

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**VALORACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE LA
CONTAMINACIÓN DE ORIGEN AGRARIO:
INCORPORACIÓN DE BIOENSAYOS EN LOS
PROTOCOLOS DE EVALUACIÓN DEL RIESGO
AMBIENTAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Paloma Sánchez Argüello

Bajo la dirección del doctor

José Vicente Tarazona Lafarga

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-1717-9

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**VALORACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE LA
CONTAMINACIÓN DE ORIGEN AGRARIO. INCORPORACIÓN
DE BIOENSAYOS EN LOS PROTOCOLOS DE
EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL**

TESIS DOCTORAL

PALOMA SÁNCHEZ ARGÜELLO

Madrid, 2002

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**VALORACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE LA
CONTAMINACIÓN DE ORIGEN AGRARIO. INCORPORACIÓN
DE BIOENSAYOS EN LOS PROTOCOLOS DE
EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL**

**Tesis Doctoral presentada por Paloma
Sánchez Argüello para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas por la
Universidad Complutense de Madrid**

VºBº Director de la Tesis

VºBº Tutor de la Tesis

Dr. José Vicente Tarazona Lafarga

Dr. José Vicente Rovira Sanroque

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Laboratorio de Ecotoxicología del Departamento de Medio Ambiente del INIA, con la ayuda de una Beca de formación de investigadores del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, bajo la dirección del Dr. José Vicente Tarazona Lafarga

Madrid, Marzo de 2002

AGRADECIMIENTOS:)

Todo pasa, todo queda,..., y en la vida todo llega. Y como todo llega..., llega hasta el momento de dar por concluido este trabajo. Antes de poner punto y final quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible de una manera u otra su inicio, nudo y desenlace.

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento al Dr. José Vicente Tarazona Lafarga por ofrecerme su confianza y la posibilidad de realizar este trabajo bajo su dirección. Por su apoyo e infinita paciencia, y en especial por sus continuas "dosis de optimismo". Gracias también por haberme introducido en un tema tan comprometido con el respeto al medio ambiente, del que espero continuar aprendiendo y discutiendo "resultados divertidos".

Quiero agradecer a la Dra. Esperanza Martínez Conde todas sus recomendaciones durante la conclusión de este trabajo y al Dr. José Vicente Rovira Sanroque su generosidad al no dudar aceptar la tutoría de esta tesis en medio de circunstancias excepcionales.

Del conjunto del Laboratorio de Ecotoxicología tengo una larga lista de personas que aumenta cada día por su admirable crecimiento y expansión. Un gran equipo de doctores, licenciados, auxiliares,..., que ante todo son un gran equipo de compañeros:

Quisiera empezar por Goya y Carlos (permitidme un bautizo personal e intransferible: "the perfect team"), gracias por atender toda clase de consultas, ruegos y preguntas (a veces cercanas a la pesadez), por estar siempre ahí y poder contar con vuestro apoyo científico, técnico, logístico e incluso "todoterreno".

Gracias a Mila(gros) por su completa bio-disponibilidad (no te preocupes no lo diré bio..., bio..., bio, biomagnification!!!!, se me escapó) para prestarme su ayuda ante multitud de problemas de diversa índole: ensayos, informática, congresos (incluida vomitona, perdón), ERAs, churros (SIN AZUCAR)... Gracias a Viki por tener siempre tiempo para escucharme, animarme y aconsejarme. Ay!!! Qué razón tienes cuando dices eso de "qué pena de lotería!!", y si es posible la del GORDO, "qué gordo!!, quién el gordo??" (frase mítica del comedor del INIA). Gracias a las dos por esos momentos de MUCHAS RISAS.

Gracias a Mar que ya en los tempranos albores de esta tesis me prestó su colaboración con el ADN (te acuerdas?). A Sara (la amigüita de los pingüinos) por aguantar lo más pesadito de la tesis (escribirla) y compartir mañanas y tardes de escritorio que amenizaban la escritura. A las otras excompis del rincón-escritorio: a mi hermanita Elena (futura Dra.) ánimo que tú si que vales!!, a Conchi y a la nueva compa de despacho adjunto Loli, ambas me han aguantado en los últimos meses de tesis, lo cual no es poco. A Carmele por esos momentos de relax (contigo no son necesarias las visitas al fisio).

A Carmen Alonso gracias por animarme y ayudarme con las extracciones (a pesar de mi poca fe) y descubrimiento del GC/MS. A Jose Antonio (tus bendiciones de mindundis son únicas). A Javier nuestro Rousseau del siglo XXI. Al dúo más dicharachero (Pili y Palo), gracias chicas por vuestros mimos, regalos, vuestra inmensa ayuda a pie de laboratorio y por tantos momentos inolvidables en la cámara (incluidos los de chorros a propulsión de agua de caracol). Gracias también a Carmen del Río, Belen, Nati, Maite, a las que se fueron (Celia y Ruth) y a los que han venido (Mar, Chema, Emma y Javier). A Manolo (nuestro exdire) y todo su séquito que amenizan todas las reuniones de comensales que organiza el Departamento, y a Lola por todo su saber en informática.

A mi familia, ellos más que nadie han sufrido mis altibajos de este período, creo que va a ser una liberación para vosotros no tener que preguntarme "¿qué tal va la tesis?" y escuchar mis charlas monotema. A mis hermanos (Jesus y Carlos) por saber sacarme una sonrisa en todo momento. A Marga y la nueva alegría de la familia (Sara?). A mi mami infinitas veces gracias (a partir de ahora no te contestaré: "más o menos", sino "bien"). A Edu por ayudarme, animarme, aconsejarme, apoyarme y no sé cuantas palabras más que empiezan por "a"... en todo momento (gracias cosu). A José, Marta y resto de familia, aquí y en la distancia (gracias por escucharme y por toda vuestra comprensión).

A QK y Rafa, Mariajo, Lalilla, Andrea y Mario, Bea, Anita y Luis (y los demás del gremio)... y al resto de amigos (no se me vayan a enfadar por omisión) por los momentos distendidos de entretenimiento y diversión (tan necesarios!!!), por poder siempre contar con vosotros y por mostrarme esto desde otras perspectivas.

Gracias a todos ustedes puedo decir (ahora sí) se acabó.

Y a quién le sonríe el arroz
con infinitos dientes blancos?

Pablo Neruda

A mi madre y a Eduardo con todo mi cariño

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Bases científicas para la evaluación del riesgo ecológico	2
2. Dinámica de ecosistemas acuáticos. Influencia en la caracterización de la exposición	5
3. Valoración de efectos. Ensayos ecotoxicológicos	6
4. Objetivos	8
Bibliografía	9
PRIMERA PARTE: Incorporación de bioensayos mono-especie a estudios de campo para el seguimiento de efectos ecotoxicológicos	13
Introducción	14
Capítulo I: Desarrollo de bioensayos mono-especie con muestras de agua procedentes de arrozales	16
Introducción	17
Material y Métodos	19
1. Recogida y conservación de muestras	19
2. Bioensayos con muestras de agua procedentes de arrozales	19
2.1. Ensayo de reproducción de <i>Daphnia magna</i>	19
2.2. Ensayo de inhibición del crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i>	20
Resultados y Discusión	22
1. Efectos producidos por muestras de agua procedentes de arrozales en la reproducción de <i>Daphnia magna</i>	22
2. Efectos producidos por muestras de agua procedentes de arrozales en el crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i>	23
Bibliografía	26
Capítulo II: Valoración ecotoxicológica de productos fitosanitarios aplicados en cultivos de arroz: Estudio de semi-campo	28
Introducción	29
Material y Métodos	31
1. Diseño experimental	31
2. Selección de sustancias de referencia y tiempo de aplicación	31
3. Estrategia de muestreo	33
4. Valoración ecotoxicológica <i>ex situ</i>	33
5. Tratamiento de datos y análisis estadístico	33
Resultados y Discusión	35
1. Efectos producidos por muestras de agua procedentes de parcelas controles negativos	35

2. Efectos producidos por muestras de agua procedentes de parcelas tratadas con el nuevo herbicida	37
3. Efectos producidos por muestras de agua procedentes de parcelas controles positivos.....	37
Bibliografía	44

SEGUNDA PARTE: Desarrollo de bioensayos multi-especies en sistemas agua-sedimento para valorar la reproducción de invertebrados acuáticos46

Introducción	47
---------------------------	----

Capítulo III: Desarrollo de un sistema multi-especies para valorar efectos sobre la reproducción y diferencias debidas a la ruta de exposición: Efectos del Pentaclorofenol en *Daphnia magna* y *Chironomus prasinus*.....50

Introducción	51
Material y Métodos	53
1. Mantenimiento y cultivo de organismos	53
2. Diseño del ensayo multi-especies.....	53
3. Distribución y evolución del Pentaclorofenol en el sistema agua-sedimento.....	56
Resultados y Discusión	59
1. Distribución y evolución del Pentaclorofenol en el sistema agua-sedimento.....	59
2. Efectos letales y efectos en la reproducción de <i>Daphnia magna</i>	61
3. Efectos letales, emergencia de adultos y reproducción de <i>Chironomus prasinus</i>	63
Bibliografía	68

Capítulo IV: Desarrollo de un sistema multi-especies para valorar efectos sobre la reproducción en invertebrados acuáticos. Un caso de estudio con *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* y *Lymnaea peregra*.....71

Introducción	72
Material y Métodos	74
1. Selección de organismos utilizados en el ensayo multi-especies	74
2. Diseño del ensayo multi-especies con tres especies seleccionadas	74
3. Selección de parámetros biológicos a valorar en cada una de las tres especies	76
4. Tratamiento de datos y análisis estadístico.....	77
Resultados y Discusión	79
1. Reproducción y crecimiento de la población de <i>Daphnia magna</i>	79
2. Crecimiento y reproducción de <i>Chironomus prasinus</i> durante un ciclo de vida completo.....	84

3. Crecimiento y reproducción de <i>Lymnaea peregra</i>	86
Bibliografía	91
TERCERA PARTE: Discusión sobre la incorporación de los ensayos desarrollados en los protocolos de Evaluación del Riesgo Ambiental.....	94
Introducción	95
<u>Capítulo V: Escenarios para la Evaluación del Riesgo de productos fitosanitarios utilizados en el cultivo de arroz</u>	98
Introducción.....	99
Bases para la evaluación del riesgo ecológico en la región mediterránea	101
Evaluación de riesgo de productos fitosanitarios utilizados en el cultivo de arroz	102
1. Fase preliminar (Tier I). Escenario de exposición	102
2. Redefinición del proceso de evaluación. Tier II y III	108
Bibliografía	112
RECAPITULACIÓN Y CONCLUSIONES	115

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

BBMc/BBMe: Bold Basal Medium. Medio de cultivo para crecimiento (c) y para exposición (e) de *Chlorella vulgaris*.

BPA: Buenas Practicas Agrarias.

CL50/CE50: Concentración Letal/Efectiva media (respuesta equivalente al 50% de efecto).

DT50: Degradation Time 50. Tiempo para la degradación del 50% de una sustancia.

EAC: Ecologically Acceptable Concentration. Concentración para la que la función y estructura del ecosistema no es afectada de manera adversa.

ECCO: European Commission Co-ordination.

EL: Effect Limit. Límite a partir del cual un efecto es considerado adverso.

EMA: European Agency for the Evaluation of Medical products

EPPO: European and Mediterranean Plant Protection Organisation.

ERA: Ecological Risk Assessment. Evaluación del riesgo ambiental.

EUSES: European Union System for the Evaluation of Substances.

FOCUS: Forum for the Co-ordination of pesticide fate models and their Use.

GC/MS: Cromatografía de Gases acoplada con Espectrometría de Masas.

NOEC: No-Observed Effect Concentration. Concentración para la que no se observan efectos significativos frente al control.

OCA: Objetivo de Calidad de Agua.

PCP: Pentaclorofenol.

PEC: Predicted Effect Concentration. Concentración esperable en el medio.

PNEC: Predicted No-Effect Concentration. Concentración esperable que no producirá efectos adversos sobre los organismos vivos.

TER: Toxicity Exposure Ratio. Relación entre la toxicidad y los niveles de exposición.

VIT: Valoración por Identificación Toxicológica.

WET: Whole Effluent Toxicity.

RESUMEN

La Evaluación del Riesgo Ambiental (ERA) constituye en la actualidad la mejor herramienta disponible para el control de efectos adversos y eliminación de compuestos químicos sintéticos sobre el medio ambiente. En el marco de la UE dicha herramienta se ha incorporado a las directivas que regulan la comercialización y autorización de sustancias químicas, productos fitosanitarios, medicamentos veterinarios y biocidas.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en tres apartados complementarios: 1) Incorporación de bioensayos en estudios de campo para el seguimiento de efectos ecotoxicológicos. 2) Desarrollo de bioensayos multi-especies en sistemas agua-sedimento para valorar la reproducción de invertebrados acuáticos. 3) Desarrollo de protocolos para la incorporación de los ensayos en las valoraciones de riesgo.

En el primer apartado se valida la utilización de ensayos de toxicidad en estudios de campo con productos fitosanitarios aplicados en arrozales. La comparación de resultados de laboratorio y resultados obtenidos por una valoración *ex situ* de la toxicidad de muestras de arrozal confirma la validez de dicha herramienta para la valoración de efectos ecotoxicológicos en los estudios de campo.

En el segundo apartado se valoran los efectos del PCP en un sistema agua-sedimento sobre *Daphnia magna* y *Chironomus prasinus*. Los resultados permiten desarrollar un protocolo de ensayo en el que en un tiempo similar al del ensayo de reproducción de *D. magna* pueden valorarse efectos simultáneamente sobre la reproducción de *D. magna* y *C. prasinus* por exposición a través de agua y/o sedimento. Asimismo se desarrolla un ensayo con tres especies (*Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* y *Lymnaea peregra*) con distintas estrategias de reproducción (partenogénesis, sexual y hermafroditismo) confirmándose la capacidad de dicho ensayo para valorar efectos en varias generaciones de *Daphnia magna*, en dos generaciones de *Chironomus prasinus* y reproducción en *Lymnaea peregra*. Se establece un protocolo final que incluye condiciones de ensayo, estadíos y parámetros ecotoxicológicos.

Finalmente en el tercer apartado se desarrolla un modelo conceptual y escenarios para la evaluación de productos fitosanitarios aplicados en arrozales, proponiéndose un esquema de tres fases: una fase preliminar y dos de alto nivel. La fase intermedia incluye una valoración ecotoxicológica *ex situ* con muestras procedentes de un estudio de campo.

SUMMARY

Nowadays, Environmental Risk Assessment (ERA) constitutes the best available technology for assessing the potential environmental impact of chemicals. The EU regulation on chemicals, pesticides, veterinary medicines and biocides includes this tool in different Directives.

This study comprises three associated parts: 1) Incorporation of direct toxicity assessment in field studies 2) Development of water/sediment multi-species assays for assessing reproductive effects on invertebrates. 3) Development of protocols for the incorporation of their results in ERA procedures.

The first part includes a validation study with rice pesticides using direct toxicity assessment of paddy waters from a field study. The comparison of results between laboratory data and off-line assessment of field samples confirms that the direct measurement of paddy water toxicity is a cost/effective tool for effect assessment in field studies.

