



UNIVERSIDAD CATOLICA DE TEMUCO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS

**“DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE TOXICIDAD
AGUDA DEL FUNGICIDA CARBENDAZIM Y EL
HERBICIDA 2,4 D MEDIANTE BIOENSAYOS CON
GALAXIAS MACULATUS”**

Por

Ramón Alejandro Varela bruce

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

UNIVERSIDAD CATOLICA DE TEMUCO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES

COMISION EXAMEN DE GRADO.

Este Examen de Grado ha sido realizado en la Escuela de Ciencias Biológicas y
Químicas

Presidente Comisión:

Sr. Marco Fernández Navarrete
Decano de la Facultad Recursos Naturales

Profesor Patrocinante:

Sr. Francisco Encina Montoya
Doctor © en Ciencias Ambientales

Profesor Informante:

Sra. Teresa Rueda Leighton
Licenciada en Biología Marina

Profesor Co-Patrocinante:

Sr. Rolando Vega Aguayo
Doctor © en Acuicultura

Secretario Académico de la
Escuela:

Sra. Teresa Rueda Leighton
Licenciada en Biología Marina

Coordinador de Tesis:

Sr. Santiago Peredo Faure
Master in Biology

Dedicatoria

Esta Tesis se la dedico a mi abuelo Ramón Varela por su apoyo y Preocupación en todo momento, y a las personas que de alguna u otra forma me ayudaron en el transcurso de mi vida universitaria y en el transcurso de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A la gente que trabajo de una u otra forma conmigo en el desarrollo de ésta tesis, en especial al profesor patrocinante Sr. Francisco Encina y profesores informante y co-patrocinante Sra. Teresa Rueda, Sr. Rolando Vega por su entrega teórica, guía y apoyo.

También quisiera agradecer a todos y cada uno de las personas que me ayudaron a llegar al fin de esta etapa particularmente: Mis abuelos Ramón Varela e Iris Thiele, a mis Padres Alexis Bruce y Ernesto Varela, a mi hermano Cristián Varela, mis primos Patricio Borlando y Rodrigo Varela, a mi compañero Jaime Mendoza, y amigos Gregorio Guerra y Rolando del Río por su preocupación, disposición, amabilidad y paciencia.

INDICE

INDICE DE CONTENIDOS -----	i
INDICE DE FIGURAS -----	iv
INDICE DE TABLAS -----	v
INDICE DE ANEXOS -----	vi
RESUMEN -----	vii
ABSTRACT -----	viii

INDICE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis-----	13
1.2 Objetivos-----	13
Objetivo general-----	13
Objetivos específicos-----	13
2. METODOLOGÍA	14
2.1 Recopilación de información-----	16
2.1.1 Características generales de la especie en estudio-----	16
2.1.2 Características generales Carbendazim-----	18

2.1.3	Características generales 2,4 D-----	18
2.2	Evaluación de los efectos a través de bioensayos-----	19
2.2.1	Selección, recolección y transporte peces -----	20
2.2.2	Bioensayo de toxicidad aguda en laboratorio-----	22
2.2.3	Análisis de resultados-----	27
2.2.4	Valores de toxicidad aguda-----	27
2.3	Evaluación de la exposición-----	28
2.4	Estimación del riesgo-----	28
 3. RESULTADOS		 30
3.1	Evaluación de los efectos-----	30
3.1.1	Bioensayo Carbendazim-----	30
3.1.2	Bioensayo 2,4 D-----	32
3.1.3	Estandarización de resultados con $K_2Cr_2O_7$ -----	34
3.2	Valores de toxicidad obtenidos de bases de datos-----	36
3.3	Evaluación del riesgo-----	39
 4. DISCUSIÓN -----		 40

5. CONCLUSIONES -----	48
6. BIBLIOGRAFÍA -----	49
7. ANEXOS -----	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujo metodológico para la determinación del bioensayo	15
Figura 2. Especie prueba	17
Figura 3. Formula química Carbendazim	18
Figura 4. Fórmula química 2,4 D	19
Figura 5. Lugar de captura sector Pillalelbum (Cajón) río Cautín	21
Figura 6. Set de Bioensayos	22
Figura 7. Diagrama Metodológico	30
Figura 8. Mortalidad promedio (3 réplicas) v/s concentración de Carbendazim y estimación del LC ₅₀ 96 h para <i>Galaxias maculatus</i>	31
Figura 9. Mortalidad promedio (3 réplicas) v/s concentración de 2,4 D y estimación del LC ₅₀ 96 h para <i>Galaxias maculatus</i>	33
Figura 10. Mortalidad promedio (3 réplicas) v/s concentración de K ₂ Cr ₂ O ₇ y estimación del LC ₅₀ 96 h para <i>Galaxias maculatus</i>	35

INDICE TABLAS

Tabla i. Concentraciones máximas permisibles de pesticidas en el agua destinada a uso de vida acuática.	8
Tabla ii. Condiciones generales para la realización de bioensayos de toxicidad aguda con Carbendazim en <i>Galaxias maculatus</i>	24
Tabla iii. Condiciones generales para la realización de bioensayos de toxicidad aguda con 2,4 D sobre <i>Galaxias maculatus</i> .	26
Tabla iv. Resumen LC ₅₀ 96 Horas por replica en el bioensayo con Carbendazim sobre <i>Galaxias maculatus</i> , intervalos de confianza al 95%, coeficiente de variación y desviación estándar.	32
Tabla v. Resumen LC ₅₀ 96 Horas por replica en el bioensayo con 2,4 D sobre <i>Galaxias maculatus</i> , intervalos de confianza al 95%, coeficiente de variación y desviación estándar	34
Tabla vi. Resumen LC ₅₀ 96 Horas por replica en el bioensayo con K ₂ Cr ₂ O ₇ sobre <i>Galaxias maculatus</i> , intervalos de confianza al 95%, coeficiente de variación y desviación estándar.	36
Tabla vii. Database LC ₅₀ 96 h en especies de salmonideos para Carbendazim	37
Tabla viii. Database LC ₅₀ 96 h en especies de salmonideos para 2,4 D	38
Tabla ix. Riesgo ecológico como cociente de riesgo (RQ)	39
Tabla x. Propiedades físico-químicas para elección pesticidas	41

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1

Tabla i. Mortalidad <i>Galaxias maculatus</i> con Carbendazim LC ₅₀ 96 horas	5
Tabla ii. Mortalidad <i>Galaxias maculatus</i> con 2,4 D LC ₅₀ 96 horas	60
Tabla iii. Mortalidad <i>Galaxias maculatus</i> con K ₂ Cr ₂ O ₇ LC ₅₀ 96 horas	62

ANEXO 2

Figura 1. Herbicida Duett	63
Figura 2. Herbicida Arco 2,4 D	64

RESUMEN

Se determinó experimentalmente la toxicidad de dos pesticidas comúnmente utilizados en la actividad agrícola de la IX Región los cuales según estudios recientes difundirían a través de fuentes difusas hacia los cuerpos de agua. Ambos tendrían cierto riesgo sobre la fauna acuática de éstas: el fungicida Carbendazim y el herbicida 2,4 D, ambos de uso masivo.

La toxicidad se determinó por medio de bioensayos de toxicidad aguda a las 96 h con los dos pesticidas utilizando una especie nativa de los ríos de la IX Región *Galaxias maculatus* “el Puye” el cual se capturó en el río Cautín. Para fines de evaluar la toxicidad de los compuestos en estudio se utilizó el método Spearman y los datos se graficaron en curvas de regresión, posteriormente se elaboró una base de datos con los LC₅₀ 96 h para salmonideos.

Como resultado se obtuvo que el Carbendazim presentó efectos sobre el “Puye” LC₅₀ 96 h de 19,7 mg/l lo que entra en el rango de moderadamente tóxico. Los resultados para 2,4 D arrojaron ser no tóxico 764,4 mg/l.

Finalmente la evaluación de la exposición mostró que ambas sustancias no presentarían riesgo ecológico en el ecosistema de la IX región.

Palabras claves: Fungicida, Herbicida, *Galaxias maculatus*

ABSTRACT

Was determined in an experimental the toxicity of two pesticides commonly used in the agricultural activities of the IX Region. These pesticides according recent studies would spread through diffuse sources toward the waters bodies. Both would have risk over the aquatic fauna of this one: Carbendazim fungicide and 2,4 D herbicide, both of massive use.

The toxicity was determined for acute toxicity bioassay at 96 h with both pesticides using a native species of IX Region rivers *Galaxias maculatus* “Puye” this fish was captured in the Cautín River. Tending to evaluating the toxicity both pesticides was used the SPEARMAN method and the data was graphically represented in regression curves, later were processed a database with the LC₅₀ 96 h for salmonides.

As outcome was obtained than Carbendazim reported effect over Puye, LC₅₀ 96 h of 18,9 mg/l than enter in the range of toxic moderately. The outcomes for 2,4 D threw to be no toxic 764,4 mg/l.

Finally the exposition assessment showed than both substances wouldn't show ecological risk in IX region ecosystem.

Words keys: Fungicide, Herbicide, *Galaxias maculatus*

1. INTRODUCCIÓN

La ecotoxicología es una disciplina basada en la toxicología y ecología que se ocupa del estudio de las acciones y los efectos nocivos de agentes tanto químicos como físicos presentes en el ambiente (contaminantes y polutantes), sobre los constituyentes vivos de los ecosistemas, o sea, sobre los animales (incluido el hombre), vegetales y microorganismos (Larraín 1995).

La ecotoxicología tiene como objetivo valorar el riesgo ecológico frente a sustancias potencialmente tóxicas en el ambiente acuático y que proveen información suficiente para elaborar estrategias de gestión para proteger ecosistemas. Se deben tener en cuenta varios factores que incluyen características intrínsecas de la sustancia como actividad biológica o características físico-químicas, distribución en el ambiente y aquellas que dependen de características de la emisión (carga, patrones de descarga) o de las propiedades ambientales (características de los ecosistemas, corrientes etc.) (Encina y Díaz 2001).

La evaluación del riesgo ecológico evalúa la probabilidad de que los efectos adversos puedan ocurrir o que puedan estar ocurriendo como resultado de la exposición a uno o más agentes estresantes, como producto de las múltiples actividades hechas por el hombre, una evaluación puede involucrar agentes químicos, físicos y biológicos estresantes (EPA 1998). La evaluación del riesgo también evalúa la probabilidad de los efectos causados en el pasado. Esta valoración esta basada en dos elementos: a) La caracterización de la exposición y b) la caracterización de los efectos:

a) Caracterización de la exposición: corresponde a la evaluación de la potencial interacción co-ocurrencia o contacto de los agentes estresantes con una o más entidades ecológicas.

b) Caracterización de los efectos: fase que se busca establecer la relación entre el agente contaminante y los efectos adversos producidos sobre una entidad biológica (EPA 1998), se evalúa como los efectos traducidos en respuesta causados por un contaminante cambian con los niveles de variación de éstos. La caracterización empieza evaluando los datos de los efectos.

Dentro de la estimación de los efectos, los estudios convencionales sobre calidad de agua disponen de una gran cantidad de datos analíticos que dificultan la elaboración de un diagnóstico certero sobre la contaminación de un ambiente acuático y la comunicación de los resultados de una manera comprensible y confiable (Encina y Díaz 2001).

