



INFORME FINAL

Beca de Entrenamiento 2015

Efectos biológicos de plaguicidas en cuerpos de agua asociados a agroecosistemas de la Provincia de Buenos Aires

Tomás M. Mac Loughlin

Directora: Dra. Leticia Peluso

Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIMA)
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata

1. Introducción

1.1 Generalidades

La agricultura es uno de los pilares fundamentales de la economía argentina. Desde la década de los años 90, con la introducción de los organismos genéticamente modificados (OGMs), resistentes a distintos factores adversos para los cultivos (Solbrig, 2004), como plagas o sequía, se desencadenó un cambio en la forma de producción y la tecnología empleada. Es así, que hoy en día la producción se basa en paquetes tecnológicos, que incluyen semillas transgénicas, plaguicidas y el proceso de siembra directa (Demetrio, 2012). Las demandas de mercado y el avance de la tecnología agropecuaria han conducido a la homogenización del paisaje agrícola (Aizen *et al.*, 2009). En particular, la superficie implantada de soja ha incrementado exponencialmente (**Figura 1**) resultado de: la aptitud de muchos de los biomas de nuestro país para este cultivo, el precio creciente de este producto en los mercados internacionales y los altos rendimientos de las variedades genéticamente modificadas (Donald, 2004; INTA, 2004; Satorre, 2005). Este aumento en la producción conlleva un incremento proporcional en la cantidad de plaguicidas utilizados. Los mismos incluyen un enorme grupo de compuestos orgánicos que pertenecen a diferentes familias químicas, los cuales juegan un importante rol en el aumento de la productividad (Matson *et al.*, 1997; INTA, 2012).

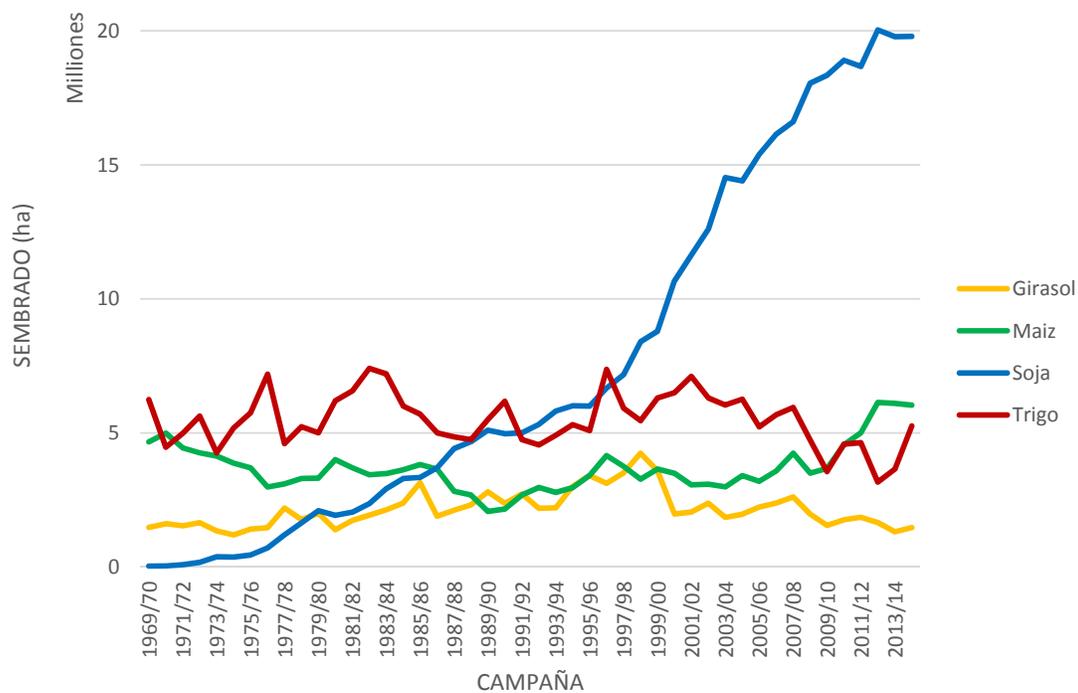


Figura 1. Crecimiento de la superficie sembrada en el país. Elaboración propia, fuente: SIIA.

En los últimos 22 años, al mismo tiempo que se expandió la frontera soja y el uso de variedades transgénicas, el consumo de plaguicidas aumentó un 858%, mientras que la superficie cultivada lo hizo en un 50% y el rendimiento de los cultivos sólo en un 30% (CASAFE, 2012). En consecuencia, el modelo de producción actual tiene un paquete tecnológico de base química que hace uso de volúmenes cada vez mayores de formulaciones de distintos plaguicidas. Este se debe a que los monocultivos y la aplicación continua de determinados activos de plaguicidas pueden llevar a la generación de resistencia en los organismos que pretenden controlar (Heap, 2014). Traducido a números, esto significa que según la última publicación de CASAFE, en el año 2012, se aplicaron más de 317 millones de kg/litros de plaguicidas en el territorio argentino, con una estimación actual superior a los 400 millones.

En la última década, en la Provincia de Buenos Aires, el área sembrada creció 42%. De la superficie abocada al sector agrícola el 80% se destina a la producción de cuatro cultivos: soja (6584272 ha sembradas en campaña 2014/15), trigo (2187415 ha), maíz (1561280 ha), y girasol (835150 ha). Sin embargo, el sector agrario está cada vez más concentrado en la actividad sojera, creciendo la superficie cultivada por esta oleaginosa 111% desde 2003 hasta 2013, ocupando casi la mitad de la superficie cultivada en la Provincia (CASAFE, 2012; SIIA, 2015). La Plata no queda exenta de esta realidad, ya que en la campaña 2014/15 se sembraron superficies de 300 hectáreas (ha) de soja, 200 ha de maíz, y 100 de sorgo (SIIA, 2016).

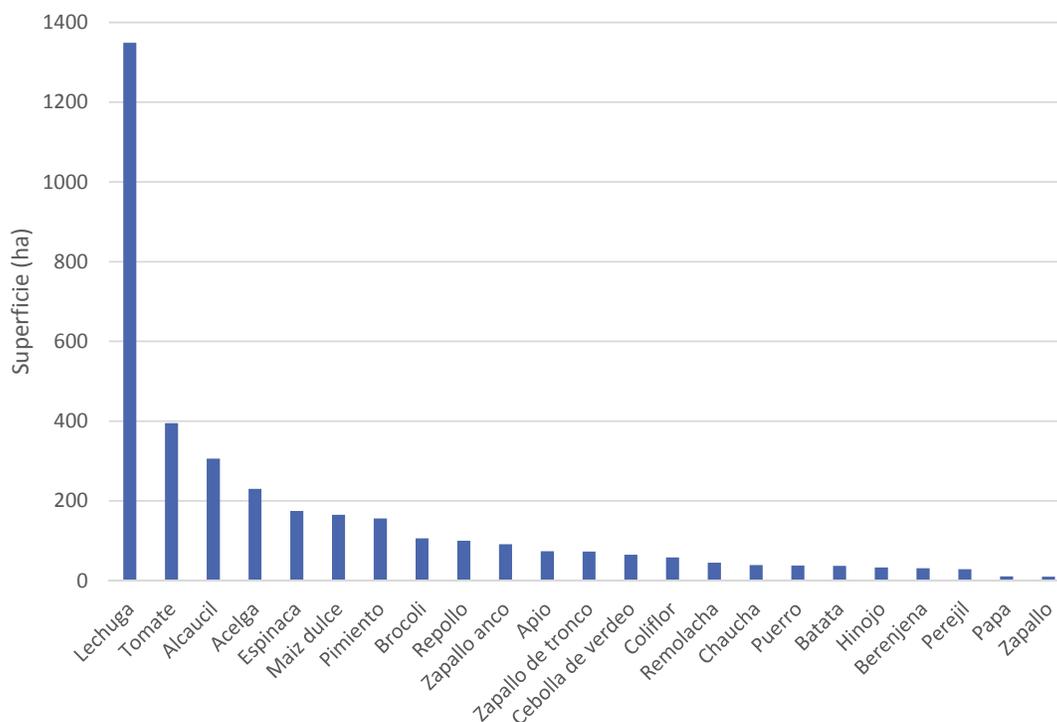


Figura 2. Principales cultivos hortícolas (mayores a 10 ha) en Cinturón del Gran Buenos Aires: Sur: La Plata, Florencio Varela, Berazategui y Esteban Echeverría. Elaboración propia, fuente: Defensor del Pueblo.

Sin embargo, la principal actividad productiva en el partido de La Plata no es la agricultura extensiva de granos, sino el cultivo hortícola. En los últimos 20 años, el Cinturón Hortícola Platense ha crecido tanto en su superficie cultivada como en productividad e importancia, a nivel regional, provincial y nacional. Muchos han sido los factores que han facilitado y hasta potenciado este auge. Uno de ellos ha sido la temprana, profunda y continua incorporación de la tecnología del invernáculo, caracterizada por estructuras de madera recubiertas con polietileno que buscan controlar el ambiente. Además del control del ambiente, el resto de los factores productivos están más cercanos al óptimo de cada cultivo, lo que trae como consecuencia un rendimiento y calidad del producto comercial superior. Según el Censo Hortiflorícola de Buenos Aires (2006), el Cinturón Hortícola Platense cuenta con una superficie de 2880 hectáreas de explotaciones hortiflorícolas, de las cuales 1888 ha (65,56%) son a campo y 992 ha (34,44%) son bajo cubierta. De los principales cultivos que se producen en la región (**Figura 2**) se destacan las distintas variedades de lechuga (capuchina, crespita, criolla, mantecosa, etc.), seguida en un distante segundo puesto por el tomate (se listan aquellos que ocupan más de 10 hectáreas).