In the second part the response of *Daphnia magna* and *Chironomus prasinus* to PCP in a single water/sediment was studied. The results allowed to develop a protocol suitable for assessing effects on *Daphnia magna* and *Chironomus prasinus* reproduction exposed either through sediment or water with a duration similar to the *Daphnia magna* reproduction test. On the other hand a new multi-species tests with three selected species (*Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* y *Lymnaea peregra*) covering three reproductive strategies (parthenogenesis, sexual reproduction and hermaphroditism) was developed. The test design presents a multi-generation population study for daphnids, a two generations study for chironomids and an early life-cycle study on *L. peregra*.

Finally in the third part a conceptual model and exposure/effect scenarios for the ERA of rice pesticides are proposed. A tiered approach is considered with three tiered levels. The intermediate tier considers an off-line ecotoxicological assessment of samples from field studies.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La elevada producción de compuestos químicos sintéticos exige el estudio de los posibles impactos sobre el hombre y el medio ambiente originados por su uso y vertido. La Toxicología y la Ecotoxicología vienen experimentando un creciente desarrollo con el fin de proporcionar la información y el conocimiento básico para la identificación y valoración de la peligrosidad de estos compuestos (Bro Rasmussen, 1997). Durante los años 70 y como resultado de un nuevo paradigma, los países industrializados adoptan un esquema de trabajo que permite incorporar esta información recopilada en un proceso de regulación conocido como Evaluación de Riesgo (Thornton, 2000). La Evaluación de Riesgo constituye hoy la mejor herramienta disponible por la que se limita la producción y vertido de los compuestos químicos que puedan constituir un riesgo para la salud humana y del medio ambiente.

La Evaluación del Riesgo Ecológico es el proceso por el que se define la probabilidad de un determinado estrés para producir efectos ecológicamente adversos (U.S. EPA, 1992). La terminología anglosajona hace referencia a las siglas ERA (Ecological Risk Assessment) y por analogía con la expresión en castellano: "Evaluación del Riesgo Ambiental" conservaremos dicha terminología. El proceso ERA constituye una herramienta para la gestión y regulación de actividades humanas potencialmente generadoras de efectos no deseables sobre el medio (U.S. EPA, 1998). Esta definición induce a pensar que la ERA es un instrumento igual o similar a la Evaluación de Impacto Ambiental (EIA), regulada esta última en el ámbito europeo por la Directiva 85/337/CEE. Sin embargo existe una diferencia fundamental entre ambos instrumentos de gestión, mientras que la EIA es una herramienta de tipo preventivo, las ERAs pueden ser tanto de carácter prospectivo como retrospectivo, lo que permite una evaluación de efectos sobre el medio debidos a la presencia de agentes o actividades actuales o del pasado. Esta diferencia convierte a la ERA en una herramienta muy indicada para alcanzar los objetivos de la Directiva relativa a la Prevención y Control Integrados de la Contaminación (UE, 1996a).

La Agenda 21 recomienda la extensión y aceleración de la integración de esta herramienta en el control de sustancias químicas a nivel internacional (Vermerie *et al.*, 1997). Siguiendo estas directrices, en Europa la ERA se convierte en un instrumento para autorizar la comercialización de nuevas sustancias así como la producción e importación de las ya existentes, regulándose mediante las correspondientes directivas (UE, 1992; UE 1993). Esta normativa demanda la necesidad de desarrollar un soporte científico-técnico y las herramientas necesarias para facilitar y armonizar dicho proceso. Los esfuerzos de todos los estados miembros en esta dirección han culminado con la elaboración de documentos como la TGD- Technical Guidance Document (UE, 1996b) y el correspondiente soporte informático EUSES (UE, 1996c). Asimismo y dentro del marco de la directiva por la que se regula la comercialización de productos fitosanitarios (UE, 1991) se vienen desarrollando protocolos ERA específicos para plaguicidas (EPPO, 1994; Punja, 1998). Y más tardíamente para el caso de productos de uso veterinario (EMEA, 1997) y biocidas (Rasmussen *et al.*, 1999).

1. BASES CIENTÍFICAS PARA LA EVALUACIÓN DEL RIESGO ECOLÓGICO

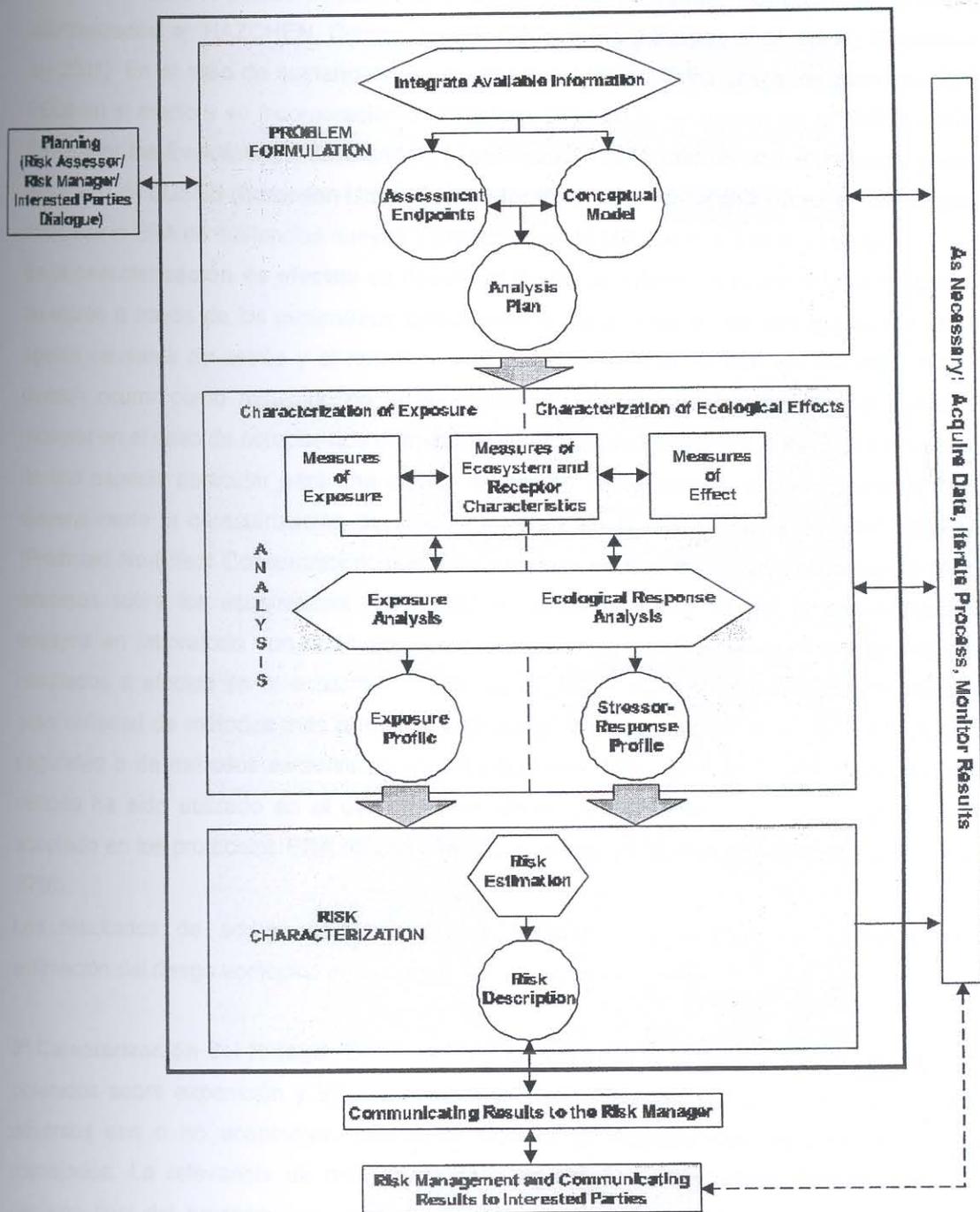
Los procesos ERA constan de dos componentes básicos: la caracterización de efectos y la caracterización de la exposición. Sobre ambos componentes se apoyan las tres fases fundamentales de la ERA: 1º formulación del problema, 2º análisis del riesgo y 3º caracterización del riesgo. Todas estas fases se describen y relacionan en el manual sobre ERA desarrollado por la U.S. EPA (1998), y se resumen a modo de esquema en la Figura 1. Las fases que componen el proceso ERA propiamente dicho se encuadran todas ellas dentro del rectángulo mayor:

1º Formulación del Problema: Es el proceso por el que se generan y evalúan hipótesis sobre los posibles efectos que podrán ocasionar las actividades humanas sobre el medio. Existen dos piezas claves en esta fase: (1) elección adecuada de los parámetros a determinar (assessment endpoints) (2) desarrollo de modelos conceptuales que describan las relaciones clave entre el agente causante (de origen químico, físico y/o biológico) y los parámetros a determinar.

Los parámetros seleccionados deberán representar valores ecológicos definiendo unidades específicas (especies, poblaciones, comunidades, ecosistemas, habitats), así como atributos cuantificables de éstas, de manera que permiten establecer relaciones causa-efecto. Los modelos conceptuales (2) representan de manera visual, generalmente mediante diagramas de flujo, las relaciones entre los receptores biológicos y la exposición de estos a un estrés determinado.

2º Análisis del Riesgo (Caracterización de Exposición y Efectos) Como puede observarse en la Figura 1 esta fase de la evaluación ocupa un lugar central y se estructura a partir de los dos productos de la fase anterior (parámetros seleccionados y modelos conceptuales desarrollados). Durante la fase de análisis se evaluarán todos los datos existentes para determinar cómo el receptor es expuesto al estrés (caracterización de la exposición) y qué tipo de efectos ecológicos producirá o está produciendo (caracterización de efectos).

Durante la **caracterización de la exposición** se analizan las fuentes generadoras de la exposición, su distribución o ruta y la co-ocurrencia o contacto con el receptor a escala espacial y temporal. En el caso de la ERA de compuestos químicos se determina el destino (agua, suelo, aire, etc.) y comportamiento en el medio de acuerdo a sus propiedades físico-químicas (solubilidad, presión de vapor, etc.). Se han desarrollado diferentes métodos de estimación y modelos para el cálculo de las denominadas PECs (PECs- Predicted Effect Concentrations) o concentraciones esperables en los distintos compartimentos medioambientales (UE, 1996d). Los modelos para la caracterización de la exposición incorporan asimismo información sobre las distintas rutas por las que los organismos son expuestos (ingestión, inhalación, por contacto), incluyendo aspectos como la intoxicación secundaria, bioacumulación y biomagnificación.



En Europa los esfuerzos se han orientado hacia la validación de un sistema armonizado de caracterización de la exposición. La información recopilada y contrastada durante los últimos años en los distintos países ha permitido el desarrollo de un número considerable de modelos informatizados: ej. HAZCHEN, Cemos, SAMS, GREAT-ER (Matthies *et al.*, 1997; Showanek *et al.*, 2001). En el caso de sustancias de uso industrial los modelos utilizados para estimar las PECs en el medio y su incorporación a la cadena alimenticia se reúnen en el USES (Uniform System for the Evaluation of Substances) (Jager *et al.*, 1994), que constituye la etapa previa al desarrollo de EUSES (European Union System for the Evaluation of Substances), por el que se armoniza la ERA de sustancias nuevas y existentes en la UE (Vermeire *et al.*, 1997).

En la **caracterización de efectos** se describen los efectos producidos por el agente causante de estrés a través de los parámetros seleccionados, se analiza la relación que existe entre el agente causante de estrés y el receptor, y si existe la certeza de que los efectos ocurren o pueden ocurrir como resultado de la exposición al estrés. La relación entre el estrés y el receptor en el caso de compuestos químicos suele analizarse mediante curvas dosis-respuesta de una especie particular para una unidad de tiempo de exposición al compuesto (ej. 24 h). Generalmente la caracterización de efectos consiste en el cálculo de la denominada PNEC (Predicted No-Effect Concentration) que indica el nivel de exposición que no produce efectos adversos sobre los ecosistemas. La PNEC se calcula a partir de los datos obtenidos de ensayos en laboratorio con unas pocas especies, lo que implica la extrapolación de estos resultados a efectos en el ecosistema (Crossland, 1992). Para ello se han desarrollado una gran variedad de métodos más o menos sofisticados basados o bien en el uso de factores de seguridad o de métodos estadísticos (Bro-Rasmussen, 1997; Roman *et al.*, 1999). El primer método ha sido utilizado en el desarrollo de Objetivos de Calidad de Agua (OCA) y se ha adoptado en los protocolos ERA de compuestos químicos y fitosanitarios en Europa (Tarazona, 1998).

Los resultados de ambas caracterizaciones (exposición y efectos) se combinan en la estimación del riesgo ecológico en la tercera y última fase.

3º Caracterización del Riesgo: En esta última fase, mediante la integración de los resultados obtenidos sobre exposición y efectos durante la fase de análisis, se determina si los efectos adversos son o no aceptables, evaluando siempre la incertidumbre asociada a los datos manejados. La relevancia de esta última fase es máxima pues influye directamente en la decisión final del proceso. Los criterios por los que se define el límite entre aceptable o no aceptable son actualmente objeto de un amplio debate científico. Existen no obstante diferentes técnicas para la estimación del riesgo, estando su utilización condicionada a los datos obtenidos sobre exposición y efectos durante la fase anterior. La estimación más sencilla y típica en el caso de compuestos químicos es la obtención de una relación o cociente entre exposición y efectos (cociente de riesgo), expresado como $PEC/PNEC$ (UE, 1996d) o como su inversa TER (Toxicity Exposure Ratio) (Punja, 1998). El número de datos utilizados para la obtención del cociente de riesgo es limitado, por lo que existe un grado de incertidumbre

asociado a las decisiones basadas en este tipo de estimaciones (escasez de parámetros y de especies ensayadas, datos no fidedignos, valores genéricos de los modelos y variabilidad natural). La utilización del llamado “principio de precaución” por el que se adopta el peor de los casos posibles en la decisión final contrarresta esta incertidumbre (Tarazona, 1997). Estos principios son uniformes para el caso de fitosanitarios así como de sustancias nuevas y existentes en la UE (UE, 1994; UE, 1997). Sin embargo el “principio de precaución” puede dar lugar a evaluaciones poco reales. Desde un punto de vista científico, es aconsejable la cuantificación del grado de incertidumbre y su consideración durante el proceso de decisión, mediante un análisis probabilístico (Jager *et al.*, 2001). Esta opción está lejos de la práctica actual en el ámbito de la UE debido a la escasez de documentos guía, si bien existen algunos ejemplos desarrollados por la U.S. EPA (U.S. EPA, 1997), y sobre todo a la falta de suficientes datos para poder aplicarlos.

2. DINAMICA DE ECOSISTEMAS ACUÁTICOS. INFLUENCIA EN LA CARACTERIZACIÓN DE LA EXPOSICIÓN.

La preocupación por la contaminación acuática surge como consecuencia del indiscriminado vertido de efluentes industriales, urbanos y de origen agrícola hacia cauces naturales. Este hecho ha propiciado un auge en el desarrollo de metodologías para valorar los niveles de exposición a compuestos químicos, llegando incluso a establecerse límites permitidos de sus concentraciones tanto en agua como en sedimentos (Di Toro *et al.*, 1991; Bro-Rasmussen *et al.*, 1994).