Existen varias estrategias para la elaboración del diagnóstico de calidad de agua de un ambiente determinado, tales como:

- a) determinación de parámetros físico-químicos y biológicos
- b) detección de bioindicadores de contaminación
- c) realización de bioensayos de laboratorio y campo

Las dos primeras estrategias generan información sobre el estado del cuerpo de agua en cuanto a sus condiciones abióticas y/o bióticas en un lapso determinado (Lopretto y Tell 1995).

Los bioensayos de laboratorio y de campo son mediciones experimentales (Larrain 1995), permiten establecer una relación causal entre las concentraciones ambientales y los efectos sobre poblaciones extrapolando estos resultados al nivel de comunidad y ecosistema (Encina y Díaz 2001), se usan para diferenciar los efectos de contaminantes de aquellos inducidos por otras perturbaciones y son capaces de descubrir concentraciones muy bajas de contaminantes (USGS 2000). Permiten el establecimiento de límites de permisibilidad para distintos xenobióticos evaluando el impacto de mezclas de contaminantes sobre las comunidades de los cuerpos hídricos receptores (Cepeda 2000). La utilización de animales y plantas con este objeto puede llevarse a cabo sólo si se han estandarizado estos ensayos y se conocen las características de sus respuestas (Larraín 1995).

Hay disponible en literatura, numerosos protocolos estandarizados de ensayos ecotoxicológicos para diferentes especies y contaminantes tanto individuales como en mezcla, como son los efluentes urbanos e industriales (Lagos 2000). Los bioensayos son test usados para evaluar la potencia relativa de un químico o una mezcla de químicos para comparar efectos sobre organismos vivos con el efecto de una preparación estandarizada en el mismo tipo de organismo (EPA 1999a).

La respuesta de las entidades ecológicas frente a la exposición de un contaminante se realiza mediante bioensayos ecotoxicológicos principalmente desarrollados en organismos de una determinada población (Encina y Díaz 2001.).

Los bioensayos permiten obtener respuestas del daño a la biota y ecosistemas de manera rápida, aún cuando miles de sustancias químicas potencialmente tóxicas puedan o no puedan ser detectadas por análisis rutinarios ya que la gran diversidad, extensión y complejidad de los mismos hacen casi imposible su caracterización completa, así mismo, ayudan a monitorear el ambiente incluso cuando es difícil predecir el efecto conjunto que se produce con la interacción de las sustancias o factores como el pH, la dureza y el carbono orgánico disuelto, entre otros (Castañeda 1999). Proporcionan evidencia directa del efecto acumulativo de contaminantes en la supervivencia, crecimiento, conducta o la reproducción de organismos vivientes.

Las pruebas de toxicidad y bioensayos pueden realizarse in vitro con células y tejidos de una variedad de organismos, o en vivo con organismos completos que van desde el tamaño de una bacteria a vertebrados. Las respuestas pueden variar de señales bioquímicas de exposición a los contaminantes o daño genético a la muerte o pérdida de movilidad de organismos en una prueba de corto plazo. Los bioensayos y pruebas de toxicidad realizadas en organismos completos son muy generales con respecto a los contaminantes que entregan la respuesta; sin embargo ellos también pueden proporcionar información más específica sobre la naturaleza e identidad de las sustancias involucradas cuando se realizan pruebas múltiples con organismos de diferente susceptibilidad a ciertos contaminantes (USGS 2000).

Características de los bioensayos o test con especies individuales según EPA (1999a).

- Integran aditividad e interacciones acumulativas de químicos
- Proveen de una medida directa de biodisponibilidad química
- Miden respuestas a tóxicos para los cuales no hay estándares de calidad de agua específicos químico-químico
- Dan una precaución temprana y son predictivos de probables deterioros de ecosistemas acuáticos sus resultados en la mayoría de los casos son predictores fiables cualitativos de respuestas de comunidades en ecosistemas acuáticos
- El poder de predicción aumenta cuando el ambiente acuático se compara a las descargas existiendo una alta magnitud de toxicidad
- Han entregado estimaciones de concentración confiables (para muchos tipos diferentes de químicos) que causan efectos en ecosistemas acuáticos
- Al estar altamente estandarizados con garantía de calidad específica y requerimientos de control proveen resultados confiables replicables y comparables, con buena precisión comparado a otros tipos de test químicos y biológicos
- Dan una temprana señal de alerta así se pueden tomar acciones para minimizar impactos significativos en el ecosistema en especial con consideraciones a descargas y liberación de químicos tóxicos
- Al ser interpretados en forma rápida y tiempo corto permiten la acumulación de sets de datos que caractericen mejor los sistemas de aguas residuales o ambientales.

Los bioensayos pueden ser de dos tipos:

a) Toxicidad aguda: estos test determinan la concentración de efluentes o aguas receptoras (o ambiente acuático) que producen un efecto adverso en un grupo de organismos de prueba durante un tiempo de exposición corto (24, 48, o 96 horas). La respuesta es letalidad. La toxicidad aguda es medida usando procedimientos estadísticos (por ejemplo técnica de estimación de puntos y prueba t) (EPA 1999a). Sus respuestas pueden expresarse como: concentraciones medias. LC_{50} que es la concentración tóxica que causa la muerte al 50% de organismos de prueba (Encina y Díaz 2001).

b) Toxicidad crónica: son definidos como los test a largo plazo en que efectos subletales (por ejemplo reducción de crecimiento o reproducción) son usualmente medidos en adición para letalidad (EPA 1998). Sus respuestas se expresan en niveles (Encina y Díaz *op cit.*), NOEC son las mayores pruebas de concentración con tóxicos a que organismos son expuestos en un ciclo completo de vida o un ciclo parcial de vida (corto plazo) no se observan efectos adversos en los organismos de prueba. LOEC es la concentración baja de tóxicos a que organismos son expuestos en una prueba, que causan efectos adversos estadísticamente significantes en los organismos de prueba. MATCH es el rango entre el NOEC y LOEC y es la concentración máxima aceptable de tóxico esta proporciona referencia útil para comparar varias toxicidades estresantes de químicos. El MATCH ha sido ampliamente utilizado por EPA para evaluar pesticidas y químicos industriales (EPA 1999a).

El hombre ha descubierto productos químicos llamados plaguicidas para controlar o eliminar plagas que causan enfermedades que interfieren con la producción agrícola. Entre los que se encuentran los insecticidas que se usan para combatir a los insectos, los fungicidas para hongos, los herbicidas para plantas consideradas nocivas, los rodenticidas para roedores, los nematocidas para gusanos y los moluscidas para caracoles (Lomeli *et al.*, 2003). Los plaguicidas acumulados en las aguas ponen en peligro la vida de animales y vegetales acuáticos, estos compuestos químicos pueden llegar a provocar la muerte de peces, acumularse en sus tejidos poniendo en peligro la vida de sus consumidores. En condiciones de laboratorio se ha observado que algunos de ellos son cancerígenos, teratogénicos y mutágenos en ratas, hámsters y monos (UNAM *et al.*, 2001).

La legislación chilena designa tres instituciones con responsabilidad de control y fiscalización en el campo de los plaguicidas, el Servicio Agrícola Ganadero (SAG), el Servicio de Salud del Ambiente (SSA) y el Ministerio del Trabajo. El decreto ley N° 3557/80 de Protección Agrícola permite al SAG regular, restringir y prohibir la fabricación, importación, distribución, venta y aplicación de pesticidas que permita la sustentabilidad del medio ambiente y la salud del hombre tendrá su base sólida en una adecuada legislación (Rubin *et al.*, 1993). Dentro de los usos del agua que son afectados por presencia de pesticidas se encuentran: agua destinada a uso potable y vida acuática. Para la calidad del agua para la vida acuática la NCH 1333 of. 78 establece los valores de pesticidas y otros compuestos, a partir de un factor correspondiente a un porcentaje de bioacumulación de éstos en los organismos acuáticos, es decir a través de bioensayos de toxicidad los que actualmente no se encuentran estandarizados (Tabla i).

A diferencia de esta situación la normativa de la EPA considera los pesticidas en $\mu\text{g/L}$, en tanto que la CEE y Canadá los consideran en mg/L (KRISTAL 1997). Sin embargo las normas chilenas de calidad de agua 409 y 1333 no mencionan factores de seguridad para fungicidas.

Tabla i. Concentraciones máximas permisibles de pesticidas en el agua destinada a uso de vida acuática

Pesticidas	Chile	EPA $\mu\text{g/L}$	CEE	Canadá
*Aldrín	1/100 de la LTm 96	0,03		0,0007
*Lindano	1/100 de la LTm 96	0,01		1E-5
Parathión	1/100 de la LTm 96	0		1E-5
*Dieldrín	1/100 de la LTm 96	0,03		0,0007
*Clordano	1/100 de la LTm 96	0,01		6E-6
*DDT	1/100 de la LTm 96	0-0,01		1E-6
Demetón	1/100 de la LTm 96	0,1		
*Heptaclor	1/100 de la LTm 96	0,001		1E-5

LTm 96: Límite máximo de sustancias tóxicas obtenidos a partir de bioensayos. *Actualmente prohibidos

EPA: Agencia de Protección Ambiental, CEE: Norma Comunidad Europea

El Carbendazim es un ingrediente activo que forma parte de los Fungicidas sustancias más usadas en agricultura y también las más diversas en composición, en agricultura se aplica este término a cualquier producto que tenga actividad directa contra enfermedades fungosas ya sea que mate el hongo o retrase su desarrollo (González 1985). Desde 1981 en Chile la aplicación de fungicidas para el control de enfermedades foliares en trigo y cebada tomó un gran auge, debido al conocimiento de los daños que potencialmente las

enfermedades prevalentes podrían producir y a la mayor rentabilidad y productividad de estos cultivos (Latorre 1989).

Los Herbicidas se ocupan principalmente en la IX Región en el control de malezas en cero labranza, una de las técnicas mas utilizadas sobre cereales principalmente en el trigo (Olave 2001) en agricultura se aplica este término a cualquier producto que tenga actividad directa contra malezas erradicándolas. El herbicida de mayor uso en el mundo es el 2,4 D (González 1985). El 2,4 D es un herbicida usado para controlar hierbas de hoja ancha en cultivos de cereales, remolacha césped, después de 50 años de uso es el herbicida más ampliamente utilizado en el mundo (Kaioumova *et al.*, 2001).

En los ambientes acuáticos los criterios de calidad de agua deben ser fijados por medio de parámetros derivados de bioensayos significativos deben considerarse para ellos efectos agudos, crónicos, letales y subletales, más algunas circunstancias particulares del ambiente (Larrain 1995), sin embargo, éstos no son considerados como parámetros de evaluación en la legislación chilena. Además no se considera el efecto de mezcla de sustancias, pese a que en países como Brasil, Argentina, Estados Unidos y Comunidad Europea se incorpora desde ya varios años este tipo de ensayos (CETESB 1990). El desarrollo de los respectivos protocolos ha estado relacionado principalmente con la APHA (American Public Health Association), EPA (Environmental Protection Agency) y ASTM (American Society for Testing of Materials) de Estados Unidos y la oficina ambiental de la Comunidad Europea. En Chile, solo la ordenanza de la Dirección General del Territorio Marítimo, del 18 de Noviembre de 1992, establece, entre los

objetivos de la evaluación de impacto ambiental, la obligatoriedad de determinar la toxicidad de efluentes mediante bioensayos, así como la mantención de control y autovigilancia periódica de los efectos de efluentes (Larraín 1995).