Este modelo tecnológico posee una serie de exigencias, entre ellas: la alta demanda y dependencia de agroquímicos (García, 2011, Sarandón *et al.*, 2015). Por ejemplo, en los cultivos de tomate; se contabilizaron el uso de más de 60 principios activos. Esto no sólo plantea un problema de contaminación ambiental, sino que, a su vez, los plaguicidas contaminan a los alimentos tornándolos de consumo riesgoso para la población. Según estudios realizados, el caso más problemático lo constituyen las hortalizas para el consumo en fresco donde el tiempo de carencia no es respetado por los productores a lo que se suma la inexistencia de controles en los mercados concentradores (Souza Casadinho, 2009).

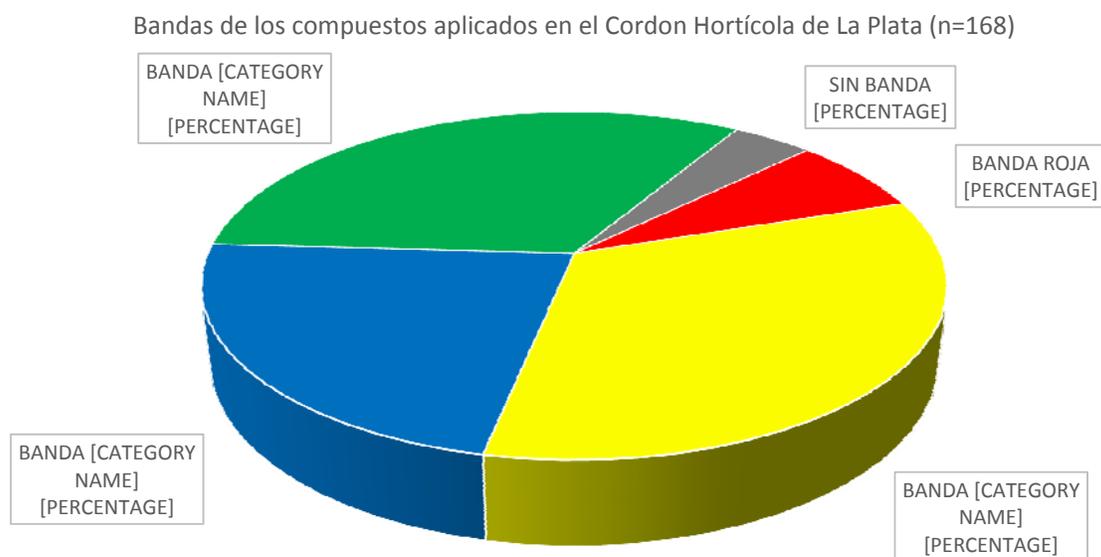


Figura 3. Distribución de las bandas, que da idea de la toxicidad de los compuestos, para el Cordón Hortícola de La Plata.

De acuerdo al Relevamiento de la utilización de agroquímicas en la Provincia de Buenos Aires, Mapa de situación e incidencia sobre la salud (2015), elaborado en conjunto entre el Defensor del Pueblo y profesionales de la Universidad Nacional de La Plata, en el Cordón se aplican 168 compuestos activos, de distintas categorías toxicológicas y bandas, para las distintas producciones (**Figura 3**). En consecuencia, la ciudad posee el valor más alto del índice de peligrosidad hortícola (**Figura 4**), resultado de la cantidad de activos que se usan para cada producción, la peligrosidad de dicho activo, y la superficie cultivada, entre otros factores.

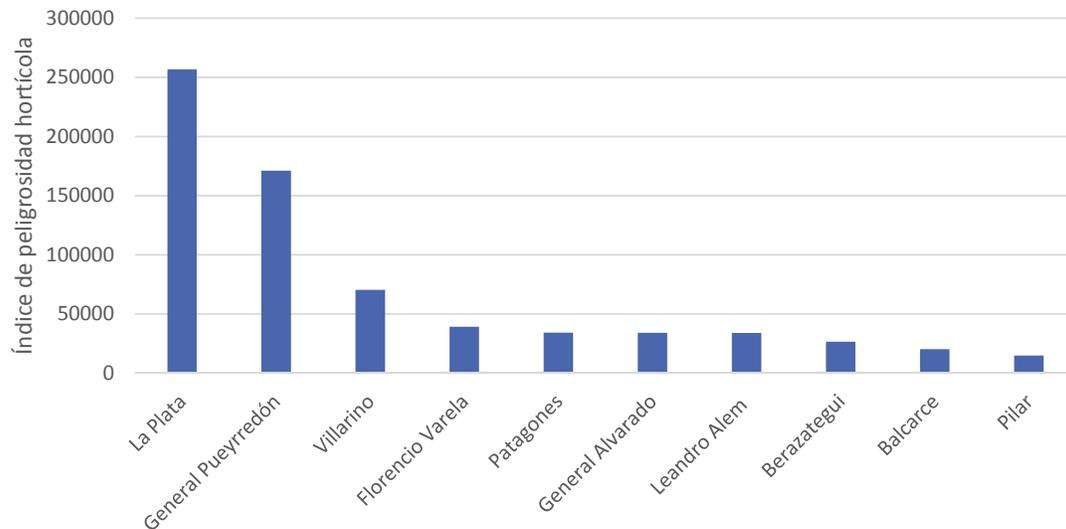


Figura 4. Partidos de la provincia de Buenos Aires con los 10 mayores índices de peligrosidad hortícola. Elaboración propia, fuente: Defensor del Pueblo.

Cabe destacar que, entre los activos de banda roja, que el estudio menciona, se encuentra el endosulfán, un insecticida organoclorado que desde julio de 2012 está prohibida la importación del principio activo y sus productos formulados, y desde de julio 2013 está prohibida la elaboración, formulación, comercialización y uso de productos que lo contengan (SENASA, Resolución 511/2011).

1.5 Ensayos ecotoxicológicos

Las actividades agrícolas como la labranza, drenaje, intercalado y rotación de cultivos, el pastoreo y el uso extensivo de pesticidas y fertilizantes tienen implicaciones significativas para las especies silvestres de flora y fauna (McLaughlin & Mineau, 1995). Tal como se menciona en los apartados anteriores, la dinámica ambiental de los plaguicidas una vez liberados en el ambiente, muestra el potencial de que estos compuestos alcancen cuerpos de aguas superficiales y con un amplio rango de impactos sobre la biota acuática (Larson *et al.*, 1997). Los programas de monitoreo de contaminantes suelen focalizar sus objetivos en el compartimento agua, sin embargo, muchos plaguicidas se asocian fuertemente al

material particulado y finalizan en los sedimentos de fondo, los cuales terminan siendo fuentes de contaminación por mecanismos de movilización y presentando riesgos para la biota acuática (Knezovich, 1987; Warren *et al.*, 2003). El análisis de sedimentos debería ser incluido en los estudios del ambiente porque son el resultado de la integración de todos los procesos (biológicos, físicos y químicos) que ocurren en el sistema acuático, influenciando en el metabolismo del mismo (Brondi *et al.*, 2011). En este sentido, además de conocer la dinámica ambiental y el destino de los diferentes tipos de plaguicidas, es muy relevante estudiar conjuntamente los efectos que producen sobre la fauna asociada, tanto de la columna de agua como la fauna bentónica.

Los bioensayos de toxicidad son una herramienta bioanalítica de gran importancia y complemento de los análisis químicos, para la evaluación integral de la peligrosidad asociada a plaguicidas, tanto para los ecosistemas acuáticos y sus posibles proyecciones a la salud humana (Peluso, 2011; Demetrio, 2012). A partir de la realización de ensayos de toxicidad en laboratorio se puede examinar la toxicidad potencial de una matriz contaminada, por exposición aguda o crónica, de los que se pueden obtener, por ejemplo, medidas de mortalidad, inhibición del crecimiento y efectos en la reproducción de los organismos. El objetivo principal de la utilización de ensayos de toxicidad con sedimentos es poder determinar su peligrosidad sobre la fauna bentónica asociada. Estos utilizan organismos de diferente organización celular y niveles tróficos que incluyen algas, bacterias, moluscos, anélidos, insectos, crustáceos y peces (Giesy & Hoke, 1989; Ingersoll, 1995). Sin embargo, los organismos más frecuentemente empleados corresponden a invertebrados bentónicos (Blaise & Féraud, 2005), esto se relaciona con el hecho de que la fase más empleada para conducir ensayos de toxicidad sea el sedimento completo (Nebeker *et al.*, 1984; Munawar *et al.*, 1999; Bettinetti *et al.*, 2003; Giusto & Ferrari, 2008; Hintzen *et al.*, 2009).