La tradicional valoración de los niveles de contaminantes en el medio acuático no incluye aspectos como el comportamiento y transporte del compuesto a través del ecosistema necesarios en la caracterización de la exposición. En el caso de sistemas acuáticos tanto el tamaño del ecosistema como el grado de renovación y movimiento del agua son factores críticos a considerar en la caracterización de la exposición (Burger, 1997). Desde esta perspectiva claramente debemos diferenciar entre sistemas loticos y lenticos, cuya diferencia fundamental estriba en la velocidad de flujo de agua. No existe una delimitación clara entre ambos tipos de sistemas acuáticos, en general cursos de agua en movimiento (ríos, arroyos) pertenecen al primer tipo, mientras que aguas “estancadas” (lagos, lagunas) se clasifican dentro de los sistemas lenticos. Lam y Calow (1988) establecen un límite arbitrario por el cual aguas con una velocidad superior a 0,3 m/s corresponderían a sistemas loticos, mientras que aguas con una velocidad menor de 0,04 m/s corresponderían a sistemas lenticos. Existen entre ambos tipos de sistemas zonas de transición o ecotonías que desde el punto de vista de conservación y protección del medio acuático no deben ser olvidadas por constituir habitats de gran biodiversidad (Williams, 1996; Samways y Stewart, 1997; Ward *et al.*, 1999).

La mayoría de metodologías desarrolladas para estudiar el medio acuático están dirigidas a sistemas loticos, si bien existe un número significativo de métodos desarrollados exclusivamente para lagos y embalses (Bain *et al.*, 1999). Un ejemplo claro es el caso de los modelos utilizados para estudiar la eutrofización de las aguas, los cuales se han desarrollado fundamentalmente para sistemas lenticos (Biggs, 2000).

La menor velocidad de flujo de agua en sistemas lenticos favorece el intercambio entre los compartimentos agua y sedimento y permite un mayor tiempo de residencia de los contaminantes. Sin duda este factor afectará a la concentración, biodisponibilidad, toxicidad, distribución y destino final del contaminante. La caracterización de la exposición en estos sistemas depende fundamentalmente de fenómenos de sorción y persistencia en sedimentos, efectos sobre las comunidades de bentos, influencia de estas en el transporte de compuestos desde el sedimento y a través de la cadena trófica por procesos de bioacumulación y biomagnificación. Todos estos procesos han sido objeto de estudio durante los últimos años (Ankley *et al.*, 1993; Sibley *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 2000; Lytikäinen *et al.*, 2001).

Las diferencias evidentes entre ambos sistemas no se consideran en los primeros pasos de los protocolos ERA (Lower Tier), ya que estos se basan en escenarios que representan un peor-caso-posible, y por ello se asume que cubren todo tipo de sistemas acuáticos. Sin embargo, en las estimaciones de alto nivel (Higher Tier) que pretenden aproximar la estimación a la realidad, esta diferencia debe considerarse necesariamente. Para ello existen dos opciones, la primera desarrollar modelos complejos como GREAT-TER para sustancias industriales de uso difuso (Showanek *et al.*, 2001) o FOCUS para plaguicidas (FOCUS, 1996). La segunda supone la evaluación de la exposición mediante las concentraciones reales medidas bien en programas de seguimiento, bien en estudios de campo.

3. VALORACIÓN DE EFECTOS. ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS

Según Burger (1997) la vulnerabilidad de los ecosistemas a la exposición por compuestos químicos depende de tres factores: a) diferencias en el destino y transporte del compuesto b) diferencias en la complejidad del sistema y c) diferencias en las respuestas individuales de los organismos. Esta vulnerabilidad debe estar reflejada en los parámetros biológicos en una ERA (U.S. EPA, 1998). La Ecotoxicología ha proporcionado abundante información sobre el último factor mediante el desarrollo de bioensayos o ensayos mono-especie. Sin embargo, los parámetros ecotoxicológicos obtenidos mediante ensayos mono-especie no representan la complejidad de los ecosistemas.

Aunque la toxicidad aguda o crónica (CL50, NOEC) obtenida para las especies más sensibles puede utilizarse en un primer nivel de ERA (Crossland, 1992), la incertidumbre

asociada a la extrapolación de estos datos a condiciones ambientales reales ha impulsado el mayor empleo de estudios de campo y el desarrollo de herramientas alternativas (ensayos multi-especies, microcosmos, mesocosmos). No existe una clasificación única que diferencie cada una de estas herramientas, algunos autores incluyen dentro de ensayos multi-especies todos aquellos que no sean mono-especie: microcosmos, mesocosmos y estudios de campo (Buikema y Voshell, 1993; Van Dijk *et al.*, 2000). Las diferencias entre ensayos multi-especies, microcosmos y mesocosmos normalmente hacen referencia a tamaño y complejidad, si bien los primeros suelen reunir unas pocas especies y se realizan bajo condiciones de laboratorio controladas, los últimos reúnen a un gran número de especies, suelen tener grandes dimensiones y se realizan bajo condiciones ambientales (atmosféricas) reales (Crossland y La Point, 1992; Campbell *et al.*, 1999).

Estas nuevas metodologías responden a la necesidad de valorar efectos a niveles superiores de organización (población, comunidad) (Cairns *et al.*, 1996). Los datos obtenidos con los ensayos multi-especies resultan más representativos pues proporcionan información simultáneamente sobre el comportamiento del compuesto y un mayor número de parámetros ecotoxicológicos (Cairns y Cherry, 1993). La mayor complejidad y relevancia ecológica de estos métodos corresponde a los estudios de campo y mesocosmos, que constituyen herramientas esenciales para la ERA de plaguicidas, a pesar de su elevado coste y baja reproducibilidad (Caquet *et al.*, 2000; Caquet *et al.*, 2001). La mayor parte de los estudios de mesocosmos han simulado sistemas lenticos, son los denominados “estanques artificiales”, aunque existen algunos ejemplos de simulación de sistemas loticos (Rodgers *et al.*, 1996; Jungmann *et al.*, 2001).

La incorporación de todas estas herramientas a los procesos de ERA de compuestos vertidos al medio acuático se realiza dentro de un esquema iterativo de evaluación por el cual los ensayos mono-especie son utilizados en un primer nivel (Tier I), reservándose el último nivel a los estudios de campo. Los microcosmos y ensayos multi-especies constituyen el puente entre el nivel inferior y el último (Campbell *et al.*, 1999).

4. OBJETIVOS

Además de proteger la salud humana y del medio ambiente, las decisiones finales de un proceso ERA tienen consecuencias económicas y sociales. Si bien la ERA tiene una sólida base científica, en numerosas ocasiones este proceso ha sido criticado por su falta de realismo. La falta de conocimiento y datos obliga a la utilización de factores de seguridad. La utilización de factores de seguridad, así como del “principio de precaución”, tiene en muchos casos como consecuencia la sobreestimación del riesgo real de un compuesto químico, y la imposición de límites de producción y de exposición que no son necesarios. El reto de los científicos es el de proporcionar toda la información necesaria para la toma de decisiones con un alto nivel de confianza, y un camino para ello es mejorar la aplicabilidad de la Ecotoxicología a la ERA.

El objetivo general de esta tesis es el de desarrollar y/o adaptar herramientas ecotoxicológicas que puedan ser incorporadas de manera rutinaria en los protocolos ERA de alto nivel para compuestos químicos. Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1 Adaptación e incorporación de ensayos ecotoxicológicos estandarizados para la caracterización de efectos en estudios de campo con plaguicidas.
- 2 Desarrollo de nuevos ensayos multi-especies en sistemas estáticos agua-sedimento para valorar efectos sobre la reproducción de invertebrados acuáticos. Identificación de nuevos parámetros ecotoxicológicos (endpoints).
- 3 Incorporación de los ensayos desarrollados como herramientas para la caracterización de efectos de los protocolos actuales de Evaluación del Riesgo Ambiental.
- 4 Desarrollo de un modelo conceptual y un escenario de exposición específico para la Evaluación de Riesgo Ambiental de plaguicidas aplicados sobre campos de arroz.

Bibliografía

- Ankley T.G., Benoit D.A., Hoke R.A., Leonard E.N., West C. W., Phipps G.L., Mattson V.R. y Anderson L.A. (1993). Development and evaluation of test methods for benthic invertebrates and sediments: effects of flow rate and feeding on water quality and exposure conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 12-19.
- Bain M.B., Hughes T.C. y Arend K.K. (1999). Trends in methods for assessing freshwater habitats. *Fisheries.* 24, 16-21.
- Biggs B.J.F. (2000). Eutrophication of streams and rivers: dissolved nutrient-chlorophyll relationships for benthic algae. *J.N. Am. Benthol. Soc.* 19, 17-31.
- Bro-Rasmussen F, Calow P, Canton JH, Chambers PH, Silva Fernandes A, Hoffmann L, Jouany JM, Klein W, Persoone G, Scoullou M, Tarazona JV y Vighi M. (1994). EEC water quality objectives for chemicals dangerous to aquatic environment (list 1). *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 137, 83-110.
- Bro-Rasmussen F. (1997). The environmental experience: ecosystem protection. *Arch. Toxicol. Suppl.* 19, 155-166.
- Buikema AL y Voshell JR (1993). Toxicity studies using freshwater benthic macroinvertebrates. En: Rosenburg DM, Resh VH (eds). *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates.* Chapman and Hall, New York, pp 344-398.
- Burger J. (1997). Methods for and approaches to evaluating susceptibility of ecological systems to hazardous chemicals. *Environ. Health. Perspect.* 105, 843-848.
- Cairns J. y Cherry D.S. (1993). Freshwater multi-species test systems. En: Calow P (ed). *Handbook of Ecotoxicology, Vol 1.* Blackwell Scientific Publications. Oxford, pp 101-116.
- Cairns J., Bidwell J.R. y Arnegard M.E. (1996). Toxicity testing with communities: microcosms, mesocosms, and whole-system manipulations. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 147, 45-69.
- Campbell P.J., Arnold D.J.S., Brock T.C.M., Grandy N.J., Heger W., Heimbach F., Maund S.J. y Streloke M. (1999). Guidance document on higher-tier assessment for pesticides. SETAC-Europe, Brussels. Pp-179.
- Caquet T., Lagadic L. y Sheffield S.R. (2000). Mesocosms in ecotoxicology (1): outdoor aquatic systems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 165, 1-38.
- Caquet T., Lagadic L., Monod G., Lacaze J.C. y Couté A. (2001). Variability of physicochemical and biological parameters between replicated outdoor freshwater lentic mesocosms. *Ecotoxicology.* 10, 51-66
- Crossland N.O. (1992). Hazard assessment in freshwater ecosystems. *Toxicol. Lett.* 64/65, 511-517.
- Crossland N.O. y La Point T.W. (1992). The design of mesocosm experiments. *Environ. Toxicol Chem.* 11, 1-4
- Di Toro D.M., Zarba C.S., Hansen D.J., Berry W.J., Swartz R.C., Cowan C.E., Pavlou S.P., Allen H.E., Thomas N.A. y Paquin P.R. (1991). Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Annual Review. Environ. Toxicol Chem.* 10, 1541-1583.

- EMEA..(1997). Note for guidance: Environmental risk assessment for veterinary medicinal products other than GMO-Containing and immunological products. EMEA/CVMP/055/96-FINAL.
- EPPO. (1994). European and Mediterranean Plant Protection Organisation and the Council of Europe (EPPO/CoE). Environmental Risk Assessment Schemes. Decision-making scheme for the environmental risk assessment of plant protection products. EPPO Bulletin Volume 24, 1-165.
- FOCUS. (1996). Draft Report on Surface Water Models and EU Registration of Plant Protection Products (FOCUS Steering Committee, June 1996, pages 221).
- Jager D.T., Visser J.D. y van de Meent C.J. (1994). Uniform System for the Evaluation of Substances. IV. Distribution and intake. Chemosphere 29, 353-369.
- Jager T., Vermeire T.G., Rikken M.G.J. y van der Poel P. (2001). Opportunities for a probabilistik risk assessment of chemicals in the European Union. Chemosphere 43, 257-264.
- Jungmann D., Brust K., Licht O., Mählmann J., Schmidt J. y Roland N. (2001). Artificial indoor streams as a method to investigate the impact of chemicals on lotic communities. Environ. Sci. and Pollut. Res. 8, 49-55.
- Lam P.K.S. y Calow P. (1988). Differences in the shell shape of *Lymnaea peregrina* (Müller) (Gastropoda: pulmonata) from lotic and lentic habitats; environmental or genetic variance?. J. Moll. Stud. 54: 197-207.
- Lyytikäinen M., Sormunen A., Ristola T., Juvonen R. y Kukkonen J.V.K. (2001). Toxicity of freshwater sediments in the vicinity of an old sawmill: Application of three bioassays. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40, 318-326.
- Matthies M., Koormann F., Boeije G. y Feijtel T.C. (1997). The identification of thresholds of acceptability and danger: the chemical presence route. Arch. Toxicol. Suppl. 19, 123-135.
- Pereira A.M.M., Soares A.M.V.M., Gonçalves F. y Ribeiro R. (2000). Water-column, sediment and *in situ* chronic bioassays with cladocerans. Ecotoxicol. Environ. Saf. 47, 27-38.
- Punja N. (1998). Regulations and risk assessments of the ecotoxicological impact from the use of plant protection products in the European Union. En: Pugh DM y Tarazona JV (editors). Regulation for chemical safety in Europe: analysis, comment and criticism. Kluwer Academic Publishers. pp 157-169.
- Rasmussen K., Chemin P. y Haastrup P. (1999). Regulatory requirements for biocides on the market in the European Union according to Directive 98/8/EC. J. Hazard. Mater. 3, 237-251.
- Rodgers J.H., Crossland N.O., Kline E.R., Gillespie W.B., Figueroa R.A., y Dorn P.B. (1996). Desing and construction of model stream ecosystems. Ecotoxicol Environ. Saf. 33, 30-37.
- Roman G., Isnard P. y Jouany J.M. (1999). Critical analysis of methods for assessment of Predicted No-Effect Concentration. Ecotoxicol Environ. Saf. 43, 117-125.
- Samways M.J. y Stewart D.A.B. (1997). An aquatic ecotone and its significance in conservation. Biodivers. Conserv. 6, 1429-1444.
- Showanek D., Fox K., Holt M., Schroeder F.R., Koch V., Cassani G., Matthies M., Boeije G., Vanrolleghem P., Young A., Morris G., Gandolfi C. y Feijtel T.C. (2001). GREAT-ER: a

new tool for management and risk assessment of chemicals in river basins. Contribution to GREAT-ER # 10. *Water. Sci. Technol.* 43, 179-185.