Hasta ahora, excepto por esfuerzos pioneros de algunas Industrias, los bioensayos de toxicidad no han sido utilizados en evaluaciones ambientales realizadas en nuestro país. Sin embargo, tanto los proyectos de legislación ambiental, como sus reglamentos, los consideran como una tecnología adecuada para evaluar los efectos biológicos de residuos industriales y/o domésticos sobre las aguas continentales y costeras en países desarrollados (Jaksic *et al.*, 2003).

De acuerdo a Tortorelli (1994) las prioridades para la elección del Carbendazim y 2,4 D en la realización de bioensayos esta justificada por los siguientes criterios:

- Indicación de cierta sospecha o sospecha de riesgo para la salud humana; tipo y severidad de efectos potenciales para la salud
- Extensión probable de producción y uso
- Persistencia potencial en el ambiente
- Acumulación potencial en la biota y en el ambiente
- Tipo o tamaño de las poblaciones que estarán expuestas

Un producto de alta prioridad sería aquél que presente altos niveles en todas o en la mayoría de los criterios.

Los principales atributos de acuerdo a Tortorelli (1994) que hacen a los peces componentes deseables de evaluaciones biológicas y programas de monitoreo para evaluaciones correctas del medio ambiente son:

- Disponibilidad inmediata durante todo el año
- Fácil mantenimiento en laboratorio
- Aptitud para las condiciones de ensayo
- Sensibilidad relativa

Existe en la actualidad una gran variedad de bioensayos de toxicidad estandarizados que utilizan plantas, invertebrados y vertebrados acuáticos para evaluar los efectos biológicos-ambientales de efluentes complejos (totales) sobre cuerpos receptores (Larraín 1995) en este estudio se trabajará con el nivel trófico peces con el orden Osmeriforme, utilizando el Puye (*Galaxias maculatus*) especie nativa en los ríos de Chile (Campos 1993).

La selección de *Galaxias maculatus* “Puye” para este estudio se basó principalmente en que presenta condiciones de disponibilidad de individuos durante casi todo el año, fácil mantenimiento en laboratorio, especie de importancia comercial (juveniles), recreacional y ecológica, se reproducen fácilmente en condiciones artificiales, se conocen sus requerimientos en cuanto a alimentación, profilaxis de enfermedades además de conocimiento de su alta y constante sensibilidad frente a los tóxicos (Tortorelli *op cit.*).

Por otro lado los bioensayos con especies individuales tienden a usar especies foráneas que no representan la biota local (EPA 1999 a). Por este motivo se trabajó con el Puye especie nativa de los ríos de Chile debido a su distribución y morfología de tipo ritrónico, además de los escasos estudios sobre ella.

La finalidad de este estudio es determinar la toxicidad de dos xenobióticos el fungicida Carbendazim y el herbicida 2,4 D de uso masivo en la actividad agrícola de la IX Región y según antecedentes recopilados ambos tendrían algún efecto sobre la fauna acuática de las cuencas, ya que provendrían de fuentes difusas de acuerdo a Olave (2001). Por lo tanto será necesario implementar bioensayos de toxicidad aguda con ambos pesticidas utilizando *Galaxias maculatus* “Puye”, con el objetivo final de caracterizar los efectos determinando la toxicidad aguda de estas dos sustancias sobre esta especie, posteriormente con esta información mas la caracterización de la exposición se evaluará el riesgo ecológico esperando aportar antecedentes técnicos que puedan ser útiles en la generación de normas de protección para la fauna íctica y el medio acuático de nuestro país.

1. HIPÓTESIS

- Las concentraciones de pesticidas Carbendazim y 2,4 D que llegan a las aguas superficiales de las cuencas de la IX región causan toxicidad aguda en el pez *Galaxias maculatus*

1.2 OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar el nivel de toxicidad del Carbendazim y el 2,4 D mediante la realización de bioensayos de toxicidad aguda en adultos de *Galaxias maculatus*

Objetivos específicos

- Estimar el nivel de toxicidad del Carbendazim mediante la realización de bioensayos de toxicidad aguda con adultos de *Galaxias maculatus*
- Estimar el nivel de toxicidad del 2,4 D mediante la realización de bioensayos de toxicidad aguda con adultos de *Galaxias maculatus*
- Estimar el riesgo ecológico de ambos pesticidas

2. METODOLOGÍA

La metodología utilizada para cumplir los objetivos de este estudio se desarrolló en cuatro etapas principales que se describen detalladamente en el diagrama que se entrega en la Figura 1.

1. Recopilación de Información
2. Evaluación de los Efectos a través de Bioensayos
3. Evaluación de la Exposición
4. Evaluación Riesgo Ecológico

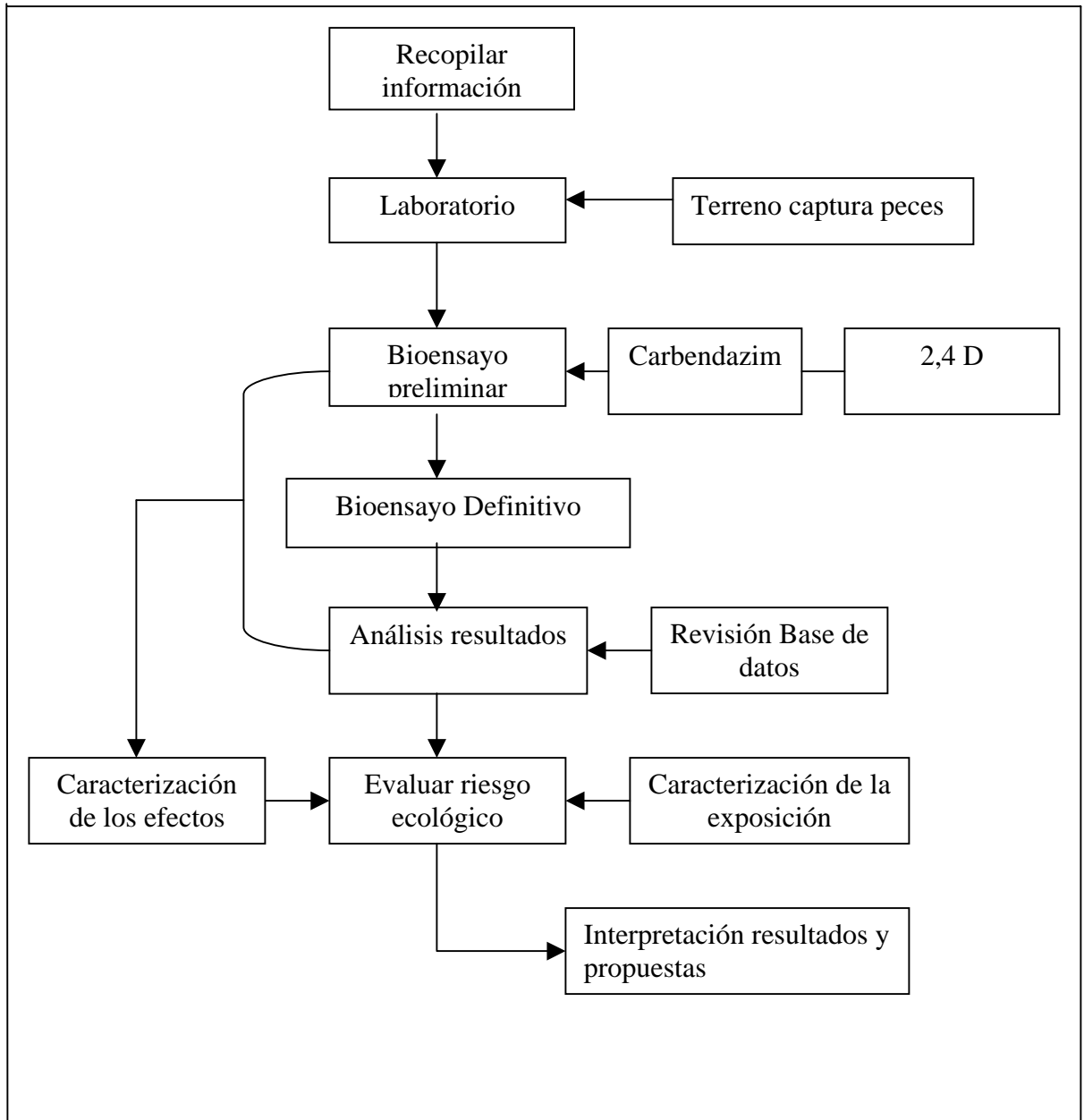


Figura 1. Flujo metodológico para cumplir los objetivos de este estudio

2.1. RECOPIACIÓN DE INFORMACION

2.1.1 Características generales de la especie utilizada en el estudio:

La especie utilizada en este estudio correspondió a *Galaxias maculatus* (ver Fig. 2), especie nativa de aguas del sur de Chile. De acuerdo a su morfología presenta un cuerpo alargado, fusiforme, carece de escamas y aleta adiposa, cabeza corta, longitud puede alcanzar 15 cm. pero el promedio es de 7cm; la coloración en adultos es de tonalidad amarillenta con grandes manchas en flancos, su distribución es la mayor de los peces de Chile, presenta primeramente una distribución discontinua al norte de Concepción y de la hoya del Bío-Bío se encuentra ininterrumpidamente hasta Tierra del fuego, en la hoya del río Imperial su distribución se encuentra principalmente en el área estuarina y potamal, en cuanto a la biología, esta especie es pelágica de ríos potamales o hiporitrales y lagos, es diadrómica, es decir, puede vivir en aguas salobres, saladas y agua dulce, en cuanto a su alimentación es de zooplancton cuando es juvenil (entre 4 y 6 meses) alimentándose en mar ríos o lagos, durante su fase adulta se alimenta de larvas de insectos acuáticos, pequeños crustáceos y oligoquetos, su reproducción es en primavera y verano, la madures la alcanzan al primer año de vida llegando a vivir probablemente entre 2 a 3 años, las post-larvas de puye alcanzan tamaños de 5 centímetros en 6 meses, siendo totalmente cristalinas, los cambios morfológicos ocurren cuando las post-larvas comienzan a pigmentarse (estado adulto), alcanzando una talla de 8 centímetros entre los 12 a 15 meses, alrededor de un 70 % de la población de cristalinos alcanza la madurez sexual durante la primavera del primer año (aproximadamente 9 meses de edad), con un peso de $1,12 \pm 0,38$ gramos y una longitud de $55,60 \pm 5,20$ milímetros Las poblaciones

de puye tienen individuos de longevidad promedio de 1 a 2 años, aunque se pueden encontrar especímenes de 4 años de edad (Vega 1999).



Figura 2. Especie prueba

Clase : Osteichthyes

Orden : Osmeriformes

Familia : Galaxiidae

Género : Galaxias

Especie : *Galaxias maculatus*

2.1.2 Características generales Carbendazim

Los fungicidas representan como grupo de plaguicidas los de mayor riesgo potencial para el ser humano, dado que alrededor del 90% de los fungicidas en la actualidad o en el pasado reciente han probado tener efectos cancerígenos sobre animales de experimentación (Loewy 2000). Dentro de éstos está el Carbendazim (ver Fig. 3), un fungicida sistémico (movilización interna en la planta) perteneciente al grupo de los Benzimidazoles controlador del hongo Ascomycetes (Latorre 1989).

