



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Biología Marina

Profesor Patrocinante:

Dr. Enrique Bay – Schmith
Instituto de Zoología
Universidad de Concepción

Profesor Co – Patrocinante:

Dr. Jorge Toro Yagui
Instituto de Biología Marina

**“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS ECOTOXICOLÓGICOS DEL CLOROTALONIL
EN DOS ESPECIES DULCEACUÍCOLAS: *Daphnia obtusa* (CLADÓCERA) Y *Gambusia
affinis* (CYPRINODONTIDAE)”**

Tesis de grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Biólogo Marino.

**ELIZABETH CAMPOS BONTA
VALDIVIA - CHILE
2007**

Dedicado a ustedes, mis corazones de papel, quienes enternecieron sus palabras fortaleciéndome.

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos van dirigidos al laboratorio de Bioensayos de la Universidad de Concepción, especialmente al Dr. Enrique Bay – Schmith y la profesora Jeannette Silva, por recibirme como tesista en un proyecto personal, por el tiempo que me dedicaron, por su comprensión y apoyo durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A todos los funcionarios de la Universidad que de alguna u otra forma fueron participe de mis alegrías, mis tristezas, decepciones, ilusiones y proyectos, durante mis años en la universidad fueron mas allá que un rostro, fueron, y son parte de mis recuerdos por una conversación grata, un consejo oportuno, una ayuda desinteresada, un palmazo en la espalda, un abrazo de consuelo.

A Margarita Cofré, Matthias Freiburghaus, Nicole Diemer, a mis Tíos: Ramón y Margarita por su incondicional amistad, fundamental para retomar este trabajo. A mis padres, Violeta Bonta, Francisco Campos, mis hermanos, Eric Campos y Cesar Campos, por el ánimo, los consejos, por ser parte de mi soporte emocional, con el cual pude perseverar y continuar con este trabajo de investigación. En la última etapa de este proceso le agradezco fundamentalmente la ayuda desinteresada de mi hermano, Cesar Campos y mi tía, Maria Campos, por cuidar a mi hija, Isidora. A Isabel Andrade por su hospitalidad, a Rosita Assef por su buena voluntad, finalmente a todos aquellos que no los he nombrado en esta oportunidad, infinitamente, gracias.

A mis padres, Violeta y Francisco por creer en mí.

A mi exquisita y linda hija, Isidora, que con cuatro años pudo de alguna forma asimilar este proceso.

Y a ti, Rodolfo Godoy, que confiaste en mí para escribir juntos nuestra historia.

Y por sobre todas las cosas, a Dios, mi fiel e incondicional amigo.

INDICE

	Pagina
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE CONTENIDO	v
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE TABLAS	vii

INDICE DE CONTENIDO

I. RESUMEN	1
1.1 SUMMARY	2
II. INTRODUCCIÓN	3
III. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivos Generales	13
3.2 Objetivos Específicos	13
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	14
4.1 Organismos de ensayo	14
4.2 Condiciones de cultivo	15
4.3 Reactivos y materiales	17
4.4 Preparación de soluciones	18
4.5 Preparación de los controles	19
4.6 Procedimientos de los bioensayos con <i>Daphnia obtusa</i> .	19
4.6.1 Protocolo de bioensayos de toxicidad aguda con <i>D. obtusa</i> .	19
4.6.2 Protocolo de bioensayos crónicos con <i>D. obtusa</i> .	22
4.7 Procedimientos de los bioensayos con <i>Gambusia affinis</i>	25
4.7.1 Protocolo de bioensayos de toxicidad aguda con <i>G. affinis</i>	25
4.7.2 Protocolo de bioensayos de toxicidad crónica con <i>G. affinis</i>	28

4.8	Análisis estadístico de los Resultados	30
4.9	Criterio de aceptabilidad de los bioensayos	30
V. RESULTADOS		
5.1	Bioensayos agudos	31
5.1.1	Bioensayos agudos con <i>D. obtusa</i>	31
5.1.2	Bioensayos agudos con <i>G. affinis</i>	32
5.2	Bioensayos crónicos	33
5.2.1	Bioensayo crónico con <i>D. obtusa</i>	34
5.2.2	Bioensayo crónico con <i>G. affinis</i>	34
VI. DISCUSIÓN		
		36
VII. CONCLUSIÓN		
		40
VIII. BIBLIOGRAFÍA		
		41
IX. ANEXOS		
		46
Anexo 1.	Planilla de registro de los bioensayos agudos con <i>D. obtusa</i> y su respectivo análisis estadístico.	46
Anexo 2	Planilla de registro de los bioensayos agudos con <i>G. affinis</i> y su respectivo análisis estadístico.	63
Anexo 3	Planilla de registro del bioensayo crónico con <i>D. obtusa</i> y su respectivo análisis estadístico.	81
Anexo 4	Planilla de registro del bioensayo crónico con <i>G. affinis</i> y su respectivo análisis estadístico.	89

Anexo 5. Alimento para <i>Daphnia obtusa</i>	94
Anexo 6. Información sobre el clorotalonil	95

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- a) <i>Daphnia obtusa</i> . y b) <i>Gambusia affinis</i> .	14
Figura 2.- Cámara de cultivo de dáfnidos con temperatura y fotoperíodo controlados	16
Figura 3.- Acuario de 50 L usado para la climatización de <i>G. affinis</i> .	16
Figura 4. Viales (20 ml) utilizados para los bioensayos agudos realizados con la especie <i>D. obtusa</i>	18

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones experimentales y criterios de aceptabilidad para los bioensayos agudos con <i>D. obtusa</i> .	20
Tabla 2. Condiciones experimentales y criterios de aceptabilidad para el bioensayo crónico con <i>D. obtusa</i> .	23
Tabla 3. Condiciones experimentales y criterios de aceptabilidad para los bioensayos agudos con <i>G. affinis</i> .	26
Tabla 4. Condiciones experimentales y criterios de aceptabilidad para el bioensayo crónico con <i>G. affinis</i> .	28
Tabla 5. Bioensayos agudos: valores de $CL_{50-48 h}$ y los rangos de sensibilidad (Intervalo de Confianza al 95%) para <i>D. obtusa</i> expuesta al tóxico clorotalonil	32
Tabla 6. Bioensayos agudos: valores de $CL_{50-48 h}$ y los rangos de sensibilidad (Intervalo de Confianza al 95%) para <i>G. affinis</i> expuesta al tóxico clorotalonil.	33

- Tabla 7.** En la tabla se observa la diferencia de peso (grs.) medida antes y después de exponer a juveniles de *G. affinis* a los distintos tratamientos por un período de 96 h (control, control acetona y las distintas concentraciones de clorotalonil). **35**
- Tabla 8.** Bioensayo agudo n ° 1: mortalidades (n° de individuos muertos) de *D. obtusa* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,5). **47**
- Tabla 9.** Bioensayo agudo n ° 2: mortalidades (n° de individuos muertos) de *D. obtusa* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,6). **50**
- Tabla 10.** Bioensayo agudo n ° 3: mortalidades (n° de individuos muertos) de *D. obtusa* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,6). **54**
- Tabla 11.** Bioensayo agudo n ° 4: mortalidades (n° de individuos muertos) de *D. obtusa* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,5). **58**
- Tabla 12.** Bioensayo agudo n ° 5: mortalidades (n° de individuos muertos) de *D. obtusa* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,5). **61**
- Tabla 13.** Bioensayo agudo n ° 1: mortalidades (n° de individuos muertos) de *G. affinis* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,5). **64**

- Tabla 14.** Bioensayo n ° 2: mortalidades (n° de individuos muertos) de *G. affinis* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,6). **68**
- Tabla 15.** Bioensayo n ° 3: mortalidades (n° de individuos muertos) de *G. affinis* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,6). **71**
- Tabla 16.** Bioensayo agudo n ° 4: mortalidades (n° de individuos muertos) de *G. affinis* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,5). **75**
- Tabla 17.** Bioensayo agudo n ° 5: mortalidades (n° de individuos muertos) de *G. affinis* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,5). **79**
- Tabla 18.** Bioensayo crónico con *D. obtusa*: en la tabla se observa el número de dafnidos nacidos por hembra expuesta a distintas concentraciones de clorotalonil con sus respectivas replicas durante 21 días. **85**
- Tabla 19.** Bioensayo crónico con *D. obtusa*: esta tabla presenta un promedio del número de individuos nacidos por replica para cada tratamiento. **88**
- Tabla 20.** Bioensayo crónico con *G. affinis*: Registro del peso inicial (P. I) de los peces, medido al inicio del bioensayo, del peso final (P. F) medido después del bioensayo y la diferencia de peso (Dif. P) entre P. I. y P. F para cada tratamiento y sus respectivas replicas. **90**

I. RESUMEN

Pocos son los estudios que han sido publicados sobre el riesgo para los organismos acuáticos expuestos al clorotalonil, por lo que el presente estudio fue diseñado para proveer de información sobre la toxicidad aguda y crónica del clorotalonil sobre *Daphnia obtusa* (microcrustáceo) y *Gambusia affinis* (pez dulceacuícola), ambas especies presentes dentro de los sistemas acuáticos de Chile. Para ello, se expuso a las dos especies a un gradiente de concentraciones preparadas con soluciones de clorotalonil. Los bioensayos agudos con *D. obtusa* y *G. affinis* revelaron una sensibilidad al clorotalonil con CL_{50-48 h} promedio de 120,501 µg /L para *D. obtusa* y CL_{50-96 h} promedio de 124,263 µg / L para *G. affinis*. No se detectaron efectos subletales significativos (crecimiento en *G. affinis* y reproducción en *D. obtusa*) en el rango de concentraciones ensayadas con 21 días de exposición, sin embargo una tendencia tóxica es evidente. Estos antecedentes, pueden ser útiles para la elaboración de criterios y estándares de calidad del agua para la protección de los sistemas acuáticos nacionales.

1.1 SUMMARY

Few studies have been published regarding risk to aquatic organisms exposed to chlorothalonil, so this study was performed to provide information about the acute and chronic toxicity of this fungicide to *Daphnia obtusa* (microcrustacea) and *Gambusia affinis* (freshwater fish), both species present in aquatic ecosystems of Chile. For this purpose, both species were exposed to a concentration gradient prepared with solutions of chlorothalonil. The acute bioassays with *D. obtusa* and *G. affinis* revealed sensitivity to chlorothalonil with CL_{50-48 h} mean value of 120,501 µg /L for *D. obtusa* and 124,263 µg / L for *G. affinis*. No significant sublethal effects (*i.e.*, growth in *G. affinis* or reproduction in *D. obtusa*) were detected under the concentration range exposed for 21 day although a tendency of toxic effects was evident. This toxicological knowledge might be useful for the proposition of water quality criteria and standards for protection of the national aquatic ecosystems.

II. INTRODUCCIÓN

El agua dulce disponible está concentrada fundamentalmente en lagos, ríos y lagunas. Estas aguas también llamadas aguas superficiales se encuentran en una proporción que no llega al 0,5 % del agua total presente en la biosfera (Doménech, 1994). Otra fuente importante de agua dulce son las aguas subterráneas, las que tradicionalmente han sido consideradas como fuente de agua pura (Baird, 2001).

Una buena proporción de las aguas subterráneas y superficiales está contaminada por el vertido indiscriminado de residuos, los cuales han sido generados por la actividad del hombre en centros urbanos e industriales (Doménech, 1994). En este caso, cuando hablamos del vertido de residuos en los ecosistemas acuáticos, nos referimos a las emisiones puntuales (*i.e.* efluentes industriales y domésticos) y a las emisiones provenientes desde las fuentes difusas (*i.e.* actividades agrícolas y forestales). En esta última se incluyen las actividades agrícolas, las que en su proceso de producción hacen uso frecuente de pesticidas y que luego de su aplicación directa al suelo (forma manual o mecánica) o a las partes aéreas de las plantas, una parte alcanza el objetivo deseado, que es la planta, mientras que el resto es depositado en la superficie del suelo, ya sea por escorrentía de agua lluvia o viento, deposiciones atmosféricas y en menor proporción a través de restos de vegetales desprendidos o que quedan en el suelo al cosechar (Edmunds, 2007). Una vez en el suelo están sujetos a una serie de procesos de conversión y transporte.

Distribuidos por el suelo, los pesticidas son degradados por procesos bióticos y abióticos, formándose así, en algunos casos, en otros productos de mayor o menor toxicidad. Según Fournier y Col, (1997) (en: Edmunds, 2007) estos subproductos pueden absorberse al suelo y de esta forma alcanzar sistemas mas sensibles como el subsuelo o el agua subterránea. Sin embargo,

la degradación puede presentar resistencia a la degradación biológica, la cual suele ocurrir con los organoclorados que mantiene su actividad por periodos prolongados de tiempo, o puede ser incompleta y sus metabolitos persistir en el ambiente (Edmunds, 2007).

En el suelo, la dinámica de los pesticidas esta compuesto por una serie de procesos, los cuales determinan su disposición final (Edmunds, 2007). Según Navarro y col, (1992) (en: Edmunds, 2007) estos procesos que están expuestos los pesticidas son: la absorción, la difusión, la penetración y la lixiviación. De manera que, los pesticidas se transfieren a la atmósfera mediante fenómenos de evaporación, a las plantas por incorporación a través de la raíces o por absorción, al agua subterránea por infiltración de lixiviados y al agua superficial por escorrentía (Edmunds, 2007). Por medio de estos dos últimos procesos de transporte, los pesticidas son incorporados a las aguas subterráneas y superficiales, constituyendo un alto riesgo de contaminación para las aguas continentales y a su biota (Sherrad *et al.*, 2003).

Los autores: Edmunds, (2007), Doménech, (1994) concuerdan en que la naturaleza del pesticida, sus propiedades químicas y físicas, en algunos casos, su transformaciones químicas o biológicas, así como también las características fisicoquímicas del lugar donde es aplicado y de los diferentes procesos a los que están expuestos en los suelos, son decisivos en la acción contaminante de estos productos en el medio ambiente y su biota. Así por ejemplo, en el proceso de lixiviados de pesticidas, la solubilidad de estos en el agua juega un rol importante, por ejemplo, los compuestos organoclorados son poco solubles en agua debido a su carácter polar, y los organofosforados son, en general, más solubles. Otro factor esencial que interviene en el proceso de lixiviación es la absorción de los pesticidas, que se define como la tendencia del pesticida por adherirse a las partículas del suelo, este proceso, afecta a su movilidad evitando ser transportado hacia el acuífero. Así también, influye la volatilización del pesticida, ya que compuestos con una alta

presión de vapor tenderán a volatizarse y se encontraran en menor cantidad disponible para la lixiviación (Edmunds, 2007). Por lo tanto, la cantidad de pesticida que se desplace por lixiviación depende de la retención del pesticida, de su transformación química o biológica y de su volatilización (Doménech, 1994). En principio, se puede asegurar que aquellos pesticidas que son poco solubles en agua, poco volátiles y químicamente estables, permanecen largos períodos de tiempo en el suelo (Doménech, 1994; Edmunds, 2007).