- Sibley P.K., Legler J., Dixon D.G. y Barton D.R. (1997). Environmental health assessment of the benthic habitat adjacent to a pulp mill discharge. I Acute and chronic toxicity of sediments to benthic macroinvertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32, 274-284.
- Tarazona J.V. (1997). The identification of thresholds of acceptability and danger: the biological route. *Arch. Toxicol. Suppl.* 199, 137-146.
- Tarazona J.V. (1998). Scientific concepts and uncertainties in the identification of ecotoxicological thresholds of acceptability and danger. En: Pugh DM y Tarazona JV (editors). *Regulation for chemical safety in Europe: analysis, comment and criticism.* Kluwer Academic Publishers. pp 41-63.
- Thornton J. (2000). Beyond risk: an ecological paradigm to prevent global chemical pollution. *Int. J. Occup. Environ. Health.* 6, 318-330.
- UE. (1985). Directiva 85/377/CEE relativa a la evaluación de las repercusiones de determinados proyectos públicos y privados sobre el medio ambiente.
- UE. (1991). Directiva 91/414/CEE relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.
- UE. (1992). Directiva 92/32/CEE por la que se modifica por séptima vez la Directiva 67/548/CEE relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de sustancias peligrosas.
- UE. (1993). Directiva 93/67/CEE por la que se fijan los principios de evaluación del riesgo, para el ser humano y el medio ambiente, de las sustancias notificadas de acuerdo con la Directiva 67/548/CEE del Consejo.
- UE. (1994). Comisión Regulation (EC) 1488/94. Principles for the assessment of risks to man and the environment of existing substances in accordance with Council Directive 793/93.
- UE. (1996a). Directiva 96/61/CE relativa a la prevención y al control integrados de la contaminación.
- UE. (1996b). Technical guidance document in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and Commission Regulation (EC) 1488/94 on risk assessment for existing substances. Parts I, II, III and IV. Document ISBN 92-827-8011-2. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- UE. (1996c). EUSES, the European Union System for the Evaluation of Substances. European Chemicals Bureau (EC/DGXI), Ispra. Italy.
- UE. (1996d). European Commission. Joint Research Centre. "Risk Assessment. The theory and practice". Proceedings of the Workshop Risk Assessment: a Workshop on Practical Experience. Vollmer G., Gioannoni L., Sokull-klüttgen y Karcher W. (Editores). ECSC-EC-EAEC Brussels.
- UE. (1997). Directiva 97/57/CE por la que se establece el Anexo VI de la Directiva 91/414/CEE relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.
- U.S. Environmental Protection Agency. USEPA. (1992). Framework for ecological risk assessment. Washington, DC: Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency. EPA/630/R-92/001.

- U.S. Environmental Protection Agency. USEPA.. (1997). Guiding principles for Monte Carlo analysis (EPA/630/R-97/001). US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- U.S. Environmental Protection Agency. USEPA. (1998). Guidelines for Ecological Risk Assessment. Risk Assessment Forum. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC. EPA/630/R-95/002F.
- Van Dijk H.F.G., Brussaard L., Stein A., Baerselman F., de Heer H., Brock T.C.M., Van der Gaag M.A., Van Gestel C.A.M., Van der Hoeven N., de Jong F.M.W., Van der Linden A.M.A., Van Noort P.C.M., Oomen P.A. y Van Vliet P.J.M. (2000). Field Research for the authorisation of pesticides. *Ecotoxicology*. 9, 377-381.
- Vermerie T.G., Jager D.T., Bussian B., Devillers J., den Haan K., Hansen B., Lundberg I., Niessen H., Robertson S., Tyle H. y van der Zandt P.T. (1997). European Union System for the Evaluation of substances (EUSES). Principles and structure. *Chemosphere*. 34, 1823-1836.
- Ward J.V., Tockner K., Schiemer F. y Layzer J.B. (ed). (1999). Biodiversity of floodplain river ecosystems: ecotones and connectivity. *Regul. Rivers. Res. Mgmt.* 15, 125-139.
- Williams D.D. (1996). Environmental constraints in temporary fresh waters and their consequences for the insect fauna. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 15, 634-650.

PRIMERA PARTE

**Incorporación de bioensayos mono-especie
a estudios de campo para el seguimiento de
efectos ecotoxicológicos.**

La evaluación de los riesgos para el medio ambiente es un instrumento al servicio de la toma de decisiones para el registro y la autorización de los productos fitosanitarios en Europa (UE, 1991). La primera fase de una evaluación de riesgo o Tier I, si utilizamos la terminología anglosajona, consiste en la comparación de los efectos observados mediante el uso de ensayos de laboratorio frente al nivel de exposición esperable en el medio. En el caso de productos fitosanitarios se obtienen de esta manera TERs (Toxicity Exposure Ratio) que de acuerdo a un modelo conservativo de caracterización de riesgo, deben cumplir los principios uniformes recogidos en la Directiva 97/57/CE. Cuando los TERs exceden los principios uniformes y por tanto el riesgo resulta potencialmente inaceptable, se procede a una redefinición del proceso de evaluación que conlleva la realización de nuevos estudios que permitan aportar información adicional necesaria.

En un proceso ERA los resultados básicos de estudios de laboratorio pueden llevar por tanto a estudios más complejos (Tier 2, Tier 3 ó Tier 4), entre los que se incluyen los estudios de campo. El objetivo principal de estos estudios de campo ha sido verificar predicciones basadas en estudios de laboratorio y cuantificar el nivel de exposición y los efectos ecotoxicológicos de una sustancia química bajo condiciones ambientales reales. Sin embargo tras la revisión de los procedimientos que regulan la autorización de productos fitosanitarios en USA, los estudios de campo han pasado a desempeñar otras funciones adicionales dentro de un nuevo esquema de evaluación que integra la valoración del riesgo y la formulación de medidas mitigadoras para reducirlo. Los estudios de campo pueden permitir en este caso verificar el buen funcionamiento de las medidas mitigadoras aplicadas, las cuales normalmente afectan a las prácticas agrícolas utilizadas durante o después de la aplicación del producto fitosanitario (SETAC, 1994).

Debido a la gran variedad de compuestos químicos, las diferentes rutas de exposición y la variedad de efectos que pueden producir, la estandarización de los estudios de campo resulta compleja (OECD, Draft, 1996). En el caso de productos fitosanitarios los estudios de campo se han orientado mayoritariamente hacia la valoración de la exposición mediante ensayos de disipación en suelos (SETAC-Europe, 1995) con el fin de validar datos obtenidos en laboratorio mediante modelos matemáticos. Estos estudios suelen diseñarse sin considerar la posibilidad de realizar valoración de efectos simultáneamente. Por otro lado la utilización de estudios de campo para la valoración ecotoxicológica de un producto fitosanitario no está normalizada. Existen sin embargo documentos orientativos para el caso del medio acuático basados en el uso de microcosmos y mesocosmos, los cuales son sistemas de complejidad intermedia entre los ensayos de laboratorio y los estudios de campo (SETAC/RESOLVE, 1991a; SETAC-Europe, 1991b; OECD, Draft, 1996).

En esta primera parte se propone la incorporación de una herramienta para la valoración de efectos en los estudios de campo con productos fitosanitarios. Esta herramienta consiste en realizar una valoración ecotoxicológica ex situ con muestras de agua y/o suelo recogidas tras la aplicación de plaguicidas en campo bajo condiciones controladas. La propuesta supone un paso intermedio para la valoración de efectos entre los estudios de laboratorio y de campo, por este motivo nos referiremos a estudios de semi-campo. La validación de dicha propuesta se realizó con muestras de agua procedentes de arrozales.

Bibliografía

- OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. (1996). Draft Proposal for a Guidance Document for Freshwater Lentic Field Tests. Draft Document.
- SETAC/RESOLVE. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. (1991a). Workshop on aquatic microcosms for ecological assessment of pesticides. Report from a meeting held at Wintergreen Virginia, USA. October 11, 1991.
- SETAC-Europe. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. (1991b). Guidance document on Testing Procedures for pesticides in freshwater mesocosms. Edited by D Arnold, I Hill, P Matthiessen, R Stephenson.
- SETAC. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. (1994). Aquatic Dialogue Group: Pesticide Risk Assessment and Mitigation. Pensacola, Florida.
- SETAC-Europe. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Lynch M. (Ed.). Brussels, Belgium.
- UE. (1991). Directiva 91/414/CEE relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.
- UE. (1997). Directiva 97/57/CE por la que se establece el Anexo VI de la Directiva 91/414/CEE relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.

Capítulo I

Desarrollo de bioensayos mono-especie
con muestras de agua procedentes de arrozales

CAPÍTULO I:**DESARROLLO DE BIOENSAYOS MONO-ESPECIE CON MUESTRAS DE AGUA PROCEDENTES DE ARROZALES.****INTRODUCCIÓN**

La importancia de los bioensayos en el control de la contaminación se basa en la capacidad de éstos de valorar efectos sobre los organismos vivos, permitiendo establecer relaciones dosis-respuesta para un determinado compuesto químico. La posibilidad de estandarizar estos métodos hace que los resultados, obtenidos tras el cumplimiento de unos requerimientos específicos, sean comparables, repetibles y confiables. Los bioensayos permiten además medir directamente la biodisponibilidad y los efectos tóxicos aditivos, antagónicos y sinérgicos de los compuestos presentes en una mezcla compleja. Finalmente son métodos comparativamente más rápidos y de menor coste que otros métodos químicos y biológicos (de Vlaming *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2000).

La potencialidad de los bioensayos para evaluar la toxicidad de muestras complejas ha estado mayoritariamente orientada al medio acuático. El ejemplo más notorio es quizás el de la U.S. EPA que recomienda la utilización de datos de toxicidad para el control de vertidos, e incorpora los llamados métodos WETs (Whole Effluent Toxicity) en el programa NPDES (National Pollutant Discharge Elimination System) estableciendo de esta forma límites de toxicidad permitidos para efluentes (U.S. EPA, 1991). Otros países han seguido métodos similares al desarrollado por la U.S. EPA como es el caso de Canadá (Environment Canada, 1992), UK (Johnson *et al.*, 1993, Whitehouse *et al.*, 1996) o el de España que ha incorporado el uso de bioensayos para el control de la contaminación, en algún caso a la legislación autonómica (DOGC, 1992; BOCM, 1993).

Los bioensayos mono-especie estandarizados por la U.S. EPA no sólo se han aplicado al control de vertidos, sino que también han sido adaptados para valorar directamente la toxicidad de muestras ambientales de agua (U.S. EPA 1993 y 1994). Diferentes estudios muestran la aparición de efectos letales y/o subletales en especies de artrópodos (*Mysidopsis bahia*, *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna*) y peces (*Pimephales promelas*) tras su exposición a muestras de agua procedentes de cauces contaminados (Khan *et al.*, 1994; Robinson *et al.*, 1994; Bervoets *et al.*, 1996; Viganò *et al.*, 1996). Ello demuestra la posibilidad de utilizar esta nueva herramienta en el control y seguimiento de la contaminación de aguas superficiales, junto con los análisis químicos convencionales y los estudios ecológicos con comunidades residentes, tal y como recomienda la U.S. EPA (1991).

Existen, sin embargo, ciertas limitaciones de los bioensayos mono-especie en la valoración de la toxicidad de muestras ambientales de agua: a) no valoran la persistencia ni la frecuencia de exposición a un tóxico sin repetir muestreos y ensayos, ya que es difícil la reproducción de las condiciones reales en el laboratorio (esto es de especial importancia en el caso de sistemas lóticos ya que pueden existir grandes cambios de la composición en el tiempo); b) pueden no abarcar los rangos de sensibilidades de especies ya que no suelen realizarse con especies residentes y c) no pueden valorar efectos indirectos como la bioacumulación (de Vlaming *et al.*, 2000). La incertidumbre sobre la posibilidad de extrapolar los resultados obtenidos con esta herramienta a nivel ecosistema ha orientado algunos trabajos hacia la evaluación de su capacidad para ello (Waller *et al.*, 1996). La comparación de datos de toxicidad de muestras ambientales de agua, obtenidos mediante la utilización de bioensayos mono-especie, con estudios sobre comunidades residentes de peces y macroinvertebrados demuestran que existen buenas correlaciones entre ambos métodos (Eagleson *et al.*, 1990; Dickson *et al.*, 1992; Robinson *et al.*, 1994; Hartwell, 1999). Los bioensayos mono-especie con muestras ambientales de agua proporcionan, por tanto, un método rápido, preciso y de bajo coste para la predicción de efectos adversos sobre el ecosistema.

Estas herramientas (análisis químicos, bioensayos mono-especie con muestras ambientales y estudios a nivel ecosistema) constituyen piezas combinables (U.S. EPA 1991; Hall *et al.*, 1992; Karr, 1993; Kosmala *et al.*, 1999) aunque no sustituibles (Sarakinos y Rasmussen, 1998) en los programas de monitorización de calidad de ríos. Un buen ejemplo de ello lo proporcionan los estudios de Hunt *et al.* (1999) y Werner *et al.* (2000) en los que gracias a la combinación de análisis químicos y bioensayos mediante procedimientos VIT (Valoración por Identificación Toxicológica) (Vega *et al.*, 1996) se han podido relacionar fenómenos de mortandad o disminución en el censo de especies acuáticas con la aparición de contaminantes específicos en el agua, en particular plaguicidas procedentes de actividades agrícolas cercanas.

El objetivo de este capítulo fue establecer las condiciones para ensayar muestras de agua procedentes de arrozales, mediante la utilización del ensayo de reproducción de *Daphnia magna* (OECD, 1993a) y el ensayo de inhibición del crecimiento de *Chlorella vulgaris* (OECD, 1993b), para realizar una posterior valoración ecotoxicológica de plaguicidas utilizados en el cultivo de arroz (Capítulo II).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Recogida y conservación de muestras

Las muestras de agua procedían de un campo de arroz situado en la provincia de Sevilla. En Mayo de 1999, tras la inundación del campo, y sin haber recibido tratamiento alguno con productos fitosanitarios, se recogieron muestras de agua. Las muestras de agua del arrozal se almacenaron en botellas de 1L de cristal topacio y se mantuvieron a 4°C hasta su utilización (no más de 24 h. desde su recepción en el laboratorio).

2. Bioensayos con muestras de agua procedentes de arrozales

Para realizar los bioensayos con muestras ambientales procedentes de cultivos de arroz hubo que realizar ciertas modificaciones respecto de las condiciones estandarizadas por la OECD. En todos los casos se consideró la posibilidad de emplear la máxima cantidad de agua del arrozal como medio de ensayo.

2.1. Ensayo de Reproducción de *Daphnia magna*

Los parámetros físico-químicos generales de calidad (conductividad, dureza, pH) de las muestras se mantuvieron dentro de un rango aceptable para asegurar la supervivencia de *Daphnia magna*, sin embargo debido a la presencia de sólidos en suspensión así como de otros invertebrados, el filtrado de las mismas fue necesario. Las muestras se filtraron a través de una malla de 60 µm de luz. En controles de laboratorio se utilizaron 100 ml de agua reconstituida (UE, 1984). En el caso de las muestras de agua procedentes de arrozal los ensayos se llevaron a cabo con 100 ml de agua filtrada, lo que permitiría la valoración de la toxicidad de las muestras de agua del arrozal sin diluir.

A los 100 ml de cada muestra y control de laboratorio se les añadió un juvenil de *Daphnia magna* menor de 24h. Los bioensayos se llevaron a cabo en una cámara climatizada a una temperatura de 20 ±2 °C, la luz se ajustó a una intensidad de 1000 lux, con un ciclo de luz:oscuridad de 12h:12h. La duración del ensayo fue de 21 días (OECD, 1993a). Al principio de la primera semana las pérdidas por evaporación de muestra de agua de arrozal fueron compensadas rellenando con la correspondiente muestra filtrada, a los 15 días las muestras fueron renovadas completamente. Cada 48h los organismos se alimentaron con *Chlorella vulgaris* a una proporción de 0,25 mgC/daphnia adulta, reduciéndose a la mitad esta cantidad para organismos menores de 7 días. Todos los lunes, miércoles y viernes durante el período de bioensayo se contaron los juveniles por daphnia en muestras y controles de laboratorio.