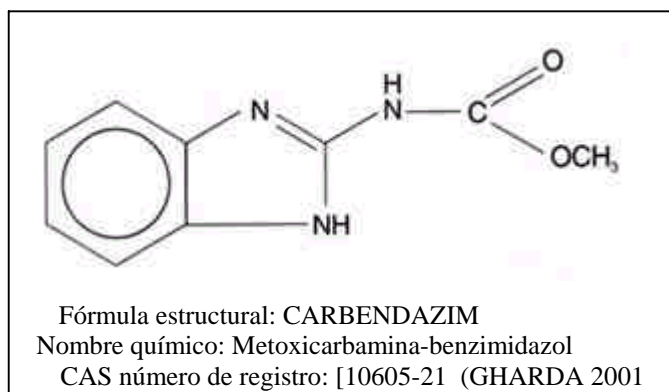


Figura 3. Formula química Carbendazim

2.1.3 Características generales del 2,4 D

El 2,4 D (2,4-Dicloro ácido fenoxiacético) (ver Fig. 4), pertenece al grupo de los llamados fenoxherbicidas, es un herbicida fenoxiacético sistémico. Tóxico para peces, insectos, aves y vida silvestre en general, reduciendo su número y retardando la tasa de recuperación. El 2,4 D es ingrediente activo de diversos productos vendidos con los

nombres de Weed-B-Gone, Weedone, Miracle, Demise, Lawn-Keep, Raid Weed Killer, Plantgard, Hormotox, Ded-Weed, Arco 2,4 D y Tordot estos dos últimos utilizados ampliamente en la IX Región.

Prohibido en Colombia, Suecia (2,4- D) Belize (2,4- DB) restringido en Guatemala y en Estados Unidos desde 1967 (OLCA 2002).

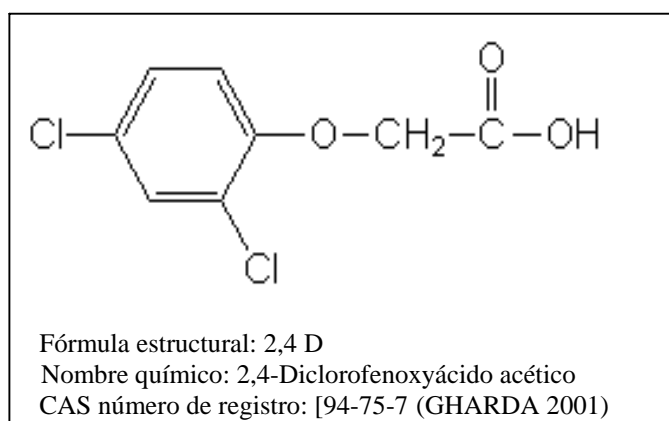


Figura 4. Fórmula química 2,4 D

2.2. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS A TRAVÉS DE BIOENSAYOS

Para el cumplimiento de este paso de la metodología se considero la propuesta de la EPA (1993) y Tortorelli (1994).

2.2.1 Selección, recolección y transporte peces

Para la realización de los ensayos de toxicidad se utilizó una especie nativa de los ríos y cuencas Chilenas perteneciente a la familia de los Osmeriformes de quien prácticamente existen pocos estudios de los impactos de contaminantes sobre ella, correspondiendo esta especie a *Galaxias maculatus* “Puye”.

Para la recolección de este pez se utilizó una red de arrastre alternativa de 1 x 10 metros, tamaño de luz de malla de 2 mm. con cadenas y flotadores realizándose la modalidad de cerco sobre determinados sectores para capturar los individuos (ver Fig. 5). El muestreo se realizó durante el mes de diciembre del año 2004 en sectores bajos del río Cautín.

Se realizaron 3 terrenos al río Cautín sector Pillalelbum (Cajón) en cada uno se capturaron 100 individuos para cada bioensayo correspondiente.



Figura 5. Lugar de captura sector Pillalelbum (Cajón) río Cautín

Los individuos fueron puestos en Bidones de 50 litros (4 adultos/litro) con aireación permanente durante el trayecto a destino. Se seleccionaron individuos adultos de similar peso y talla, una vez obtenido el material fue transportado al laboratorio, donde se procedió a un período de aclimatación de 24 horas con el propósito de eliminar individuos dañados debido a la recolección y el transporte.

Para una buena mantención de los organismos de ensayo se debieron hacer recambios diarios de agua con oxigenación constante, los peces debieron ser alimentados con pellets de harina de pescado.

2.2.2 Bioensayo de toxicidad aguda en laboratorio:



Figura 6. Set de Bioensayos

a) Bioensayo Carbendazim

Los ensayos de toxicidad para el Carbendazim se realizaron con el fungicida marca comercial Duett (ver Anexo 2 Fig. 1), el que esta compuesto de dos ingredientes activos (Epoconazol 125 g/l Inhibidor de la síntesis del Ergosterol + Carbendazim 125 g/l), se trabajó con una concentración madre de 10.000 ppm.

De acuerdo a Tortorelli (1994) se realizó un test preliminar de corta duración 48 horas que abarcó un amplio rango de concentraciones, debido que éste pudo proporcionar un valor aproximado del LC_{50} 96 horas y sirvió para definir el rango de concentraciones en el test definitivo.

Los bioensayos de toxicidad aguda definitivos se realizaron a las 96 horas, se llevaron a cabo en un nivel trófico; peces adultos; debido a que los individuos adultos están presentes en toda época del año lo que facilita su recolección.

Basado en EPA (1998) se utilizó un control más cinco concentraciones (ver Fig. 6), y 5 ejemplares por concentración con seis réplicas. Para así establecer los LC_{50} (concentración letal a la que muere el 50% de los peces). Los peces sometidos a ensayo se colocaron en acuarios de vidrio de 1 litro, los ejemplares vivos se trasladaron a acuarios de recuperación por un período de 7 días. Las condiciones generales de los bioensayos se entregan en la Tabla ii.

Tabla ii. Condiciones generales para la realización de bioensayos de toxicidad aguda con Carbendazim en *Galaxias maculatus* según Tortorelli et al (1994) y EPA (1998).

Parámetros	Condición
Agua de dilución	Agua declorada y filtrada
Temperatura	16 °C
pH	7
Fotoperíodo hrs.	14 horas de luz
Aireación	Asegurar OD > 5 ppm
Duración test	96 hrs.
Talla promedio de organismos	5,75 cm.
Peso promedio de organismos	0,69 gr.
Alimentación	Ninguna
Nº de individuos por solución test	5
Nro. concentraciones	6
Nro. de réplicas	3
Factor de dilución	0,5-0,25
Expresión resultados	LC50-96 hrs.
Validez del test	Mortalidad en control < 10%
Variable de respuesta	Mortalidad
Aceptabilidad del test	50% de saturación

b) Bioensayo 2,4 D

Los ensayos de toxicidad para el 2,4 D se realizaron con el fungicida marca comercial Arco 2,4 D (ver Anexo 2 Fig. 2), el que esta compuesto de este ingrediente activo (2,4 D 480 g/l) se trabajó con una concentración madre de 10.000 ppm. para la ejecución de los bioensayos se utilizó el mismo procedimiento que para el Carbendazim. Las condiciones generales de los bioensayos se entregan en la Tabla iii.

Tabla iii. Condiciones generales para la realización de bioensayos de toxicidad aguda con 2,4 D sobre *Galaxias maculatus* según Tortorelli *et al.*, (1994) y EPA (1998)

Parámetros	Condición
Agua de dilución	Agua de clorada y filtrada
Temperatura	15 °C
pH	7
Fotoperíodo hrs.	14 horas de luz
Aireación	Asegurar OD > 5 ppm
Duración test	96 hrs.
Talla promedio de organismos	5,42 cm.
Peso promedio de organismos	0,46 gr.
Alimentación	Ninguna
Nº de individuos por solución test	5
Nro. concentraciones	5
Nro. de réplicas	6
Factor de dilución	0,5-0,25
Expresión resultados	LC ₅₀ -96 hrs.
Validez del test	Mortalidad en control < 10%
Variable de respuesta	Mortalidad
Aceptabilidad del test	50% de saturación

2.2.3. Análisis de resultados

De acuerdo a EPA (1993), para establecer la toxicidad, tanto para el Carbendazim como para el 2,4 D se utilizó, como criterio, la inmovilidad de los peces a las 96 h. Para determinar el LC_{50} 96 horas se utilizó el método estadístico Spearman-Kärber (1978) procedimiento no paramétrico para estimar el LC_{50} y el intervalo de confianza del 95% asociado a ella este método es implementado por el programa de computación EPA (1993). Posteriormente se graficaron los resultados obtenidos mediante curvas de regresión con la relación concentración-mortalidad mediante el programa Microsoft Excel versión 5.0, con sus respectivos límites de confianza y valores de pendiente.

2.2.4 Valores de toxicidad aguda

Se realizó esta etapa mediante la revisión de base de datos sobre salmonídeos PAN Pesticidas y Ecotox de la EPA, se obtuvo valores de toxicidad para Carbendazim y 2,4 D en peces

2.3. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN

Basándose en EPA (1998) para realizar esta tercera etapa se analizaron las concentraciones ambientales de cada pesticida a estudiar. Se dispuso de datos de monitoreo químico registrados en Palma *et al.*, datos de la cuenca del río Traiguén, IX región (1994), normalmente se les debe dar preferencia a éstos, antes que emplear datos calculados (PNUMA 1999).

2.4. ESTIMACIÓN DEL RIESGO

La estimación del riesgo, última etapa de este estudio, se basó en la integración de los datos de exposición obtenidos a través de datos de monitoreo químico y los datos de los efectos obtenidos por los Bioensayos (ver Fig. 7). Para estimar el riesgo ecológico se utilizó el método más usual, el que consiste en dividir la concentración prevista en el ambiente (exposición), con la concentración que produce un efecto ambiental inaceptable (efecto) (PNUMA 1999).

El riesgo de pesticidas en sistemas acuáticos es calculado como $PEC/PNEC$ este es usado como un indicador de riesgo (RQ). Se trata de una expresión cualitativa del riesgo (PNUMA *op cit.*).

PEC (Concentración ambiental prevista), concentración a la que el ambiente es expuesto, el procedimiento más comúnmente empleado para determinar la exposición es

la química analítica. Se obtienen las concentraciones en los sustratos y los medios, y también en los componentes biológicos del ecosistema. (PNUMA *op cit.*)

PNEC (Concentración ambiental sin efectos previstos), es la concentración bajo la cual un efecto inaceptable no pareciera ocurrir (Palma *et al.*, 2004), para calcular el PNEC a partir del LC_{50} se utilizó el factor de incertidumbre 100 usado por la EPA para datos de toxicidad aguda ($LC_{50}/100$). Si el PEC es mayor o igual que el PNEC hay probabilidad que estaría ocurriendo un daño en el ecosistema. La relación entre ambas se toma como una medida de la probabilidad de que ocurrirá un daño.