Dentro de los invertebrados, los organismos de agua dulce más utilizados en las evaluaciones de la toxicidad de sedimentos incluyen las siguientes especies bentónicas: *Hyaella azteca* (Crustacea), *Chironomus tentans* (Insecta, Diptera), *C. riparius* (Insecta, Diptera), *Hexagenia limbata* (Insecta, Ephemeroptera) y *Tubifex tubifex* (Oligochaeta). Una de los aspectos más importantes de estas especies para ser utilizadas en bioensayos es la disponibilidad de protocolos estandarizados que facilitan la comparación de las respuestas biológicas de manera sistemática y reproducible, para muestras de distintos orígenes (OECD, 1993; ASTM, 1999; US. EPA, 1994, 1998, 2000, 2001; EC, 1997, 1999; IRAM, 2003).

Cuando se selecciona una especie nativa como organismo prueba diferente a las incluidas en protocolos estandarizados, se deben tener en cuenta una serie de pautas que indiquen una sensibilidad equivalente a las especies recomendadas para el tipo de ensayo en consideración. A este respecto, ASTM (1994) y USEPA (2000) definen algunos criterios a tener en consideración cuando se selecciona una especie prueba para ser utilizada en ensayos con sedimento:

- sensibilidad a sustancias tóxicas asociadas a sedimentos
- relevancia ambiental
- tiempos cortos de generación
- facilidad en el cultivo y mantenimiento en laboratorio
- si se encuentra en contacto con el sedimento
- tolerancia a las variaciones fisicoquímicas del medio
- facilidad de identificación taxonómica
- importancia ecológica
- localización geográfica en relación al sitio de estudio
- compatibilidad con la metodología de ensayo y los puntos finales seleccionados



Figura 5. *Hyalella curvispina*.

Teniendo en cuenta que se trata de una especie nativa, de hábitos similares a la especie protocolizada y por la facilidad en el mantenimiento y supervivencia en condiciones de laboratorio en los últimos años se ha comenzado a emplear el anfípodo de distribución Sudamericana *Hyalella curvispina* (Figura 6) como organismo prueba. En algunas evaluaciones ecotoxicológicas, principalmente en ensayos *in situ* para determinar efectos producidos por plaguicidas en áreas de cultivos (Jergentz *et al.*, 2004; Venturino *et al.*, 2007; Anguiano *et al.*, 2008; Mugni, 2009). A su vez se ha utilizado en bioensayos de laboratorio tanto para evaluaciones de sensibilidad a tóxicos (Di Marzio *et al.*, 1994; García *et al.*, 2010) como en evaluaciones de muestras ambientales (Di Marzio *et al.*, 2005; Giusto & Ferrari, 2008). La aplicación de *H. curvispina* como organismo de ensayo de laboratorio fue validada por Peluso *et al.* (2011, 2013).

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

La actividad hortícola-agrícola aporta plaguicidas tanto en la columna de agua como en sedimentos de fondo de ecosistemas acuáticos de la región pampeana generando efectos negativos sobre la fauna bentónica asociada a dichos ambientes productivos.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo particular

Estudiar el impacto químico y ecotoxicológico por plaguicidas en aguas superficiales y sedimentos de fondo, en un arroyo representativo de la región pampeana, identificando zonas con distinto grado de impacto agrícola.

2.2.2 Objetivos específicos

- Entrenamiento en el diseño y realización de monitoreos ambientales y las acciones derivadas: conservación, almacenamiento y análisis.
- Familiarización con metodologías analíticas para el pretratamiento de muestras y el manejo de técnicas cromatográficas aplicadas al análisis químico de plaguicidas en aguas y sedimentos.
- Aplicar bioensayos utilizando *Hyalella curvispina* para evaluar la toxicidad letal y subletal de sedimentos de cuerpos de agua superficiales de agro-ecosistemas.
- Interpretar los resultados obtenidos en función de variables vinculadas a la geografía del lugar, tipo de práctica agrícola, niveles de plaguicidas y efectos medidos y características del medio receptor.

3. Materiales y métodos

3.1 Muestreo

Las muestras analizadas en el presente estudio fueron obtenidas en dos campañas de muestreo, la primera realizada en agosto de 2015 (**CAMP 1**) y la segunda en fines de enero de 2016 (**CAMP 2**). Estos períodos coinciden con épocas de baja y alta aplicación de plaguicidas, tanto en variedad como en frecuencia, siguiendo los ciclos productivos de la zona estudiada. (Marino & Ronco, 2005; Ronco *et al.*, 2008).

A partir de los datos mencionados anteriormente sobre producción agrícola y hortícola en la periferia de La Plata, se seleccionaron sitios de muestreos en la región, en función de la magnitud y tipo de actividad productiva presente, así como otros libres de esta influencia, con el fin de estudiar el impacto del uso de plaguicidas sobre un curso de agua característico de la región, como es el Arroyo Carnaval. En este sentido se tomó una zona como “blanco o control”, próximo a la naciente del curso de agua, una zona en detalle inmersa en plena área de producción o “de impacto” y una zona aguas abajo “posterior a cultivo”, fuera del área productiva y previa a la entrada del curso al tejido urbano de City Bell. Vale destacar que los sitios considerados en la zona 2 fueron seleccionados conforme al sentido de circulación del arroyo. Una descripción de la región de estudio se muestra en la **Figura 6**.

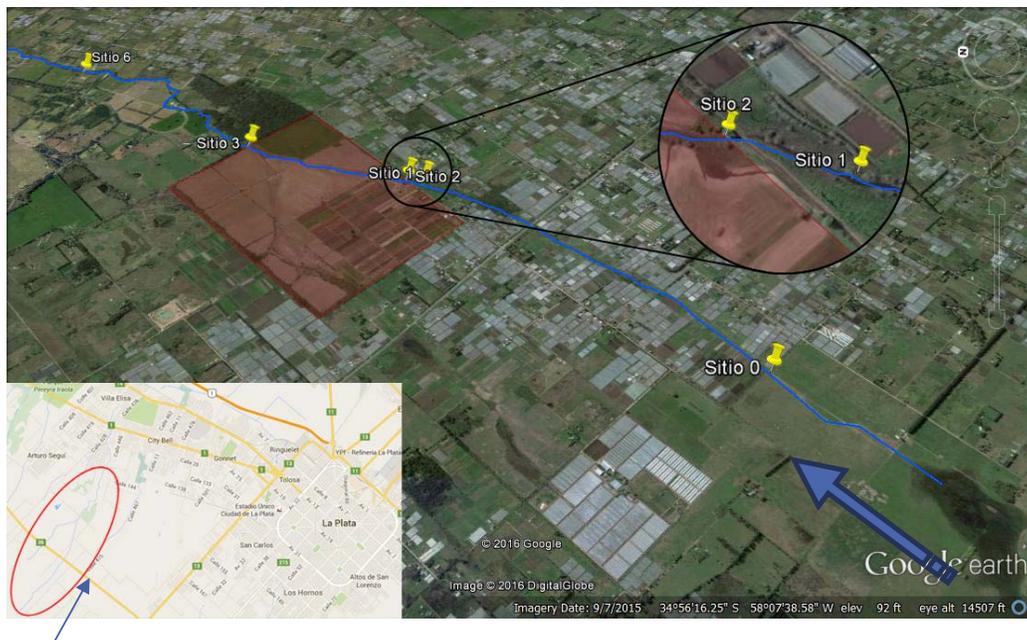


Figura 6. Imagen satelital de las zonas de muestreo. En el recuadro de color rojo se muestra la zona de impacto productivo, el Punto 0 representa el sitio control y el Punto 6, la zona aguas abajo de los campos productivos. Fuente: Google Earth.

La numeración de los sitios respeta la nomenclatura preexistente para la zona de estudio en el marco de proyectos de investigación vigentes en el CIMA.

3.2 Plaguicidas estudiados

En base a experiencias previas del equipo de trabajo del CIMA, para el trabajo propuesto se seleccionaron compuestos representativos de distintas familias químicas en función de su acción plaguicida,

- Herbicidas: Glifosato (**GLY**) y su metabolito el Ácido Aminometilfosfónico (**AMPA**) y Atrazina (**ATZ**).
- Insecticidas: Cipermetrina (**CYP**), Clorpirifós (**CLP**) y Endosulfán (**END**).
- Fungicidas: Epoxiconazol (**EPX**) y Azoxistrobin (**AZX**).

De la misma forma, como estándares internos de procedimiento, se usaron Atrazina deuterada (**ATZ***).

3.3 Metodología analítica

3.3.1 Procedimiento analítico

3.3.1.1 Agua superficial

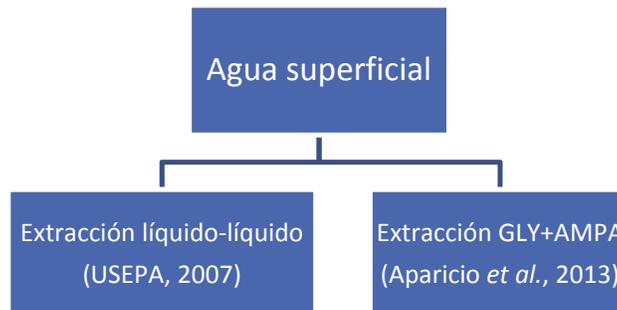


Figura 7. Resumen del proceso analítico sobre agua superficial.