2.2. Ensayo de Inhibición del Crecimiento de *Chlorella vulgaris*

Las muestras de arrozal, filtradas para realizar el ensayo con *Daphnia magna*, fueron filtradas a su vez por filtros estériles de 0,22 μm (Millipore) para realizar el ensayo con *Chlorella vulgaris*, ya que este bioensayo se realiza en condiciones de esterilidad. Con el fin de establecer la cantidad máxima de muestra a ensayar se utilizaron como controles de laboratorio varias diluciones de dos medios denominados BBMc y BBMe (Tabla 1), lo que supone un total de nueve combinaciones diferentes de sales y nutrientes. El cultivo del alga en suspensión acuosa se realiza en BBMc (Bold Basal Medium- Bischoff y Bold, 1963), mientras que en el caso del BBMe el contenido de nutrientes es el recomendado para ensayo por la OECD (1993b). El volumen total de ensayo fue de 30 ml. En el caso de las muestras del arrozal, y para mantener la cantidad de nutrientes recomendados por la OECD, a 27 ml de muestra filtrada se le añadieron 3 ml de BBMe 10X, pudiéndose de esta manera ensayar las muestras de agua de arrozal a un 90% (dilución 9:1).

A cada muestra y control se le añadió un inóculo de un cultivo en agar de *Chlorella vulgaris* tras activación por exposición a 8000 lux durante 24h. Cada inóculo contenía la concentración de 10^4 células/ml. Los bioensayos se llevaron a cabo en cámara climatizada a una temperatura de 20 ± 2 °C y la luz se ajustó a una intensidad de 8000 lux. La duración del período de bioensayo fue de 72h. Los recipientes que contenían las muestras y controles de laboratorio se agitaron dos veces al día con el fin de impedir que las células sedimentaran. Cada 24h se midió la absorbancia a 440nm mediante un espectrofotómetro Uvikon 940 (Kontron Instruments). Los datos de absorbancia obtenidos a los tiempos 0, 24, 48 y 72 h se representaron para obtener una curva de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en cada muestra y control.

Tabla 1: Contenido de nutrientes de cada una de las diluciones utilizadas como controles de laboratorio en el bioensayo con *Chlorella vulgaris*.

mg/l	BBMc					BBMe			
	1	2	3	4	5	10X	5X	2.5X	1X
BO₃H₃	11,4	5,7	2,85	1,425	0,7125	1,85	0,925	0,462	0,185
CaCl₂.2H₂O	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	180	90	45	18
Co(NO₃)2.6H₂O	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	—	—	—	—
CoCl₂.6H₂O	—	—	—	—	—	0,015	7,5 10 ⁻³	3,75 10 ⁻³	1,5 10 ⁻³
CuCl₂.2H₂O	—	—	—	—	—	10 ⁻⁴	5 10 ⁻⁵	1,66 10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
CuSO₄.5H₂O	3,16	1,58	0,79	0,395	0,1975	—	—	—	—
FeCl₃.6H₂O	—	—	—	—	—	0,8	0,4	0,2	0,08
FeSO₄.7H₂O	4,98	2,49	1,245	0,6225	0,31125	—	—	—	—
K₂HPO₄	74,8	37,4	18,7	9,35	4,675	—	—	—	—
KH₂PO₄	174,8	87,4	43,7	21,85	10,925	16	8	4	1.6
KOH	30,6	15,3	7,65	3,825	1,9125	—	—	—	—
MgCl₂.6H₂O	—	—	—	—	—	120	60	30	12
MgSO₄.7H₂O	74,8	37,4	18,7	9,35	4,675	150	75	37,5	15
MnCl₂.4H₂O	2,92	1,46	0,73	0,365	0,1825	4,15	2,075	1,037	0,415
Na₂EDTA.2H₂O	—	—	—	—	—	1	0,5	0,25	0,1
NaCl	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	—	—	—	—
Na₄EDTA/KOH	50	25	12,5	6,25	3,125	—	—	—	—
NaHCO₃	—	—	—	—	—	500	250	125	50
NaMoO₄.2H₂O	2,36	1,18	0,59	0,295	0,1475	0,07	0,035	0,0175	7 10 ⁻³
NaNO₃	250	125	62,5	31,25	15,625	—	—	—	—
NH₄Cl	—	—	—	—	—	150	75	37,5	15
ZnCl₂	—	—	—	—	—	0,03	0,015	7,5 10 ⁻³	3 10 ⁻³
ZnSO₄.7H₂O	1,764	0,882	0,441	0,2205	0,11025	—	—	—	—

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Efectos producidos por muestras de agua procedentes de arrozales en la reproducción de *Daphnia magna*

Los resultados del bioensayo con *Daphnia magna* confirmaron que no hubo efectos letales en ningún caso. A las 48h de ensayo se observó, por el contrario, que en las muestras del arrozal el crecimiento fue mayor que en los controles de laboratorio, lo que puede explicarse por la presencia de materia orgánica que sirve de alimento a los neonatos. Los resultados de reproducción en *Daphnia magna* para los controles y muestras de agua de arrozal se muestran en la Tabla 2. En todos los casos (controles y muestras) se superó la producción mínima de juveniles por daphnia que recomienda la OECD (1993a) para la aceptabilidad del ensayo (tras tres puestas el número de juveniles en los controles debe ser mayor o igual a 20). En las cuatro muestras del arrozal el número de juveniles producidos por daphnia fue siempre mayor que en los controles. Efectos similares han sido observados por diferentes autores. El mayor crecimiento y reproducción de *Ceriodaphnia dubia* en muestras de agua procedentes de ríos con respecto a controles de laboratorio, se asoció a el gran contenido de materia orgánica presente de manera natural en estas muestras (Stewart *et al.*, 1990; Robinson *et al.*, 1994; Stewart, 1996; Viganò *et al.*, 1996; Kosmala, 1999). El incremento en la tasa reproductiva se relacionaría, por tanto, con un aumento de sólidos en suspensión, de conductividad y de nutrientes (Na, K, SO₄), así como de algas y bacterias que constituyen fuentes de alimento adicionales a las proporcionadas durante el bioensayo. Stewart y Konetsky (1998) advierten de la importancia de la alimentación de *Ceriodaphnia dubia* durante el ensayo de reproducción, así como de las características del agua y del efecto tras filtración de las muestras, ya que la respuesta de *Ceriodaphnia* podría ser más sensible a estos factores que a los propios efectos tóxicos de una muestra. Los autores concluyen que el estudio básico de los efectos y respuestas de estos organismos utilizando muestras ambientales permitiría una mayor estandarización de los ensayos por lo que la extrapolación de los resultados a nivel ecosistema sería más segura y precisa. Esta misma explicación es perfectamente aplicable a los resultados obtenidos en nuestro experimento. La utilización de una malla relativamente intermedia para el filtrado de la muestra evita el paso de invertebrados que puedan confundirse/competir con los juveniles de *Daphnia magna*, pero permite el paso del material particulado.

Obviamente, este procedimiento aumenta la variabilidad en los resultados, ya que la tasa de reproducción está relacionada con la cantidad de alimento disponible y esta puede variar significativamente con cada muestra. No obstante, el procedimiento seleccionado, mantener un nivel básico de alimentación adicional al proporcionado por la muestra y comparar los resultados obtenidos de un control alimentado con esta tasa básica, permite una fácil interpretación de los resultados. El método cuantifica la inhibición de la reproducción que es el

parámetro considerado relevante en los procedimientos ERA. El sistema de filtrado permite valorar los efectos de la fracción del fitosanitario ligada a material particulado, incluyendo la desorción, mineralización y exposición a través del alimento, lo que se considera una ventaja evidente del método.

2. Efectos producidos por muestras de agua procedentes de arrozales en el crecimiento de *Chlorella vulgaris*

Los resultados obtenidos con *Chlorella vulgaris* se muestran en la Figura 1. Al igual que ocurre con *Daphnia magna*, el crecimiento del alga fue mayor en las muestras del arrozal que en cualquiera de los controles de laboratorio utilizados. Aunque no existe una relación concentración/efecto en los controles de laboratorio, se observó que en el BBMc más concentrado (BBMc1) y en el BBMe menos concentrado (BBMe 1X) se produjeron el mayor y menor crecimiento del alga respectivamente, lo que confirma la relación entre contenido en nutrientes y la tasa de reproducción. La utilización del bioensayo con el alga *Selenastrum capricornutum* aplicado a muestras ambientales de agua permitió relacionar la toxicidad con la presencia de metales procedentes de actividades mineras, así como de plaguicidas procedentes de actividades agrícolas (de Vlaming *et al.*, 2000). En estos ensayos se observó que el crecimiento de *S. capricornutum* fue mayor en las muestras ambientales de agua que en los controles de laboratorio y que una disminución en el crecimiento no necesariamente indicaba la presencia de sustancias tóxicas, por lo que el empleo de procedimientos VIT fue necesario para confirmar la presencia de compuestos tóxicos.

En nuestro caso, el crecimiento en las muestras de agua del arrozal fue mayor que en todas las concentraciones de nutrientes ensayadas. La presencia de elevadas concentraciones de nutrientes en estas muestras es explicable por sus características, incluyendo las necesidades del cultivo, lo que explica estos resultados.

La utilización de ensayos sobre muestras ambientales se ha considerado problemática por ciertos autores. Las características físico-químicas específicas de cada muestra ambiental de agua afectan a la biodisponibilidad y la toxicidad de los compuestos químicos presentes en ella (Bervoets *et al.*, 1996). Un buen ejemplo lo proporciona la presencia de sólidos en suspensión de estas muestras, ya que parte de estos (algas, bacterias, sedimentos) pueden ser utilizados como alimento, estos beneficios nutricionales pueden ser muy importantes en la respuesta de los organismos vivos, por lo que resulta poco aconsejable comparar los resultados obtenidos con muestras ambientales con los obtenidos en controles de laboratorio para determinar si una muestra produce efectos tóxicos o no.

Tabla 2: Reproducción en *Daphnia magna*. Número de juveniles en distintas puestas durante el bioensayo y total producido por daphnia en controles de laboratorio y muestras de arrozal.

	NUMERO DE JUVENILES				
	Día 10	Día 13	Día 15	Día 17	Total
Control 1	0	14	20	1	35
Control 2	0	10	30	0	40
Arrozal 1	21	23	0	38	82
Arrozal 2	16	2	29	1	48
Arrozal 3	12	29	0	20	61
Arrozal 4	18	30	5	38	91

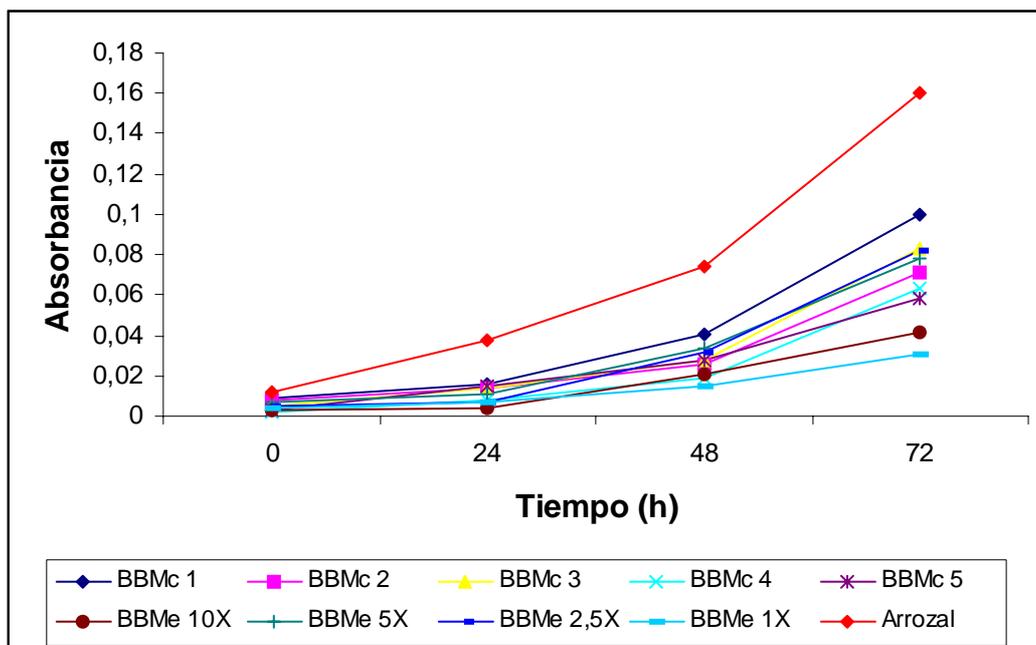


Figura 1: Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* para todos los controles de laboratorio (n=2) y para las muestras de arrozal (n=3).

Por otro lado, la principal diferencia entre los WETs y los bioensayos con muestras ambientales de agua es que mientras en los primeros el objetivo principal es determinar cuán tóxico es un efluente, para establecer ED50s (Effect Dilution) ó NOEDs (No Observed Effect Dilution), en el caso de las muestras ambientales de agua es establecer si esta produce efectos tóxicos o no. En el primer caso podemos establecer una relación dilución-respuesta, sin embargo, en el caso de las muestras ambientales la toxicidad, si existe, no va a ser tan evidente como en un efluente como para establecer una relación dilución-respuesta; a ello hay que sumar que en un sistema lótico (sistemas a los que normalmente han sido orientadas estas herramientas) las características físico-químicas del agua pueden cambiar en cuestión de minutos, por lo que tampoco tendría sentido establecer dicha relación (Stewart, 1996).

El objetivo general de esta Primera Parte no coincide con ninguno de los dos objetivos anteriormente indicados, sino que supone una nueva adaptación de los bioensayos con muestras ambientales, específicamente muestras de agua de arrozales, para hacer una valoración ecotoxicológica de plaguicidas empleados en el cultivo de arroz. La estrategia para su validación es, por tanto, muy diferente a las seguidas hasta ahora en los WETs y en los programas para el control de la calidad de agua mediante el uso de bioensayos. Aunque la riqueza en nutrientes de estas muestras es un factor importante a considerar en el diseño del estudio de validación (Capítulo II), los resultados preliminares han demostrado la capacidad de los bioensayos con *Daphnia magna* y *Chlorella vulgaris* para ser utilizados con muestras de agua de arrozales. Se propone además su incorporación como herramientas adicionales en estudios experimentales, en los cuales tanto el producto fitosanitario como las dosis empleadas están bien constatados, lo que facilita indudablemente sus posibilidades de utilización.