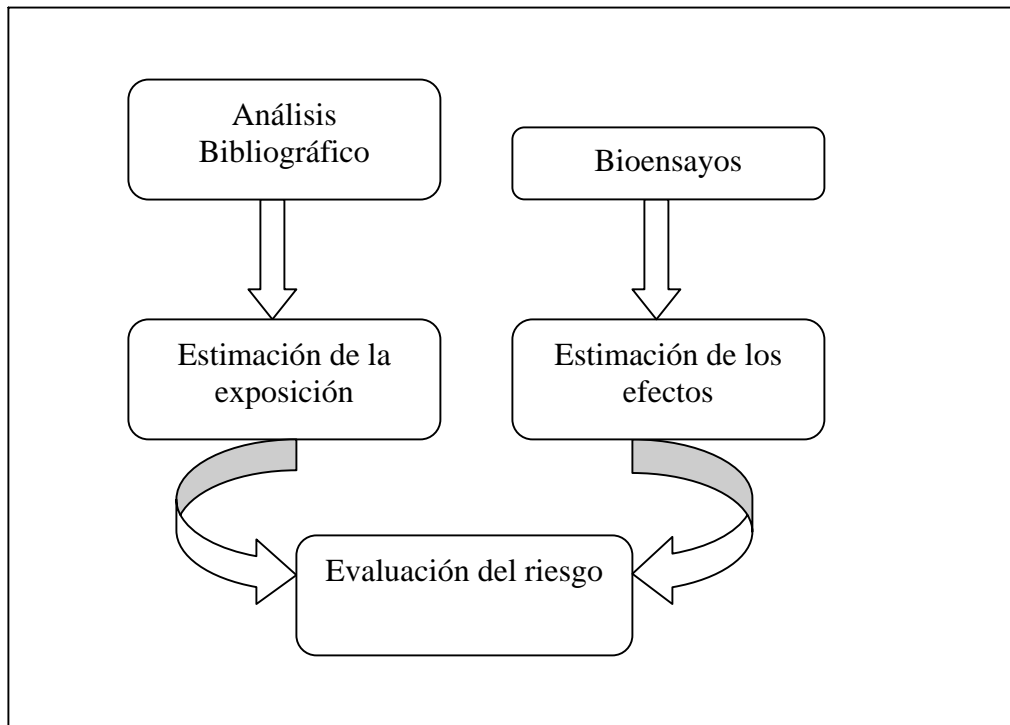


Figura 7. Diagrama Metodológico

3. RESULTADOS

3.1 Evaluación de los efectos

3.1.1 Bioensayo Carbendazim

El test de toxicidad aguda permitió determinar el porcentaje de organismos muertos en cada una de las concentraciones (ver Anexo 1 Tabla i). Se obtuvo que con 96 horas de exposición el LC₅₀ para *Galaxias maculatus* fue de 18,9 mg/l (Figura 8) alcanzándose una mortalidad del 90% en la mayor concentración. Con un $p < 0,05$. Resumen de resultados Tabla iv

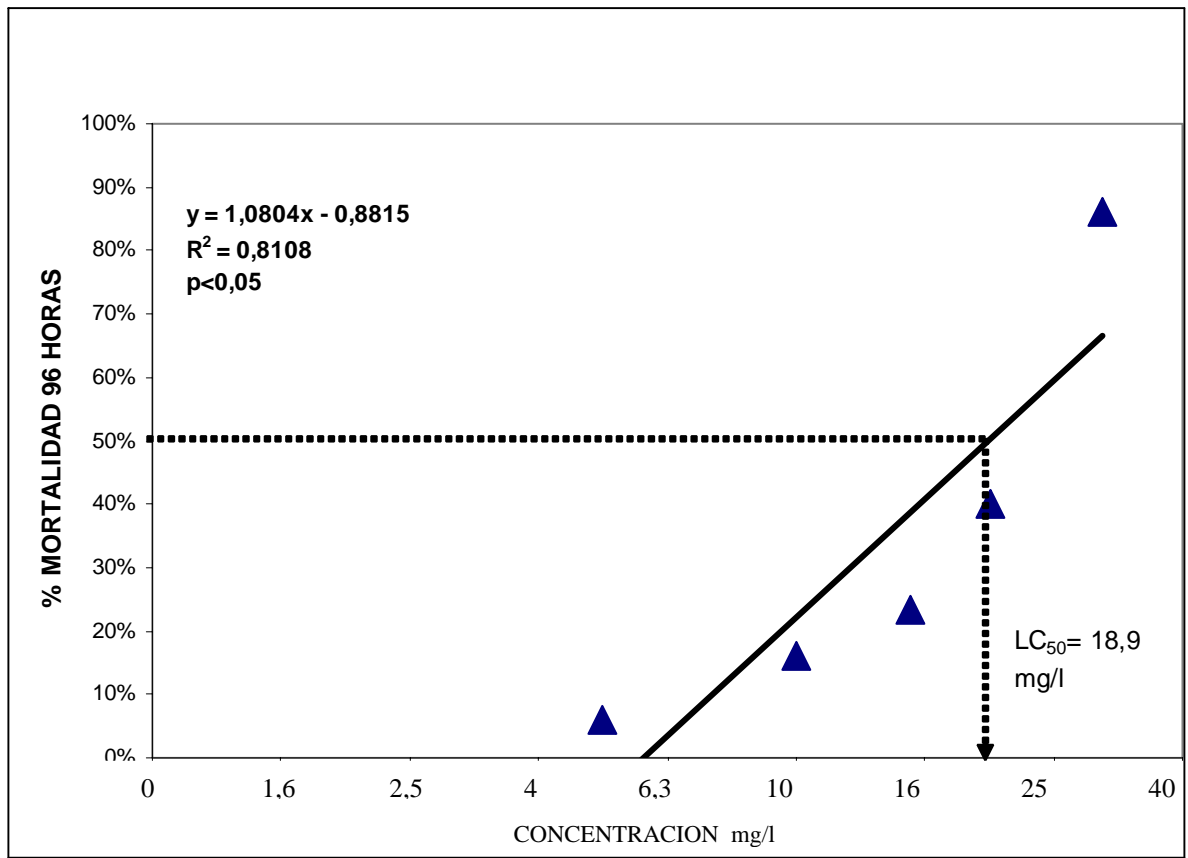


Figura 8. Mortalidad promedio (3 réplicas) v/s concentración de Carbendazim
y estimación del LC₅₀ 96 h para *Galaxias maculatus*

Tabla iv. Resumen LC₅₀ 96 Horas por replica en el bioensayo con Carbendazim sobre *Galaxias maculatus*, intervalos de confianza al 95%, coeficiente de variación y desviación estándar

REPLICA	LIM.INFERIOR (mg/l)	LC₅₀ 96 HORAS (mg/l)	LIM. SUPERIOR (mg/l)
1	14,5	22,0	33,3
2	15,3	18,6	22,6
3	15,0	18,6	23,0
4	14,4	18,5	23,8
5	11,6	17,3	25,8
6	14,4	18,5	23,8
PROMEDIO	14,2	18,9	25,4
C.V.		8,4	
D.E.		1,6	

3.1.2 Bioensayo 2,4 D

El test de toxicidad aguda permitió determinar el porcentaje de organismos muertos en cada una de las concentraciones (ver Anexo 1 Tabla ii). Se obtuvo que con 96 horas de exposición el LC₅₀ para *Galaxias maculatus* fue de 855,1 mg/l alcanzándose una mortalidad del 100% a la máxima concentración de 2.000 mg/l (Figura 9). Resumen de resultados Tabla v

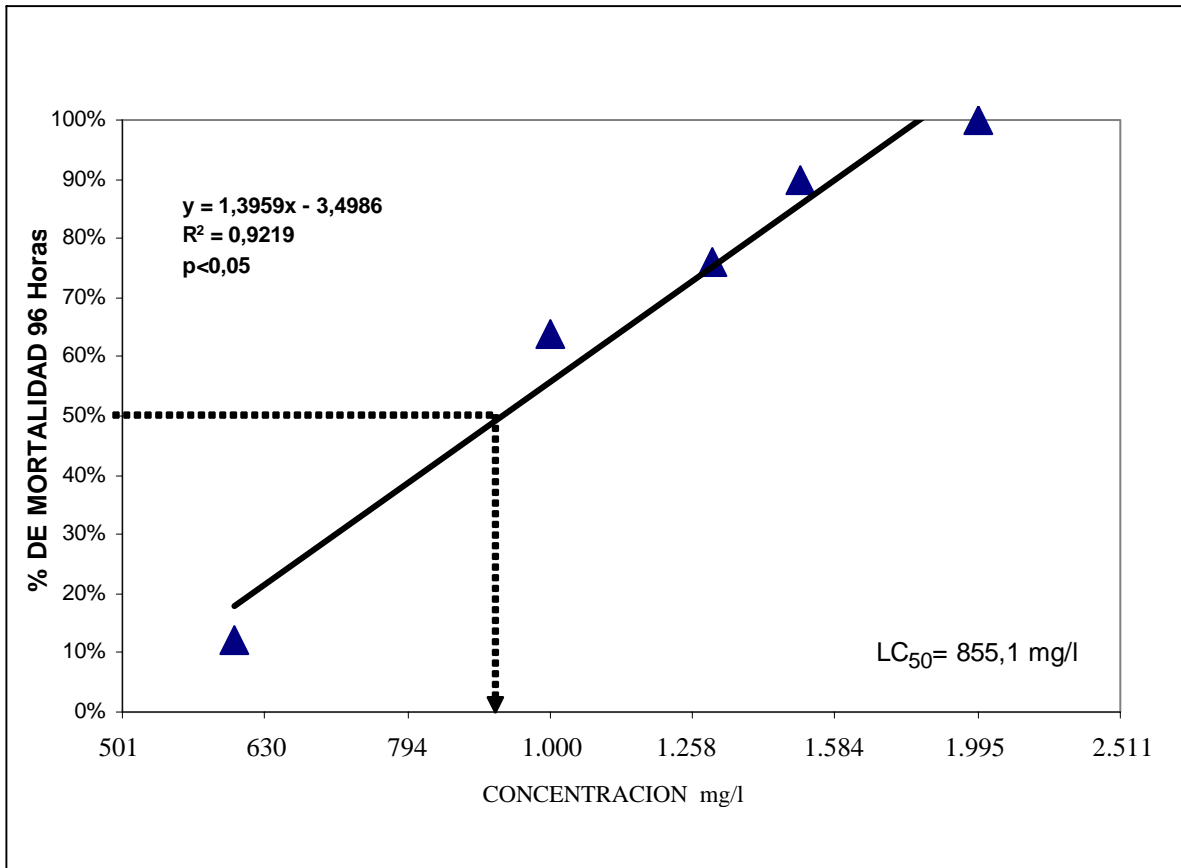


Figura 9. Mortalidad promedio (3 réplicas) v/s concentración de 2,4 D
y estimación del LC₅₀ 96 h para *Galaxias maculatus*

Tabla v. Resumen LC₅₀ 96 Horas por replica en el bioensayo con 2,4 D sobre *Galaxias maculatus*, intervalos de confianza al 95%, coeficiente de variación y desviación estándar

REPLICA	LIM.INFERIOR (mg/l)	LC₅₀ 96 HORAS (mg/l)	LIM. SUPERIOR (mg/l)
1	728,8	836,9	961,0
2	351,1	774,6	1.709,1
3	441,3	681,7	1.053,2
4	773,0	924,4	1.105,5
5	817,7	988,6	1.195,4
6	773,0	924,4	1.105,5
PROMEDIO	647,5	855,1	1.188,3
C.V.		13,3	
D.E.		113,4	

3.1.3 Estandarización de resultados con K₂Cr₂O₇

Respecto al ensayo ecotoxicológico utilizando K₂Cr₂O₇ con *Galaxias maculatus*, El test de toxicidad aguda permitió determinar el porcentaje de organismos muertos en cada una de las concentraciones (ver Anexo 1 Tabla iii) para estandarizar la sensibilidad de esta especie, se obtuvo que con 96 horas de exposición el LC₅₀ fue de 26,7 mg/l

alcanzándose una mortalidad del 75 % a la máxima concentración de 50 mg/l (Figura 10). Resumen de resultados Tabla vi.

