KINAE, K SAOTOME, A TAKAI, YF SASAKI, N ASANO, T SOFUNI, Y OJIMA (1998) Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organism. Mutat. Res. 20;399 (2): 125-133.

KOPPE C & F STARLING (2001) micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutat. Res.* 491:39-44.

KOPPE C (2002) a comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomicina c and various pesticides. *Mutat. Res.* 518: 145-150.

LARRAÍN A (1995) Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad. *Cienc. Tec. Mar. Cona* (Nº especial). 39-47 pp.

LEONZIO C (2002) Evaluación y monitoreo de la contaminación acuática: bases científicas y casos de estudio. *Contaminación química y bioindicadores*. Centro de ciencias ambientales eula-chile. Universidad de concepción. 10 pp.

MAJONE F, R BRUNETTI, I GOLA & A LEVIS (1987) Persistence of micronuclei in the marine mussel, *mytilus galloprovincialis*, after treatment whit Mitomycin C. *Mutat. Res.* 191:157-161.

MAJONE F, R BRUNETTI, O FUMAGALLI, M GABRIELE & A LEVIS (1990) Induction of micronucleus by Mitomicina C and Colchicina in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mutat. Res.* 244: 147-151.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

MCCARROLL N, A PROTZEL, Y IOANNOU, H FRANK STACK, M JACKSON, M WATERS & K DEARFIELD (2002) A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. *Mutat. Res. Sep*;512(1):1-35.

MOHAMMED K & T MA (1999) *Tradescantia*-micronucleus and -stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides. *Mutat. Res. May* 19;426(2):193-9.

MÖLLER P (1998) *Humedales y Educación Ambiental. Guía Práctica para Padres, Profesores y Monitores.* 90 pp.

MINISTERIO DE OBRAS PUBLICAS Y TRANSPORTES (1992) *Guías para la Elaboración de Estudios del Medio Físico. Contenido y Metodología.* 809 pp.

MUÑOZ A (2000) *Conservación de Recursos Naturales. Guía de Cátedra.* Universidad Católica de Temuco. 197 pp.

NEPOMUCENO J, I FERRARI, M ESPAÑO & A CENTENO (1997) Detection of Micronuclei in Peripheral Erythrocytes of *Cyprinus carpio* Exposed to Metallic Mercury. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30:293-297 pp.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

OLAVE Y (2001) Propuesta Monitoreo de Pesticidas Subcuenca del Río Traiguén. Tesis para optar al Grado de Licenciado en Recursos Naturales. Universidad Católica de Temuco. 113 pp.

PASTOR S (2002) Biomonitorización Citogenética de Cuatro Poblaciones Agrícolas Europeas, Expuestas a Plaguicidas, Mediante el Ensayo de Micronúcleos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 107 pp.

PALM A & T KRAUSE (1995) Micronucleated Erythrocytes in Fish from several Estonian waterbodies. Proc. Estonian Acad. Sci. Biol. Vol. 44. N°3/4. 69 – 77 pp.

PALMA G, SANCHEZ A, OLAVE Y, ENCINA F, PALMA R & R BARRA (2004) Pesticide levels in surface waters in an agricultural-forestry in Southern Chile. Chemosphere 57. 763-770 pp.

PARRA O (2003) Evaluación y monitoreo de la contaminación acuática a través del uso de biomarcadores. Conceptualización. Universidad de Concepción. Centro EULA-Chile. Escuela de verano en medio ambiente. 51 PP.

PEAKALL D & L SHUGART (1997) Strategy for Biomarker Research and Application in the Assessment of Environmental Health. NATO ASI Series: Cell Biology, Vol. 68. 114 pp.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

PLHARES D & C KOPE (2002) Comparasion between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocyte in tilapia fish, following mitomicina C treatment. *Genetics and Molecular Biology*. 25:3. 281-284.

SANCHEZ A (2002) Monitoreo de Pesticidas en la Subcuenca del río Traiguén. Trabajo de título presentado a la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de Temuco para optar al Título de Ingeniero Ejecución en Química. 88 pp.

SANCHEZ A & R GARCIA (1999) Biomonitorio de Ríos en la Gestión de Cuencas.; Una aproximación introductoria. IX Congreso Nacional de Irrigación. Simposio 4 Manejo Integral de Cuencas Hidrográficas. México. 63-71 pp.

STOPPELEAAR J, VAN DER KUIL T, VERHAREN H, HOKSE H, OPPERHUIZEN A, MOHN GR, VAN BENTHEM J & HOEBBE B (1999) In vivo cytokinesis blocked micronuclei assay with Carbendazim in rat fibroblasts and comparision with in vitro assays. *Mutagenesis* Mar;15(2):155-164.