Bibliografía

- Bervoets L., Baillieul M., Blust R. y Verheyen R. (1996). Evaluation of effluent toxicity and ambient toxicity in a polluted lowland river. *Environ. Pollut.*, 60, 101-39.
- Bischoff y Bold. (1963). Phycological studies IV: University of Texas. Publication number 6318.
- BOCM, (1993). Ley 10/93, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento en la Comunidad de Madrid. Núm. 269 del 12 de noviembre.
- de Vlaming V., Connor V., DiGiorgio C, Bailey H.C., Deanovic L.A. y Hinton D.E. (2000). Application of whole effluent toxicity test procedures to ambient water quality assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 42-62.
- Dickson K.L., Waller W.T., Kennedy J.H y Ammann L.P. (1992). Assessing the relationship between ambient toxicity and instream biological response. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11, 1307-1322.
- DOGC, (1992). Decret 286/92, de 24 de novembre, de modificació del procediment de determinació de l'increment de tarifa de sanejament i cànon de sanejament per mesurament directe de la càrrega contaminant. Núm. 1683 16.12.92.
- Eagleson K.W., Lenat D.L., Ausley L.W. y Winborne F.B. (1990). Comparison of measured instream biological responses with responses predicted using the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9, 1019-1028.
- Environment Canada. (1992). Pulp and paper effluent regulations. *Canada Gazette, Part II*, 126, 1967-1997.
- Hall W.H., Ziegenfuss M.C. y Fisher S.A. (1992). Ambient toxicity testing in the Chesapeake bay watershed using freshwater and estuarine water column tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1409-1425.
- Hartwell S.I. (1999). Empirical assessment of an ambient toxicity risk ranking model's ability to differentiate clean and contaminated sites. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1298-1303.
- Hunt J.W., Anerson B.S., Phillips B.M., Tjeerdema R.S., Puckett H. M. y de Vlaming V. (1999) Patterns of aquatic toxicity in an agriculturally dominated coastal watershed in California. *Agric. Ecosyst. Environ.* 75, 75-91.
- Johnson I., Butler R y Adams N. (1993). Draft protocol for the derivation of Toxicity-Based Consents. Final Report to the National Rivers Authority. Project R&D/049/11/W.
- Karr J.R. (1993). Defining and assessing ecological integrity: Beyond water quality. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1521-1531.
- Khan A.A., Barbieri J., Sweeney F. y Khan S.A. (1994). Estimation of ambient chronic toxicity in a polluted creek system. *Environ. Pollut.*, 83, 379-382.
- Kosmala A., Charvet S., Roger M.C. y Faessel B. (1999) Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using instream invertebrates and the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Wat. Res.* 33, 266-278.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. (1993a). *Daphnia sp.* acute immobilisation test and reproduction test. Guideline for testing of chemicals, N° 202. Volume 1. Paris France.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. (1993b). Alga growth inhibition test. Guideline for testing of chemicals, N° 201. Volume 1. Paris France.

- Robinson R., Carey J.H., Solomon K.R., Smith I.R., Servos M.R. y Munkittrick K.R. (1994) Survey of receiving-water environmental impacts associated with discharges from pulp mills. 1. Mill characteristics, receiving-water profiles and laboratory toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1075-1088.
- Sánchez P., Pablos M.V., Valdovinos C.E., Bay-Schmith E., Tarazona J.V. y Larrain A. (2000). Los bioensayos como instrumentos legales en la gestión medioambiental. En: Globalización medioambiental. Perspectivas agrosanitarias y urbanas. Secretaría General Técnica, MAPA. Madrid. Pp. 455-463.
- Sarakinos H.C. y Rasmussen J.B. (1998). Use of bioassay-based whole effluent toxicity (WET) test to predict benthic community response to a complex industrial effluent. *J. Aquat. Ecosyst. Stress recovery.* 6, 141-157.
- Stewart A.J., Kszos L.A., Harvey B.C.; Wicker L.F.; Haynes G.J. y Bailey R.D. (1990). Ambient toxicity dynamics: assessments using *Ceriodaphnia dubia* and fathead minnow (*Pimephales promelas*) larvae in short-term tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 367-379.
- Stewart A.J. (1996). Ambient bioassays for assessing water-quality conditions in receiving streams. *Ecotoxicology* 5, 377-393.
- Stewart A.J. y Konetsky B.K. (1998). Longevity and reproduction of *Ceriodaphnia dubia* in receiving waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1165-1171.
- UE. (1984). Directive 84/449/EEC of 25 April 1984 adapting to technical progress for the sixth time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances.
- U.S. Environmental Protection Agency. USEPA. (1991). Technical support document for water quality-based toxic control. EPA/505/2-90-001. Technical Report. Washington, DC.
- U.S. Environmental Protection Agency. USEPA. (1993). Methods for measuring acute toxicity of effluents and receiving water to freshwater and marine organisms, 4th ed. EPA/600/4-90/027. Technical Report, Washington DC.
- U.S. Environmental Protection Agency. USEPA. (1994). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms, 3rd ed. EPA/600/4-91/002. Technical Report. Washington DC.
- Vega M.M., Blazquez, T., Castaño, A. y Tarazona, J.V. (1996). Biological and chemical tools for toxicological risk assessment of Jarama River. *Environ. Pollut.* 93, 135-139.
- Viganò L., Bassi A. y Garino A. (1996). Toxicity evaluation of waters from tributary of the river Po using the 7-day *Ceriodaphnia dubia* test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 199-208.
- Waller WT. *et al.* (1996). Predicting instream effects from WET tests. En: Grothe DR. Dickison KL. Reed-Judkins DK. Eds. Whole Effluent Toxicity Testing: An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, FL. USA. 271-286.
- Werner I., Deanovic L.A., Connor V., de Vlaming V., Bailey H.C. y Hinton D. E. (2000). Insecticide-caused toxicity to *Ceriodaphnia dubia* (cladocera) in the Sacramento-San Joaqui river delta, California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 215-227.
- Whitehouse P, Crane M, Redshaw CJ y Turner C. (1996). Aquatic toxicity tests for the control of effluent discharges in the UK- the influence of test precision. *Ecotoxicology.* 5, 155-168.

Capítulo II

Valoración ecotoxicológica de productos fitosanitarios aplicados en cultivos de arroz: Estudio de semi-campo¹

¹ Los resultados de este capítulo están en preparación para su envío a la revista Environmental Toxicology and Chemistry.

CAPÍTULO II:

VALORACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS APLICADOS EN CULTIVOS DE ARROZ: ESTUDIO DE SEMI-CAMPO.

INTRODUCCIÓN

Durante las dos últimas décadas los esfuerzos para prevenir el deterioro de la calidad de aguas superficiales y profundas se han centrado mayoritariamente en el seguimiento y control de las fuentes puntuales de contaminación (ej: vertidos industriales, urbanos), prestándose una menor atención a las de origen difuso, ya que estas últimas son difíciles de identificar y cuantificar. Las principales fuentes de contaminación difusa se han relacionado con actividades agrarias, entre las que destaca la aplicación de productos fitosanitarios para el control de plagas, enfermedades y malas hierbas en cultivos (Pereira y Hostettler, 1993), ya que supone la emisión de grandes cantidades de agentes contaminantes.

Las prácticas agrícolas condicionan en parte las rutas por las que herbicidas, insecticidas y funguicidas pueden alcanzar aguas superficiales. El caso del cultivo de arroz es excepcional por ser el único que se realiza en condiciones de inundación del terreno, de tal manera que el cultivo se mantiene parcialmente sumergido mediante irrigación. Los campos de arroz se comunican a través de canales de riego y de drenaje conectándose estos últimos con cauces, lagos u otras masas de aguas superficiales cercanas. Programas de monitorización sobre calidad de aguas llevados a cabo en terrenos destinados al cultivo de arroz, han demostrado que la presencia de plaguicidas es comparativamente superior en aguas de drenaje que en las utilizadas para riego, coincidiendo los incrementos con el calendario de aplicaciones (Iwakuma *et al.*, 1993; Bhuiyan y Castañeda, 1995; Abdullah *et al.*, 1997; Coupe *et al.*, 1998). Ello indica que el agua de drenaje es un vehículo de transporte de plaguicidas hacia aguas conectadas con arrozales y que esta práctica constituye una fuente directa de contaminación acuática.

La combinación de metodologías químicas y biológicas, entre estas últimas el empleo de bioensayos con muestras de agua procedentes de canales de drenaje, permitieron a Bailey *et al.* (1994) relacionar episodios de mortandades y sucesivo descenso de poblaciones de peces con la aplicación de plaguicidas en arrozales próximos al delta de los ríos Sacramento y San Joaquín (USA). El uso de bioensayos con muestras de agua procedentes de arrozales y de cauces receptores ha sido empleado por otros autores (Takamura *et al.*, 1991; Korth *et al.*, 1995; Shigehisa y Shiraishi, 1998) demostrando la capacidad de estos métodos para predecir efectos ecotoxicológicos asociados a las descargas de plaguicidas desde los canales de drenaje.

Prácticamente toda la superficie dedicada al cultivo de arroz en Europa, alrededor de 412.000 Ha (Ferrero, 1999), se encuentra situada en países mediterráneos. España es el segundo país productor de arroz en Europa con aproximadamente 100.000 Ha de arrozales (Cano *et al.*, 1999; Gómez de Barreda, 1999; Ramos *et al.*, 2000). La mayoría de estos arrozales forman parte del entorno de áreas de interés turístico, económico y ecológico como son La Albufera, El Delta del Ebro y El Parque Nacional de Doñana. La aplicación de plaguicidas en el cultivo de arroz ha contribuido a la contaminación de los canales que drenan hacia La Albufera (Carrasco *et al.*, 1987) y hacia el Ebro (Santos *et al.*, 1998). Por otro lado, Cano *et al.* (1999) han estudiado los efectos del Malathion sobre *Procambarus clarkii*, una especie de cangrejo de importancia económica destinada al consumo humano, cuya producción ha disminuido en los últimos años en las marismas del Guadalquivir. Los bajos valores de CE50 obtenidos por Cano *et al.* indican que el descenso de la producción de *Procambarus clarkii* puede estar relacionado con el empleo de Malathion en los arrozales. Todo ello explica la necesidad de evaluar el riesgo ecológico asociado al empleo de productos fitosanitarios que en el caso del arroz es de particular importancia por desarrollarse en zonas húmedas, zonas más vulnerables a la contaminación acuática.

En este capítulo se desarrolla y valida una propuesta para la valoración de efectos producidos tras la aplicación de productos fitosanitarios: el empleo de bioensayos con muestras obtenidas durante un estudio de campo. La validación se realizó con un nuevo herbicida utilizado en el cultivo de arroz. Para ello se diseñó un calendario de aplicaciones en campo y de recogida de muestras de agua cuya toxicidad se valoró en el laboratorio mediante el uso de bioensayos con *Daphnia magna* y *Chlorella vulgaris*. Estos bioensayos fueron previamente adaptados para la valoración de muestras de agua procedentes de arrozales (Capítulo I).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño experimental

El estudio de campo se realizó en 15 parcelas de 6 m² situadas en el margen de una plantación de arroz en Sevilla (Figura 1) durante el mes de Junio de 1999. Las parcelas se separaron mediante surcos de tierra y pantallas de plástico, estas últimas se colocaron con el fin de prevenir contaminación por deriva durante la aplicación entre los distintos tratamientos. Las aplicaciones se llevaron a cabo a los 30 días de la siembra momento en que la plántula comienza la diferenciación de tallos secundarios o ahijamiento (Tinarelli, 1989) que corresponde a un estado de crecimiento GS 21-25 (BBCH). Las parcelas recibieron los siguientes tratamientos: 1) sin tratamiento (controles negativos), 2) tres plaguicidas (dos herbicidas y un insecticida) de referencia (controles positivos) aplicados sobre la misma parcela a diferentes tiempos, y 3) el nuevo herbicida bajo estudio aplicado sobre las parcelas drenadas junto con el coadyuvante recomendado (DASH HC) a tres dosis (1x, 3x, 9x) por encima de la recomendada (1 l/ha). Cada tratamiento se realizó por triplicado. Las aplicaciones se llevaron a cabo con un pulverizador de espalda (Figura 2) simulando prácticas agrícolas estándar. El estudio tuvo una duración total de 10 días.

2. Selección de sustancias de referencia y tiempo de aplicación

El diseño de controles positivos constituye una parte fundamental del estudio puesto que es necesario obtener una respuesta ecotoxicológica clara a fin de establecer comparación de efectos directos e indirectos debidos a la aplicación de un herbicida, efectos que como vimos en el Capítulo I pueden verse alterados por las características intrínsecas de las muestras procedentes de arrozales. Por otro lado la utilización de productos fitosanitarios de referencia aplicados únicamente sobre suelos, como en el caso del herbicida bajo estudio, no permitiría observar efectos potenciales sobre las comunidades propias de un arrozal ya que estas no están presentes en el momento de la aplicación. Las comunidades propias del arrozal aparecen tras la inundación, por tanto si la aplicación del plaguicida se realiza sobre el cultivo drenado la exposición de estas comunidades ocurrirá después de la aplicación como consecuencia de fenómenos de desorción del plaguicida y/o sus metabolitos desde el suelo. Teniendo en cuenta estos factores se consideraron tres tipos relevantes de efectos: a) efectos sobre la capacidad de recuperación de las poblaciones de algas; b) efectos sobre las poblaciones de algas una vez establecidas; y c) efectos en otras especies, particularmente especies de invertebrados. Para simular estos efectos se decidió utilizar una combinación de tres plaguicidas aplicados a diferentes tiempos sobre la misma parcela: en primer lugar un herbicida sobre suelos para inducir efectos de tipo a), en segundo lugar un herbicida aplicado tras inundación para inducir efectos de tipo b) y finalmente una tercera aplicación en agua de un insecticida para inducir efectos de tipo c).



Figura 1: Parcelas experimentales de arrozales



Figura 2: Pulverización con productos fitosanitarios en arrozales

Las parcelas utilizadas como controles positivos fueron tratadas con Gulliver® (Dupont), un formulado disuelto en el adyuvante recomendado (DP) con un contenido del 50% de Azimsulfuron, a una dosis de 55 gr/Ha. Esta aplicación se realizó sobre las parcelas drenadas el mismo día en que se realizó la aplicación del nuevo herbicida. Dos días después (Día 2) las parcelas se inundaron hasta alcanzar una columna de agua de entre 10 y 20 cm. Al tercer día de la inundación (Día 5) se aplicó sobre las mismas parcelas utilizadas como controles positivos Surcopur® (Bayer), formulado con un contenido del 35% de Propanil, a una dosis de 13 l/Ha. La última aplicación sobre estas parcelas se realizó al quinto día de inundación (Día 7) con Tramal® (50% de Malathion), a una dosis de 3 l/Ha.

3. Estrategia de muestreo

Se recogieron muestras de agua de cada una de las parcelas después de la inundación (Día 2) y en siete ocasiones más: Días 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10. En el caso de las parcelas tratadas con los plaguicidas de referencia se realizaron dos recogidas adicionales en los Días 5 y 7 antes y después de la aplicación.

El volumen de cada muestra fue de 1 L obtenido por la combinación de pequeñas muestras recogidas en al menos tres puntos diferentes de la parcela. Las muestras se conservaron en botellas de cristal topacio refrigeradas (4 °C) hasta su utilización.

4. Valoración ecotoxicológica *ex situ*

La toxicidad de las muestras se valoró en el laboratorio mediante la utilización del ensayo de reproducción de *Daphnia magna* y el ensayo de inhibición del crecimiento de *Chlorella vulgaris* de acuerdo a las modificaciones descritas en el apartado de material y métodos del Capítulo I. En el ensayo de *Daphnia magna* se utilizaron 100 ml de agua reconstituida como controles de laboratorio. Los controles de laboratorio en el ensayo con *Chlorella vulgaris* se prepararon con 27 ml de agua miliQ y 3ml de BBMe 10X. Muestras y controles de laboratorio se ensayaron por cuadruplicado en el caso de *Daphnia magna*, mientras que en el caso de *Chlorella vulgaris* se ensayaron por duplicado.