Los pesticidas, poseen características contaminantes que dependen principalmente de sus propiedades tóxicas, las cuales se definen por la concentración de este en un momento dado en el ambiente y la sensibilidad de los organismos vivos afectados (Edmunds, 2007). Según Orozco *et al.*, (2003) desde el punto de vista de la contaminación ocasionada por los pesticidas, se deben tomar en cuenta tres aspectos: persistencia, bioacumulación y toxicidad en el ambiente. La persistencia de un pesticida en el ambiente (agua o suelos) se define como el tiempo necesario que tarda en degradarse la mitad de la cantidad de pesticida aplicada (vida media). La bioacumulación de los pesticidas en el ambiente, en general, es producida por que presentan una baja solubilidad en el agua y una elevada solubilidad en las grasas, que al ser ingeridos pueden acumularse en el tejido adiposo, lo que produce su acumulación en la cadena trófica. Por último, el término toxicidad se refiere al daño que puede producir en los seres vivos la presencia de determinados contaminantes en el agua, en concentraciones que den positivos los denominados test de toxicidad. La toxicidad es en función de la concentración del contaminante y del tiempo de exposición al que este sometido el ser vivo al tóxico.

Los pesticidas son formulaciones que consisten en mezclar un ingrediente activo con elementos que cumplen el rol de vehículos, obteniendo en distintas formas el producto final (Comisión Nacional del Medio Ambiente, 1998). Los pesticidas se clasifican según la especie a combatir en: Insecticidas, herbicidas, fungicidas.

Los fungicidas, son sustancias que se utilizan para el control del crecimiento de varios tipos de hongos. Los fungicidas mas modernos están constituidos por compuestos orgánicos (Doménech, 1994), tales como los pesticidas organofosforados, carbamatos y los organoclorados. Baird (2001), caracteriza a los pesticidas organoclorados por los enlaces carbono – cloros difíciles de romper, que le confieren una baja reactividad, además de una lenta degradación en el medio ambiente. Estos compuestos, tienen otras propiedades notables: estabilidad a la descomposición, bajas solubilidades en agua, excepto que estén presentes átomos de oxígeno o nitrógeno en las moléculas. Este autor, al igual que Doménech (1994), concluye que los pesticidas organoclorados son los que han causado un mayor impacto ambiental negativo, ya que, una vez en el ambiente se degradan lentamente. Además la mayor parte de estos compuestos son hidrofóbicos; no se disuelven fácilmente en agua, pero si en medios hidrocarbonatos, tales como aceites o tejidos grasos; Esta peculiaridad ha conducido a su acumulación en los organismos vivos, como peces, seres humanos y otros animales.

Los fungicidas se clasifican en grupos, entre ellos se encuentran: los bencenos sustituidos, tiocarbamatos, compuestos de cobre, organomercurios, organoestánicos, compuestos de cadmio y fungicidas orgánicos diversos (Edmunds, 2007). El modo de acción de los fungicidas es variado. Los de acción sistemática se mueven dentro de los espacios extracelulares, paredes celulares y elementos del xilema gobernados por difusión y tasa de respiración. Actúan sobre funciones bioquímicas específicas y también hay algunos que interfieren en el metabolismo de bases

nitrogenadas o ácidos nucleicos. Y los de modo de acción indirecta disminuyen la patogenicidad del hongo y aumentan las defensas de las plantas. Hay otros de acción no sistémica los cuales no penetran en la planta, quedan depositados sobre la superficie de hojas y frutos. Requieren una cobertura completa del follaje (Edmunds, 2007). Generalmente actúan inhibiendo múltiples funciones celulares ya que se unen grupos químicos de las enzimas (Mitidieri M., 2006).

Los pesticidas de naturaleza bencenos sustituidos, específicamente bencenos clorados, ejercen su principal acción tóxica sobre el sistema nervioso, interfiriendo con el flujo de cationes a través de membranas de las células nerviosas, aumentando la irritabilidad de las neuronas. Su modo de acción incluye la combinación de este con una molécula llamada glutatión dentro de las células de los hongos. Mientras que se van adhiriendo, van quedando las enzimas dependientes del glutatión sin poder realizar su función. Una cantidad variable de enzimas que participan en la respiración celular, proceso que aporta energía a las células, son dependientes del glutatión. Por lo que los efectos tóxicos de clorotalonil se caracterizan por inhibir este proceso (Edmunds, 2007).

Los fungicidas comercializados en Chile y los laboratorios que lo producen son: Bravo 500 (Syngenta), Bravo ultrex (Syngenta Agribusiness S. A.), Pasta poda TPN 50 (Agrícola Nacional), Podastik (Moviagro S. A.), Point clorotalonil 50 flotable (Point Enterprise Chile. Ltda.), Púgil 50 SC (Sipcam Agrocom de Chile Ltda.), Púgil 75 WG (Sipcam Agrocom de Chile Ltda.), Swap (Solchem Ltda.) (Subdepartamento de Plaguicidas y Fertilizantes, 2001). Todos estos compuestos están constituidos por una sustancia activa clorotalonil (2, 4, 5,6-tetracloroisofaltonitrilo), que es un compuesto organoclorado de benceno sustituido, de baja hidrosolubilidad (0,81 mg/L a 25 °C) (The British Crop Protection Council, 2001), es un pesticida no sistémico, usado extensamente en la agricultura, silvicultura y ambientes urbanos (Sherrad *et al.*, 2003). El clorotalonil es

comúnmente usado en la agricultura como fungicida, indirectamente puede ser introducido dentro de los sistemas acuáticos a través de agua lluvia o directamente cuando es aplicado por medio de pulverizaciones (terrestre o aérea).

Según Caux *et al.*, (1996) (en: Sherrard *et al.*, 2003), el clorotalonil es altamente tóxico para peces, invertebrados acuáticos y microorganismos marinos. El modo de acción para estas especies no objetivo, es que el clorotalonil se une a las enzimas sulfidril, importantes en la respiración celular. Con suficiente concentración de clorotalonil y tiempo a su exposición, las funciones metabólicas y de respiración celular disminuyen, provocando la muerte del organismo (Sherrard *et al.*, 2003). Sherrard *et al.*, (2003), plantea que son escasos los estudios publicados sobre el riesgo para organismos acuáticos expuestos al clorotalonil, y a su vez se refiere a los pocos conocimientos sobre efectos letales o subletales de este compuesto.

En 1980, según Abarca y Ruepert, (1992) (en Astorga, 1998) se demostró que el clorotalonil contaminó pozos y ríos en el valle de la Estrella en Costa Rica, donde se detectaron concentraciones de este compuesto sobre los 8 $\mu\text{g/L}$; una concentración entre 3 a 6,5 $\mu\text{g/L}$ por un período prolongado de tiempo, tuvo efectos adversos en peces (Astorga, 1998);

En Chile, el crecimiento económico ha traído consigo problemas de contaminación de los ambientes acuáticos, debido al incremento de las sustancias químicas activas liberadas al ambiente por los procesos productivos. Esto ha motivado una preocupación por el medio ambiente e impulsado el desarrollo de herramientas de evaluación y monitoreo de la contaminación acuática (Silva *et al.*, 2003). En este proceso, se deben considerar tanto la exposición como sus efectos sobre los organismos que habitan los ecosistemas acuáticos (Gaete *et al.*, 1999).

Una aproximación para evaluar los efectos de un agente tóxico (xenobiótico) son las pruebas biológicas de toxicidad (Larraín, 1995; Ronco *et al.*, 2004). Estas últimas, son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes químicos sobre los organismos de prueba, bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación y son evaluados por la reacción del organismo: mortalidad, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos e histológicos. Estos efectos presentan valores de toxicidad, que pueden ser expresados en forma de concentración del tóxico en el agua; En este estudio se utilizó la concentración letal media (CL_{50}), definida como la concentración del material en el agua, que se estima afecta al 50% de los organismos de ensayo, en una prueba de toxicidad aguda. En cambio, los valores de las pruebas de toxicidad crónicas pueden ser expresados como la concentración mas baja a la cual se observa efecto (LOEC) y la concentración a la cual no se observa efecto (NOEC);

Los bioensayos, son pruebas toxicológicas rápidas, fácilmente interpretables y reproducibles (Sprage, 1970; Hartley, 1982; Calow, 1989). Esta última característica es importante para la confiabilidad de los resultados en la aplicación de cualquier diseño experimental.

Los bioensayos son pruebas de toxicidad, los que además de determinar el efecto tóxico de un agente químico, son útiles en la determinación de criterios de calidad necesarios para establecer estándares de carácter legislativo para la protección de la vida acuática. Para la realización de estos experimentos con distintos organismos, se han desarrollado protocolos por organizaciones internacionales, como por ejemplo: la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S.E.P.A), Comunidad Europea (CEE), Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (A.S.T.M), la Compañía de Tecnología de Saneamiento Ambiental de Brasil (CETESB), todas describen metodologías estandarizadas para el desarrollo del cultivo del organismo de prueba,

condiciones de los experimentos, aplicabilidades y restricciones. Además, establecen criterios para la selección de los organismos de prueba, tales como una alta y constante sensibilidad a los tóxicos, alta disponibilidad y abundancia, estabilidad genética y uniformidad de las poblaciones, uso de organismos autóctonos o representativos del ecosistema que se evalúa, conocimiento de su biología, sencillo mantenimiento y cultivo en laboratorio y disponibilidad de los ejemplares a lo largo de todo el año. Las especies utilizadas pueden ser tanto marinas como dulceacuícolas, entre ellos bacterias, microalgas, crustáceos, peces, etc. En concordancia con lo anterior, actualmente hay dos especies de prolongado uso como organismos de prueba: *Daphnia obtusa* y *Gambusia affinis*. Ambas especies son utilizadas para el desarrollo de bioensayos y están presentes en los ecosistemas acuáticos nacionales. *D. obtusa* es un microcrustáceo de agua dulce, que se reproduce partenogénicamente (lo cual asegura una uniformidad de respuesta), tienen un ciclo de vida y reproductivo corto, además de tener un pequeño tamaño favoreciendo su manipulación, según el registro de Vavra (1900) (en Villalobos, 1994) con medidas entre 1,8 a 3,6 mm.. *D. Obtusa*, presenta distribución cosmopolita y en Chile se encuentra de norte a sur y de costa a cordillera, en diferentes cuerpos de agua dulce (Villalobos, 2006). Existen registros de Villalobos (1994) de la presencia de *D. obtusa* en Chile central, en el lago Inca y de registros anteriores, en la localidad de Limache. Esta especie ha sido utilizada en la evaluación de la toxicidad de sustancias puras y de muestras ambientales de composición desconocida.

G. affinis es un pez dulceacuícola, perteneciente a la familia Cyprinodontidae, que fue introducida en Chile para combatir plagas de zancudos. Esta especie cosmopolita tiene un máximo de 56 mm de longitud y generalmente se encuentra en altas densidad, siendo por esto útil para los requerimientos de los bioensayos.

En Chile, desde 1990 han surgido cambios en la políticas concernientes al medio ambiente (Castillo y Schâfer, 2000), los que han sido necesarios para la evaluación del riesgo ambiental de la gama de plaguicidas que ingresan a nuestro país. Considerando las evidencias de contaminación del clorotalonil en el ambiente, además de sus propiedades químico- físicas peculiares que lo caracterizan como un compuesto químico potencialmente riesgoso para el ambiente, aparece la necesidad de evaluar los efectos de este pesticida órganoclorado por medio de pruebas biológicas de toxicidad en especies presentes en los ecosistemas acuáticos chilenos. Esta información es necesaria para establecer criterios y estándares de calidad de carácter legislativo que orienten a un uso responsable de esos productos y provean de un marco de referencia a los fiscalizadores encargados de la preservación del ambiente. Para este fin, la presente investigación tuvo como objetivo determinar niveles de concentración del clorotalonil que tienen efectos tóxicos agudos y crónicos en el microcrustáceo *Daphnia obtusa* y el pez dulceacuícola *Gambusia affinis*. Esta estimación se realizó mediante bioensayos ecotoxicológicos, cuyos procedimientos se basaron en los protocolos descritos por la Agencia para la Protección del MedioAmbiente de los Estados Unidos (U.S.E.P.A, 1990) y la Organización Internacional de Estandarización 6341 (ISO, 1989).

Se postula en el presente trabajo que las concentraciones de clorotalonil encontradas en cuerpos de agua dulce de regiones agrícolas ($\mu\text{g} / \text{L}$) tienen efectos tóxicos sobre especies de la biota acuática de Chile.

HIPOTESIS

El fungicida clorotalonil, presenta efectos tóxicos sobre la biota acuática.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Generales

- ◆ Evaluar la toxicidad aguda y crónica del clorotalonil sobre *Daphnia obtusa* (microcrustáceo).
- ◆ Evaluar la toxicidad aguda y crónica del clorotalonil sobre *Gambusia affinis* (pez).