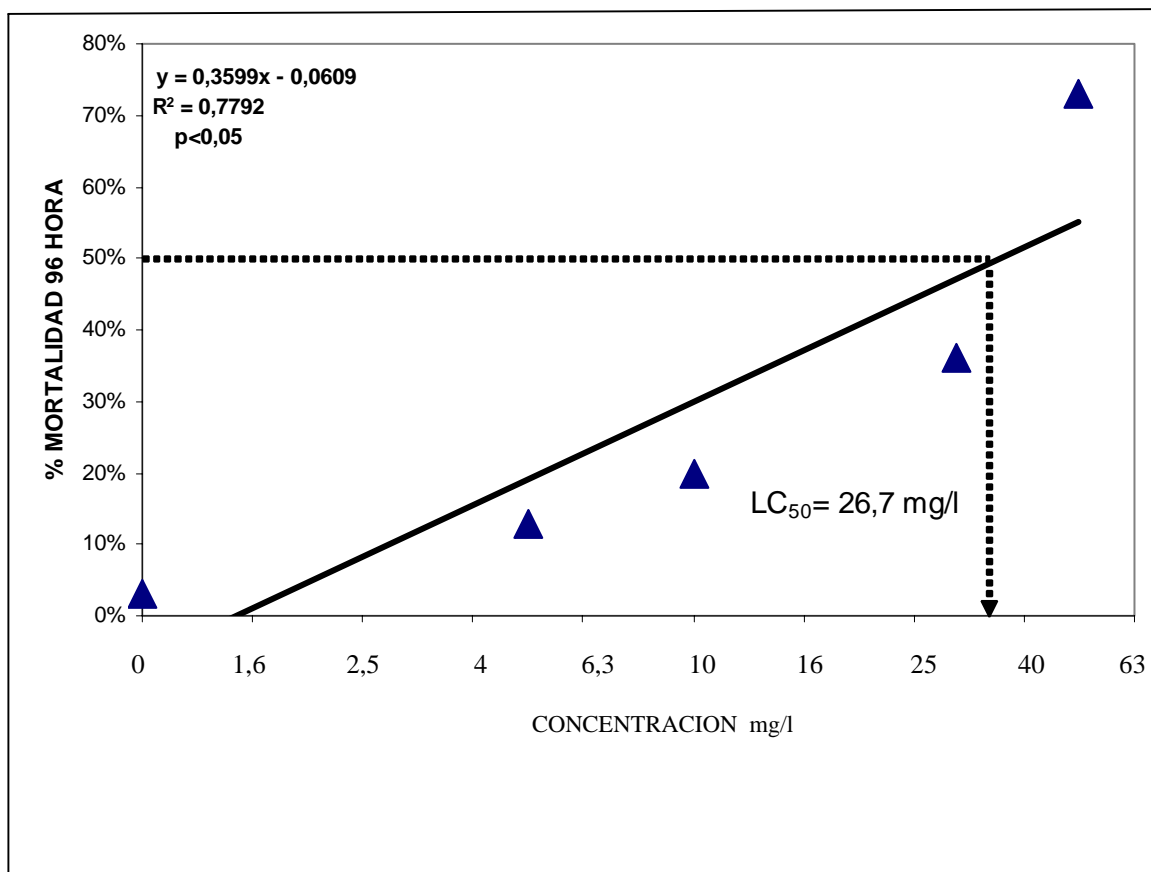


Figura 10. Mortalidad promedio (3 réplicas) v/s concentración de $K_2Cr_2O_7$

y estimación del LC_{50} 96 h para *Galaxias maculatus*

Tabla vi. Resumen LC₅₀ 96 Horas por replica en el bioensayo con K₂Cr₂O₇ sobre *Galaxias maculatus*, intervalos de confianza al 95%, coeficiente de variación y desviación estándar

REPLICA	LIM.INFERIOR (mg/l)	LC₅₀ 96 HORAS (mg/l)	LIM. SUPERIOR (mg/l)
1	22,1	38,7	67,8
2	9,7	15,6	25,0
3	18,3	25,9	36,7
PROMEDIO	16,7	26,7	43,2
C.V.		44,9	
D.E.		12	

3.2 Valores de toxicidad obtenidos de bases de datos

Los resultados de bases de datos para Carbendazim (ver Tabla vii), muestran que los valores de toxicidad van de ligeramente tóxico para *Galaxias maculatus* con un LC₅₀ 96 h de 18,9 mg/l, a altamente tóxico para *Oncorhynchus mykiss* con un LC₅₀ 96 h de 0,51 mg/l (PAN Pesticides Database) con un coeficiente de variación inferior al 10% para ambas especies.

Tabla vii. Database LC₅₀ 96 h en especies de salmonideos para Carbendazim

Nombre común	Nombre científico	Exposición	Promedio LC₅₀ (mg/l)	Desviación estándar	Promedio ranking especie *
Trucha Arcoiris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96 h	0,51	333,6	Altamente ^a Tóxico
Trucha Arcoiris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96h	0,024		Altamente ^b Tóxico
Trucha Arcoiris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96h	0,72		Altamente ^c Tóxico
Puye	<i>Galaxias maculatus</i>	96 h	18,9	113,4	Ligeramente ^d Tóxico

a PAN Pesticides Database

b ECOTOX Database USEPA

c The pesticide manual

d Bioensayo experimental

* Clasificación de acuerdo a Orme & Kegley (2004)

Los resultados de bases de datos para 2,4 D (ver Tabla viii), muestran que los valores de toxicidad para ambas especies varían bastante. Según PAN van de no tóxico para *Oncorhynchus mykiss* y *Galaxias maculatus* con un LC₅₀ 96 h de 410,4 y 855,1 mg/l respectivamente, hasta moderadamente tóxico de acuerdo a ECOTOX para *Oncorhynchus mykiss* con un LC₅₀ 96 h de 1,4 mg/l.

Tabla viii. Database LC₅₀ 96 h en especies de salmonideos para 2,4 D

Nombre común	Nombre científico	Exposición	Promedio LC₅₀ (mg/l)	Desviación estándar	Promedio ranking especie *
Trucha Arcoiris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96 h	410,4	881	No ^a Tóxico
Trucha Arcoiris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96 h	1,4	-	Moderadamente ^b Tóxico
Puye	<i>Galaxias maculatus</i>	96 h	855,1	78,1	No ^c Tóxico

a PAN Pesticides Database

b ECOTOX Database USEPA

c Bioensayo experimental

* Clasificación de acuerdo a Orme & Kegley (2004)

3.3 Evaluación del riesgo

La estimación del riesgo integrando los datos de exposición obtenidos a través de datos de monitoreo químico (PEC) y los datos de los efectos obtenidos por los bioensayos (PNEC), mostró valores superiores del PNEC que para el PEC y el cociente de riesgo (RQ) fue en ambos casos inferior a 1 (Tabla ix).

Tabla ix. Riesgo ecológico como cociente de riesgo (RQ) (Palma *et al.*, 2004)

Pesticida	PEC *	PNEC (LC_{50/100})	RQ
Carbendazim	0,04 µg/l	189 µg/l	2,1 E ⁻⁴
2,4 D	0,08 µg/l	8,551 µg/l	9,3 E ⁻⁶

PEC = concentración ambientalmente prevista

PNEC = concentración ambientalmente observada

* Datos recogidos de Palma *et al.*, (2004)

4. DISCUSIÓN

Se calcula que actualmente se usan más de 3500 plaguicidas orgánicos, todos ellos pueden ser agentes contaminantes al ser arrastrados por el agua desde los campos de cultivo hasta los ecosistemas acuáticos donde se introducen en las cadenas alimenticias provocando la muerte de varias formas de vida necesarias en el balance de algunos ecosistemas (Lomeli *et al.*, 2003).

Cada plaguicida después de haber sido aplicado o expuesto al ambiente actúa con una dinámica y un destino propio, de acuerdo a las propiedades mismas del plaguicida y a los diferentes compartimentos de los ecosistemas con los que tendrá que interactuar. El movimiento y la dispersión en los ecosistemas de un plaguicida son las causas de la contaminación ambiental. Su dispersión y destino final dependerá de las características del ecosistema y del plaguicida, tipo de formulación, método de aplicación, condiciones ambientales y agrícolas (OLCA 2002).

En Chile en áreas de agricultura intensiva, el agua es uno de los recursos que presenta un alto riesgo de contaminación por pesticidas, debido a la dinámica que presentan estos productos en el ambiente y los múltiples factores involucrados (características del suelo, clima, prácticas de manejo agrícola y forestal, entre otras), además los pesticidas usados en Chile se utilizan en cantidades superiores a la permitida (Poblete 2000).

En las cuencas de la IX Región los organismos que allí habitan son afectados por contaminación difusa (fertilizantes y plaguicidas) (TERRAM 1999).

Los plaguicidas especialmente fungicidas generalmente se aplican en época de lluvias desde fines de otoño a comienzos de primavera, la aplicación por vía aérea de éstos sobre huertos inundados y la escasez de cubierta vegetal en invierno hasta principios de primavera disminuyen la intercepción de fungicidas potenciando su llegada a los cuerpos de agua (CDFG 1999).

Los pesticidas Carbendazim y 2,4 D son ampliamente utilizados en la actividad agrícola de la IX Región, Además de acuerdo al modelo de fugacidad propuesto por Olave 2001 los plaguicidas a trabajar fueron seleccionados por sus propiedades físico-químicas considerando; % Distribución en el agua, Carga total, Toxicidad y Persistencia en el ambiente (ver Tabla x).

Tabla x. Propiedades físico-químicas para elección pesticidas (Olave 2001)

Pesticidas	% Distribución en el agua	Carga total Kg.	Toxicidad en Peces LC₅₀ (µg/l)	T_{1/2} Suelo (días)
Carbendazim	96,24	267	8,30 E ²	120
2,4 D	99,98	53,63	1,10 E ³	18

Se pone de manifiesto que incluso algunos efluentes que son lanzados cumpliendo con las exigencias establecidas en la legislación vigente estarían afectando negativamente a la flora y fauna autóctonas de los cursos receptores, ésto reafirma lo dicho sobre la necesidad del uso de técnicas que puedan prever el impacto de agentes químicos sobre los organismos acuáticos. Para ello los ensayos de toxicidad con especies nativas, en este estudio *Galaxias maculatus*, deberían ser considerados indispensables en el control, evaluación y monitoreo de la polución hídrica (Zanuzzi *et al.*, 2005).

Para la caracterización de la exposición primera etapa en una valoración de riesgo la medición y/o estimación de la concentración de los contaminantes en el ambiente, puede ser realizada mediante recopilación de información existente, programas de monitoreo o por estimaciones basadas en modelos (modelos de dispersión) que incorporan información relativa a los patrones de descarga (Encina y Díaz 2001), para este estudio se utilizó información originada en programas de monitoreo ya que éstos proveen evidencia empírica que permite relacionar la exposición con los efectos.