5. Tratamiento de datos y análisis estadístico

El área bajo la curva de crecimiento de *Chlorella vulgaris* y el porcentaje de inhibición con respecto a la media de los controles negativos correspondientes al mismo día de recogida, se calcularon según lo establecido por la OECD (1993). En ciertas muestras el crecimiento de *Chlorella vulgaris* a las 72h no se ajustó a un crecimiento exponencial, cuando se observó este efecto el área bajo la curva se calculó considerando las medidas de absorbancia hasta las 48h.

Los análisis estadísticos se realizaron con los datos de porcentajes de inhibición del crecimiento de *Chlorella vulgaris* y el número total de juveniles producidos por daphnia. Con el fin de diferenciar efectos debidos al tratamiento y/o al tiempo transcurrido después de la aplicación se realizaron ANOVAs multifactorial (tratamiento y tiempo como variables independientes) y ANOVAs de una vía (tratamiento o tiempo como variable independiente) con todos los datos. En el caso de observarse diferencias significativas ($p < 0,05$) un segundo análisis se llevó a cabo día por día para comparar tratamientos con sus correspondientes controles negativos mediante una *t* de Student. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATGRAPHICS Plus versión 4.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Efectos producidos por muestras de agua procedentes de parcelas controles negativos

Como se observó en el Capítulo I el crecimiento de *Chlorella vulgaris* y la reproducción de *Daphnia magna* fue superior en los controles negativos que en los controles de laboratorio, debido al mayor contenido en nutrientes de las muestras procedentes de arrozales.

El porcentaje de inhibición del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en controles negativos varió entre un -21,09% y un 18,25%. No se observaron diferencias significativas entre los controles negativos ni debidas a la parcela de la cual procedían ($n=24$; $F = 2,37$ para 2 y 21 grados de libertad; $p=0,1184$) ni debidas al día de recogida ($n= 24$; $F = 0,00$ para 7 y 16 grados de libertad; $p = 1$).

Ciertas muestras (controles negativos y tratamientos) produjeron efectos letales en *Daphnia magna* como consecuencia de otros factores no asociados a los tratamientos ya que las diferencias significativas debidas al tratamiento se mantuvieron considerando o no los datos de mortalidad. Puesto que el ensayo de reproducción esta orientado a la determinación de efectos crónicos y no agudos se decidió excluir de los análisis las muestras donde se observó mortalidad. La media de juveniles producidos por daphnia en los controles negativos (121 ± 40 ; $n=66$) fue muy superior a la requerida para la validez del ensayo por la OECD. El análisis de varianza demostró que no hubo diferencias significativas en los controles negativos debidas a la parcela de la que procedían ($n= 66$; $F = 0,05$ para 2 y 63 grados de libertad; $p = 0,9478$). La media de juveniles producidos por daphnia en cada parcela control negativo fue: 123 ± 47 $n=21$; 119 ± 37 $n=18$; 121 ± 37 $n=27$. Sin embargo sí existieron diferencias entre los controles negativos debidas al día de recogida de la muestra ($n= 66$; $F = 12,02$ para 7 y 58 grados de libertad; $p = 0,0000$). El número de juveniles producido por daphnia fue superior en los últimos días de muestreo (Días 7, 8 y 10) (Tabla 1), lo que puede relacionarse con un aumento de la biomasa disponible en las muestras, ya que las poblaciones de algas y otros organismos se recuperan después de inundar las parcelas y es de esperar que continúen creciendo con el tiempo. Puesto que en el caso de *D. magna* las muestras de los arrozales no se filtran para eliminar algas y otras partículas, el diseño de este ensayo permite observar efectos indirectos por exposición a través del alimento, lo que resulta indispensable para que ciertos contaminantes ejerzan su efecto (Muñoz *et al.*, 1996).

Tabla 1: Media de juveniles producidos por individuo de *Daphnia magna* en los controles negativos según el día de muestreo

Día muestreo	Número de juveniles/daphnia
2	117 ±30 n=6
3	96 ±17 n=7
4	97 ±14 n=3
5	90 ±16 n=8
6	88 ±27 n=8
7	145 ±37 n=11
8	175 ±20 n=11
10	116 ±32 n=12

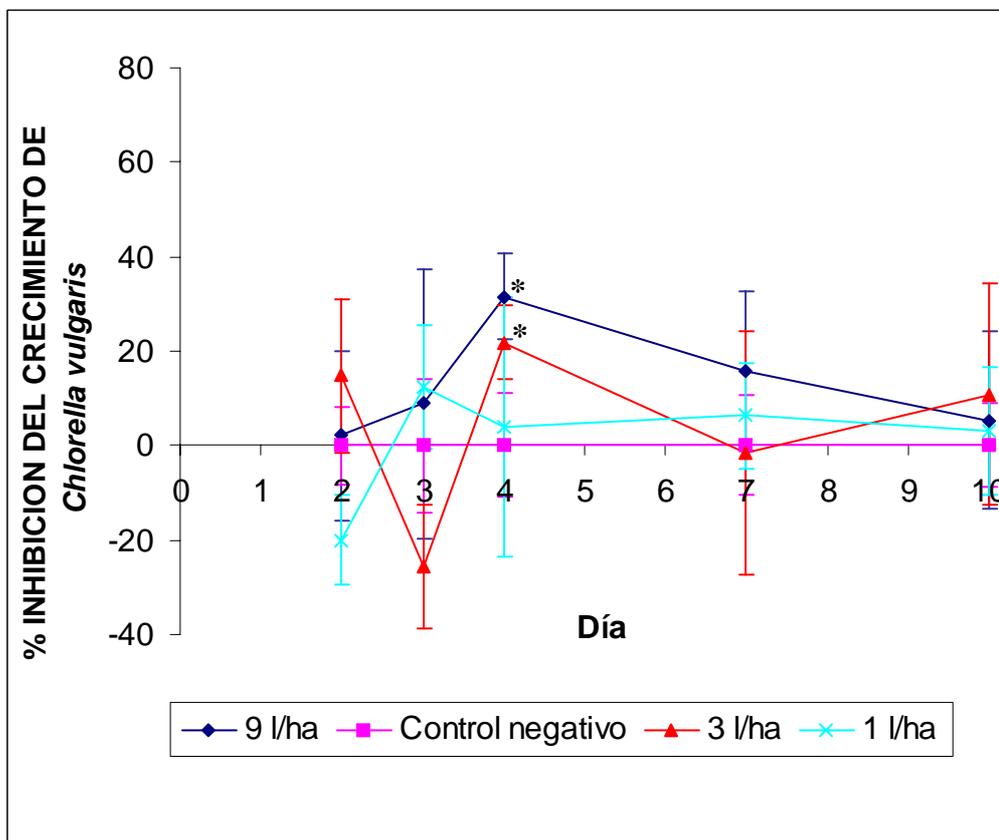


Figura 3: Efectos de las distintas dosis utilizadas del nuevo herbicida en cada día de muestreo. El análisis t-Student se realizó con respecto a los controles negativos de cada día de recogida de muestras (*p<0,05).

2. Efectos producidos por muestras de agua procedentes de parcelas tratadas con el nuevo herbicida

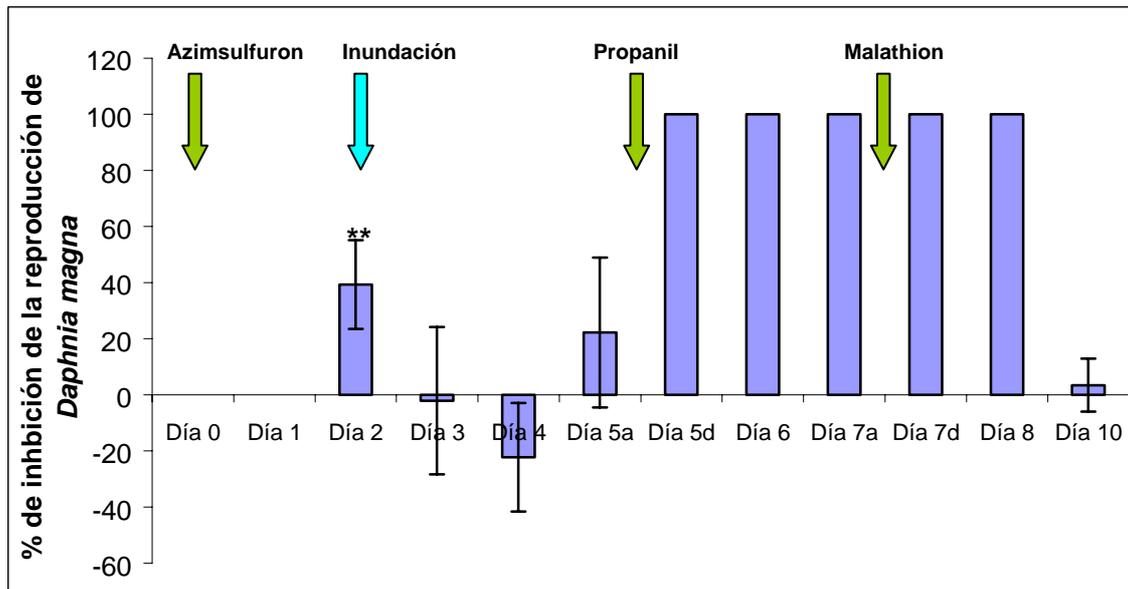
El nuevo herbicida bajo estudio no produjo efectos significativos sobre la reproducción de *Daphnia magna* a ninguna de las dosis ensayadas ($n=211$; $F = 0,40$ para 11 y 199 grados de libertad; $p = 0,9538$). La media de juveniles por daphnia expuestas a 1, 3 y 9 l/ha del nuevo herbicida fue 119 ± 37 ($n=43$), 120 ± 29 ($n=53$) y 120 ± 30 ($n=49$) respectivamente. En el caso de *Chlorella vulgaris* aunque no se observaron diferencias significativas entre controles negativos y tratados ($n=69$; $F=1,81$ para 3 y 65 grados de libertad; $p = 0,1537$) el análisis de comparación múltiple de medias mostró diferencias significativas entre los grupos pertenecientes al tratamiento de 9 l/ha y los controles negativos, existiendo un aumento de inhibición del crecimiento directamente proporcional a la dosis utilizada de nuevo herbicida. Por este motivo cada dosis se analizó día por día mediante una t de Student respecto a los controles negativos. El crecimiento de *Chlorella vulgaris* disminuyó significativamente en el Día 4 a las dosis de 3 y 9 l/ha, estos efectos desaparecen después de 3 y 6 días respectivamente (Figura 3). La dosis de aplicación recomendada (1 l/ha) no produjo efectos significativos en el alga ninguno de los días de muestreo.

3. Efectos producidos por muestras de agua procedentes de parcelas controles positivos

Exceptuando las diferencias observadas en la reproducción de *Daphnia magna* debidas al día de muestreo tanto en controles como en tratamientos, el resto de diferencias significativas obtenidas en los ANOVAs debidas a los tratamientos y/o al día de muestreo desaparecieron cuando se excluyeron los datos correspondientes a los controles positivos. Las dosis empleadas de cada herbicida e insecticida en los controles positivos produjeron por tanto claros efectos en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* y la reproducción de *Daphnia magna*. Para un análisis pormenorizado de los efectos producidos por los controles positivos se consideraron los resultados respecto de los controles negativos día por día. La Figura 4 resume los efectos observados en *Chlorella vulgaris* y *Daphnia magna* tras cada aplicación. Con el fin de unificar criterios los datos de reproducción de *Daphnia magna* se transformaron en porcentajes de inhibición ($100 - \text{Porcentaje de Juveniles}$; este último se calcula respecto a la media de los controles negativos correspondientes al mismo día de muestreo).

Considerando la superficie total de la parcela y la altura mínima de la columna de agua (10 cm) se estimó la concentración en agua de cada uno de los productos fitosanitarios utilizados como controles positivos. Las concentraciones estimadas tras cada aplicación asumiendo que no hubo pérdidas del producto fueron: 27,50 $\mu\text{g/l}$ de Azimsulfuron; 6,41 mg/l de Propanil y 1,84 mg/l de Malathion.

a)



b)

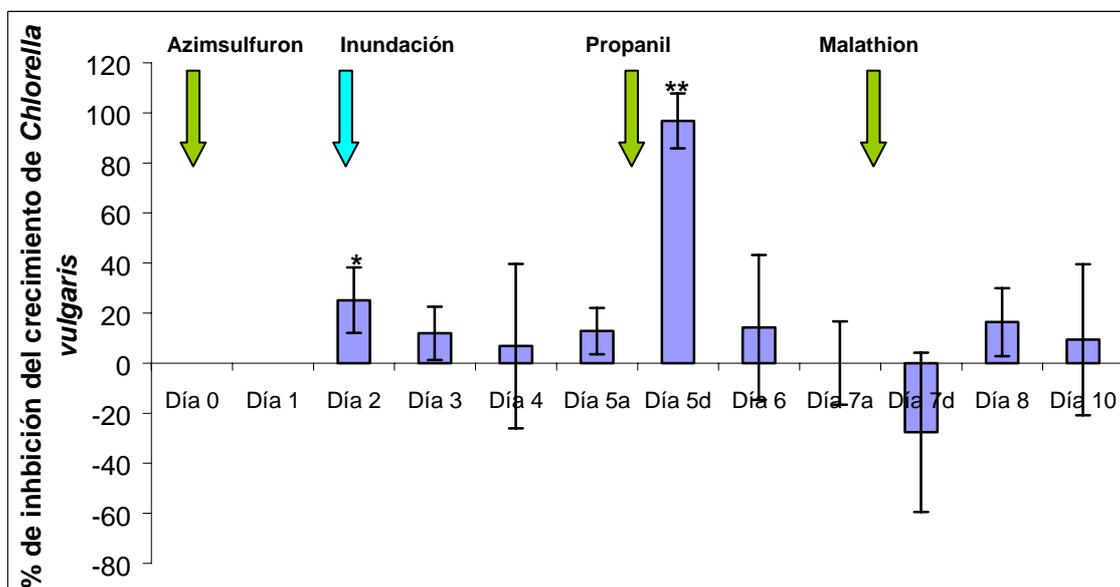


Figura 4: Efectos de los controles positivos cada día de muestreo sobre a) la reproducción de *Daphnia magna* y b) el crecimiento de *Chlorella vulgaris*. Las flechas indican los días de aplicación de los productos fitosanitarios y de inundación de las parcelas. Se representan los porcentajes de inhibición y los resultados de la t-Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. "a" y "d" significan antes y después de las aplicaciones de los Días 5 y 7.

Asimismo se estimó la degradación de cada uno de los plaguicidas en el agua en los días sucesivos a su aplicación y hasta la siguiente aplicación (Tabla 2).