3.2 Objetivos Específicos

- ◆ Determinar la concentración de clorotalonil, que causa la muerte al 50% de los organismos de *D. obtusa*, expuesta por un período de 48 hrs. (CL_{50-48 h})
- ◆ Determinar la concentración de clorotalonil, que causa la muerte del 50% de los organismos de *G. affinis*, expuesta por un período de 96 hrs. (CL_{50-96 h})
- ◆ Determinar la concentración mas baja de clorotalonil que produce un efecto negativo (LOEC), estadísticamente significativo, sobre la reproducción de *D. obtusa* y la concentración mas alta en la cual no se observan dichos efectos adversos sobre los organismos (NOEC), expuestos por 21 días al tóxico.
- ◆ Determinar la concentración mas baja de clorotalonil, que produce un efecto negativo (LOEC), estadísticamente significativo, sobre la diferencia de peso de *G. affinis* y la concentración mas alta en la cual no produce dichos efectos adversos sobre los organismos (NOEC), expuestos por 96 hrs. al tóxico.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Organismos utilizados en los bioensayos

Para las pruebas de toxicidad se utilizaron dos especies de agua dulce: el micro - crustáceo *D. obtusa* (Fig. 1. a.) y el pez *G. affinis* (Fig. 1. b.), *D. obtusa* se obtuvo de cultivos mantenidos en el laboratorio, en condiciones controladas y estandarizadas. A diferencia de *D. obtusa*, los ejemplares juveniles (1 – 1,50 cm.) de *G. affinis* fueron capturados con una malla en la laguna grande de San Pedro de la Paz (VII Región) en los periodos de otoño e invierno (anexo 2). Una vez capturados fueron mantenidos en un acuario por un período no inferior a 7 días en el laboratorio antes de ser utilizados como organismos de ensayo. Se alimentaron diariamente con Tetramin, un alimento compuesto por: levadura secada, almidón de maíz, comida del camarón, gluten del trigo, proteína de papa, aceite de soja, comida de soja descortezada, l-ascorbiyl-2-polyphosphate, carnitine, complejo del bisulfito del sodio del menadione.

Los ensayos ecotóxicológicos fueron realizados en el Laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción.

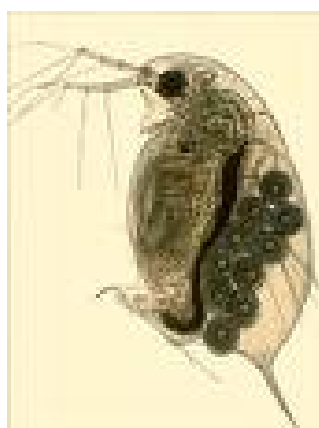


Fig. 1 a) *Daphnia obtusa*.



Fig. 1b) *Gambusia affinis*.

4.2 Condiciones de Cultivo

Los cultivos de *D. obtusa* estaban constituidos por 25 a 30 adultos en recipientes de 1 litro de agua reconstituida (Fig. 2), la cual era renovada 3 veces en la semana, junto con el suministro de alimento (1,5 ml por litro, cada vez). El alimento consistió en una mezcla de levadura, alfalfa y harina de pescado (Anexo 5). El agua reconstituida, preparada según el protocolo ISO 6341 (1989), consiste básicamente en agua destilada con sales inorgánicas.

Las condiciones físicas en las cuales se mantuvieron los cultivos de *D. obtusa* fueron iluminación con ampollas fluorescentes, fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, la temperatura constante de 20 ± 2 °C.

Una vez alcanzada la madurez reproductiva de las dafnias, alrededor de los 7 días de edad, se obtiene la descendencia (neonatos) los cuales son utilizados como organismos de ensayo.

Los ejemplares de *G. affinis* se mantuvieron en acuarios de 50 L (Fig.3) con agua de laguna, con aireación constante y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Después de un período de climatización (7 días) se utilizaron los juveniles (1 a 1,5 cm de longitud) para los bioensayos.



Fig. 2. Cámara de cultivo de dáfidos con temperatura y fotoperíodo controlados.



Fig. 3. Acuario de 50 L usado para la climatización de *G. affinis*.

4.3 Reactivos y Materiales

En el desarrollo de los bioensayos se utilizó el compuesto químico puro en forma de polvo blanco de clorotalonil, facilitado por la empresa ANASAC (Anexo 6).

Para la dilución del clorotalonil se utilizó el solvente orgánico acetona al 100%, donde su concentración en las diluciones no fue mayor a 0,1ml / L, según lo especificado en protocolos internacionales (ISO 6341,1989).

Los parámetros físico-químicos: PH, T°, y O₂ disuelto, fueron medidos con los siguientes equipos: peachímetro (HANNA 9021), Water Quality Cheker U-10 (HORIBA), respectivamente.

Para la preparación del agua reconstituida utilizada en los cultivos de *D. obtusa* fue necesario un sistema destilador de agua.

Para los bioensayos agudos con *D. obtusa* se dispuso de los siguientes materiales: Balanza analítica, vasos precipitados (1000 ml), micropipeta automática (Socorex 411), pipeta Pasteur con pera de goma, viales (20ml) (Fig. 4), viales de 40 ml, reactivos: Ca Cl₂ * 2H₂O, MgSO₄ * 2H₂O, NA HCO₃ y KCl. (para la preparación de agua reconstituida según ISO 6341,1989).

Para los bioensayos agudos con *G. affinis* se dispuso del siguiente material: vasos precipitados (500 ml), frascos de vidrio (400 ml), probeta graduada (100 ml, 500 ml, 2000 ml), frascos de 250 ml.

El agua de dilución para los bioensayos con peces fue agua potable declorada, mientras que la solución stock del compuesto químico se hizo con agua destilada.



Fig. 4. Viales (20 ml) utilizados para los bioensayos agudos realizados con la especie *D. obtusa*.

4.4 Preparación de las soluciones

Las diferentes concentraciones de clorotalonil ensayadas en cada bioensayo, se realizaron a partir de una solución Stock 0.0008 gr/ L. Esta solución, se preparó extrayendo un alícuota desde una solución inicial 8 gr/ L, cuya concentración se preparó disolviendo una cantidad conocida de clorotalonil, pesada en una balanza analítica y disuelta en volumen específico de acetona.

Las soluciones, stock e inicial, se prepararon con agua de laguna, en los bioensayos con peces, o agua reconstituida, en los bioensayos con dafnidos, para cada vez que se realizó una nueva prueba de toxicidad.

4.5 Preparación de los controles

En los controles se utilizó agua reconstituida para los bioensayos con *D. obtusa* y agua de laguna para los bioensayos con *G. affinis*.

4.6 Procedimientos de los bioensayos con *D. obtusa*

4.6.1 Protocolo de Bioensayos de toxicidad aguda con *D. obtusa*

Se realizaron 5 bioensayos agudos basados en el protocolo descrito por A.S.T.M (1996) y U.S.E.P.A. (1990) para dáfnidos. Las condiciones experimentales y criterios de aceptabilidad para los bioensayos agudos con *D. obtusa* se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones experimentales y criterios de aceptabilidad para los bioensayo agudos con *D. obtusa*.

Tipo de prueba	Estático
Duración de la prueba	24 horas
Temperatura	20 ± 2 °C
Calidad de la luz	Iluminación ambiente de laboratorio
Foto período	16 h luz/ 8 h oscuridad
Volumen de la solución de prueba	10 ml
Edad de los organismos	Neonatos < a 24 horas
Número de controles	2 (agua y acetona)
Número de concentraciones	5
Número de réplicas por concentración	4
Número de organismos/envase	5
Aireación	Sin aireación
Agua de dilución	Agua reconstituida (ISO 6341,1989)
Alimentación	Ninguna
Criterio de aceptabilidad	≤ 10 % de mortalidad en los controles
Respuesta	Inmovilidad de los neonatos

Para el desarrollo de las pruebas de toxicidad aguda con *D. obtusa* se emplearon neonatos expuestos a diferentes concentraciones del agente tóxico clorotalonil, durante un período de 48 horas. Como resultado de dicha exposición se pudo determinar la concentración del clorotalonil, que produce la muerte del 50% de la población de neonatos expuestos (concentración letal media o CL₅₀), con un nivel de confiabilidad del 95%.

Las concentraciones ensayadas (bioensayo definitivo) de clorotalonil se prepararon a partir de una solución stock de 0,0008 gr/L.

Previo al ensayo definitivo se llevo a cabo una prueba preliminar, en la cual se preparó un amplio número de concentraciones (1,5, 15, 150, 500, 800 µg /L). Para la prueba se colocó 10 ml de cada una de las diluciones en los viales de prueba y se transfirieron 5 neonatos por vial. A las 48 h se registró el número de dáfidos sin movilidad (respuesta de mortalidad). Con esta información se pudo establecer el intervalo de concentración en la cual se observó un 0 y un 100% de mortalidad de los organismos de ensayo expuestos. Este intervalo de concentraciones se utilizó como rango para establecer las concentraciones ensayadas en las pruebas definitivas. Las concentraciones de clorotalonil ensayadas fueron 5, en progresión geométrica. En cada bioensayo se hicieron dos controles, un control con agua y otro control con la máxima cantidad de acetona empleada en la disolución del clorotalonil (0,1 ml). El rango de concentraciones ensayadas en los bioensayos con *D. Obtusa* fluctuaron entre 35 - 560 µg /L. Las concentraciones se concretaron por medio de diluciones utilizando agua reconstituida (ISO 6341,1989) en el caso de *D. Obtusa*. Para la prueba se colocó 20 ml de cada una de las 5 diluciones en los viales de prueba, se traspasaron 20 neonatos por concentración, divididos en 4 réplicas con 5 ejemplares cada una. Fueron mantenidos sin alimentación por 48 h., al final de este período se contabilizó el número de organismos inmóviles.

4.6.2 Protocolo de bioensayos crónicos con *D. obtusa*

Se efectuó un bioensayo crónico cuyo procedimiento se obtuvo del protocolo de la A.S.T.M (E) 1193. Las condiciones experimentales y criterios de aceptabilidad para el bioensayo crónico con *D. obtusa* se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones experimentales y criterios de aceptabilidad para el bioensayo crónico con *D. obtusa*.

Tipo de test	Semi – estático
Duración del test	21 días
Temperatura	20°C ± 1°C
Calidad de luz	Iluminación ambiental del laboratorio
Foto período	16 h luz/ 8 h oscuridad
Volumen de vial	40 ml
Edad de los organismos	Neonatos < 24 h
N° de repl./ por concentración	10
N° de organismos por cámara	1
Recambio de medio	Cada 48 horas
Régimen de alimentación	0,075 ml de suspensión alimenticia por cámara, en cada recambio de medio
Aireación	Ninguna
Tipo de agua control y dilución	Agua reconstituida
Respuesta	Tasa de reproducción por dafnia parental
Criterio de aceptabilidad	< 10 % de mortalidad de las dafnias parentales, mínimo 3 camadas en el control
Expresión de los resultados	LOEC Y NOEC

Para el desarrollo de las pruebas crónicas con *D. obtusa* se utilizaron neonatos de menos 24 horas de nacidos, los cuales se exponen individualmente en cada vial a las distintas concentraciones de clorotalonil, por un período de 21 días. Día por medio se retiran los neonatos nacidos en cada frasco. Al término del período de exposición se contabiliza el número total de crías nacidas por hembra parental. Estos datos fueron usados para determinar los parámetros de toxicidad: LOEC y NOEC. El LOEC representa la concentración más baja en la cual se observan diferencias significativas en la tasa de reproducción de las dafnias parentales, con respecto al grupo control. El NOEC es la mayor concentración en la cual no se observan diferencias significativas en la tasa de reproducción comparadas con el grupo control.

A partir de una solución stock de 0,0008 gr /L de clorotalonil, preparada con agua reconstituida como medio de dilución, se prepararon las distintas concentraciones ensayadas, las cuales fueron dispuestas en los 10 viales por concentración. Luego, se añadió 1 neonato por vial, incluyendo los 2 grupos de controles (agua y acetona). Ambos controles fueron preparados con agua reconstituida, pero al control acetona se le agregó 0,0072 ml. de acetona, ya que fue la cantidad mayor de acetona utilizada en la concentración más alta de clorotalonil. Se realizó recambio de medio cada 48 h, para ello se preparó otro set de viales con medio fresco y 0,075 ml de alimento por unidad experimental. Luego con una pipeta Pasteur se traspasaron los individuos parentales a las nuevas cámaras. A los 7 días de exposición comienzan a nacer las nuevas camadas de dáfidos, los cuales fueron retirados y contados cada vez que se realizaban los recambios de medio hasta completar los 21 días de exposición al tóxico.

4.7 Procedimientos de los bioensayos con *Gambusia affinis*.

4.7.1 Protocolo de bioensayos de toxicidad aguda con *G. affinis*.

Se realizaron 4 bioensayos agudos, en los cuales se emplearon especímenes juveniles de *G. affinis* (1 – 1,50 cm de longitud), expuestos a las distintas concentraciones de clorotalonil por un período de 96 h. Las condiciones experimentales y criterios de aceptabilidad de los bioensayos agudos realizados con esta especie se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones experimentales y criterios de aceptabilidad para los bioensayos agudos con *G. affinis*.

Tipo de prueba	Semi – estático
Duración de la prueba	96 horas
Temperatura	18 ± 2° C
Calidad de luz	Iluminación ambiental del laboratorio
Foto período	16 h luz/ 8 h oscuridad
Recambio de las soluciones de la prueba	A las 48 horas
Nº de organismos por cámara	5
Nº de réplicas por concentración	4
Régimen de alimentación	No se requiere alimentación
Aireación de la solución de prueba	No se requiere aireación, excepto si la concentración baja de 6 mg/L
Volumen de muestra necesario	400 ml por cámara
Criterio de aceptabilidad de la prueba	≤ 10% de mortalidad en los controles

Durante el bioensayo se realizó un recambio de medio a las 48 horas de exposición. Como resultado a dicha exposición se pudo determinar la concentración del clorotalonil que produce la muerte al 50% de la población de juveniles expuestos por 96 horas a la acción del compuesto (concentración letal media o CL₅₀), con un nivel de confiabilidad del 95%.

Las diferentes concentraciones de clorotalonil se prepararon a partir de una solución stock de 0.0008 gr /L para los bioensayos 1, 2 y de 0.0005 gr /L para los bioensayos 3, 4 y 5. Las

soluciones stock se prepararon con agua destilada en un vaso precipitado (1000 ml) cada vez que se realizó un bioensayo.

Para determinar las concentraciones a ensayar se llevó a cabo una prueba preliminar, con un amplio rango de concentraciones. De esta manera se estableció el rango de concentraciones entre las cuales se observó un 0 y un 100% de mortalidad. Este intervalo se utiliza como guía para la preparación de las diluciones en las pruebas definitivas.