La segunda etapa de una valoración de riesgo corresponde a la evaluación de los efectos ecológicos a la exposición (EPA 1998). Esta fase se realizó mediante ensayos ecotoxicológicos de toxicidad aguda los que indicaron que *Galaxias maculatus* mostró ser más tolerante a los efectos agudos que *Oncorhynchus mykiss*. Cuan tolerante es *Galaxias maculatus* a los contaminantes no se sabe, pero esta especie es claramente más tolerante que los salmonídeos a amplios rangos de pH, Temperatura, salinidad y bajas de oxígeno (Richardson 1991).

Cabe señalar que actualmente *Galaxias maculatus* “Puye” según últimas investigaciones se clasifica dentro del orden Osmeriforme, sin embargo, su biología sigue estando muy emparentada a la de los salmonídeos por lo cual éstos son utilizados como punto de comparación en este estudio, el salmonídeo de comparación es *Oncorhynchus mykiss* por lo ya mencionado y porque la sensibilidad de esta especie a diferentes tóxicos esta ampliamente registrada en bases de datos, además de ocupar el mismo hábitat por distribución y viéndose expuesta a los mismos contaminantes que *Galaxias maculatus* (Rolando Vega comunicación personal 2004).

La clasificación de toxicidad aguda en bioensayos se realizó de acuerdo a lo señalado por Orme & Kegley (2004) quien establece 5 categorías; muy altamente tóxico (0-0,1 mg/l), altamente tóxico (0,1-1 mg/l), moderadamente tóxico (1-10 mg/l), ligeramente tóxico (10-100 mg/l) y no tóxico (> 100 mg/l).

Como resultado del bioensayo con Carbendazim sobre *Galaxias maculatus*, se obtuvo que con 96 horas de exposición el LC₅₀ fue de 18,9 mg/l superando los valores para *Oncorhynchus mykiss* con un LC₅₀ 96 h de 0,51 mg/l (PAN 2004), lo que estaría indicando que *Galaxias maculatus* es menos sensible y mas tolerante a esta sustancia que *Oncorhynchus mykiss*.

Galaxias maculatus para Carbendazim entro en el rango de ligeramente tóxico, siendo la concentración registrada en la base de datos PAN 2004 para *Oncorhynchus mykiss* altamente tóxica.

La toxicidad aguda del Carbendazim es leve según EPA 2002. Los rangos de toxicidad aguda en peces para el Carbendazim van de prácticamente no tóxico a muy alta toxicidad, los resúmenes para datos crónicos en peces y otros indican efectos acumulativos, conducta y mortalidad (PAN 2004).

El Carbendazim es uno de los fungicidas más estudiado, pues presentaría riesgo para organismos acuáticos e invertebrados acuáticos, test de laboratorio muestran que es altamente tóxico para organismos acuáticos (Palawski *et al.*, 1986). EPA señala al Carbendazim como posible agente cancerígeno, sospechoso disruptor endocrino y que no es inhibidor de la colinesterasa. Esta en duda si es un gran contaminante del agua y tóxico en la reproducción o desarrollo de organismos acuáticos.

Resultados de la aplicación del modelo de fugacidad por Olave (2001) evidencian la presencia de Carbendazim en el agua, estimando concentraciones de 0,423 a 0,79 ug/l sobre cuencas de la IX región, Carbendazim corresponde al pesticida con mayor peligro de riesgo al considerar parámetros tales como toxicidad en peces (0,83 mg/l), persistencia en el ambiente (120 días) carga de pesticida que difunde hacia las cuencas (267 kg.), Sin embargo, la alta toxicidad del Carbendazim al parecer no se vería en el medio natural pues es fuertemente absorbido por la materia orgánica del suelo, así sólo los organismos vivientes en el sedimento probablemente recibirían alta exposición (Palawski *et al.*, 1986).

Como resultado del bioensayo con 2,4 D sobre *Galaxias maculatus* este pez mostró ser más tolerante en comparación a *Oncorhynchus mykiss* al igual que en el caso del

Carbendazim. Se obtuvo que con 96 horas de exposición el LC₅₀ fue de 855,1 mg/l para *Galaxias maculatus*, la revisión de las bases de datos muestran que *Oncorhynchus mykiss* presenta un LC₅₀ 96 h de 410,4 mg/l, entrando ambos en la categoría de no tóxicos. (PAN 2004), sin embargo ECOTOX 2004 indica cierta toxicidad en *Oncorhynchus mykiss* 1,4 mg/l.

Pese a no mostrar toxicidad aguda en este estudio el 2,4 D es considerado un contaminante de riesgo, ya que es bien conocido que este compuesto es moderadamente tóxico, hay poca información disponible de los mecanismos a nivel celular de su toxicidad, resultados en carcinogenicidad, genotoxicidad y mutagenicidad son contradictorios pero efectos neurotóxicos, inmunosupresivos y hepatotóxicos han sido definidos (Tuschl *et al.*, 2002).

2,4 D es altamente tóxico para peces y tiene efectos adversos sobre humanos y animales, también se acumula en tejidos y causa envenenamiento agudo (Sarıkaya *et al.*, 2003). Aunque su toxicidad ha sido un tópico de extensiva investigación, no se han sacado conclusiones definitivas concernientes a sus efectos cancerígenos, mutagénicos o genotoxicidad (Kaioumova *et al.*, 2001).

El 2,4 D produce efectos tóxicos en animales y humanos en rangos desde embriotoxicidad y teratogenicidad a neuro, inmuno y hepatotoxicidad estudios recientes sobre DNA muestran escaso potencial carcinogénico (Tuschl *op cit.*).

El amplio uso del 2,4 D (ácido clorofenoxiacético) como herbicida y regulador del crecimiento en agricultura, silvicultura y jardinería ha incrementado el daño incurrido por estos compuestos tóxicos sobre el medio ambiente y salud humana. Los químicos agrícolas contaminan todo el medio abiótico particularmente agua y suelo. La contaminación de aguas subterráneas y otras fuentes de agua por químicos agrícolas pone una potencial amenaza para organismos acuáticos y peces (Sarıkaya *et al.*, 2003). Además otro hecho importante es que el ácido diclorofenoxiacético “2,4 D” y sus derivados son los herbicidas más ampliamente usados para el control del crecimiento de plantas de hoja ancha y plantas leñosas en el mundo (Tuschl *et al.*, 2002).

La estandarización de *Galaxias maculatus* con $K_2Cr_2O_7$ fue de 26,7 mg/l. variando poco de la estandarización registrada en bases de datos para *Oncorhynchus mykiss* de 66,7 mg/l. entrando ambas en la categoría de ligeramente tóxicos (PAN 2004).

La caracterización del riesgo ecológico corresponde a la fase final de la valoración del riesgo ecológico, esta se realiza sobre la base de la integración de los datos y/o estimaciones de la exposición y del efecto, dependiendo del tipo de datos, el riesgo puede expresarse cuantitativamente o cualitativamente, como la probabilidad de que un efecto adverso pueda ocurrir como resultado de la exposición a un determinado contaminante (EPA 1998). La evaluación del riesgo ecológico tanto como para Carbendazim que para 2,4 D el cociente “RQ” fue muy por debajo a la unidad lo que indica que no hay probabilidad que ocurra daño en el ambiente.

El “PEC” fue mas bajo que el “PNEC” para ambas sustancias lo que indicaría que no se anticipan efectos adversos. Si después de una evaluación de riesgo se llega a la conclusión de que no existe un riesgo inherente importante sobre el ecosistema no es necesario pasar a la etapa de manejar el riesgo ecológico y tomar decisiones (PNUMA 1999).

5. CONCLUSIONES

- La toxicidad del Carbendazim mediante bioensayos de toxicidad aguda a las 96 h. indica que éste es ligeramente tóxico en *Galaxias maculatus*.
- La toxicidad del 2,4 D mediante bioensayos de toxicidad aguda a las 96 h. indica que éste no presenta toxicidad sobre *Galaxias maculatus*.
- *Galaxias maculatus* es mas tolerante al Carbendazim y 2,4 D que *Oncorhynchus mykiss* especie estandarizada en bases de datos de PAN y EPA.
- El Carbendazim y 2,4 D no presentarían riesgo ecológico.

6. BIBLIOGRAFÍA

- **Campos H. (1993).** Peces del río Bío-Bío. Editores Francisco Farada – Oscar

Parra EULA Universidad de Concepción, Chile. 100 pp.

- **Castañeda O. (1999).** Determinación de la toxicidad en lodos generados por una planta potabilizadora, utilizando bioensayos. CENAPRED, México. 15 pp.

- **CDFG The California Department of fish and game (1999).** Administrative report. Hazard assessment of the fungicides Benomyl, Captan, Chloro thalonil, Maneb and Ziram to aquatic organism.. State of California, USA. 66 pp.

- **Cepeda W. (2000).** Estimación del riesgo ecológico asociado a las descargas de efluentes urbanos en el curso medio del río Cautín comuna de Temuco, IX región. Tesis presentada a la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de Temuco, Chile, para Optar al Grado de Licenciado en Recursos Naturales. 55 pp.

- **CETESB (1990)**. Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. Companhia de tecnologia de saneamento ambiental. Sao Paulo, Brasil. 18 pp.

- **Decreto 609 (1998)**. Normas de emisión para la regulación de contaminantes asociadas a descargas de residuos industriales líquidos a sistemas de alcantarillado

- **Encina F & O. Díaz (2000)**. Contaminación, estimación del riesgo ecológico y protección asociado de algas bentónicas marinas. Universidad Católica de Temuco- Universidad de Chile. 13 pp.

- **EPA (2002)**. Attributes of fish that make them desirable components of biological assessments and monitoring programs

http: // www.epa.gov

- **EPA (2002).** Ecotox database

http: // www.epa.gov/ecotox/

- **EPA (1998)** Guidelines for Risk Assessment. Washington DC, USA. 114 pp.

- **Gharda (2001).** Agrochemical Carbendazim

http:// www.gharda.com.mht

- **González C. (1985).** Introducción a la Fitopatología Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura San José de Costa Rica. 150 pp.

- **Hoechs de Chile (1988).** Química y Farmacéutica Agroquímicos cuarta edición Santiago. 280 pp.

- **Jaksic F. & P. Ojeda (2003).** Estándares secundarios de calidad ambiental en Chile, Departamento de Ecología Universidad Católica de Chile. 23 pp.

- **Kaioumova D., F. Kaioumov, F. Opelz & C. Süsal (2001).** Chemosphere. Toxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on lymphoid organs of the rat. Heidelberg, Germany. 801-805 pp.

- **Kooplin M. (2001).** Toxicology ambient The University of Arizona center for toxicology

<http://www.pharmazy.arizona.edu>

- **KRISTAL (1997).** Proposición de normas de calidad de agua para proteger usos determinados, Santiago, Chile. 180pp.

- **Larraín A. (1995).** Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad. Ciencia y Tecnología Marina CONAMA, Chile (Nº especial). 39-47 pp.

- **Latorre B. (1989).** Fungicidas y Nematicidas avance y aplicabilidad (colección en agricultura) publicación Facultad de Agronomía Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 216 pp.

- **Loewy R. (2000).** Plaguicidas en aguas subterráneas del alto valle de Río Negro Neuquén. Tesis de maestría en ciencias químicas, Universidad Nacional de Comahue, Argentina. 162 pp.

- **Lomeli M. y R. Tamayo (2003).** Deterioro ambiental, Contaminación del agua

<http://www.sagan-gea.org>

- **Lagos M. (2000).** Caracterización del uso de Pentaclorofenato de Sodio (NaPCP) y determinación de sus efectos ecotoxicológicos de NaPCP residual del suelo y aguas subterráneas, asociado a actividades de la industria maderera de la provincia de Cautín, IX región Chile. Tesis presentada a la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de Temuco para optar al grado de Licenciado en Recursos Naturales. 137 pp.