VANHAUWAERT A, VANPARYS P & KIRSCH-VLDERS M (2001) The in vivo gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage. *Mutagenesis*. Jan:16 (1):39-50.

VENEGAS W, S POBLETE, G WEIGERT, C MARQUEZ, V MARTINEZ & R MARCOS (2002) Seminario Internacional Contaminación Ambiental en Chile.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Efectos Tóxicos y Genotóxicos de Agentes Químicos y Físicos. Universidad de Concepción.

VIGHI M, O PARRA, C VALDOVINOS & R URRUTIA (1993) Evaluación de la Calidad del Agua y Ecología del Sistema Limnético y Fluvial del Río Bio-Bio. Mapas de la Calidad del agua del río Bío-Bío y afluentes principales. Serie de Monografías Científicas CENTRO-EULA. Volumen 12. 409 pp.

WEISSER K (2003) Evaluación de la calidad del agua utilizando bioindicadores en la subcuenca del río Traiguén, IX Región. Tesis presentada a la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de Temuco para optar al grado de Licenciado en Recursos Naturales. 109 PP.

ZAROR (1998) Introducción a la Ingeniería Ambiental. Universidad de Concepción. Proyecto de desarrollo de la Docencia.

ANEXOS

Anexo 1. Ficha de los pesticidas propuestos para monitoreo.

1.- 2,4-D

Nombre común: 2,4-D (BSI, E-ISO, (m) F-ISO, WSSA), 2,4-PA (JMAF).

Nombre IUPAC: (2,4-diclorofenoxy)ácido acético

Nombre C.A.: (2,4-diclorofenoxy)ácido acético

Grupo químico: Fenóxidos

Concentración y formulación: 69.5% SL (líquido soluble), 57.89% EC líquido soluble

Modo de acción: Sistémico

Nombre comercial: DMA-6 (DowElanco Brasil) Arco 2,4-D 480 (ICD-Group)

CAS RN: 94-75-7

Propiedades físico-químicas.

Peso molecular: 221.0 **Fórmula molecular:** C₈H₆CL₂O₃

Forma: polvo incoloro. **M.p.** 140.5°C **V.p.** 1.1*10⁻² Pa (20°C). **SG/densidad** 1.565 (30°C). **Kow log P** = 2.58-2.83 (pH 1). **Solubilidad en agua** 311 mg/(pH 1,25°C).

Estabilidad: 2,4-D es muy ácido y las formas de las sales soluble en agua con álcalis metales y aminas. **Pka** 2.64.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Aplicaciones:

Herbicida hormonal en aplicación postemergente, controla en forma eficiente, selectiva de las malezas de hoja ancha en los cultivos de cereales, maíz, frutales y áreas no agrícolas.

Toxicidad en mamíferos

LD₅₀ para ratas 639-764, ratones 138 mg/Kg. **Ojos y piel LD₅₀** para ratas > 1600, conejos > 2400 mg/Kg. **Inhalación: LC50** (4h) para ratas > 1.79 mg/l. **NOEL** (2años) para ratas y ratones 1 mg/Kg dieta. Clase toxicidad WHO II: EPA II.

Ecotoxicología

LC50 (48h) 90, trucha arco iris 11 mg/l. *Daphnia* EC₅₀ (21d) 235 mg/l.

2.- Simazina

Nombre común: Simazina (BSI, E-ISO, (f) F-ISO, ANSI, WSSA), CAT (JMAF).

Nombre IUPAC: 6-Cloro-N², N⁴ - diethyl - 1, 3, 5 -triazina- 2, 4 -diamina.

Nombre C.A.: 6-Cloro-N, N'-diethyl- 1, 3, 5-triazina-2, 4- diamina

Grupo químico: Triazinas

Concentración y formulación: 50% F (Flowable)

Modo de acción: sistémico, selectivo, suelo activo

Nombre comercial: Simazinex ® 50SC (Biesterfeld U.S. Inc), Simazaina 500F (Agrícola Nacional S.A.C. e 1.), Simazina 500FW (Atanor Argentina).

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

CAS RN: 122-34-9.

Propiedades físico-químicas.

Peso molecular: 201.7 **Fórmula molecular:** C₇H₁₂CLN₅

Forma: polvo incoloro. **M.p.** 225-227 °C (decomp.). **V.p.** 2.94 uPa (25°C) (OECD 104). **SG/densidad** 1.302 (20°C). **Kow log P** = 2.1 (25°C). **Solubilidad en agua** 6.2 mg/l (20°C), etanol 570, acetona 1500, tolueno 130, n-octanol 390, n-hexano 3.1 (todos en mg/l, 25°C).