Ya determinado el intervalo de concentración del clorotalonil a ensayar, se procedió a realizar las diluciones para las pruebas definitivas, compuestas por 5 concentraciones en progresión geométrica y dos controles (control agua y control acetona). Los intervalos de concentración variaron entre 51,45 a 1000 $\mu\text{g} /\text{L}$. Las distintas concentraciones se prepararon con agua de laguna. Para la prueba se colocó 400 ml de cada concentración en los envases de prueba con 4 réplicas por concentración. Luego se dispusieron 5 peces por envase con un total de 20 individuos (*G. affinis*) por concentración. Fueron mantenidos sin alimentación y sin aireación durante el transcurso del bioensayo. Al final de este período de exposición (96 horas) se contabilizó el número de peces muertos.

En cada bioensayo se realizaron dos controles, uno con agua de laguna y otro con una concentración de 0,08 ml/L de acetona en agua, siendo ésta la concentración más alta de acetona utilizada en las concentraciones ensayadas con clorotalonil.

4.7.2 Protocolo de Bioensayos de toxicidad crónica con *G. affinis*

Se realizó 1 bioensayo de toxicidad crónica con juveniles de *G. affinis* expuestos a 5 concentraciones en progresión geométrica de clorotalonil y dos controles, por un periodo de 21 días. Las condiciones experimentales y criterios de aceptabilidad para el bioensayo crónico *G. affinis* se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones experimentales y criterios de aceptabilidad para el bioensayo crónico con *G. affinis*.

Tipo de test	Estático, con recambio
Duración del test	21 días
Temperatura	20 ± 1 °C
Calidad de luz	Iluminación ambiental del laboratorio
Foto período	16 h luz/ 8 h oscuridad
Volumen de las cámaras	300 ml
Volumen de la solución de prueba	250 ml
Edad de los organismos	Juveniles
N° de réplicas por concentración	10
N° de peces por cámara	1
Recambio del medio	Cada 48 horas
Alimentación	Tetramin
Aireación	Sin aireación continua

Las distintas concentraciones se prepararon a partir de una solución stock de 0.0008 gr /L preparados en un vaso precipitado de 1000 ml. Las concentraciones preparadas fueron 1,25, 2,5, 5 y 10, μg /L, utilizando agua de laguna como agua de dilución.

Para la prueba se colocó 250 ml de cada concentración de clorotalonil en frascos de vidrio de 250 ml, con 10 réplicas por concentración. Luego se introdujo un pez por frasco. Cada 48 horas se realizó recambio del medio y se le suministró alimento (Tetramin). Para el recambio se preparó un nuevo set de frascos con medio fresco y alimento, en los cuales fueron colocados cuidadosamente los peces de los frascos utilizados anteriormente. Se midieron las variables: oxígeno disuelto, ph y la temperatura en cada recambio. Los controles fueron preparados con agua de laguna. Uno de ellos con una concentración de 0,1 ml/L de acetona en agua.

Cada pez fue individualizado en su cámara experimental y pesado antes de la exposición al compuesto. Una vez terminada la prueba se registraron los pesos individuales de los peces expuestos para determinar la variación del peso corporal durante el período de exposición. De esta manera se obtuvo una diferencia de peso del individuo. Estos datos fueron usados para determinar los parámetros de toxicidad: LOEC y NOEC. El LOEC es la concentración más baja a la cual se observa diferencias significativas en la disminución del peso del pez con respecto al control y el NOEC es la concentración en la cual no se observa disminución en relación al control.

4.8 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos de los bioensayos agudos se analizaron utilizando el programa estadístico Probit (U.S.E.P.A., 1988) el cual es un método paramétrico para el cálculo de la $CL_{50-24 h}$ y su intervalo de confianza, o el Trimmed Spearman-Kärber v. 1.5, para datos no paramétricos.

Para los resultados de los bioensayos crónicos se utilizó el paquete estadístico TOXSTAT, el cual compara grupos de datos, con respecto al control, para obtener los valores de toxicidad LOEC y NOEC.

4.9 Criterio de aceptabilidad de los bioensayos

Tanto los bioensayos agudos como los bioensayos crónicos realizados con *D. Obtusa* y *G. Affinis* fueron considerados válidos cuando la mortalidad en los controles fue \leq a 10 % (U.S.E.P.A, 1990).

V. RESULTADOS

5.1. Bioensayos agudos

Los bioensayos agudos realizados con *D. obtusa* y *G. affinis* fueron considerados válidos cuando la mortalidad en los controles fue \leq a 10% (U.S.E.P.A., 1990).

5.1.1 Bioensayos agudos con *D. obtusa*

En la Tabla 5, se puede observar las $CL_{50-48\text{ h}}$ y los rangos de sensibilidad para los cinco bioensayos de toxicidad aguda realizados con *D. obtusa*. El bioensayo N° 2 presentó el valor mas bajo de $CL_{50-48\text{ h}}$ con 99,705 $\mu\text{g /L}$, mientras que el bioensayo N° 4 mostró una $CL_{50-48\text{ h}}$ más alta con 153,84 $\mu\text{g /L}$ (Anexo 1). El promedio estimado de las $CL_{50-48\text{ h}}$ fue de 124,263 $\mu\text{g /L}$ y una desviación estándar (D. E.= 23,185).

Tabla 5. Bioensayos agudos: valores de $CL_{50-48\text{ h}}$ y los rangos de sensibilidad (Intervalo de Confianza al 95%) para *D. obtusa* expuesta al tóxico clorotalonil

Bioensayo N°	$CL_{50-48\text{ h}}$ (µg/L)	Intervalo de Confianza (95%) (µg/L)
1	133,83	113,58 – 157,69
2	99,705	87,434 – 113,608
3	132,37	116,91 – 150,03
4	153,84	125,83 – 188,10
5	101,57	52,10 - 197,99
Promedio	124,263	
Desviación Estándar	23,185	

5.1.2 Bioensayos agudos con *G. affinis*.

En la Tabla 6 se observan las $CL_{50-96\text{ h}}$ y sus intervalos de confianza (95%) al clorotalonil estimados para cada uno de los cinco bioensayos de toxicidad aguda realizados con *G. affinis*. El bioensayo N° 1 entrega una $CL_{50-96\text{ h}}$ de 47,188 µg /L siendo el valor más bajo, en tanto que el bioensayo N° 4 mostró la mayor $CL_{50-96\text{ h}}$ de 189,673 µg /L (Anexo 2). El valor promedio estimado de las $CL_{50-96\text{ h}}$ fue de 120,501 µg /L, el intervalo de confianza fue de 101,43 – 139,89 µg /L. La desviación estándar estimada fue de 63,38.

Tabla 6. Bioensayos agudos: valores de $CL_{50-48\text{ h}}$ y los rangos de sensibilidad (Intervalo de Confianza al 95%) para *G. affinis* expuesta al tóxico clorotalonil.

Bioensayo N°	$CL_{50-96\text{ h}}$ ($\mu\text{g/L}$)	Intervalo de Confianza (95%) ($\mu\text{g/L}$)
1	47,188	24,508 - 60,515
2	113,84	103,25 - 125,52
3	72,024	62,117 - 83,340
4	189,673	160,038 - 224,487
5	179,78	157,21 - 205,59
Promedio	120,501	
Desv. Estándar	63,38	

5.2 Bioensayos crónicos

Los datos obtenidos en los bioensayos crónicos fueron analizados, en primer lugar, con los test de normalidad y homogeneidad de varianza para determinar si eran datos paramétricos o no paramétricos. Según el tipo de datos que se analizó y el número de réplicas de cada grupo de datos (igual o desigual n° de réplicas/grupo de datos) se eligió el test estadístico más adecuado para esos grupos de datos, del programa computacional TOXSTAT v.3.0 (Gulley *et al.*, 1989), para obtener los valores de NOEC y LOEC correspondientes.

5.2.1 Bioensayo crónico con *D. obtusa*

El análisis estadístico de los datos se realizó usando una tabla de ANOVA que analiza si existe diferencias significativas entre la cantidad de neonatos nacidos en los distintos tratamientos comparados con el grupo control. Los datos procesados son paramétricos y pasaron los test de homogeneidad de varianza y normalidad. Los resultados no mostraron diferencia significativa en la cantidad de neonatos nacidos en los distintos tratamientos comparados con el grupo control. El F estimado ($F=1,761$) fue menor que el valor de F calculado ($F=2,34$) (Anexo 3).

5.2.2 Bioensayo crónico con *G. affinis*

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el test Wilcoxon's Rank sum, ya que los datos no fueron paramétricos. Los resultados del test mostraron que no existe evidencia de inhibición en el incremento de peso del pez en ninguno de los tratamientos comparados con el grupo control. Sin embargo existe una disminución del incremento del peso del pez cuando gradualmente aumenta la concentración de clorotalonil (Tabla 7).

Tabla 7. En la tabla se observa la diferencia de peso (grs.) medida antes y después de exponer a juveniles de *G. affinis* a los distintos tratamientos por un período de 96 h (control, control acetona y las distintas concentraciones de clorotalonil).

Tratamiento ($\mu\text{g/L}$)	Diferencia de peso de <i>G. affinis</i> (grs.)
Control	0,005
Control acetona	0,021
1,25	0,086
2,5	0,063
5	0,036
10	0,023
20	0,043

VI. DISCUSIÓN

En esta investigación se evaluó la toxicidad producida en *D. obtusa* y *G. affinis* luego de la exposición al clorotalonil por un periodo de tiempo (bioensayo agudo y bioensayo crónico). Los bioensayos agudos dejaron en evidencia que ambos organismos son sensibles al clorotalonil. *D. obtusa* presentó un aumento de la mortalidad a medida que las concentraciones de clorotalonil fueron más altas, registrando un promedio de CL_{50-48h} igual a 124.263 $\mu\text{g/L}$. Igualmente, los bioensayos agudos hechos con *G. affinis* mostraron un aumento de la mortalidad a mayores concentraciones y un promedio de las CL_{50-96h} igual a 120.501 $\mu\text{g/L}$.

Existen algunos registros de CL_{50} de clorotalonil para *Daphnia sp.* y peces, como es el caso de Ernst *et al.*, (1991), quien registró en 48 h un CL_{50} de 129 $\mu\text{g/L}$ (clorotalonil) para *D. magna* y una CL_{50-48h} de 169 $\mu\text{g/L}$ para *Ceriodaphnia dubia*. De acuerdo con esta referencia, *D. obtusa* sería más sensible a los efectos letales que produce el clorotalonil bajo condiciones experimentales. Para especies de peces, según Davies (1987) (en: Sherrad *et al.*, 2003) registró una $CL_{50-96h} = 7.6 \mu\text{g/L}$ para *Oncorhynchus mykiss* siendo mas sensible que *G. affinis* ($CL_{50-96h} = 120, 501 \mu\text{g/L}$).

El bioensayo crónico tanto en *D. obtusa* como en *G. affinis* no registró efecto en la tasa de reproducción ni en la tasa de crecimiento respectivamente, en el rango de concentraciones ensayadas y durante 21 días de exposición. Probablemente se podría encontrar un efecto crónico tóxico al exponer a las dafnias a un rango de concentración entre 30 y 60 $\mu\text{g/L}$, por que entre este rango, según los registros de los bioensayos agudos realizados, en su mayoría, no hay mortalidad de los especímenes y permitiría hacer una nueva evaluación de los efectos crónicos, ya que, bajo los 30 $\mu\text{g/L}$ no fue posible registrar.

Las concentraciones letales de clorotalonil, registradas en los bioensayos agudos para ambas especies fue sobre los 120 $\mu\text{g} / \text{L}$. Esta concentración es 15 veces mayor que la registrada por Abarca & Ruepert (1992) (en: Astorga, 1998). Ellos encontraron en ríos y pozos colindantes a plantaciones de banana en Costa Rica concentraciones por sobre los 8 $\mu\text{g} / \text{L}$. Esto sugiere que tanto *D. obtusa* como *G. affinis* podrían sobrevivir en ese lugar a esos niveles de concentración de clorotalonil, en este sentido, en esa localidad las concentraciones ambientales del pesticida, no serían de riesgo para estas especies. También existen registros de concentraciones de clorotalonil encontrados en suelos agrícolas de Isla de Pascua, en Chile, según Edmundo (2007) encontró concentraciones de 2643,05 y 500 $\mu\text{g} / \text{L}$ en la superficie del suelo en dos predios distintos, a una profundidad del suelo de 50 cm, encontró una concentración de 500,74 y 535,15 $\mu\text{g} / \text{L}$ en distintas localidades dentro de la Isla de Pascua, según estos datos, en esa localidad las especies de este estudio no podrían sobrevivir a esos niveles de concentración de clorotalonil.

El clorotalonil es el ingrediente activo del pesticida Púgil 75 WG, producto comercializado en Chile y que tiene una dosis de aplicación recomendada de 2 – 3 Kg. / ha. Según Shuman *et al.*, (2000) (en: Sherrard, 2003), en un experimento en terreno aplicaron una dosis de 9,5 Kg. / ha de clorotalonil (3,1 veces mayor a la recomendada para Púgil) y simuló un evento de agua lluvia midiendo niveles de clorotalonil de 290 $\mu\text{g} / \text{L}$ en un canal de riego receptor de la escorrentía. Según esto, si se aplicara una dosis de Púgil 2 - 3 Kg. / ha en un terreno agrícola, en las aguas colindantes se esperaría encontrar 93,5 $\mu\text{g} / \text{L}$ del producto. Considerando esta estimación se esperaría encontrar efectos letales sobre las especies acuáticas en aguas con un nivel de concentración de clorotalonil de 93,5 $\mu\text{g} / \text{L}$ ya que esta es próxima a la concentración letal encontrada para ambas especies de este estudio ($CL_{50} = 120 \mu\text{g} / \text{L}$ aproximadamente). En este caso, y a los niveles de concentración anteriormente planteados, el clorotalonil sería un riesgo

potencial para la biota acuática que se encuentra en los cuerpos de aguas receptoras colindantes a los sectores agrícolas.

Este estudio revela que el clorotalonil si produce efectos tóxicos letales sobre los organismos acuáticos estudiados. Con estos resultados se acepta la hipótesis de este estudio, por que a pesar que éste compuesto es un fungicida, presenta efectos tóxicos sobre la biota acuática si se llegará a encontrar en los cuerpos de agua.