3.3.1.2 Sedimentos

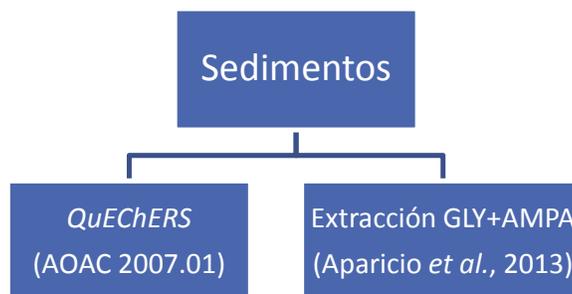


Figura 8. Resumen del proceso analítico sobre sedimento.

3.3.2 Análisis Instrumental

El análisis químico cuantitativo de los analitos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida y gaseosa, ambas acopladas a espectrometría de masas. Se contaba con el siguiente instrumental:

- Cromatógrafo líquido (HPLC) marca Agilent, modelo 1100, con fuentes de ionización ESI acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple, marca Agilent modelo VL, con rango de masas 50-1500 umas.
- Cromatógrafo gaseoso (GC) marca Perkin Elmer, modelo Clarus 580 acoplado a detector de masas de cuadrupolo simple, marca Perkin Elmer, modelo Clarus SQ 8S, equipado con estación cromatográfica para adquisición de datos y análisis, TurboMass versión 6.1.

3.3.3 Bioensayos de toxicidad

Se realizaron ensayos estandarizados de 10 días de duración, con sedimento completo utilizando el anfípodo *Hyaella curvispina* como organismo prueba, siguiendo las recomendaciones de los protocolos USEPA para *H. azteca* con modificaciones.

Se emplearon frascos de vidrio de 500 mL para generar los medios (los mismos fueron lavados de la misma forma que el material de laboratorio). En cada recipiente se dispusieron 120 mL de sedimento, previamente homogeneizado, y luego se agregaron 200 mL de agua de red de clorinada como agua sobrenadante. El sistema se dejó reposar durante 24 horas. Para cada muestra a ensayar se hicieron cinco replicados. Pasado el estado de reposo, se midieron el oxígeno disuelto (OD), conductividad, pH y temperatura antes de introducir 10 organismos de *H. curvispina*. Los organismos, de 7-14 días de edad, fueron seleccionados de cultivos de laboratorio 24-48 horas previas al inicio del ensayo. Las exposiciones se realizaron sin aireación y con recambio parcial de agua sobrenadante una vez día de por medio. Los anfípodos se colectaron con pipeta plástica, se colocaron en los recipientes de ensayo, y se verificó el número y estado de los mismos en todos los recipientes. Finalizado el ensayo, se midieron el oxígeno disuelto (OD), conductividad, pH y temperatura.

Los recipientes se dispusieron en cámara incubadora con foto-período a 16:8 horas luz:oscuridad y una temperatura de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$. Los puntos finales medidos fueron supervivencia y crecimiento (longitud). Al finalizar los bioensayos, el sedimento de cada recipiente fue tamizado por una malla para separar los organismos vivos, los cuales fueron fijados en formol (4%) para su medición mediante el software ImageJ (dominio público, National Institutes of Health - *NIH*, versión diciembre 2015).

Debido a la distancia entre sitios de muestreo en la Zona 2, y al ser la de mayor impacto, se optó por ensayar cada sitio por separado en lugar de hacer una muestra integrada por zona.

Para las otras dos zonas, se realizará un solo ensayo con muestras de sedimentos integradas.

3.4 Análisis de Resultados

Para evaluar los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos de toxicidad se realizaron pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. La supervivencia y el crecimiento (longitud) de los anfípodos se evaluaron mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba *a posteriori* de Dunnett para determinar diferencias significativas con respecto al control y ANOVA de medidas repetidas para la comparación entre las campañas de muestreo. Antes del análisis los datos de porcentaje de supervivencia fueron transformados a arcoseno y la longitud a logaritmo.

En todos los casos se trabajó con un nivel de significancia $\alpha = 0,05$.

Se realizaron análisis de componentes principales (ACP) (Hair *et al.*, 1999; Quinn & Keough, 2002) para determinar las correlaciones entre los resultados de toxicidad y las variables fisicoquímicas del sedimento. El análisis se realizó utilizando las concentraciones de plaguicidas, el contenido de materia orgánica y los datos de toxicidad. La selección de los factores significativos se basó en el principio de Kaiser aceptando factores con Eigenvalues >1 (Quinn & Keough, 2002). Las concentraciones de plaguicidas por debajo del LD fueron reemplazadas por la mitad del correspondiente límite (Delistraty & Yokel, 2007). En todos los casos se trabajó con un nivel de significancia de 0,05. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando herramientas de los softwares STATISTICA (Stat Soft, Inc. 2001; versión 7) y XL-STAT (Addinsoft 2016; 01.26136).

4 Resultados

A fin de simplificar la escritura se utilizarán las siguientes abreviaciones:

HERBICIDAS		
GLY	AMPA	ATZ
Glifosato	Ácido Aminometilfosfónico	Atrazina

INSECTICIDAS		
CYP	CLP	END
Cipermetrina	Clorpirifós	Endosulfán

FUNGICIDAS	
EPX	AZX
Epoxiconazol	Azoxistrobin

4.1 Análisis de resultados

4.1.1 Niveles ambientales de plaguicidas

Las concentraciones de cada compuesto fueron corregidas por sus respectivos valores de recuperación y respuesta instrumental durante el proceso de análisis, evaluados experimentalmente mediante el uso de estándares internos y estándares de trabajo (*working standard*). Los resultados se presentan en las **Figura 9** a **Figura 12**.

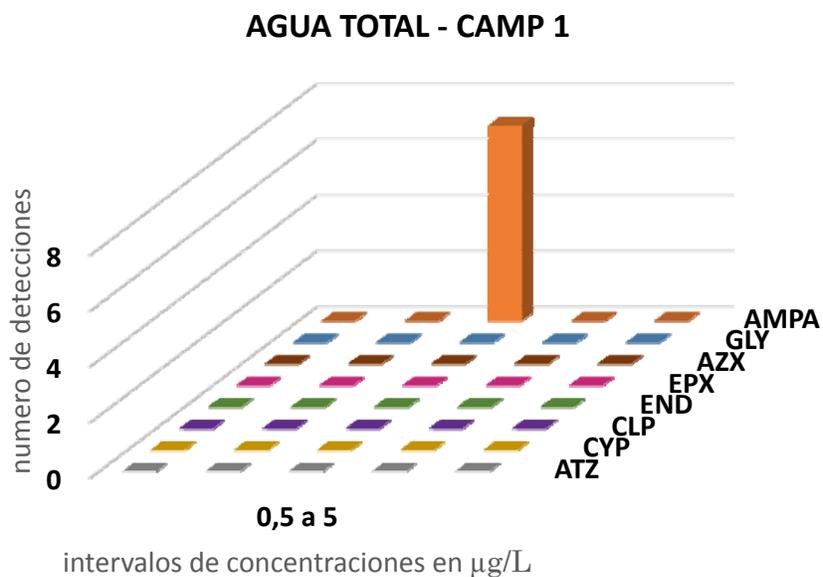


Figura 9. Concentraciones en agua total durante CAMP 1.

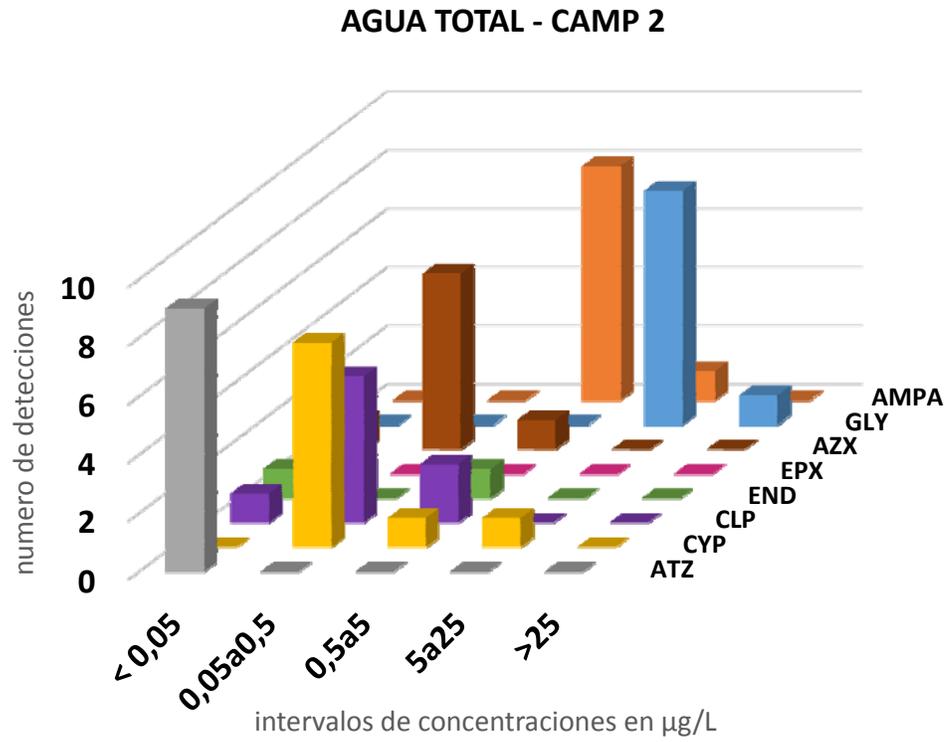


Figura 10. Concentraciones en agua total durante CAMP 2.