Estabilidad: estableen neutro, ácido débil y alcalino medio débil. Descomposición por u.v. irradiación (c.90% en 96 h). **Pkb** 12.3.

Aplicaciones.

Herbicida selectivo para el control principalmente pre-emergente de malezas anuales de hoja ancha, y angosta, gramíneas en vides, frutales, forestales (eucaliptus, pino insignne). Debe aplicarse preferentemente al iniciarse la época de las lluvias, sobre suelo bien mullido y libre de malezas.

Toxicidad en mamíferos

LD₅₀ para ratas, ratones y conejos > 5000 mg/Kg. **Ojos y piel** **LD₅₀** para ratas > 3100, conejos > 10200 mg/Kg. **Inhalación: LC50** (4h) para ratas > 2 mg/l. **NOEL** (2años) para ratas 10 mg/Kg dieta (0.7 mg/Kg día). Clase toxicidad WHO II. EPA IV.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Ecotoxicología

LC₅₀: pájaros, palomas y gallinas > 5000 mg/Kg. **LC₅₀** para patos 51200 mg/Kg. Peces (96h) 90, trucha arcoiris > 1000 mg/l. *Daphnia* EC₅₀ (48h) > 100 mg/l; (21d) 0.29 mg/l. Otras especies: **LC₅₀** (14d) gusanos de tierra > 1000 mg/Kg.

3.- Carbendazim

Nombre común: Carbendazim (BSI; E-ISO) carbendazima ((f) F-ISO), Carbendazol (JMAF).

Nombre IUPAC: Metil benzimidazol-2-ylcarbamate.

Nombre C.A.: Metil 1 H-benzimidazol-2-ylcarbamate.

Grupo químico: Benzimidazoles

Concentración y formulación: 50% WP (polvo mojable), 50% D.F. (gránulos dispersables).

Modo de acción: sistémico, preventivo y erradicante.

Nombre comercial: Desoral T.S. (Hoeschst A.G.), DU PONT Carbendazim D.F. (E.I. du Pont de Nemours & Co., Inc.)

CAS RN: 10605-21-7

Propiedades físico-químicas.

Peso molecular: 191.2 **Fórmula molecular:** C₉H₉N₃O₂

Forma: crisates incoloros. **M.p.** 302-307 °C (descomp.). **V.p.** 0.009 mPa (20°C) 0.15 mPa(25°C), 1.3 mPa (50°C). **SG/densidad** 1.45 (20°C). **Kow** = 24 (pH 5), 32 (pH 7), 31 (pH 9). **Solubilidad en agua** 29 mg/l (24°C)(pH 4), 8mg/l (pH 7), 7 mg/l

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

(pH 8). Dietilformamida 5, acetona 0.3, etanol 0.3, cloroformo 0.1, acetato de etilo 0.135, diclorometano 0.068, benceno 0.036, ciclohexano < 0.01, dietil éter <0.01, hexano 0.0005 (todos en g/l, 24°C). **Estabilidad:** estable < 2 y mayor 50°C. Descomposición en solución alcalina (20°C).

Aplicaciones.

Fungicida desinfectante de semilla de amplio espectro de acción. Previene y controla a un gran número de enfermedades que atacan las semillas, plantaciones forestales y ornamentales.

Toxicidad en mamíferos

LD₅₀ para ratas >1500 mg/Kg, perros >2500 mg/Kg. **Inhalación: LC₅₀** (4h) para ratas, conejos (10 g/l agua). **NOEL** (2años) para perros 300 mg/Kg dieta correspondiente a 6-7 mg/Kg. **Clase toxicidad** WHO III: EPA IV.

Ecotoxicología

LD₅₀: pájaros, palomas y gallinas 5826-15595 mg/Kg. **LC₅₀** para peces (96h) 90, trucha arcoiris 0.83 mg/l. *Daphnia* EC₅₀ (48h) > 0.13-0.22 mg/l.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

4.- Picloram

Nombre común: picloram (BSI, E-ISO, ANSI, WSSA, JMAF), piclorama ((m) F-ISO).

Nombre IUPAC: 4-amino-3, 5, 6-tricloropyridina carboxílico; 4-amino-3,5,6- ácido tricloropocolínico

Nombre C.A.: 4-amino-3, 5, 6-tricloro-2-acido piridina carboxilico

Grupo químico: derivado del ácido picolínico

Concentración y formulación: 24.9%SL (líquido soluble)

Modo de acción: sistémico, absorbido por hojas y raíces.