El clorotalonil es un riesgo potencial para el medio ambiente, sin embargo, su grado de toxicidad para la biota acuática dependerá de los niveles de concentración que se encuentren en los ecosistemas acuáticos. Si nos trasladamos a los niveles de concentración encontrados en Costa Rica, en este caso los 8 $\mu\text{g} / \text{L}$ de clorotalonil hallados en aguas receptoras, no sería un riesgo para los organismos acuáticos, diferente es los que ocurre en Isla de Pascua, donde los niveles de concentración de clorotalonil en los suelos agrícolas, serian un riesgo para los organismos acuáticos de esa localidad. Analogamente, el caso de las dosis recomendadas de Púgil 75 WG (2 – 3 Kg / ha), para los 93,5 $\mu\text{g} / \text{L}$ de clorotalonil que sería posible encontrar en el agua, si podría provocar efectos letales para los organismos acuáticos estudiados en esta investigación, ya que la CL_{50} para ambas especies de este estudio fue aproximadamente de 120 $\mu\text{g} / \text{L}$. También tendría efectos subletales en el caso de *D. obtusa*, por que a pesar que el resultado fue significativamente evidente, este se encontraría entre los 30 y 60 $\mu\text{g} / \text{L}$. Se debe tener en consideración, en este tercer caso, las condiciones del sedimento en la que realizaron la simulación de esorrentía, ya que estas están relacionadas con los procesos de transporte del clorotalonil hacia las aguas subterráneas y superficiales.

Este estudio sugiere que futuros experimentos que se realicen con clorotalonil se lleven a cabo con muestras de agua de campo, para evaluar la toxicidad de niveles de concentración

ambientales del clorotalonil en cuerpos de agua nacionales y de esta forma ver el riesgo que estos niveles de concentración producirían en la biota de dichos ecosistemas. Estos antecedentes serían de gran utilidad para la elaboración de criterios y estándares de calidad del agua para fiscalizar las concentraciones de uso del pesticida en los sectores agrícolas nacionales.

VII. CONCLUSIÓN

Los resultados de esta investigación mostraron que *G. affinis* y *D. obtusa* tienen sensibilidad letal al 50 % una vez que son expuestos al clorotalonil, a una CL_{50} de 120 $\mu\text{g} / \text{L}$ aprox. En el caso de los bioensayos crónicos no hubo un efecto subletal evidente (crecimiento o reproducción) en el rango de concentraciones en que se trabajó. A futuro habría que probar concentraciones entre 30 y 60 $\mu\text{g} / \text{L}$ dado que a 60 $\mu\text{g} / \text{L}$ aparecen efectos letales.

Evidentemente el clorotalonil siendo un fungicida provocó un efecto tóxico sobre el microcrustáceo *D. obtusa* y el pez *G. affinis*, lo cual indica que éste constituye un riesgo potencial para la biota acuática que se encuentra en los cuerpos de agua colindantes a los sectores agrícolas que utilizan este pesticida. Se debería tomar en cuenta que su grado de toxicidad dependerá de los niveles de concentraciones que se encuentren en los ecosistemas acuáticos nacionales, es por ello que en este trabajo, se recomienda realizar futuras investigaciones utilizando muestra de agua de campo para evaluar el nivel de riesgo en el que se encuentran la biota en los cuerpos de agua. Estos antecedentes, serían de gran utilidad para la elaboración de criterios y estándares de calidad del agua para fiscalizar las concentraciones de uso de los pesticidas y de esta forma proteger la biota de los ecosistemas acuáticos en Chile.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- A.S.T.M. (1996) Standard guide for conducting *Daphnia magna* life cycle toxicity tests. American Society for Testing and Materials. E 1193, Draft N°9. pp.: 66.
- Astorga, Y. (1998) The Environmental impact of the banana industry: a case study of Costa Rica. En: Banana Action.Net: www.bananas.agoranet.be/Environmenta. Version (06/2002)
- Baird, C. (2001) Química Ambiental. 2^a Ed. Reverté, S. A. Barcelona. España. pp.: 622.
- Calow, P. (1989). The Choice and implementation of environmental biassays. *Hydrobiol.*, 188 : 61 – 64.
- Castillo, G. and Díaz, M. (2004) Ensayos ecotoxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Centro Internacional de investigaciones para el desarrollo. Ottawa. Canada. pp.: 189.
- Castillo, G. and Schâfer, L. (2000) Evaluation of a bioassay battery for water toxicity testing: a Chilean experience. *Environ. toxicol.*, 15: 331 – 337.

- Comisión Nacional del Medio Ambiente (1998). Guía para el control y prevención de la contaminación industrial: fabricación de plaguicidas, insecticidas, pesticidas y funguicidas. CONAMA.Santiago. Chile. pp.: 77.
- Doménech, X. (1994). El impacto ambiental de los residuos. En: Química ambiental.2ª edición. Mariguana, S. A. Universidad autónoma de Barcelona. Madrid. España. pp.:187.
- Edmunds, T. (2007). Estimación de la contaminación ambiental por plaguicidas en suelos agrícolas de la Isla de Pascua. V región. Tesis, Escuela de Ciencias. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile. pp.: 114
- Ernst, W., Doe, K., Jonah, P., Young, J., Julien, G. and Hennigar, P. (1991). The toxicity of chlorothalonil to aquatic fauna and the impact of its operational use on a pond ecosystem. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 1-9.
- Extensión Toxicology Network (2003). Pesticide information profiles: Chlorothalonil <http://extoxnet.ors.edu/pips/chloroth.htm>.
- Gaete, H. Larrain, A. Bay – Schmith, E. Cifuentes, A. Rodriguez J. and Baeza, J. (1999). Toxicidad crónica y características físicas químicas de aguas receptoras de efluentes de industrias de celulosa localizadas en la cuenca del río Bio - Bio (Chile, Central). *Ecotoxicol. and Environ. Res.*, 2: 66 – 74.

- Gulley, D.D., Boelter, A.M. And Bergman H.L. (1989). Toxstat, Release 3.2. University of Wyoming, Laramie, WY.
- Hartley, J. P. (1982). Methods for monitoring of shore macrobenthos. *Mar. pollut. bull.*, 13: 150-154.
- Instituto Nacional de Normalización (INN) (1999). Norma chilena oficial. Aguas – bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera). Instituto Nacional de Normalización. Santiago. Chile. Pp.: 19.
- ISO 6341: (1989). Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* straus (Cladocera, - crustacea) (E) 7 pp.
- Larrain, A. (1995). Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad. *Cienc.Tec.Mar CONA.*, (Nº especial): 39 – 47.
- Ministerio de Salud, (2004). Reglamento sanitario sobre el manejo de residuos peligrosos. Diario oficial de la República de Chile. Miércoles 16 de junio del 2004. pp: 20
- Mitidieri, M. S., (2006). Manejo integrado de enfermedades en cultivos de tomate bajo cubierta. Trabajo presentado. Jornadas de enfermedades en cultivos bajo cubierta.

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad de La Plata –CIC. La Plata.

29 al 30 de junio de 2006. Pp.: 116. <http://www.inta.gov.ar>

Orozco, C., Pérez, A., González, M., Rodríguez, F. and Alfayate, J. (2003). Contaminación ambiental. Una visión desde la química. Madrid. España. Pp.:682.

Ronco, A., Díaz, M., and Granados, Y. (2004). Conceptos generales. En: Castillo G. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones: 17 – 22. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México.

Santa María, I. (1990). Pesticidas: dinámica y análisis. Apuntes del curso: contaminación marina. Universidad Católica de Valparaíso.

Sherrad, R. M., Murray – Gulde, C. L., Rodgers, Jr., and Shah Y. T. (2003). Comparative toxicity of Chlorothalonil: *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas*. *Ecotoxicol. and Environ. Safety*, 56: 327- 333.

Silva, J., Torrejon, G., Bay - Schmith, E. and Larrain, A. (2003) Calibracion del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia obtusa* (Crustacea: Cladocera) usando un toxico de referencia. *Gayana*, 67 (1), 87 - 96.

Sprague, J. B. (1970). Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Wat. Res.*, 4: 3- 32.

Subdepartamentos de Plaguicidas y Fertilizantes (2001). Autorizaciones de plaguicidas agrícolas vigentes al 31/05/2001. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Gobierno de Chile.pp.: 195.

The British Crop Protection Council, (2001). The e- Pesticide Manual. 12^{ava} edición.

U.S.E.P.A. (1988) Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. E.P.A/600/388/029.

U.S.E.P.A. (1990) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Fourth edition. Report 600/4-90/027F.

Villalobos, L. (1994). Zooplankton of andine temperate lakes in South- America with special emphasis on the *Daphnia* species: taxonomy, geographical distribution, ecology, and functional morphology of the filtering apparatus. Tesis doctoral. Faculty of biology. University of Konstanz..

Villalobos, L. (2006).Estado de conocimiento de los crustáceos zooplanctónicos dulceacuícolas de Chile. *Gayana*, 70: 31-39.

IX. ANEXOS

Anexo 1Planillas de registro de bioensayos agudos con *D.obtusa* y sus respectivos análisis estadísticos.

BIOENSAYO N° 1

TIPO DE BIOENSAYO	: Agudo – 1
ESPECIE	: <i>Daphnia obtusa</i>
RESPUESTA MEDIDA	: Mortalidad
FECHA INICIO BIOENSAYOS	: 11 de junio 2006
TIEMPO DE EXPOSICIÓN	: 48 horas

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOENSAYO

TIPO DE BIOENSAYO	: Semi estático
NUMERO REPLICAS	: 4
ORGANISMOS / ENVASE	: 5
DILUCIONES ENSAYADAS	: 5 concentraciones (35 µg /L; 70 µg /L ;140µg /L /; 280 µg /L; 560 µg /L)
AGUA DE DILUCION (preparada según EPA)	
pH	: 7.76
OXIGENO DISUELTO	: 8 mg/L
TEMPERATURA	: 20°C
RESULTADO DEL BIOENSAYO	: CL _{50-24 h} = 133,8 µg/L (113,58 -157,69 µg /L)

Tabla 8. Bioensayo agudo n ° 1: mortalidades (n° de individuos muertos) de *D. obtusa* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,5).

Tratamiento (µg/L)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Total
Control	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 20
Control Acet.	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 20
35	1 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	1 de 20
70	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 20
140	5 de 5	3 de 5	2 de 5	1 de 5	11 de 20
280	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20
560	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

DATE: Agudo TEST NUMBER: 1 DURATION: 48 h

TOXICANT : Clorotalonil

SPECIES: *D. obtusa*

RAW DATA: Concentration	Number	Mortalities
-----	Exposed	
(µg/L)		
,00	20	0
35,00	20	1
70,00	20	0
140,00	20	11
280,00	20	20
560,00	20	20

SPEARMAN-KARBER TRIM: 2,50%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: **LC50: 133,83**

95% LOWER CONFIDENCE: **113,58**

95% UPPER CONFIDENCE: **157,69**

BIOENSAYO N° 2

TIPO DE BIOENSAYO	: Agudo – 2
ESPECIE	: <i>Daphnia obtusa</i>
RESPUESTA MEDIDA	: Mortalidad
FECHA INICIO BIOENSAYOS	: 24 de junio 2006
TIEMPO DE EXPOSICIÓN	: 48 horas

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOENSAYO

TIPO DE BIOENSAYO	: Semi estático
NUMERO REPLICAS	: 4
ORGANISMOS / ENVASE	: 5
DILUCIONES ENSAYADAS	: 5 concentraciones (64 µg /L; 108 µg /L; 180µg/L; 300µg /L /; 500 µg /L)
AGUA DE DILUCION (preparada según EPA)	
pH	: 7,68
OXIGENO DISUELTO	: 8 mg/L
TEMPERATURA	: 20°C
RESULTADO DEL BIOENSAYO	: CL _{50-24 h} = 99,705µg/L (87,434 - 113,608 µg /L)

Tabla 9. Bioensayo agudo n ° 2: mortalidades (n° de individuos muertos) de *D. obtusa* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,6).

Tratamiento (µg/L)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Total
Control	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 20
Control Acet.	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 20
64,8	1 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 20
108	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	15 de 20
180	5 de 5	3 de 5	2 de 5	1 de 5	19 de 20
300	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20
500	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM

USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES

	Observed	Responding	Predicted			
	Number	Number	Proportion	Adjusted for	Proportion	
Con.	Exposed	Resp	Responding	Controls	Responding	
	64,8000	20	0	0,0000	0,0000	0,0474
	108,0000	20	15	0,7500	0,7500	0,6217
	180,0000	20	19	0,9500	0,9500	0,9890
	300,0000	20	20	1,0000	1,0000	1,0000
	500,0000	20	20	1,0000	1,0000	1,0000

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 5,192

Chi - Square for Heterogeneity

(Tabular value at 0,05 levels) = 7,815

Mu = 1,998717

Sigma = 0,112019

Parameter Estimate Std. Err. 95% Confidence Limits-

Intercept -12,842614 3,864350 (-20,416740, -5,268488)

Slope 8,927032 1,929086 (5,146024, 12,708040)

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000

D. obtusa agudo

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Conc.	Exposure 95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
LC/EC 1, 00	54,718	34,244	67,203
LC/EC 5, 00	65,231	46,009	76,765
LC/EC 10,00	71,640	53,687	82,665
LC/EC 15,00	76,317	59,452	87,091
LC/EC 50,00	99,705	87,434	113,608
LC/EC 85,00	130,261	114,211	166,853
LC/EC 90,00	138,765	120,341	184,745
LC/EC 95,00	152,398	129,607	215,548
LC/EC 99,00	181,680	148,064	289,570

BIOENSAYO N° 3

TIPO DE BIOENSAYO	: Agudo – 3
ESPECIE	: <i>Daphnia obtusa</i>
RESPUESTA MEDIDA	: Mortalidad
FECHA INICIO BIOENSAYOS	: 27 de junio 2006
TIEMPO DE EXPOSICION	: 48 horas

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOENSAYO

TIPO DE BIOENSAYO	: Semi estático
NUMERO REPLICAS	: 4
ORGANISMOS / ENVASE	: 5
DILUCIONES ENSAYADAS	: 5 concentraciones (64 µg /L; 108 µg /L; 180µg/L /; 300µg /L /; 500 µg /L)
AGUA DE DILUCION (preparada según EPA)	
pH	: 7,68
OXIGENO DISUELTO	: 8 mg/L
TEMPERATURA	: 20°C
RESULTADO DEL BIOENSAYO	: CL _{50-24 h} = 132,376 µg /L (116,916 - 150,033 µg /L)

Tabla 10. Bioensayo agudo n ° 3: mortalidades (n° de individuos muertos) de *D. obtusa* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,6).