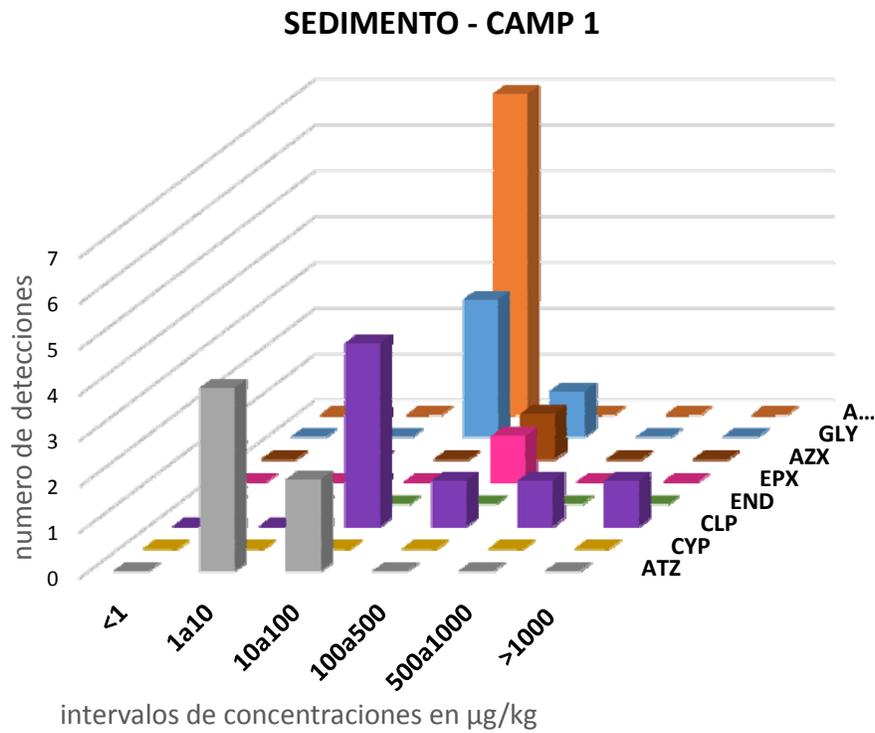


Figura 11. Concentraciones en sedimento durante CAMP 1.

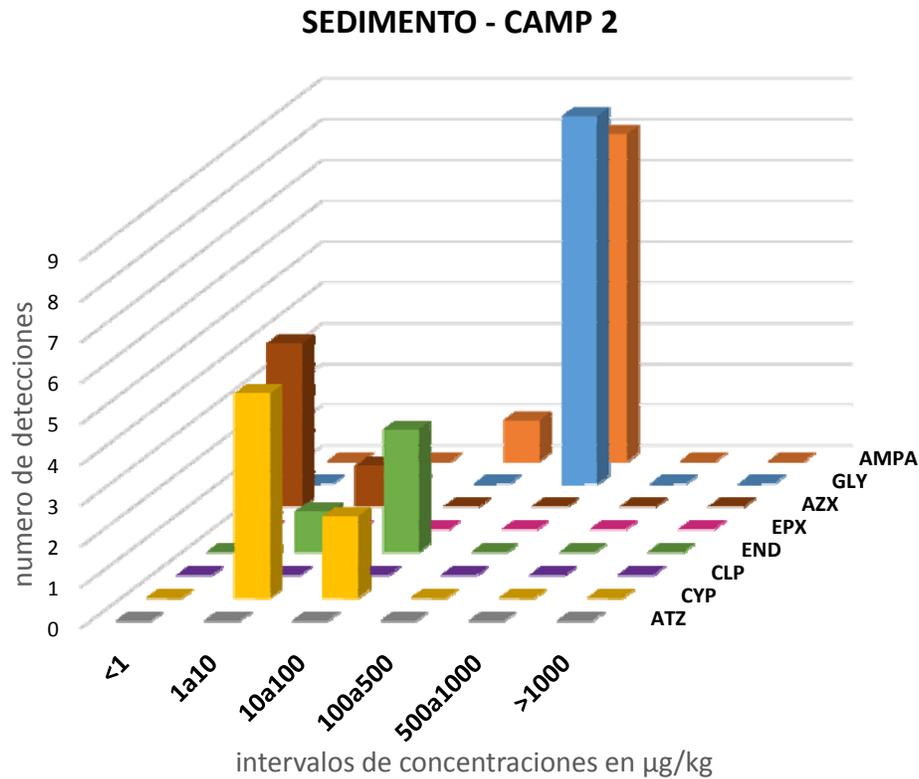


Figura 12. Concentraciones en sedimento durante CAMP 2.

4.2 Bioensayos de toxicidad

Los resultados de supervivencia obtenidos de los ensayos a 10 días se muestran en la **Figura 13**. En el sitio control (S0) se obtuvo una supervivencia del 90 y 80% para las campañas 1 y 2 respectivamente, cumpliendo en ambos casos los criterios de aceptación recomendados por USEPA para bioensayos con sedimento completo (USEPA, 2000). Las características del agua sobrenadante fueron similares entre tratamientos en todos los ensayos y las concentraciones de OD siempre fueron mayores a 2,5 mg/L (USEPA, 2000). El ANOVA mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el S2 y el sitio control en las dos campañas, con valores de supervivencia en el S0 de 0% y 50% para la CAMP 1 y 2, respectivamente. Los sedimentos de los sitios restantes no mostraron diferencias con el control en cuanto a respuestas letales.

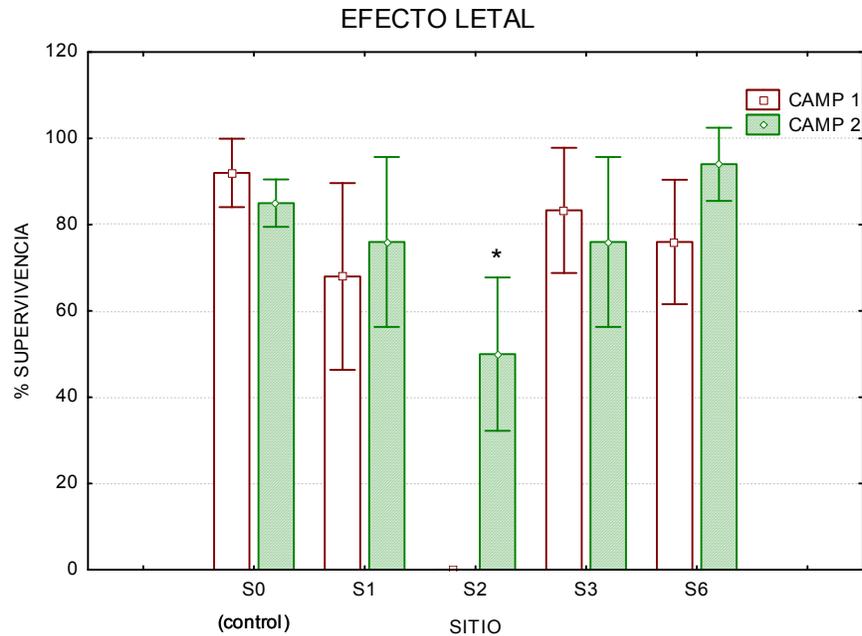


Figura 13. Porcentajes de supervivencia promedio y desvío estándar de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición a sedimentos de los sitios de estudio para las campañas 1 y 2. El asterisco indica diferencias significativas con el control (S0) ($p < 0,05$).

Además, se evaluaron efectos subletales mediante la longitud (expresada en mm) de los organismos recuperados una vez finalizado el ensayo (**Figura 14**). El crecimiento se analizó en las réplicas que tuvieron supervivencias superiores al 50%. Durante la primera campaña, no hubo diferencias significativas entre los sitios ($p > 0,05$). Sin embargo, durante la segunda campaña de muestro, se presentaron diferencias significativas entre el sitio 0 (considerado como sitio control) y los sitios 1, 2 y 3 ($p = 0,0446$; $p = 0,0070$; $p = 0,0321$; respectivamente). A su vez, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al S0, observándose la mayor inhibición en el S1 (7,98%) para la primera campaña y en el S2 (17,14%) en la segunda.