Nombre comercial: Tordon 24 K (Dow Elanco Argentina S.A.)

CAS RN: 1918-02-1

Propiedades físico-químicas.

Peso molecular: 241.5 **Fórmula molecular:** $C_6H_3Cl_3N_2O_2$

Forma: polvo incoloro. **M.p.** 215 °C (descomp.) **V.p.** 0.082 isopropanol 5.5, acetonitrilo 1.6, dietil eter 1.2, diclorometano 0.6, benceno 0.2 (todos en mg/l, 25°C).

Estabilidad: ácidos y álcalis. **Pka** 2.38 (22°C).

Aplicaciones.

Herbicida selectivo para cereales y crucíferas, excelente controlador de malezas de hoja ancha, incluyendo a los resistentes herbicidas fenoxiácéticos.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Toxicidad en mamíferos.

LD₅₀ para ratas 8200 mg/Kg, ratones 2000-4000, conejos 2000 mg/Kg. **Ojos y piel**

LD₅₀ conejos > 4000 mg/Kg. **NOEL** (2años) para ratas 150 mg/Kg dieta. **Clase**

toxicidad WHO: EPA IV.

Ecotoxicología

LD₅₀: pájaros, palomas y gallinas > 6000 mg/Kg. **LC₅₀** para patos >5000 mg/kg.

Peces **LC₅₀** (96 h) 90, trucha arcoiris 19.3 mg/l. **Daphnia EC₅₀** (48h) 50.7 mg/l.

Fuente: Sánchez (2002)

Anexo 2.

Pluviometría media (1999-2000)

Estación: Río Traiguén en Victoria

Meses	Media (mm)	Desviación estándar
E	0.435	0.256
F	0.756	0.822
M	1.1	0.705
A	3.213	1.556
M	4.953	3.139
J	7.126	3.087
J	4.487	2.133
A	3.551	1.483
S	2.861	1.520
O	1.925	1.329
N	1.295	0.757
D	1.297	1.071

Fuente: DGA en Sánchez 2002.

Anexo 3.

Caudales medios (1999-2000)

Estación: Río Traiguén en Victoria

Meses	Media (m ³ /S)	Desviación estándar
E	0.720	0.560
F	0.368	0.237
M	0.334	0.329
A	0.772	0.559
M	4.669	5.205
J	11.363	5.568
J	10.830	5.514
A	8.074	2.815
S	7.967	3.302
O	4.467	2.592
N	2.235	1.348
D	1.532	1.188

Fuente: DGA en Sanchez 2002.

Anexo 4. Parámetros de la subcuenca

A) Parámetros Físicos

Los coeficientes de bifurcación (Rb) para cada cauce expuestos en la Tabla 4.1 muestran que la subcuenca mantiene una secuencia geométrica de los cauces predicha por Horton en la ley de bifurcación. Así el Rb señala que existen 3 veces más cauces de primer orden que el segundo, los cauces de orden 2 son el doble más que los de orden 3 y así sucesivamente. De acuerdo a la determinación del Coeficiente de Gravelius (Tabla 4.1) para la clasificación de las cuencas según su morfología, se estableció que la subcuenca presenta una forma oblonga, la que se encuentra representada en la figura 7.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Tabla 4.1. Parámetros físicos de la subcuenca.

Nº de orden del cauce	Nº de cauces	Rb	Coefficiente de Gravelius	Densidad de Drenaje
1	23		2,39	0,6515
2	7	3.28		
3	3	2.33		

Fuente: Olave (2001).

B) Parámetros relativos a la red hidrográfica

Entre los parámetros relativos a la red hidrográfica se encuentran la pendiente del cauce principal y el tiempo de concentración (Tabla 4.2), el cual se define como el tiempo en que tarda en llegar a la sección de salida la gota de lluvia caída en el extremo hidráulicamente mas alejado de la cuenca.

Tabla 4.2. Parámetros relativos a la red hidrográfica.

Pendiente del Cauce Ppal(%)	Tiempo de concentración (min)
0,77	6,7

Fuente: Olave (2001).

Anexo 5 . Series de suelo.

Serie Victoria (Vc)

Caracterización general:

Suelos que se ubican en el llano central a una altura de 300 a 350 m.s.n.m. Han evolucionado de depósitos de cenizas volcánicas que descansan comúnmente sobre conglomerados multicolores y esto en depósitos laháridos. Son suelos delgados a moderadamente profundos, bien drenados. De textura superficial franco limosa y color pardo muy oscuro; de textura franco limosa y color pardo oscuro en profundidad.