Tratamiento ($\mu\text{g/L}$)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Total
Control	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 20
Control Acet.	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 20
64.8	1 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 20
108	1 de 5	2 de 5	1 de 5	0 de 5	4 de 20
180	5 de 5	3 de 5	5 de 5	5 de 5	18 de 20
300	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20
500	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM

USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed	Responding	Predicted
			Proportion Responding	Adjusted for Controls	Proportion Responding
64,8000	20	0	0,0000	0,0000	0,0013
108,0000	20	4	0,2000	0,2000	0,1947
180,0000	20	18	0,9000	0,9000	0,9031
300,0000	20	20	1,0000	1,0000	0,9997
500,0000	20	20	1,0000	1,0000	1,0000

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 0.037

Chi - Square for Heterogeneity

(Tabular value at 0.05 levels) = 7.815

Mu = 2.121811

Sigma = 0.102687

Parameter Estimate Std. Err. 95% Confidence Limits

Intercept -15.662926 4.417655 (-24.321529, -7.004323)

Slope 9.738346 2.079852 (5.661837, 13.814856)

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure	95% Confidence Limits	
	Conc.	Lower	Upper
LC/EC 1,00	76,371	50,130	92,194
LC/EC 5,00	89,722	65,506	104,277
LC/EC 10,00	97,770	75,316	111,698
LC/EC 15,00	103,606	82,581	117,249
LC/EC 50,00	132,376	116,916	150,033
LC/EC 85,00	169,136	149,351	212,778
LC/EC 90,00	179,231	156,746	233,342
LC/EC 95,00	195,308	167,873	268,332
LC/EC 99,00	229,452	189,844	350,696

BIOENSAYO 4

TIPO DE BIOENSAYO	: Agudo – 4
ESPECIE	: <i>Daphnia obtusa</i>
RESPUESTA MEDIDA	: Mortalidad
FECHA INICIO BIOENSAYOS	: 27 de junio 2006
TIEMPO DE EXPOSICION	: 48 horas

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOENSAYO

TIPO DE BIOENSAYO	: Semi estático
NUMERO REPLICAS	: 4
ORGANISMOS / ENVASE	: 5
DILUCIONES ENSAYADAS	: 5 concentraciones (35 µg /L; 70 µg /L; 140µg /L /; 280µg /L; 560 µg /L)
AGUA DE DILUCION (preparada según EPA)	
pH	: 7,68
OXIGENO DISUELTO	: 8 mg/L
TEMPERATURA	: 20°C
RESULTADO DEL BIOENSAYO	: CL_{50-24 h} = 153,84µg /L (125,83 - 188,10 µg /L)

Tabla 11. Bioensayo agudo n ° 4: mortalidades (n° de individuos muertos) de *D. obtusa* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,5).

Tratamiento ($\mu\text{g/L}$)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Total
Control	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 20
Control Acet.	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 20
35	1 de 5	0 de 5	0 de 5	1 de 5	2 de 20
70	1 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	1 de 20
140	1 de 5	3 de 5	3 de 5	1 de 5	8 de 20
280	5 de 5	3 de 5	5 de 5	5 de 5	18 de 20
560	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

DATE: Agudo

TEST NUMBER: 4

DURATION: 48 h

Concentration ($\mu\text{g/L}$)	Number Exposed	Mortalities
,00	20	0
35,00	20	2
70,00	20	1
140,00	20	8
280,00	20	18
560,00	20	20

SPEARMAN-KARBER TRIM: 7,50%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: **LC50: 153,84**95% LOWER CONFIDENCE: **125,83**95% UPPER CONFIDENCE: **188,10**

BIOENSAYO N° 5

TIPO DE BIOENSAYO	: Agudo – 5
ESPECIE	: <i>Daphnia obtusa</i>
RESPUESTA MEDIDA	: Mortalidad
FECHA INICIO BIOENSAYOS	: 21 de agosto 2006
TIEMPO DE EXPOSICION	: 48 horas

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOENSAYO

TIPO DE BIOENSAYO	: Semi estático
NUMERO REPLICAS	: 4
ORGANISMOS / ENVASE	: 5
DILUCIONES ENSAYADAS	: 5 concentraciones (35 ug/l; 70 µg /L;140µg /L /; 280µg /L; 560 µg /L)
AGUA DE DILUCION (preparada según EPA)	
pH	: 7,87
OXIGENO DISUELTO	: 8 mg/L
TEMPERATURA	: 20°C
RESULTADO DEL BIOENSAYO	: CL_{50-24 h} = 101,57 µg /L (52,10-197,99 µg /L)

Tabla 12. Bioensayo agudo n° 5: mortalidades (n° de individuos muertos) de *D. obtusa* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,5).

Tratamiento ($\mu\text{g/L}$)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Total
Control	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 20
Control Acet.	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 20
35	1 de 5	2 de 5	3 de 5	1 de 5	7 de 20
70	1 de 5	2 de 5	3 de 5	2 de 5	8 de 20
140	2 de 5	3 de 5	4 de 5	2 de 5	11 de 20
280	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20
560	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

DATE: Agudo TEST NUMBER: 5 DURATION: 48 h

Concentration ($\mu\text{g/L}$)	Number Exposed	Mortalities
,00	20	0
35,00	20	7
70,00	20	8
140,00	20	11
280,00	20	20
560,00	20	20

SPEARMAN-KARBER TRIM: 35,00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: **LC50: 101,57**

95% LOWER CONFIDENCE: **52,10**

95% UPPER CONFIDENCE: **197,99**

ANEXO 2

Planillas de registro de bioensayos agudos con *G. affinis* y sus respectivos análisis estadísticos.

BIOENSAYO N° 1

TIPO DE BIOENSAYO	: Agudo - 1
ESPECIE ENSAYADA	: <i>Gambusia affinis</i> (pez de agua dulce)
RESPUESTA MEDIDA	: Mortalidad
INICIO DEL BIOENSAYO	: 30 de junio 2002
TIEMPO DE EXPOSICION	: 96 horas

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOENSAYO

TIPO DE BIOENSAYO	: Semi- estático, con recambio de agua
VOLUMEN SOLUCION/UNIDAD EXPERIMENTAL	: 400 mL
TIEMPO RECAMBIO	: Cada 48 horas
NUMERO DE REPLICAS	4
N° PECES / UNIDAD XPERIMENTAL	: 5
EDAD PECES. DE ENSAYO:	: Juveniles, entre 2 y 3 cm de largo
NUMERO DE TRATAMIENTOS ENSAYADOS	: 5 (Control; 51,45 µg/L; 73,5µg/L; 105µg /L; 150, 214µg /L) de concentración de la muestra
AIREACION	: Sin aireación
TEMPERATURA DE EXPOSICION	: 20°C
REGIMEN DE ALIMENTACION	: No se requiere alimentación
AGUA DE DILUCION	: Agua potable declorada
pH	: 8,46
OXIGENO DISUELTO	: > 8 mg/L
RESULTADO DEL BIOENSAYO	: CL_{50-96h} = 47,188 µg /L (24,508 - 60,515 µg /L)

Tabla 13. Bioensayo agudo n ° 1: mortalidades (n° de individuos muertos) de *G. affinis* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,5).

Tratamiento (µg/L)	N° de peces muertos por réplica				Total
	Réplica 1	Réplica2	Réplica 3	Réplica 4	
Control	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	1 de 20
Control Acet.	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 20
51,45	3 de 5	2 de 5	3 de 5	4 de 5	12 de 20
73,5	2 de 5	5 de 5	5 de 5	4 de 5	16 de 20
105	3 de 5	5 de 5	4 de 5	5 de 5	17 de 20
150	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20
214	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM

USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES

	Observed	Responding	Predicted		
Number	Number	Proportion	Adjusted for		
Con. Exposed	Resp	Responding	Controls		
		Responding	Responding		
Control	20	1	0,0500	0,0000	0,0506
51,4500	20	12	0,6000	0,5787	0,5580
73,5000	20	16	0,8000	0,7893	0,7725
105,0000	20	17	0,8500	0,8420	0,9113
150,0000	20	20	1,0000	1,0000	0,9744
214,0000	20	20	1,0000	1,0000	0,9946

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 1,784

Chi - Square for Heterogeneity (Tabular value at 0,05 levels) = 7,815

Mu = 1,673830

Sigma = 0,257579

Parameter	Estimate	Std. Err.	95% Confidence Limits
Intercept	-1,498318	2,040879	(-5,498440, 2,501805)
Slope	3,882304	1,081923	(1,761735, 6,002874)
Spontaneous	0,050632	0,049013	(-0,045434, 0,146698)

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure	95% Confidence Limits	
	Conc.	Lower	Upper
LC/EC 1,00	11,875	1,241	23,411
LC/EC 5,00	17,788	3,005	30,592
LC/EC 10,00	22,066	4,808	35,337
LC/EC 15,00	25,520	6,596	38,989
LC/EC 50,00	47,188	24,508	60,515
LC/EC 85,00	87,254	70,043	122,105
LC/EC 90,00	100,912	81,158	159,513
LC/EC 95,00	125,176	97,184	246,191
LC/EC 99,00	187,515	130,299	581,055

BIOENSAYO N°2

TIPO DE BIOENSAYO	: Agudo – 2
ESPECIE ENSAYADA	: <i>Gambusia affinis</i> (pez de agua dulce)
RESPUESTA MEDIDA	: Mortalidad
INICIO DEL BIOENSAYO	: 20 de junio 2002
TIEMPO DE EXPOSICION	: 96 horas

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOENSAYO

TIPO DE BIOENSAYO	: Semi- estático, con recambio de agua
VOLUMEN SOLUCION/ UNIDAD EXP.	: 400 mL
TIEMPO RECAMBIO	: Cada 48 horas
NUMERO DE REPLICAS	4
N° PECES / UNIDAD XPERIMENTAL	: 5
EDAD PECES. DE ENSAYO:	: Juveniles, entre 2 y 3 cm. de largo
NUMERO DE TRATAMIENTOS ENSAYADOS	: 5 (Control; 60µg /L ; 100µg /L; 166,6µg /L; 277.7, 462,8µg /L) de concentración de la muestra
AIREACION	: Sin aireación
TEMPERATURA DE EXPOSICION	: 20°C
REGIMEN DE ALIMENTACION	: No se requiere alimentación
AGUA DE DILUCION	: Agua potable declorada
pH	: 7,77
OXIGENO DISUELTO	: > 8 mg/L
RESULTADO DEL BIOENSAYO	: CL_{50-96h} = 113,84 µg /L (103,25 - 125,52) µg/L)

Tabla 14. Bioensayo agudo n ° 2: mortalidades (n° de individuos muertos) de *G. affinis* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,6).

Tratamiento (µg/L)	N° de peces muertos por réplica				Total
	Réplica 1	Réplica2	Réplica 3	Réplica 4	
Control	1 de 5	0 de 5	1 de 5	0 de 5	2 de 20
Control Acet.	2 de 5	1 de 5	0 de 5	0 de 5	3 de 20
60	0 de 5	0 de 5	0 de 5	1 de 5	1 de 20
100	2 de 5	0 de 5	2 de 5	2 de 5	6 de 20
166,6	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20
277,7	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20
462,8	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

DATE: 60 TEST NUMBER: 2 DURATION: 96 h

Concentration ($\mu\text{g/L}$)	Number Exposed	Mortalities
,00	20	2
60,00	20	1
100,00	20	6
166,00	20	20
277,00	20	20
462,00	20	20

SPEARMAN-KARBER TRIM: 00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: **LC50: 113, 84**

95% LOWER CONFIDENCE: **103, 25**

95% UPPER CONFIDENCE: **125, 52**

BIOENSAYO 3

TIPO DE BIOENSAYO	: Agudo - 3
ESPECIE ENSAYADA	: <i>Gambusia affinis</i> (pez de agua dulce)
RESPUESTA MEDIDA	: Mortalidad
INICIO DEL BIOENSAYO	: 5 de julio 2002
TIEMPO DE EXPOSICION	: 96 horas

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOENSAYO

TIPO DE BIOENSAYO	: Semi- estático, con recambio de agua
VOLUMEN SOLUCION/ UNIDAD EXP.	: 400 mL
TIEMPO RECAMBIO	: Cada 48 horas
NUMERO DE REPLICAS	4
Nº PECES / UNIDAD XPERIMENTAL	: 5
EDAD PECES. DE ENSAYO:	: Juveniles, entre 2 v 3 cm de largo
NUMERO DE TRATAMIENTOS	: 5 (Control; 38,8µg /L; 64,8µg /L; 108µg /L;
ENSAYADOS	180, 300µg /L) de concentración de la muestra
AIREACION	: Sin aireación
TEMPERATURA DE EXPOSICION	: 20°C
REGIMEN DE ALIMENTACION	: No se requiere alimentación
AGUA DE DILUCION	: Agua potable declorada
pH	: 7,97
OXIGENO DISUELTO	: > 8 mg/L
RESULTADO DEL BIOENSAYO	: CL_{50-96h} = 72,024 µg /L (62,117 - 83,340)

Tabla 15. Bioensayo agudo n ° 3: mortalidades (n° de individuos muertos) de *G. affinis* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,6).