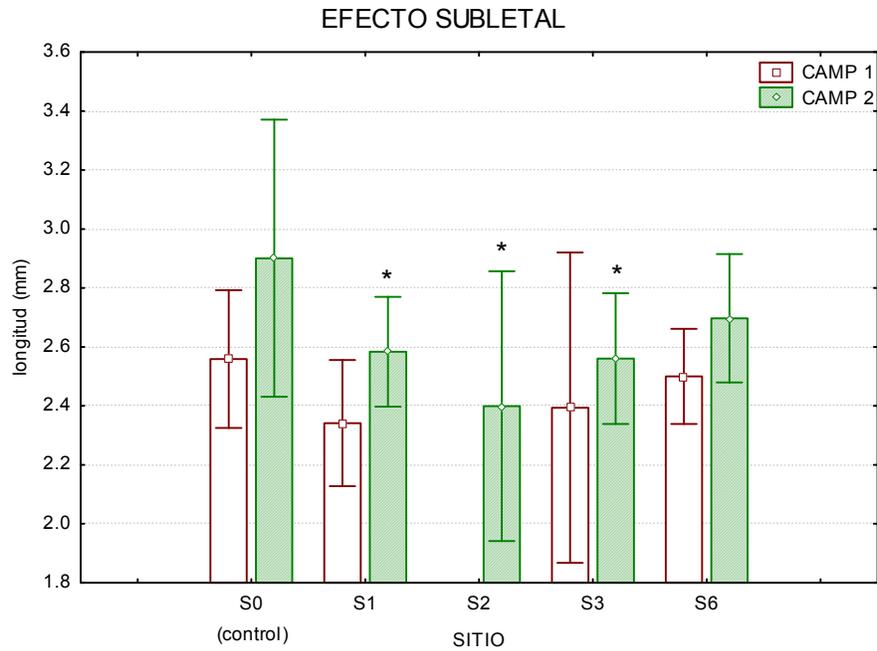


Figura 14. Longitud (mm) promedio y desvío estándar de anfípodos luego de 10 días de exposición a sedimentos de los sitios de estudio para las campañas 1 y 2. El asterisco (*) indica diferencias significativas con el control (S0) ($p < 0,05$).

5 Discusión

Generalmente los bioensayos de toxicidad con matrices sólidas se realizan en una única concentración utilizando la totalidad (100%) de la muestra y los efectos observados son comparados con un control negativo (sedimento blanco o de referencia). De esta forma la única conclusión que se obtiene es que la muestra es “tóxica” o “no tóxica” y no hay una estimación cuantitativa de la toxicidad (Suedel *et al.*, 1996; Blaise & Ferard, 2005).

5.1 Efectos observados

En ambas campañas, el S2 demostró toxicidad letal en ambas campañas de muestreo, con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al S0, considerado como control en este trabajo. El resto de los sedimentos ensayados no mostraron efectos letales significativamente diferentes al sitio control.

En este trabajo, se midieron los efectos subletales como crecimiento en longitud. Esta evaluación permite detectar sedimentos con un grado moderado de contaminación, aún en exposiciones de 10 días (Peluso, 2011). Durante CAMP 1 no se registraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los sitios ensayados. No obstante, durante la CAMP 2, los sitios pertenecientes a la Zona 2 (S1, S2, S3) presentaron inhibición del crecimiento significativamente diferente ($p < 0,05$) respecto del sitio control S0.

5.2 Análisis integrado de efectos y niveles ambientales

Para interpretar los bioensayos con *H. curvispina* se optó por realizar un análisis de componentes principales (ACP) en búsqueda de relacionar la toxicidad observada con la composición química de los sedimentos ensayados. Para computar la matriz de correlación entre las variables, se utilizó el estadístico por rangos Rho de Spearman, dada la no normalidad de los datos. El ACP es una herramienta de análisis estadístico que siempre debería ser utilizada para determinar las variables de un sistema que inciden en la asignación de la peligrosidad de un sedimento y por ende en la calidad del ecosistema en estudio (Peluso, 2011).

En el ACP se incluyeron variables propias del sedimento, como las concentraciones de analitos encontradas y propiedades fisicoquímicas (%LOI), y los efectos observados en los ensayos con *H. curvispina*. Durante la CAMP 1, donde se observó mortalidad en el S2, se generó la matriz de correlación que se presenta en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Matriz de correlación de Spearman para efectos y concentraciones de CAMP 1.

Variables	% INHIB	% SUPERV	% LOI	GLY	AMPA	TZ	CLP	EPX	AZX
% INHIB	1	-0,900	0,500	0,154	0,400	0,359	1,000	0,000	0,707
% SUPERV	-0,900	1	-0,600	-0,359	-0,700	-0,359	-0,900	0,354	-0,707
% LOI	0,500	-0,600	1	-0,410	0,100	-0,359	0,500	-0,707	0,354
GLY	0,154	-0,359	-0,410	1	0,821	0,789	0,154	0,000	0,363
AMPA	0,400	-0,700	0,100	0,821	1	0,462	0,400	-0,354	0,354
ATZ	0,359	-0,359	-0,359	0,789	0,462	1	0,359	0,181	0,725
CLP	1,000	-0,900	0,500	0,154	0,400	0,359	1	0,000	0,707
EPX	0,000	0,354	-0,707	0,000	-0,354	0,181	0,000	1	-0,250
AZX	0,707	-0,707	0,354	0,363	0,354	0,725	0,707	-0,250	1

Valores en negrita son diferentes a 0 con un nivel de significancia $\alpha=0,05$

Se puede ver una relación entre la presencia de CLP con el porcentaje de supervivencia (% SUPERV) y el de inhibición (% INHIB). Esta primera relación es negativa, mientras que la segunda es positiva. El ACP agrupó las 9 variables en tres componentes principales, F1, F2 y F3, los cuales explican el 92,4% de la variabilidad total inicial. Las variables que aportan al F1 corresponden a CLP, AZX, y en menor medida AMPA y las variables toxicológicas. En el segundo factor aportan variabilidad las variables LOI, GLY y ATZ. En el Biplot (**Figura 15**) de los factores F1 y F2 en conjunto con las observaciones (sitios) puede observarse como se relacionan las variables CLP y % INHIB de forma positiva y CLP con % SUPERV de forma negativa. Además, y como ya se presentó, es posible apreciar como el S2 se separa de los otros sitios principalmente por las variables CLP, AZX y efectos subletales (inhibición de crecimiento), además se puede observar que el resto de los sitios se ubican en los cuadrantes opuestos a la dirección de los vectores dichas variables.

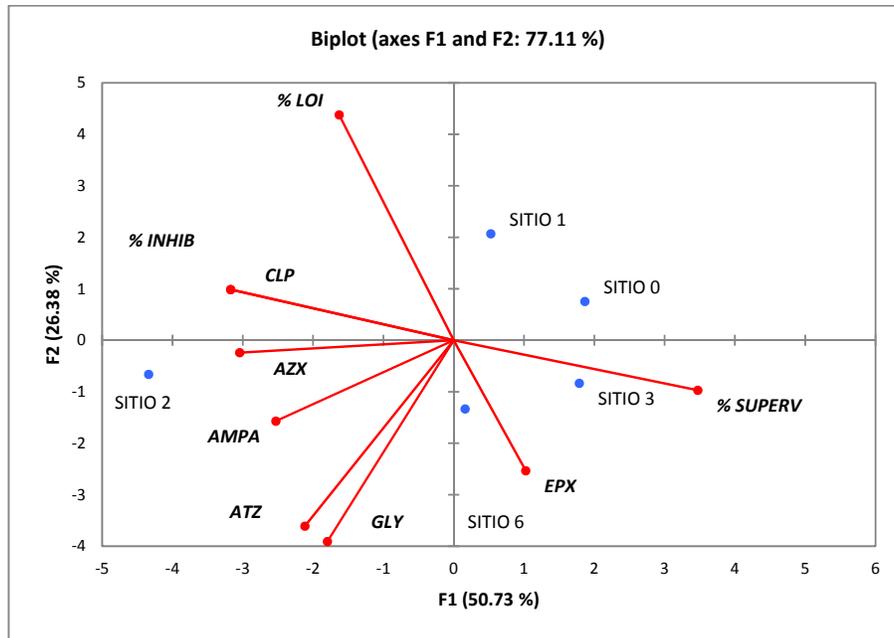


Figura 15. Biplot del análisis de componentes principales de dos factores que explican el 77,11% de la varianza total, correspondiente a los efectos observados y concentraciones cuantificadas durante CAMP 1.

Para CAMP 2 se siguió el mismo procedimiento. En la matriz de correlación (**Tabla 2**) no fue posible detectar relaciones significativas entre variables. El ACP para esta campaña agrupó las 8 variables en tres componentes principales, F1 F2 y F3, los cuales explican el 92,9% de la variabilidad total inicial, aportando principalmente al F1 las variables LOI, AMPA, AZX y END, mientras que al F2 aportan positivamente la supervivencia y GLY. En el Biplot (**Figura 16**) es posible apreciar la agrupación de los S0 (control) y S6, los cuales no mostraban diferencias significativas entre sí respecto de los efectos letales y subletales. Los sitios S1, S2 y S3 se diferencian entre sí y se distancian del grupo S0 y S6, principalmente por las variables correspondientes a los efectos letales y subletales. Sin embargo, no es simple la interpretación de las variables que podrían estar generando dicha toxicidad. En el caso de los sitios de la Zona 2, las respuestas pueden deberse a la presencia de los insecticidas CYP y END y el fungicida AZX. En el caso de la cipermetrina, hay antecedentes de efectos negativos en el crecimiento para *H. curvispina* (Ronco *et al.*, 2008; Peluso *et al.*, 2013), sin generar mortalidad en los bioensayos con sedimento directo.

Tabla 2. Matriz de correlación de Spearman para efectos y concentraciones de CAMP 2.