- **Lopretto C. y G. Tell (1995).** Ecosistemas de aguas continentales metodologías para su estudio. Ediciones Sur, Argentina. 377 pp.

- **Olave Y. (2001).** Propuesta de monitoreo de pesticidas en la subcuenca del río Traiguén, Chile, Tesis presentada a la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de Temuco para optar al grado de Licenciado en Recursos Naturales. 113 pp.

- **OLCA (2002).** Plaguicidas en Chile

[http:// www.relca.net/oca/](http://www.relca.net/oca/)

- **Orme & Kegley (2004).** PAN Pesticide Database Toxicity studies for pesticides on all organism groups- Toxicology studies on aquatic organism from science journals

[http:// www.Pesticideinfo.org](http://www.Pesticideinfo.org)

- **Palawski D. & C. Knowles (1986).** Journal Environmental Toxicology Chem. Toxicological studies of Benomyl and Carbendazim in Rainbow Trout, Channel Catfish and Bluegills. 1039-1046 pp.

- **Palma G., A. Sanchez, Y. Olave, F. Encina, R. Palma & R. Barra (2004).** Pesticide levels in surface waters in an agricultural–forestry basin in Southern Chile. Chemosphere. 763-770 pp.

- **PNUMA/IPCS (1999).** Modulo de capacitación N°3. Evaluación de riesgos químicos. Programa de las Naciones Unidas para el medio Ambiente, La organización internacional del trabajo y La organización mundial de la salud. 239 pp.
- **Poblete M. (2000).** Medio Ambiente y Calidad de Vida volumen 1, N°4. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile. 30 pp.
- **Richardson J. (1991).** Journal the fish biology and freshwater research. Acute toxicity of ammonia to juvenile “Inanga” (*Galaxias maculatus* Ministry of Agriculture and Fisheries, New Zealand. 185-190 pp.
- **Rubin J., F. Tapia, A. Llarena, M. Pérez & R. Barra (1993).** En el V encuentro científico sobre el medio ambiente. CIMPA, Temuco, Chile. 14 pp.
- **Sarikaya R. & M. Yilmaz (2003).** Chemosphere. Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behaviour of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae) Department of Biology Education, Gazi University, Ankara, Turkey. 195-201 pp.

- **Tortorelli M, W. Di Marzio, M. Saézn & J. Alberdi (1994).** Ensayos ecotoxicológicos con organismos acuáticos para la evaluación de la contaminación ambiental. Curso de postgrado. Laboratorio de Ecotoxicología. Universidad Nacional de Luján, Argentina. 182 pp.

- **Tuschl H. & C. Schwab (2002).** Food and Chemical Toxicology volume 41. Cytotoxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in HepG2 cells. Department of Toxicology. Seibersdorf, Austria. 385-393 pp.

- **UNAM, UAM & CCH (2001).** Medio ambiente, plaguicidas

<http://www.Sagan-gea.org>

- **USGS. Science for a Changing World (2000).** Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) Program: Selected Methods for Monitoring Chemical Contaminants and their Effects in Aquatic Ecosystems. Editors Christopher J. Schmitt, Gail M. Dethloff, USA. 81 pp.

- **Vega, R., I. Valdebenito, J. Bariles, P. Dantagnan, A. Bórquez & A. Mardones (1996).** Estado actual de la investigación y desarrollo de la tecnología para el cultivo comercial del puye. (*Galaxias maculatus*). IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura y 2º Simposio de Avances y Perspectivas de la Acuicultura en Chile. Coquimbo, Chile: 81-95.

- **Zanuzzi A. (2005).** Ensayos de toxicidad en agua con especies nativas Córdoba, Argentina

[http:// www.estrucplan.com.ar](http://www.estrucplan.com.ar)

ANEXO 1

Tabla i. Mortalidad *Galaxias maculatus* con Carbendazim LC₅₀ 96 horas

acuario	concentración	Mortalidad	Mortalidad	Acumulado	Mortalidad	Acumulado	Mortalidad	Acumulado
		24 h	48 h	48 h	72 h	72 h	96 h	96 h
10	30 mg/l	0	0	0	1	1	4	5
1	30 mg/l	0	5	5	0	5	0	5
5	30 mg/l	0	0	0	2	2	2	4
16	20 mg/l	0	0	0	0	0	2	2
12	20 mg/l	0	0	0	0	0	3	3
3	20 mg/l	0	1	1	0	1	0	1
5	15 mg/l	0	0	0	0	0	2	2
6	15 mg/l	0	0	0	0	0	1	1
11	15 mg/l	0	0	0	0	0	1	1
14	10 mg/l	0	0	0	0	0	0	0
17	10 mg/l	0	0	0	0	0	0	0
18	10 mg/l	0	0	0	0	0	2	2
4	5 mg/l	0	0	0	0	0	0	0
13	5 mg/l	0	0	0	0	0	0	0
9	5 mg/l	0	0	0	0	0	0	0
8	control	0	0	0	0	0	0	0
2	control	0	0	0	0	0	0	0
7	control	0	0	0	0	0	0	0

acuario	concentración	Mortalidad	Mortalidad	Acumulado	Mortalidad	Acumulado	Mortalidad	Acumulado
		24 h	48 h	48 h	72 h	72 h	96 h	96 h
35	30 mg/l	0	1	1	1	2	3	5
34	30 mg/l	2	2	2	4	4	0	4
25	30 mg/l	0	0	0	1	1	2	3
32	20 mg/l	0	0	0	1	1	2	3
28	20 mg/l	0	0	0	1	1	2	3
31	20 mg/l	0	0	0	0	0	0	0
30	15 mg/l	0	0	0	0	0	1	1
19	15 mg/l	0	0	0	2	2	0	2
21	15 mg/l	0	0	0	0	0	0	0
23	10 mg/l	0	0	0	0	0	0	0
26	10 mg/l	1	0	0	1	1	0	1
29	10 mg/l	0	0	0	1	1	1	2
33	5 mg/l	0	0	0	0	0	1	1
27	5 mg/l	0	0	0	0	0	0	0
22	5 mg/l	0	0	0	1	1	0	1
36	control	0	0	0	0	0	0	0
32	control	0	0	0	0	0	0	0
24	control	0	0	0	0	0	0	0

Tabla ii. Mortalidad *Galaxias maculatus* con 2,4 D LC₅₀ 96 horas

acuario	concentración	Mortalidad 24 h	Mortalidad 48 h	Acumulado 48 h	Mortalidad 72 h	Acumulado 72 h	Mortalidad 96 h	Acumulado 96 h
4	2.000 mg/l	5	0	5	0	5	0	5
17	2.000 mg/l	2	2	4	1	5	0	5
18	2.000 mg/l	2	3	5	0	5	0	5
6	1.500 mg/l	1	3	4	1	5	0	5
12	1.500 mg/l	2	0	2	2	4	1	5
15	1.500 mg/l	1	4	5	0	5	0	5
10	1.300 mg/l	0	3	3	1	4	0	4
13	1.300 mg/l	0	3	3	1	4	1	5
3	1.300 mg/l	0	1	1	4	5	0	5
2	1.000 mg/l	2	0	2	1	3	1	4
14	1.000 mg/l	1	1	1	1	2	1	3
16	1.000 mg/l	0	0	0	3	3	1	4
8	600 mg/l	0	1	1	1	2	0	2
11	600 mg/l	1	0	1	1	2	0	2
5	600 mg/l	0	0	0	0	0	0	0
9	control	0	0	0	0	0	0	0
1	control	0	0	0	0	0	0	0
7	control	0	0	0	0	0	0	0

acuario	concentración	Mortalidad 24 h	Mortalidad 48 h	Acumulado 48 h	Mortalidad 72 h	Acumulado 72 h	Mortalidad 96 h	Acumulado 96 h
28	2.000 mg/l	3	1	4	1	5	0	5
27	2.000 mg/l	2	2	4	0	4	1	5
33	2.000 mg/l	4	1	5	0	0	0	5
30	1.500 mg/l	1	3	4	1	5	0	5
34	1.500 mg/l	0	3	3	1	4	1	5
21	1.500 mg/l	1	0	1	1	2	0	2
32	1.300 mg/l	2	0	2	0	2	1	3
31	1.300 mg/l	2	1	3	1	4	0	4
20	1.300 mg/l	0	0	0	0	0	2	2
26	1.000 mg/l	0	1	1	1	2	2	4
22	1.000 mg/l	0	1	1	1	2	1	3
19	1.000 mg/l	1	0	1	0	1	0	1
36	600 mg/l	0	0	0	0	0	0	0
29	600 mg/l	0	0	0	0	0	0	0
23	600 mg/l	0	0	0	0	0	0	0
35	control	0	0	0	0	0	0	0
25	control	0	1	1	1	2	0	2
24	control	0	0	0	0	0	0	0

Tabla iii. Mortalidad *Galaxias maculatus* con $K_2Cr_2O_7$ LC₅₀ 96 horas

acuario	concentración	Mortalidad 24 h	Mortalidad 48 h	Acumulado 48 h	Mortalidad 72 h	Acumulado 72 h	Mortalidad 96 h	Acumulado 96 h
10	50 mg/l	0	1	1	0	1	5	6
1	50 mg/l	3	4	7	1	8	2	10
5	50 mg/l	3	2	5	0	5	4	9
16	30 mg/l	0	2	2	0	2	0	4
12	30 mg/l	0	1	1	2	3	1	4
3	30 mg/l	1	1	2	2	4	1	5
5	10mg/l	0	1	1	0	1	0	1
6	10 mg/l	1	0	1	1	2	2	4
11	10 mg/l	0	0	0	1	1	0	1
14	5 mg/l	0	0	0	1	1	1	2
17	5 mg/l	1	0	1	0	1	1	2
18	5 mg/l	0	0	0	0	0	0	0
4	1 mg/l	0	0	0	0	0	0	0
13	1 mg/l	0	0	0	0	0	0	0
9	1 mg/l	0	0	0	0	0	1	1
8	control	0	0	0	0	0	0	0
2	control	0	0	0	0	0	0	0
7	control	0	0	0	0	0	0	0

ANEXO 2

Pesticidas utilizados Bioensayos

1. Duett (Fabricación BASF)



Figura 1. Fungicida Duett

Formulación: Epoxinaxol.....	125 g/l
Carbendazim.....	125 g/l
Ingredientes inertes.....	750 g/l

Fungicida formulado a base de dos materias activas de dos materias activas Epoxiconazol (inhibidor de la síntesis del ergosterol mas Carbendazim con acción preventiva curativa y erradicante altamente eficaz para el control de enfermedades foliares y otros cereales con prolongada persistencia de acción, Autorizado SAG N° 2346.

2. Arco 2,4 D 480 SL (Fabricación ANASAC)



Figura 2. Herbicida Arco 2,4 D

Formulación: 2,4 D (Acido 2,4 dicloro fenoxiacético).....480 g/l

Auxiliares de formulación y sustancias acompañantes

Herbicida sistémico hormonal recomendado en aplicación postemergentes para el control selectivo y eficaz de malezas hoja ancha en cultivos de cereales y maíz. Además se utiliza en barbechos químicos, control de malezas arbustivas y tratamientos de sitios, Autorizado SAG N° 3233.