Serie Barros Arana (BAR)

Caracterización general:

Suelos que se ubican en el llano central a una altura de 30 a 50 m.s.n.m. se presentan en forma de terrazas recientes. Suelos planos, delgados de textura superficial franco limosa y color pardo muy oscuro; de textura franco arenosa fina y color pardo oscuro y pardo amarillento oscuro en profundidad.

Fuente: Olave 2001.

Anexo 6. Caracterización del suelo según la formula 323.

Grado de intemperización y desarrollo del perfil (3).

Esta categoría incluye los suelos con un horizonte A definido, pero si9n un horizonte B con textura o estructura. Es aceptable en esta categoría alguna, lo que se debe a la

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

lixiviación de sesquióxidos desde el horizonte A y teñido producidos por el material original inmediatamente bajo del horizonte A (Olave 2001).

Drenaje (2).

Buen drenaje, se presenta en suelos cuyas texturas van desde arena fina a franco arcillosa, y si la porosidad es adecuada en suelos arcillosos (Olave 2001).

Textura capa superficial (3).

Textura media, franco arenosa muy fina, franca arcillosa y limo.

Fuente: Olave (2001).

Anexo 7. Caracterización capacidad de uso del suelo

Clase III.

Los suelos de la clase III presentan moderadas limitaciones en su uso y restringen la elección de los cultivos, aunque pueden ser buenas para ciertos cultivos. Tiene severas limitaciones que reduce la elección de plantas o requieren prácticas especiales de conservación o ambas.

Las limitaciones más corrientes para esta clase, pueden resultar del efecto de una o más de las siguientes condiciones:

♣ Relieve moderadamente inclinado a suavemente ondulado.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

♣ Alta susceptibilidad a la erosión por agua o vientos o severos efectos adversos de erosiones pasadas.

♣ Suelo delgado sobre un lecho rocoso que limita la zona de arraigamiento y almacenamiento de agua.

♣ Permeabilidad muy lenta en el subsuelo.

♣ Baja capacidad retención de agua.

Fuente: Olave (2001).

Anexo 8. Protocolo Micronúcleos (MN) Dr. Juan Gavilán E. (2002)⁵

1. Toma de muestra (peces)
Pez punción vena caudal
 posición ventral 3° escama
 jeringa heparinizada

2. Frotis (2 frotis por organismo)
Colocar una gota sobre un porta objeto limpio
Nota: (porta objeto limpio = lavado en metanol y secado con un paño limpio).

3. Hacer el extendido con otro porta objeto limpio. Cuidar de no repasar el frotis para no romper las células. La gota se arrastra desde atrás.

4. Dejar secar al aire.

5. Fijar en Carnoy por 4 – 5 minutos.
Solución Carnoy preparación fresca (nuevo en cada uso)
 Metanol : Acido Acético 3:1

6. Lavar en agua destilada. 2 veces.

7. Dejar secar al aire.

8. Tinción Giemsa al 5 % en Buffer Sörensen 4 a 5 minutos
(controlar coloración al microscopio)

⁵ Gavilán J. 2002. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Biológicas. Depto. Biología Celular.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Buffer Sörensen

Sol A = $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ = 35,814 gr/ 1 litro agua destilada ml

} Sol A= 433

Sol B = $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ = 15,60 gr/ 1 litro agua destilada

Tomar

Sol B = 567 ml Total 1 L

Medir **pH = 6.7**

Buffer Sörensen (equivalente)

Sol A = $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ = 17,8 gr/ 1 litro agua destilada

Sol B = $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ = 13,8 gr/ 1 litro agua destilada

Tomar { Sol A = 433 ml
Sol B = 567 ml Total : 1 L

PH = 6.7

9. Lavar 2 veces en agua destilada controlar al microscopio la tinción.

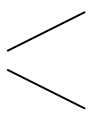
10. Dejar secar al aire.

11. Montaje definitivo

- Frotis coloreado y seco
- Agregar en la superficie 1 a 3 gotas de Bálsamo de Canadá
- Colocar lentamente el cubre objeto desde un lado para evitar formación de burbujas de aire.
- Dejar solidificar el bálsamo al aire.

“Ensayo de Micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el Río Traiguén.”

Nota: Los portaobjetos montados definitivamente se “leen” al microscopio fotónico con aceite de inmersión y lente de inmersión. Los portaobjetos se pueden limpiar (sacar el resto de bálsamo orillas y aceite con XILOL).

Cada organismo  frotis 2000 células
frotis 2000 células

Nº MN en 4000 células