Tratamiento (µg/L)	N° de peces muertos por réplica				Total
	Réplica 1	Réplica2	Réplica 3	Réplica 4	
Control	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 20
Control Acet.	2 de 5	10de 5	0 de 5	0 de 5	2 de 20
38,8	0 de 5	0 de 5	1 de 5	1 de 5	2 de 20
64,8	2 de 5	0 de 5	2 de 5	0 de 5	4 de 20
108	5 de 5	5 de 5	4 de 5	5 de 5	19 de 20
180	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20
300	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM

USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES

Con.	Observed	Responding	Predicted		
	Number Exposed	Number Res.	Proportion Responding	Adjusted for Controls	Proportion Responding
38,8000	20	2	0,1000	0,1000	0,0348
64,8000	20	4	0,2000	0,2000	0,3783
108,0000	20	19	0,9500	0,9500	0,8827
180,0000	20	20	1,0000	1,0000	0,9964
300,0000	20	20	1,0000	1,0000	1,0000

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 6,182

Chi - Square for Heterogeneity (Tabular value at 0,05 levels) = 7,815

Mu = 1,857476

Sigma = 0,148055

Parameter Estimate Std. Err. 95% Confidence Limits

Intercept -7,545822 2,378441 (-12,207565, -2,884078)

Slope 6,754232 1,273816 (4,257552, 9,250912)

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0,0000

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure	95% Confidence Limits	
	Conc.	Lower	Upper
LC/EC 1, 00	32,588	19,784	41,675
LC/EC 5, 00	41,109	28,293	49,914
LC/EC 10,00	46,529	34,120	55,145
LC/EC 15,00	50,586	38,624	59,122
LC/EC 50,00	72,024	62,117	83,340
LC/EC 85,00	102,546	87,909	133,503
LC/EC 90,00	111,487	94,286	151,069
LC/EC 95,00	126,186	104,205	182,111
LC/EC 99, 00	159,183	124,849	260,340

BIOENSAYO N°4

TIPO DE BIOENSAYO	: Agudo - 4
ESPECIE ENSAYADA	: <i>Gambusia affinis</i> (pez de agua dulce)
RESPUESTA MEDIDA	: Mortalidad
INICIO DEL BIOENSAYO	: 12 de agosto 2002
TIEMPO DE EXPOSICION	: 96 horas

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOENSAYO

TIPO DE BIOENSAYO	: Semi- estático, con recambio de agua
VOLUMEN SOLUCION/ UNIDAD EXP.	: 400 mL
TIEMPO RECAMBIO	: Cada 48 horas
NUMERO DE REPLICAS	4
N° PECES / UNIDAD XPERIMENTAL	: 5
EDAD PECES. DE ENSAYO:	: Juveniles, entre 2 y 3 cm de largo
NUMERO DE TRATAMIENTOS ENSAYADOS	: 5 (Control; 62,5µg /L; 125µg /L; 250µg /L; 500, 1000µg /L) de concentración de la muestra
AIREACION	: Sin aireación
TEMPERATURA DE EXPOSICION	: 20°C
REGIMEN DE ALIMENTACION	: No se requiere alimentación
AGUA DE DILUCION	: Agua potable declorada
pH	: 7,97
OXIGENO DISUELTO	: > 8 mg/L
RESULTADO DEL BIOENSAYO	: CL_{50-96h} = 189,673µg /L (160,03 - 224,48)

Tabla 16. Bioensayo agudo n ° 4: mortalidades (n° de individuos muertos) de *G. affinis* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,5).

Tratamiento (µg/L)	N° de peces muertos por réplica				Total
	Réplica 1	Réplica2	Réplica 3	Réplica 4	
Control	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 5	0 de 20
Control Acet.	2 de 5	10de 5	0 de 5	0 de 5	4 de 20
62,5	0 de 5	0 de 5	1 de 5	1 de 5	0 de 20
125	2 de 5	0 de 5	2 de 5	0 de 5	2 de 20
250	5 de 5	5 de 5	4 de 5	5 de 5	16de 20
500	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20
1000	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM

USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES

Conc.	Number Exposed	Observed	Responding	Predicted	
		Number Resp.	Proportion Responding	Adjusted for Controls	Proportion Responding
62,5000	20	0	0,0000	0,0000	0,0003
125,0000	20	2	0,1000	0,1000	0,0969
250,0000	20	16	0,8000	0,8000	0,8053
500,0000	20	20	1,0000	1,0000	0,9987
1000,0000	20	20	1,0000	1,0000	1,0000

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 0,037

Chi - Square for Heterogeneity (Tabular value at 0,05 level) = 7,815

Mu = 2,278006

Sigma = 0,139338

Parameter Estimate Std, Err, 95% Confidence Limits

Intercept -11,348740 3,502209 (-18,213070, -4,484409)

Slope 7,176776 1,532705 (4,172675, 10,180879)

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0,0000

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure	95% Confidence Limits	
	Conc.	Lower	Upper
LC/EC 1,00	89,921	50,568	116,286
LC/EC 5,00	111,894	72,715	137,407
LC/EC 10,00	125,727	87,895	150,809
LC/EC 15,00	136,018	99,616	161,030
LC/EC 50,00	189,673	160,038	224,487
LC/EC 85,00	264,494	223,623	359,809
LC/EC 90,00	286,142	238,836	407,697
LC/EC 95,00	321,517	262,188	492,690
LC/EC 99,00	400,082	309,879	708,313

BIOENSAYO 5

TIPO DE BIOENSAYO	: Agudo 5
ESPECIE ENSAYADA	: <i>Gambusia affinis</i> (pez de agua dulce)
RESPUESTA MEDIDA	: Mortalidad
INICIO DEL BIOENSAYO	: 27 de agosto 2002
TIEMPO DE EXPOSICION	: 96 horas

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOENSAYO

TIPO DE BIOENSAYO	: Semi- estático, con recambio de agua
VOLUMEN SOLUCION/ UNIDAD EXP.	: 400 mL
TIEMPO RECAMBIO	: Cada 48 horas
NUMERO DE REPLICAS	4
Nº PECES / UNIDAD XPERIMENTAL	: 5
EDAD PECES. DE ENSAYO:	: Juveniles, entre 2 y 3 cm de largo
NUMERO DE TRATAMIENTOS ENSAYADOS	: 5 (Control; 62,5µg /L; 125µg /L; 250µg /L; 500, 1000µg /L) de concentración de la muestra
AIREACION	: Sin aireación
TEMPERATURA DE EXPOSICION	: 20°C
REGIMEN DE ALIMENTACION	: No se requiere alimentación
AGUA DE DILUCION	: Agua potable declorada
pH	: 7.97
OXIGENO DISUELTO	: > 8 mg/L
RESULTADO DEL BIOENSAYO	: CL_{50-96h} = 189.673 µg /L (157,21- 205,59)

Tabla 17. Bioensayo agudo n ° 5: mortalidades (n° de individuos muertos) de *G. affinis* en cada uno de los tratamientos (control, control acetona y las 5 concentraciones de clorotalonil diluidas con un factor de 0,5).

Tratamiento (µg/L)	N° de peces muertos por réplica				Total
	Réplica 1	Réplica2	Réplica 3	Réplica 4	
Control	0 de 5	2 de 5	1 de 5	0 de 5	3 de 20
Control Acet.	2 de 5	10de 5	0 de 5	0 de 5	4 de 20
62,5	2 de 5	1 de 5	2 de 5	1 de 5	6 de 20
125	2 de 5	1 de 5	2 de 5	0 de 5	5de 20
250	3 de 5	5 de 5	4 de 5	5 de 5	17de 20
500	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20
1000	5 de 5	5 de 5	5 de 5	5 de 5	20 de 20

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

DATE: Bioensay TEST NUMBER: 5 DURATION: 96 h

Concentration ($\mu\text{g/L}$)	Number Exposed	Mortalities
,00	20	3
62,50	20	6
125,00	20	5
250,00	20	17
500,00	20	20
1000,00	20	20

SPEARMAN-KARBER TRIM: 14,71%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: **LC50: 179,78**

95% LOWER CONFIDENCE: **157,21**

95% UPPER CONFIDENCE: **205,59**

ANEXO 3

Planilla de registro del bioensayo crónico con *D. obtusa* y su respectivo análisis estadístico

TIPO DE BIOENSAYO	: Crónico
ESPECIE	: <i>Daphnia obtusa</i>
RESPUESTA MEDIDA	: Inhibición de la reproducción
FECHA INICIO BIOENSAYOS	: 4 de noviembre 2002
FECHA TERMINO	: 24 de noviembre 2002
TIEMPO DE EXPOSICION	: 21 días

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOENSAYO

TIPO DE BIOENSAYO	: Semi estático
NUMERO REPLICAS	: 10
ORGANISMOS / ENVASE	: 1
DILUCIONES ENSAYADAS	: 5 concentraciones (1,875 µg /L; 3,75 µg /L; 7,5 µg /L; 15µg /L /; 30 µg /L)
AGUA DE DILUCION (preparada según EPA)	
pH	: 7,76
OXIGENO DISUELTO	: 10,69 mg/L
TEMPERATURA	: 22,4 °C

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies-

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 2,2390

Table Chi-Square value (alpha = 0,01) = 13,277

Data PASS normality test. Continue analysis.

Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance

Calculated B1 statistic = 5,49

Bartlett's test using average degrees of freedom

Calculated B2 statistic = 6,94

Based on average replicate size of 8,00

Table Chi-square value = 16,81 (alpha = 0,01, df = 6)

Table Chi-square value = 12,59 (alpha = 0,05, df = 6)

Data PASS B1 homogeneity test at 0,01 level. Continue analysis.

Data PASS B2 homogeneity test at 0,01 level. Continue analysis.

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	6	1764,368	294,061	1,761
Within (Error)	56	9352,711	167,013	
Total	62	11117,079		

Critical F value = 2,34 (0,05,6,40)

Since $F < \text{Critical F}$ FAIL TO REJECT H_0 : All equal

BONFERRONI t-TEST - TABLE 1 OF 2 H_0 :Control>Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	MEAN	ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	Control	81,556	81,556		
2	Control Acetona	68,667	68,667	-1,892	
3	1,25 ppb	69,778	69,778	-1,933	
4	2,5 ppb	81,333	81,333	-0,036	
5	5 ppb	70,400	70,400	-1,879	
6	10 ppb	71,200	71,200	-1,744	
7	20 ppb	68,800	68,800	-2,148	

Bonferroni t table value = 2,48 (1 Tailed Value, $P=0,05$, $DF=50,6$)

BONFERRONI t-TEST - TABLE 2 OF 2

Ho:Control>Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum (IN ORIG. UNITS)	Sig Diff % of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	Control	9			
2	Control Acetona	6	16,873	20,7	12,889
3	1,25 ppb	9	15,091	18,5	11,778
4	2,5 ppb	9	15,091	18,5	0,222
5	5 ppb	10	14,709	18,0	11,156
6	10 ppb	10	14,709	18,0	10,356
7	20 ppb	10	14,709	18,0	12,756

Tabla 18. Bioensayo crónico con *D. obtusa*: en la tabla 18 se observa el número de dafnidos nacidos por hembra expuesta a distintas concentraciones de clorotalonil con sus respectivas replicas durante 21 días.

Tratamientos	Numero del día en que se realizaron los registros								Total	Promedio
	10	12	14	16	18	20	22	24		
C0-1	12	17	13	14	18	0	22	0	96	81,556
C0-2	12	14	15	20	0	5	17	4	87	
C0-3	11	13	12	0	10	0	10	1	57	
C0-4	8	14	10	18	0	9	10	1	70	
C0-5	10	11	17	14	0	15	10	12	89	
C0-6	7	9	7	12	11	11	13	10	80	
C0-7	11	15	15	17	1	13	9	0	81	
C0-8	11	10	15	15	0	20	11	1	83	
C0-9	11	10	14	19	0	15	14	8	91	
CA-1	10	17	3	12	8	8	10	7	75	68,667
CA-2	11	13	0	9	0	4	3	1	41	
CA-3	10	11	12	14	22	14	11	4	98	
CA-4	10	10	15	7	0	15	5	3	65	
CA-5	8	11	5	13	0	6	5	3	51	
CA-6	10	13	13	17	11	8	6	4	82	
C1-1	9	18	12	8	11	5	13	2	78	69,778
C1-3	10	11	5	10	7	7	4	13	67	
C1-4	9	11	3	6	8	4	9	5	55	
C1-5	8	10	1	7	13	5	4	5	53	
C1-6	7	18	14	0	6	1	19	7	72	
C1-7	9	11	12	9	6	0	12	10	69	
C1-8	10	10	11	12	16	0	19	4	82	
C1-9	9	12	11	14	3	11	12	0	72	

C1-10	10	12	7	14	16	0	16	5	80	
C2-1	8	17	5	15	9	8	11	12	85	81,333
C2-2	12	14	15	15	6	4	14	4	84	
C2-3	9	11	13	10	15	14	10	8	90	
C2-4	10	13	9	17	7	10	14	9	89	
C2-5	11	14	14	16	0	8	10	2	75	
C2-6	10	10	15	21	21	9	18	2	106	
C2-7	7	12	11	17	0	3	10	8	68	
C2-8	9	10	9	21	6	3	11	7	76	
C2-9	7	7	14	17	0	3	6	5	59	
C3-1	2	8	0	15	5	8	0	2	40	70,4
C3-2	8	11	8	18	15	0	9	0	69	
C3-3	8	11	3	15	10	12	19	5	83	
C3-4	10	8	10	19	13	0	20	5	85	
C3-5	7	12	3	9	11	6	6	5	59	
C3-6	9	9	4	12	9	6	9	10	68	
C3-7	8	12	13	15	10	3	11	0	72	
C3-8	10	11	13	18	0	12	12	1	77	
C3-9	10	8	11	21	0	20	12	0	82	
C3-10	10	11	16	12	0	12	4	4	69	
C4-1	8	12	7	11	9	7	6	6	66	71,2
C4-2	6	11	3	10	6	3	14	5	58	
C4-3	11	11	12	20	11	0	17	5	87	
C4-4	0	12	5	9	8	7	10	4	55	
C4-5	10	16	12	4	0	12	16	4	74	
C4-6	11	12	14	16	16	0	21	1	91	
C4-7	8	9	10	12	17	0	22	4	82	
C4-8	3	12	9	21	11	0	12	0	68	
C4-9	7	10	5	18	0	7	13	6	66	

C4-10	5	10	4	9	10	10	11	6	65	
C5-1	10	9	5	8	12	6	14	6	70	68,8
C5-2	8	15	7	17	8	8	12	0	75	
C5-3	8	17	8	19	10	10	11	0	83	
C5-4	7	12	4	11	7	6	7	10	64	
C5-5	3	7	2	22	9	9	14	7	73	
C5-6	5	11	5	8	10	6	5	7	57	
C5-7	8	8	14	17	12	3	12	4	78	
C5-8	6	6	5	8	9	7	8	3	52	
C5-9	2	10	9	12	6	7	9	13	68	
C5-10	6	12	9	17	0	12	6	6	68	

Tabla 19. . Bioensayo crónico con *D.obtusa*: esta tabla presenta un promedio del número de individuos nacidos por replica para cada tratamiento.