Variables	% INHIB	% SUPERV	% LOI	GLY	AMPA	CYP	END	AZX
% INHIB	1	-0,872	0,300	-0,600	-0,100	-0,100	-0,224	-0,051
%SUPERV	-0,872	1	-0,154	0,667	0,154	-0,359	-0,115	-0,158
LOI	0,300	-0,154	1	0,100	0,900	0,100	-0,894	0,667
GLY	-0,600	0,667	0,100	1	0,200	0,000	-0,224	-0,154
AMPA	-0,100	0,154	0,900	0,200	1	0,200	-0,783	0,821
CYP	-0,100	-0,359	0,100	0,000	0,200	1	0,335	0,616
END	-0,224	-0,115	-0,894	-0,224	-0,783	0,335	1	-0,344
AZX	-0,051	-0,158	0,667	-0,154	0,821	0,616	-0,344	1

Valores en negrita son diferentes a 0 con un nivel de significancia $\alpha=0,05$

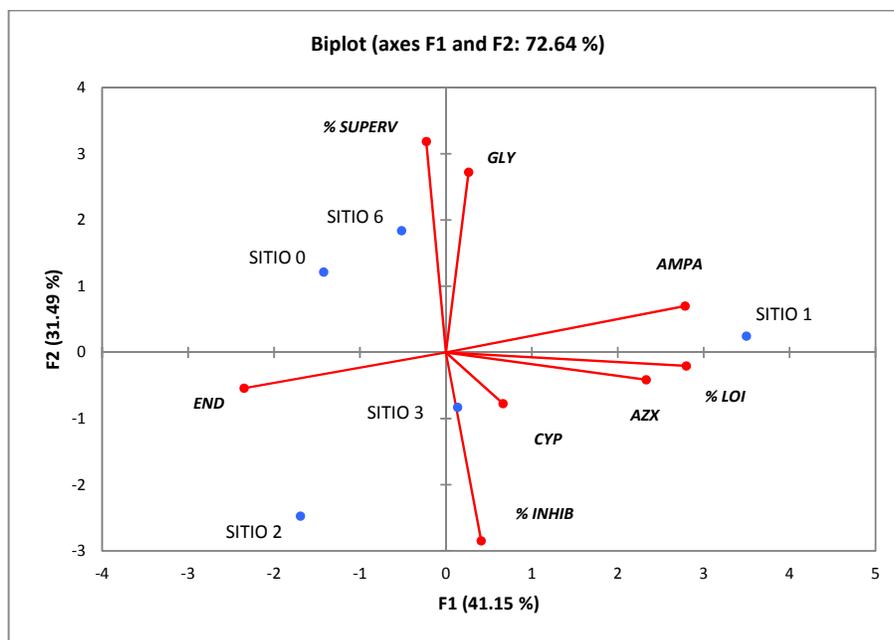


Figura 16. Figura 29. Biplot del análisis de componentes principales de dos factores que explican el 72,64% de la varianza total, correspondiente a los efectos observados y concentraciones cuantificadas durante CAMP 2.

5.3 Unidades tóxicas

Una forma más sencilla de poder relacionar la concentración encontrada en una muestra ambiental con su toxicidad asociada es mediante el uso de las unidades tóxicas. Para ello, se calcularon las unidades tóxicas (UT) para todas las muestras de sedimentos (Tabla 3). Una UT equivale a la concentración en sedimento normalizada por el contenido de carbono orgánico, dividido por la concentración letal 50 (LC₅₀) del organismo para cada pesticida. Los valores de LC₅₀ usados en este trabajo fueron del anfípodo *Hyalella azteca*, el cual se sabe que es muy sensible a piretroides (como CYP) y CLP (Weston & Lydy, 2010). Aunque *H.*

azteca no es una especie que se encuentra en Sudamérica, varias especies estrechamente relacionadas (*H. curvispina*, *H. pampeana*, y *H. pseudoazteca*) son importantes componentes de las comunidades de invertebrados acuáticos de la región. Sin embargo, no se encuentran publicados valores del LC₅₀ en sedimentos para estas especies nativas. Para END, se empleó la LC₅₀ del *Chironomus tentans* para calcular las UT, porque es sustancialmente más baja que la LC₅₀ para *H. azteca* (You *et al.*, 2004). La toxicidad de plaguicidas en sedimentos depende altamente del contenido de carbono orgánico (Meador *et al.*, 1997; Maund *et al.*, 2002; Weston *et al.*, 2004), entonces, las concentraciones encontradas fueron normalizadas por el contenido de carbono orgánico para luego calcular las UT.

$$UT = \frac{\text{concentración en sedimento } (\mu\text{g/g C org})}{LC_{50} (\mu\text{g/g C org})}$$

Tabla 3. LC₅₀ y UT para sedimentos.

UT	CLP	CYP	END
LC ₅₀ (μg/g C org)	4,160 ^a	0,960 ^a	0,380 ^b
	CAMP 1	CAMP 2	
SITIO 0	0,335	0,499	0,324
SITIO 1	1,440	0,404	0,001
SITIO 2	11,914	0,288	0,341
SITIO 3	1,474	0,215	0,002
SITIO 6	0,533	0,264	0,002

^a LC₅₀ para *Hyaella azteca* de Weston *et al.* (2013).

^b LC₅₀ para *Chironomus tentans* de You *et al.* (2004).

Es posible apreciar como durante la CAMP 1 sólo en los sitios S1, S2 y S3 la UT es mayor a 1. Únicamente en el S2 se observó 100% de mortalidad. En los otros dos sitios, S1 y S3, no se observaron efectos letales significativos. Motivo de esta observación puede ser que el CLP, un compuesto altamente hidrofóbico, no se haya encontrado biodisponible (Knezovich *et al.*, 1987; Widenfalk, 2002). Se ha encontrado que la mortalidad de *H. azteca* aumenta cuando las UT para piretroides alcanza las 0,5, y se acerca al 100% de mortalidad cuando ronda las 10 UT (Weston & Lydy, 2010).

6 Conclusiones

- ✓ Es notable la falta de información, tanto en literatura de origen regional o nacional como internacional de niveles ambientales de algunos compuestos como, por ejemplo, los funguicidas analizados en este trabajo.
- ✓ La respuesta biológica, tanto letal como subletal, de *Hyaella curvispina* dependió de la distribución ambiental de plaguicidas en las distintas zonas de estudio y representa una buena herramienta bioanalítica para la evaluación del estado ecosistémico de ambientes naturales.
- ✓ Existe un vacío en el conocimiento científico en lo que a concentraciones letales de compuestos en sedimentos respecta, aún para organismos estandarizados.
- ✓ La supervivencia del organismo ensayado, *Hyaella curvispina*, depende mayoritariamente de la carga de insecticidas en sedimentos a lo largo del curso de agua.

En función de las conclusiones parciales anteriormente descritas, se acepta la hipótesis del trabajo experimental realizado en el presente estudio:

La actividad hortícola-agrícola aporta plaguicidas tanto en la columna de agua como en sedimentos de fondo de ecosistemas acuáticos de la región pampeana generando efectos negativos sobre la fauna bentónica asociada a dichos ambientes productivos.

7 Bibliografía

Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., & Dondo, M. (2009). Expansión de la soja y diversidad de la agricultura argentina. *Ecología Austral*, 19(1), 45–54.

Aparicio, V. C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., & Costa, J. L. (2013). Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere*, 93(9), 1866–1873.

AOAC International. (2011). AOAC Official Method 2007.01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 90(2), 17–26. Retrieved from http://lib3.dss.go.th/fulltext/E_content/1060-3271/2007v90n2.pdf

Anguiano, O.L., Ferrari, A., Soleño, J., Martínez, M.C., Venturino, A., Pechen de D'Angelo, A.M. & Montagna, C.M. (2008). Enhanced esterase activity and resistance to azinphosmethyl in target and nontarget organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27: 2117-2123.

ASTM (American Society for Testing and Materials). (2002). Standard guide for collection, storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing, E1391-02.

ASTM. (1994). American Society for Testing and Materials: Standard guide for designing biological tests with sediments. ASTM E 1521-94, Philadelphia.

ASTM. (1999). Standard test methods for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. E1706-95b. In *Annual Book of ASTM Standards*, Vol. 11.05, Philadelphia, PA.

Bettinetti, R., Giarei, C., & Provini, A. (2003). Chemical analysis and sediment toxicity bioassays to assess the contamination of the River Lambro (Northern Italy). *Arch. Environ. Cont. Tox.*, 45(1): 72-78.

Brondi, S. H. G., De MacEdo, A. N., Vicente, G. H. L., & Nogueira, A. R. A. (2011). Evaluation of the QuEChERS method and gas chromatography-mass spectrometry for the analysis pesticide residues in water and sediment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86(1), 18–22.

Demetrio P. (2012). Estudio de efectos biológicos de plaguicidas utilizados en cultivos de soja RR y evaluación de impactos adversos en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampeana. Tesis Doctoral, Buenos Aires, 146pp.

Di Marzio, W., Fuente, H., Alberdi, J.L., & Tortorelli, M.C. (1994). Toxicidad aguda de un formulado comercial del herbicida paraquat sobre individuos de *Hyalella curvispina* (Crustáceo, Anfípodo) (24 horas). *Acta Toxicológica Argentina Vol 2* (1-2): 14.