Tratamiento ($\mu\text{g/L}$)	Promedio (n° de nacidos de <i>D. obtusa</i>)
Control	81,8
Control acetona	68,7
1,875	69,7
3,75	81
7,5	70
15	65
30	69

ANEXO 4

Planilla de registro del bioensayo crónico con *G. affinis* y su respectivo análisis estadístico

TIPO DE BIOENSAYO	: Crónico
ESPECIE	: <i>Gambusia affinis</i> (Pez de agua dulce)
RESPUESTA MEDIDA	: Crecimiento por aumento de peso
FECHA INICIO BIOENSAYO	: 14 de octubre 2002
TIEMPO DE EXPOSICION	: 21 días

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL BIOENSAYO

VOLUMEN / UNIDAD EXP.	: 250 ml (en envase de vidrio)
TIEMPO RECAMBIO	: Cada 48 h
NUMERO REPLICAS	: 10
ORGANISMOS / UNIDAD EXP	: 1
NUMERO DE TRATAMIENTOS	: 4. (control, 1,25 µg /L; 2,5 µg /L; 5 µg /L; 10 µg /L; 20 µg /L)
AGUA DE DILUCION	
pH	: 7,73
OXIGENO DISUELTO	: > 8 mg/L
TEMPERATURA	: 21 °C

Tabla 20. Bioensayo crónico con *G. affinis*: Registro del peso inicial (P. I) de los peces, medido al inicio del bioensayo, del peso final (P. F) medido después del bioensayo y la diferencia de peso (Dif. P) entre P. I. y P. F para cada tratamiento y sus respectivas replicas.

Tratamiento	P,I (grs)	P.F (grs)	Dif. P(grs)
C ₀₋₁	0,298	0,271	0,027
C ₀₋₂	0,352	0,386	-0,034
C ₀₋₃	0,634	0,697	-0,063
C ₀₋₄	0,212	0,204	0,008
C ₀₋₅	0,347	0,353	-0,006
C ₀₋₆	0,347	0,319	0,028
C ₀₋₇	0,124	0,077	0,047
C ₀₋₈	0,212	0,161	0,051
C ₀₋₉	0,401	0,414	-0,013
C _{A-1}	0,484	0,212	0,272
C _{A-2}	0,433	0,492	-0,059
C _{A-3}	0,396	0,371	0,025
C _{A-4}	0,350	0,372	-0,022
C _{A-5}	0,695	0,647	0,048
C _{A-6}	0,200	0,266	-0,066
C _{A-7}	0,312	0,327	-0,015
C _{A-8}	0,320	0,337	-0,017
C ₁₋₁	0,491	0,310	0,181
C ₁₋₂	0,256	0,215	0,041
C ₁₋₃	0,306	0,325	-0,019
C ₁₋₄	0,441	0,425	0,016
C ₁₋₅	0,222	0,199	0,023
C ₁₋₆	0,551	0,298	0,253
C ₁₋₇	0,413	0,294	0,119
C ₁₋₈	0,331	0,203	0,128
C ₁₋₉	0,305	0,203	0,102
C ₁₋₁₀	0,408	0,394	0,014
C ₂₋₁	0,507	0,396	0,111
C ₂₋₂	0,183	0,180	0,003
C ₂₋₃	0,666	0,572	0,094
C ₂₋₄	0,290	0,280	0,01
C ₂₋₅	0,415	0,364	0,051
C ₂₋₆	0,282	0,255	0,027
C ₂₋₇	0,355	0,252	0,103
C ₂₋₈	0,447	0,388	0,059
C ₂₋₉	0,275	0,294	-0,019

C ₂₋₁₀	0,333	0,143	0,19
C ₃₋₁	0,432	0,299	0,133
C ₃₋₂	0,134	0,102	0,032
C ₃₋₃	0,304	0,256	0,048
C ₃₋₄	0,310	0,351	-0,041
C ₃₋₅	0,365	0,257	0,108
C ₃₋₆	0,292	0,281	0,011
C ₃₋₇	0,202	0,240	-0,038
C ₃₋₈	0,240	0,249	-0,009
C ₃₋₉	0,185	0,173	0,012
C ₃₋₁₀	0,425	0,319	0,106
C ₄₋₁	0,297	0,151	0,146
C ₄₋₂	0,217	0,201	0,016
C ₄₋₃	0,207	0,195	0,012

C ₄₋₄	0,225	0,204	0,021
C ₄₋₅	0,234	0,230	0,004
C ₄₋₆	0,239	0,257	-0,018
C ₄₋₇	0,229	0,261	-0,032
C ₄₋₈	0,244	0,207	0,037
C ₅₋₁	0,490	0,303	0,187
C ₅₋₂	0,313	0,187	0,126
C ₅₋₃	0,236	0,353	-0,117
C ₅₋₄	0,343	0,183	0,16
C ₅₋₅	0,273	0,215	0,058
C ₅₋₆	0,252	0,214	0,038
C ₅₋₇	0,526	0,347	0,179
C ₅₋₈	0,121	0,150	-0,029
C ₅₋₉	0,283	0,502	-0,219

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

GROUP IDENTIFICATION # OF REPS

GROUP IDENTIFICATION	# OF REPS
1 Control	9
2 Control Acetona	8
3 1,25 ppb	10
4 2,5 ppb	10
5 5 ppb	10
6 10 ppb	8
7 20 ppb	9

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL <-1,5 -1,5 to <-0,5 -0,5 to 0,5 >0,5 to 1,5 >1,5

EXPECTED	4,288	15,488	24,448	15,488	4,288
OBSERVED	2	19	25	13	5

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 2,5476

Table Chi-Square value (alpha = 0,01) = 13,277

Data PASS normality test, Continue analysis,

WILCOXON'S RANK SUM TEST W/ BONFERRONI ADJUSTMENT -

Ho:Control>Treatment

TRANSFORMED RANK CRIT,

GROUP	IDENTIFICATION	MEAN	SUM	VALUE	REPS	SIG
1	control	0,005				
2	control acetona	0,021	88,00	47,00	8	
3	1,25 ppb	0,086	66,00	70,00	10	*
4	2,5 ppb	0,063	65,00	70,00	10	*
5	5 ppb	0,036	78,00	70,00	10	
6	10 ppb	0,023	78,00	47,00	8	
7	20 ppb	0,043	72,00	58,00	9	

Critical values use $k = 6$, are 1 tailed, and $\alpha = 0,05$

ANEXO 5

Alimento para *Daphnia obtusa*

Los individuos de *D. obtusa* se alimentaron con una mezcla de alfalfa, pescado y levadura y fue preparado de la siguiente manera:

Se colocó 6,3 g de pellet de harina de pescado, 2,6 g de levadura seca y 0,5 g de alfalfa seca en 500 ml de agua destilada, todo se mezcló con un agitador magnético por 30 min., y se pone en el refrigerador por algunas horas hasta que decante, Se utiliza el solo el sobrenadante como alimento, el cual debe mantenerse siempre refrigerado, Este alimento debe prepararse semanalmente,

ANEXO 6

Extension Toxicology Network (E X T O X N E T)

Pesticide Information Profiles

A Pesticide Information Project of Cooperative Extension Offices of Cornell University, Oregon State University, the University of Idaho, and the University of California at Davis and the Institute for Environmental Toxicology, Michigan State University. Major support and funding was provided by the USDA/Extension Service/National Agricultural Pesticide Impact Assessment Program.

EXTOXNET primary files maintained and archived at Oregon State University

Revised June 1996

Chlorothalonil

Trade and Other Names: Trade names for chlorothalonil include Bravo, Chlorothalonil, Daconil 2787, Echo, Exotherm Termil, Forturf, Mold-Ex, Nopcocide N-96, Ole, Pillarich, Repulse, and Tuffcide. The compound can be found in formulations with many other pesticide compounds.

Regulatory Status: Chlorothalonil is classified as a General Use Pesticide (GUP) by the U.S. Environmental Protection Agency. It is classified as toxicity class II - moderately toxic, due to its potential for eye irritation. Chlorothalonil containing products have a range of Signal Words, including WARNING (Bravo 720, 500), CAUTION (Exotherm Termil), and DANGER (Bravo W-75, Daconil W-75). Each of these products has a different formulation and product concentration and thus requires a different Signal Word.

Chemical Class: chloronitrile

Introduction: Chlorothalonil is a broad-spectrum organochlorine fungicide used to control fungi that threaten vegetables, trees, small fruits, turf, ornamentals, and other agricultural crops. It also controls fruit rots in cranberry bogs.

Formulation: The compound can be found in formulations with many other pesticide compounds.

Toxicological Effects:

Acute toxicity: Chlorothalonil is slightly toxic to mammals, but it can cause severe eye and skin irritation in certain formulations [2]. Very high doses may cause a loss of muscle coordination, rapid breathing, nose bleeding, vomiting, hyperactivity, and death. Dermatitis, vaginal bleeding, bright yellow and/or bloody urine, and kidney tumors may also occur [17]. The oral LD50 is greater than 10,000 mg/kg in rats and 6000 mg/kg in mice [9,17]. The acute dermal LD50 in both albino rabbits and albino rats is 10,000 mg/kg (9,17). In albino rabbits, 3 mg of chlorothalonil applied to the eyes caused mild irritation that subsided within 7 days of exposure [35].

Chronic toxicity: In a number of tests of varying lengths of time, rats fed a range of doses of chlorothalonil generally showed no effects on physical appearance, behavior, or survival [35]. Skin contact with chlorothalonil may result in dermatitis or light sensitivity [35]. Human eye and skin irritation is linked to chlorothalonil exposure; 14 of 20 workers exposed to 0.5% chlorothalonil in a wood preservative developed dermatitis. All workers showed swelling and inflammation of the upper eyelids [35]. Allergic skin responses have also been noted in farm workers [7].

Reproductive effects: Administration of high doses of chlorothalonil to pregnant rabbits through the stomach during the sensitive period of gestation was required to induce abortion in 4 of the 9 mothers. This and other studies suggest that chlorothalonil will not affect human reproduction at expected exposure levels [35].

Teratogenic effects: Long-term studies indicate that high doses fed to rats caused reduced weight gains for males and females in each generation studied [35]. Female rats given high doses of chlorothalonil through the stomach during the sensitive period of gestation had normal fetuses,

even though that dose was toxic to the mothers [35]. A study of birth defects in rabbits showed no effects [36]. Chlorothalonil is not expected to produce birth defects in humans.

Mutagenic effects: Mutagenicity studies on various animals, bacteria, and plants indicate that chlorothalonil does not cause any genetic changes [17,35,36]. The compound is not expected to pose mutagenic risks to humans.

Carcinogenic effects: Based on evidence from animal studies, chlorothalonil's carcinogenic potential is unclear. Male and female rats fed chlorothalonil daily over a lifetime developed carcinogenic and benign kidney tumors at the higher doses [35]. In another study, where mice were fed high daily doses of chlorothalonil for 2 years, females developed tumors in the fore-stomach area (attributed to irritation by the compound) and males developed carcinogenic and benign kidney tumors [35].

Organ toxicity: Chronic studies of rats and dogs fed high dietary levels show that chlorothalonil is toxic to the kidney. In addition to less urine output, changes in the kidney included enlargement, greenish-brown color, and development of small grains [37].

Fate in humans and animals: Chlorothalonil is rapidly excreted, primarily unchanged, from the body. It is not stored in animal tissues. Rats and dogs fed very high doses for 2 years eliminated almost all of the chemical in urine, feces, and expired air [17,38]. At lower concentrations, chlorothalonil leaves the body within 24 hours. Residues have not been found in the tissues or milk of dairy cows fed chlorothalonil [17].

Ecological Effects:

Effects on birds: Chlorothalonil is practically nontoxic to birds. The LD50 in mallard ducks is 5000 mg/kg [9]. Most avian wildlife are not significantly affected by this compound [17].

Effects on aquatic organisms: Chlorothalonil and its metabolites are highly toxic to fish, aquatic invertebrates, and marine organisms. Fish, such as rainbow trout, bluegill, and channel catfish are noticeably affected even when chlorothalonil levels are low (less than 1 mg/L). The LC50 is 0.25 mg/L in rainbow trout, 0.3 mg/L in bluegills, and 0.43 mg/L in channel catfish [9]. Chlorothalonil does not store in fatty tissues and is rapidly excreted from the body. Its bioaccumulation factor is quite low [17].

Effects on other organisms: The compound is nontoxic to bees [9].

Environmental Fate:

Breakdown in soil and groundwater: Chlorothalonil is moderately persistent. In aerobic soils, the half-life is from 1 to 3 months. Increased soil moisture or temperature increases chlorothalonil degradation. It is not degraded by sunlight on the soil surface [17]. Chlorothalonil has high binding and low mobility in silty loam and silty clay loam soils, and has low binding and moderate mobility in sand [35]. Chlorothalonil was not found in any of 560 groundwater samples collected from 556 U.S. sites [35].

Breakdown in water: In very basic water (pH 9.0), about 65% of the chlorothalonil was degraded into two major metabolites after 10 weeks. Chlorothalonil was found in one surface water location in Michigan at 6.5 mg/L [35].

Breakdown in vegetation: Chlorothalonil's residues may remain on above-ground crops at harvest, but will dissipate over time. Chlorothalonil is a fairly persistent fungicide on plants, depending on the rate of application. Small amounts of one metabolite may be found in harvested crops [37].

Physical Properties:

Appearance: Chlorothalonil is an aromatic halogen compound, a member of the chloronitrile chemical family. It is a grayish to colorless crystalline solid that is odorless to slightly pungent [9].

Chemical Name: tetrachloroisophthalonitrile [9]

CAS Number: 1897-45-6

Molecular Weight: 265.92

Water Solubility: 0.6 mg/L @ 25 C [9]

Solubility in Other Solvents: acetone s.s.; dimethyl sulfoxide s.s.; cyclohexanone s.s.; kerosene i.s.; xylene s.s. [9]

Melting Point: 250-251 C [9]

Vapor Pressure: 1.3 mPa @ 40 C [9]

Partition Coefficient: 437 (calc.): 20.9 [17]

Adsorption Coefficient: 1380 [14]

Exposure Guidelines:

ADI: 0.03 mg/kg/day [27]

MCL: Not Available

RfD: 0.015 mg/kg/day [8]

PEL: Not Available

HA: 0.5 mg/L (longer-term) [35]

TLV: Not Available

Basic Manufacturer:

Crystal Chemical Inter-America

10303 N.W. Freeway, Suite 512

Houston TX 77083

Phone: 713-956-6196

Emergency: Not Available