Di Marzio, W.D., Sáenz, M., Alberdi, J., Tortorelli, M., & Galassi, S. (2005). Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a fresh water environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 61:380-391.

Donald, P. F. (2004). Biodiversity impacts of some agricultural commodity production systems. *Conserv Biol* 18:17-37.

EFSA. (2015). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal*, 13(11), 107.

European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General. (2002). Review report for the active substance glyphosate. 6511/VI/99-final, 21 January 2002.

García, M. (2011). El cinturón hortícola platense: ahogándonos en un mar de plásticos. Un ensayo acerca de la tecnología, el ambiente y la política. *Theomai*, 23, 35–53.

García, M.E., Rodrigues-Capítulo, A. & Ferrari, L. (2010). Age-related differential sensitivity to cadmium in *Hyalella curvispina* (Amphipoda) and implications in ecotoxicity studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 73(5): 771-778.

Giesy, J. P., & Hoke, R. a. (1989). Freshwater Sediment Toxicity Bioassessment: Rationale for Species Selection and Test Design. *Journal of Great Lakes Research*, 15(4), 539–569.

- Giusto, A., & Ferrari, L. (2008). Copper toxicity on juveniles of *Hyaella pseudoazteca* González and Watling, 2003. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(2), 169–173.
- Hair J. F. Jr, Anderson, R. E., Tatham, R. L. & Black, W. C. (1999). *Análisis multivariante*. 5ta Ed. Prentice Hall Iberia, Madrid.
- Heap I. (2014). *Herbicide Resistant Weeds*, p 281-301 En: *Integrated Pest Managment*. Pimentel, D, Peshin, R. Editorial Springer Netherlands.
- Hintzen, E. P., Lydy, M. J., & Belden, J. B. (2009). Occurrence and potential toxicity of pyrethroids and other insecticides in bed sediments of urban streams in central Texas. *Environmental Pollution*, 157(1).
- INDEC – Censo 2010. <http://www.censo2010.indec.gov.ar/>.
- Ingersoll, C.G. 1995. Sediment Test. In: “Fundamental of aquatic toxicology”. Rand, G. M. (eds) Taylor and Francis, Washinton, DC. pp: 231-255.
- INTA, 2012. *Evolución del mercado de herbicidas en Argentina*.
- INTA. 2004. *El avance de la soja en la Argentina y la sostenibilidad de los sistemas agrícolas*. Disponible en <http://www.inta.gov.ar/reconquista/crsantafe/docsoja.htm>.
- IRAM, (2003). *Norma Argentina, Calidad ambiental y Calidad del agua de muestreo. Parte 16: Guía para el bioensayo de muestras*. IRAM 29012-16:2003.
- Jergentz, S., Mugni, H., Bonetto, C., & Schulz, R. (2004). Runoff-related Endosulfan contamination and aquatic macroinvertebrate response in rural basins near Buenos Aires, Argentina. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46 345-352.
- Jergentz, S., Mugni, H., Bonetto, C., & Schulz, R. (2005). Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere*, 61(6), 817–826.
- Knezovich, J. P., Harrison, F. L., & Wilhelm, R. G. (1987). The bioavailability of sediment-sorbed organic chemicals: A review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 32(1-2), 233–245.
- Larson, S. J., Capel, P. D., & Majewski, M. S. (1997). *Pesticides in surface waters, Distribution, trends and governing factors*. Ann Arbor Press.
- Marino, D., & Ronco, A. (2005). Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75(4), 820–826.
- Matson, P. A., Parton, W. J., Power, A. G. & Swift, M. J. (1997). Agricultural Intensification and Ecosystem Properties. *Science*, 277(5325), 504–509.
- Maud, S. J., Hamer, M. J., Lane, M. C. G., Farrelly, E., Rapley, J. H., Goggin, U. M., & Gentle, W. E. (2002). Partitioning, bioavailability, and toxicity of the pyrethroid insecticide cypermethrin in sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 21(1), 9–15.
- McLaughlin, A., & Mineau, P. (1995). The impact of agricultural practices on biodiversity. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 55(3), 201–212.
- Meador, J. P., Krone, C. A., Wayne Dyer, D., & Varanasi, U. (1997). Toxicity of sediment-associated tributyltin to infaunal invertebrates: Species comparison and the role of organic carbon. *Marine Environmental Research*, 43(3), 219–241.
- Mugni, H.D. (2009). *Concentración de nutrientes y toxicidad de pesticidas en cuerpos de agua superficial de áreas rurales*. Tesis Doctoral, Universidad nacional de La Plata 140 pp.
- Munawar, M., Dermott, R., McCarthy, L.H., Munawar, S.F., & van Stam, H.A. (1999). A comparative bioassessment of sediment toxicity in lentic and lotic ecosystems of the North American Great Lakes. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 2(4), 367–378.
- Nebeker, A. V., Cairns, M. a., Gakstatter, J. H., Malueg, K. W., Schuytema, G. S., & Krawczyk, D. F. (1984). *Biological Methods for Determining Toxicity of Contaminated Freshwater Sediments to Invertebrates*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3(4), 617.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). (1993). Guidelines for the testing of chemicals. Vol. 1 y 2, Paris, Francia.

OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Vol.107, Partition Coefficients, OECD, Paris, 1981.

Peluso, L., Bulus Rossini, G., Salibián, A., & Ronco, A. E. (2013). Physicochemical and ecotoxicological based assessment of bottom sediments from the Luján River basin, Buenos Aires, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185 (7): 5993-6002.

Peluso, L., Giusto, A., Bulus Rossini, G. D., Ferrari, L., Salibián, A., & Ronco, A. E. (2011). *Hyalella curvispina* (Amphipoda) as a test organism in laboratory toxicity testing of environmental samples. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20: 372–376.

Peluso, M. L. (2011). Evaluación de efectos biológicos y biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos del Río de la Plata y afluentes. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.

Quinn, G.P. & Keough, M.J. 2002. *Experimental Design and Data for Biologists*. Cambridge University Press, 537 pp.

Ronco A.E., Carriquiriborde P., Natale G.S., Martin M., Mugni H., Bonetto C. (2008). Integrated approach for the assessment of biotech soybean pesticides impact on low order stream ecosystems of the Pamasic region, en Chen J & Guo C, *Ecosystem Ecology Research Trends*. Nova Science Publishers. Pp: 209-239pp.

Satorre, E. H. (2005). Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Ciencia Hoy* 87: 24- 31.

SENASA, Resolución 511/2011.

Sistema Integrado de Información Agropecuaria (SIIA), Programa de Servicios Agrícolas Provinciales, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.

Solbrig O. (2004). Ventajas y desventajas de la agrobiotecnología. En: *Los transgénicos en América Latina y el Caribe: un debate abierto*. Bárcena A., Katz J., Morales C. and Schaper M. Comisión Económica para América Latina y el Caribe, Naciones Unidas, Chile. p 33-66.

Souza Casadinho J. (2009). La problemática del uso de plaguicidas en Argentina. Modelos productivos e impacto en el ambiente. Cátedra de Extensión y Sociología Rurales. Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

Suedel, B. C., Deaver, E., & Rodgers, J. H. (1996). Formulated sediment as a reference and dilution sediment in definitive toxicity tests. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 30(1), 47–52.

Sarandón, Colombo y colaboradores UNLP. (2015). Relevamiento de la utilización de agroquímicos en la Provincia de Buenos Aires. Mapa de situación e incidencia sobre la salud. Defensor del Pueblo, Buenos Aires, Argentina, 533.

USEPA (Environmental Protection Agency). (1994). *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*. First Edition. EPA/600/R-94/024, Duluth, MN.

USEPA (Environmental Protection Agency). (2000). *Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates* Second Edition. Office of Science and Technology Office of Water. Report: EPA 600/R-99/064.

USEPA (Environmental Protection Agency). (2001). *Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual*. Office of Science and Technology Office of Water. Report: EPA-823-B-01-002.

USEPA (Environmental Protection Agency). (2007). *SW846 Hazardous Waste Test Methods*

Warren, N., Allan, I. J., Carter, J. E., House, W. A., & Parker, A. (2003). Pesticides and other micro-organic contaminants in freshwater sedimentary environments - A review. *Applied Geochemistry*, 18(2), 159–194.

Weston, D. P., & Lydy, M. J. (2010). Urban and agricultural sources of pyrethroid insecticides to the sacramento-san joaquin delta of California. *Environmental Science and Technology*, 44(5), 1833–1840.

Weston, D. P., Ding, Y., Zhang, M., & Lydy, M. J. (2013). Identifying the cause of sediment toxicity in agricultural sediments: The role of pyrethroids and nine seldom-measured hydrophobic pesticides. *Chemosphere*, 90(3), 958–964.

Weston, D. P., You, J., & Lydy, M. J. (2004). Distribution and toxicity of sediment-associated pesticides in agriculture-dominated water bodies of California's Central Valley. *Environmental Science & Technology*, 38(10), 2752–2759.

Widenfalk, A. (2002). Pesticide bioavailability in aquatic sediments – a literature review. Department of Environmental Assessment, Swedish University of Agricultural Sciences.

You, J., Schuler, L.J., & Lydy, M.J. (2004). Acute toxicity of sediment-sorbed endrin, methoxychlor, and endosulfan to *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73 (3), 457–464.