Los efectos producidos por Gulliver® (Azimsulfuron) sobre la reproducción de *Daphnia magna* sólo se observaron el día de la inundación de las parcelas, cuando el número de juveniles por daphnia disminuyó significativamente respecto de los controles negativos del mismo día (Figura 4a). Los valores obtenidos en ensayos de laboratorio con *Daphnia magna* corresponden, en el caso del producto formulado, a 941 mg/l como CL50, y en el caso de la sustancia activa a 5,4 mg/l como NOEC (Tabla 2). Estos valores son muy superiores a las concentraciones de Azimsulfuron estimadas en agua (Tabla 2), por lo que los efectos observados en este estudio no confirman los valores obtenidos en laboratorio. Los efectos producidos por el herbicida Azimsulfuron sobre la reproducción de *Daphnia magna* en este estudio de campo pueden haber sido causados por productos de degradación del herbicida o por otros ingredientes del producto formulado.

El efecto del segundo herbicida utilizado, Surcopur® (Propanil), produjo efectos más drásticos y persistentes que el Azimsulfuron en *Daphnia magna*. Tras la aplicación de Propanil el porcentaje de inhibición de la reproducción fue de un 100% (Figura 4a), debido a efectos letales. Estos efectos fueron relativamente persistentes, pues la reproducción fue suprimida en las muestras obtenidas durante los dos días siguientes. Los valores obtenidos de CL50 para 48h y de NOEC para 21 días en ensayos de laboratorio estandarizados con *Daphnia magna* fueron de 6,7 mg/l y 86 µg/l respectivamente (Tabla 2). Los efectos letales observados en el estudio de semi-campo pueden explicarse al comparar estos valores con las concentraciones estimadas en las parcelas (Tabla 2). En el Día 5 después de la aplicación (Día 5d) la concentración estimada de Propanil (6,41 mg/l) fue similar a la CL50, por lo que es esperable observar efectos letales en este día. Estos efectos letales continúan el resto de días previos a la siguiente aplicación, en los que las concentraciones estimadas de Propanil siempre fueron superiores a la NOEC (Tabla 2) por lo que es difícil observar efectos crónicos, existiendo por tanto una buena correlación entre los datos de laboratorio y los resultados del estudio de semi-campo.

Como en el caso del Propanil, tras la aplicación de Tramal® (Malathion) se observó una inhibición del 100% de la reproducción de *Daphnia magna* debido a efectos letales. Las concentraciones estimadas de Malathion inmediatamente después de la aplicación (Día 7d) y en el Día 8 (Tabla 2) fueron muy superiores a los valores de CL50 en *Daphnia magna* obtenidos en la bibliografía, los cuales variaron entre 0,34 y 2,35 µg/l, siendo la media de 1,45 µg/l (Tabla 2), así como para otros invertebrados acuáticos como la CL50 (96h) para *Gammarus fasciatus* (0,75 µg/l), CL50 (48h) para *Ceriodaphnia dubia* (2,12 µg/l) y la inhibición de la movilidad a las 24h para *Chironomus tentans* (2 µg/l) (Werner *et al.*, 2000).

Tabla 2: Toxicidad obtenida en laboratorio para cada uno de los plaguicidas aplicados sobre las parcelas utilizadas como controles positivos, y valores estimados de las concentraciones en agua (PEC, Predicted Effect Concentration), considerando una altura de la columna de 10 cm.

		PEC (µg/l)	Algas	<i>Daphnia magna</i>	
			CL50 (120 h) µg/l	CL50 (48 h) µg/l	NOEC (21 d) µg/l
AZIMSULFURON	Día 2	27,50 ^a	12 ^c	941000 ^d	5400 ^e
	Día 3	21,82 ^b			
	Día 4	17,32 ^b			
	Día 5a	13,75 ^b			
PROPANIL	Día 5d	6.410	41 ^g	6700 ^g	86 ^g
	Día 6	3.660 ^f			
	Día 7a	2.090 ^f			
MALATHION	Día 7d	1.845		1,45 ⁱ	0,3 ^j
	Día 8	131 ^h			
	Día 10	0,67 ^h			

^a asumiendo que no hubo degradación en suelo; ^b $C=C_0 e^{-t \ln 2 / DT50}$; DT50= 3 días (CE, 1999); ^{c, e} (CE, 1999); ^d (Marquez, 1998); ^f $C=C_0 e^{-\alpha t}$; $\alpha=\sqrt{2}/DT50$; DT50=2,53 días (Santos *et al.*, 1998); ^g IUCLID, 1996; ^h $C=C_0 e^{-\alpha t}$; $\alpha=K_H$ (Constante de hidrólisis)= 0,11 a pH= 7 (ARS PPD, 1995); ⁱ media, n=8, (Dortland, 1980; Jonson y Finley, 1980; Cano *et al.*, 1999); ^j Dortland, 1980.

Los efectos letales y de inhibición de la reproducción de *Daphnia magna* producidos por el Malathion desaparecieron el último día de muestreo, tres días después de la aplicación (Día 10), debido a la degradación del insecticida cuya concentración estimada fue ligeramente superior a la NOEC de 21 días (Tabla 2). Si bien es de esperar un efecto mayor en el Día 10, en general existe de nuevo una buena correlación entre los resultados obtenidos en este estudio de semi-campo y los datos publicados y obtenidos a partir de ensayos de laboratorio estandarizados.

La concentración estimada de Azimsulfuron en las parcelas (6,41 mg/l), asumiendo que no hubo degradación en suelo y una desorción en agua del 100%, fue superior a la CL50 obtenida para algas tras 120 h de exposición (Tabla 2), lo que puede explicar que el crecimiento de *Chlorella vulgaris* disminuyera significativamente el primer día de muestreo tras la aplicación de Azimsulfuron (Figura 4b), al igual que en el caso de *Daphnia magna*. Este efecto desaparece y no vuelve a observarse inhibición del crecimiento en el alga hasta después de la aplicación de Surcopur® (Propanil), a pesar de que las concentraciones estimadas fueron superiores a la CL50 el resto de días previos a la aplicación de Surcopur® (Tabla 2). El Propanil produjo un efecto del 96,8% de inhibición del crecimiento en *Chlorella vulgaris*. La CL50 del Propanil en *Selenastrum capricornutum* tras 120h de exposición fue de 41 µg/l (Tabla 2), este valor está muy por debajo de la concentración teórica calculada en nuestro estudio tras la aplicación del herbicida, lo que puede explicar el marcado efecto de inhibición producido por el Propanil inmediatamente después de la aplicación. No se observaron efectos en las muestras obtenidas al día siguiente de la aplicación del herbicida. El Propanil posee una vida media corta en agua superficial (Trevisan *et al.*, 1991). Los estudios de Santos *et al.* (1998) en el delta del Ebro con Propanil aplicado sobre arrozales a una dosis de 18 l/Ha, similar a la empleada en este estudio de semi-campo (12 l/Ha) mostraron una vida media que varió entre 1,24 y 3,83 días. La media de estos valores se utilizó para calcular las concentraciones de Propanil en agua durante los días sucesivos a su aplicación, resultando en todos los casos superiores a la CL50 en *Selenastrum capricornutum* (Tabla 2). Por lo que los datos de laboratorio predicen un mayor efecto que los observados en el estudio de semi-campo. El insecticida Malathion no produjo ningún efecto de inhibición del crecimiento en *Chlorella vulgaris* desapareciendo los efectos adversos sobre la población de algas el resto de días de duración del estudio de semi-campo.

Los resultados obtenidos en este estudio de semi-campo con los controles positivos son en general comparables a los efectos que cabría esperar teniendo en cuenta los datos publicados procedentes de ensayos de laboratorio, si bien la recuperación o pérdida de toxicidad fue más rápida en el estudio de semi-campo. Las diferencias entre ambos métodos pueden deberse a las asunciones consideradas en la estimación de las concentraciones de los plaguicidas ó PECs (ej. DT50, Degradation Time). La degradación de los plaguicidas en el estudio de semi-campo no sólo depende de su solubilidad, como es el caso de los ensayos de laboratorio en condiciones estandarizadas, sino que en exposiciones bajo condiciones ambientales reales influirán factores geológicos así como las condiciones meteorológicas, entre otros. Por otro lado en los ensayos de laboratorio se obtienen respuestas para un compuesto individualmente, mientras que en nuestro estudio la aplicación múltiple de tres plaguicidas puede haber producido efectos tóxicos aditivos, antagónicos o sinérgicos. Los estudios de Korth *et al.* (1995) con *Ceriodaphnia sp.* utilizando agua de drenaje procedente de campos de arroz, previa caracterización analítica, demostraron que la toxicidad en el agua de drenaje era mayor que la toxicidad calculada basándose en datos procedentes de ensayos de laboratorio. Según los autores este fenómeno puede explicarse por la presencia de compuestos tóxicos que no fueron detectados en las determinaciones analíticas o bien por la sinergia entre los distintos plaguicidas estudiados.

La utilización de ensayos de laboratorio junto con estudios de validación en campo constituyen una buena estrategia para el estudio del comportamiento de plaguicidas utilizados en el cultivo de arroz, así como de sus efectos ecotoxicológicos (Mabury *et al.*, 1996). El empleo de estas técnicas en programas de seguimiento ha conducido a la modificación de prácticas de manejo asociadas al cultivo de arroz, con el fin de reducir las descargas de plaguicidas hacia sistemas acuáticos naturales. Así desde 1970 hasta 1996 la toxicidad observada en los canales de drenaje procedentes de arrozales y del río Sacramento (California) ha sido reducida gracias al aumento de los períodos de retención del agua en el arrozal, los cuáles han ido aumentando progresivamente permitiendo la degradación/disipación de los plaguicidas antes del drenaje (Byard, 1999).

Aunque la contaminación de aguas superficiales por la presencia de plaguicidas en aguas de drenaje puede reducirse aumentando los períodos de retención de agua en los arrozales, la ERA asociado a estas descargas continúa siendo una necesidad, especialmente para el caso del registro de nuevos productos fitosanitarios (Wilson *et al.*, 2000). Hasta el momento las evaluaciones de riesgo están dirigidas a un solo compuesto químico utilizando ensayos de laboratorio, siendo poco comunes las validaciones en campo. A pesar de que hasta la fecha la información obtenida con estudios de campo ha sido de difícil interpretación y consideración en la toma de decisiones, el papel de este tipo de estudios tanto en fases previas como fases posteriores al registro de un producto fitosanitario es cada vez más importante (Van Dijk *et al.*, 2000). Las características físico-químicas de las aguas superficiales pueden

modificar la toxicidad de un compuesto. La valoración de la toxicidad de muestras ambientales mediante el uso de bioensayos mono-especie constituyen una buena base para acciones regulatorias cuando se utilizan en conjunción con técnicas analíticas convencionales (de Vlaming *et al.*, 2000). Este estudio de semi-campo representa un buen ejemplo de la posibilidad de incorporar la utilización de bioensayos con muestras ambientales en procesos ERA.

Bibliografía

- Abdullah AR, Bajet CM, Martin MA, Nhan DD y Sulaiman AH. (1997). Ecotoxicology of Pesticides in the Tropical Paddy Field Ecosystem. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 59-70.
- ARS PPD. Agricultural Research Service. Pesticide Properties Database. American Cyanamid Corporation Data. (1995). United States Department of Agriculture. (<http://wizard.arsusda.gov/rsml/textiles/MALATHION>).
- Bailey H.C., Alexander C., DiGiorgio C., Miller M., Doroshov S.I. y Hinton D.E. (1994). The effect of agricultural discharge on striped bass (*Morone saxatilis*) in California's Sacramento-San Joaquin drainage. *Ecotoxicology*. 3, 123-142.
- Bhuiyan SI y Castañeda AR. (1995). The impact of ricefield pesticides on the quality of freshwater sources. En: Pingali PL and Roger PA, eds, *Impact of Pesticides on Farmer Health and the Rice Environment*. Kluwer, Norwell, MA, USA, pp 181-202.
- Byard JL. (1999). The impact of rice pesticides on the aquatic ecosystems of the Sacramento River and Delta (California). *Rev. Environ. Contam Toxicol.* 159: 95-110.
- Cano E, Jimenez A, Cabral JA y Ocete ME. (1999). Acute Toxicity of Malathion and New Surfactant "Genapol OXD 080" on Species of Rice Basins. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 133-138.
- Carrasco J.M., Planta M., Gomez-Casals V. y Moragues V. (1987). Pesticide residues in Lake Albufera, Valencia, Spain. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70, 752-753
- CE. (1999). Comisión Europea. http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/ph_ps/pro/eva/newactive/list2-04_en.pdf
- Coupe RH, Thurman EM y Zimmerman LR. (1998). Relation of Usage to the Occurrence of Cotton and Rice Herbicides in Three Streams of the Mississippi Delta. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3673-3680.
- de Vlaming V., Connor V., DiGiorgio C, Bailey H.C., Deanovic L.A. y Hinton D.E. (2000). Application of whole effluent toxicity test procedures to ambient water quality assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 42-62.
- Dortland R.J. (1980). Toxicological Evaluation of Parathion and Azinphosmethyl in Freshwater Model Ecosystems. *Versl. Landbouwk. Onderz* 898: 1-112. In ECOTOX: Ecotoxicology Database USEPA. (<http://www.epa.gov/medecotx/searches/aquatic-1-042500-0834041.htm>)
- Ferrero A. (1999). Rice cultivation in Europe. European Crop Protection Association. *Proceedings of the European Workshop on Environmental Risk Parameters for Use of Plant Protection Products in Rice*. Cremona (Italy), pp 3-9.
- Gomez de Barreda D. (1999). Rice scenario, ecology of the paddy field and monitoring studies in Spain. European Crop Protection Association. *Proceedings of the European Workshop on Environmental Risk Parameters for Use of Plant Protection Products in Rice*. Cremona (Italy), pp 23-28.
- IUCLID (International Uniform Chemical Information Database). (1996). European Commission-JRC, Environment Institute, Ispra (Italy) and ECB. Edition I.
- Iwakuma T., Shiraishi H., Nohara S. y Takamura K, (1993). Runoff properties and change in concentrations of agricultural pesticides in a river system during a rice cultivation period. *Chemosphere*. 27, 677-691.

- Johnson W.W. y Finley M.T. (1980). Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates. Resour. Publ. 137, Fish Wildl. Ser., USDI, Washington, D.C.: 98 pp.
- Korth W, Thomas M, Foster S, McCorkelle G y Bowmer KH. (1995). Toxicity of Rice and Maize Pesticides to *Ceriodaphnia* sp.: Implications for Management of Irrigation Drainage Water in Australia. Australian J. Ecotox. 1: 55-62.
- Mabury SA, Cox JS y Crosby DG. (1996). Environmental fate of rice pesticides in California. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 147: 71-117.
- Márquez T. (1998). Azimsulfuron (DPX-A8947): new postemergence herbicide for Echinochloa spp. control, monocotyledons and dicotyledons in rice cultivation. Phytoma-España. 98, 58-63.
- Muñoz, M.J., Ramos, C. y Tarazona, J.V. (1996). Toxicokinetics of hexachlorobenzene in *Chlorella vulgaris* and their relationship with the bioaccumulation and toxicity of the chemical on *Daphnia magna*. Aquat. Toxicol. 35, 211-220.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. (1993). Alga growth inhibition test. Guideline for testing of chemicals, N° 201. Volume 1. Paris France.
- Pereira W.E. y Hostettler F.D. (1993) Nonpoint source contamination of the Mississippi river and its tributaries by herbicides. Environ. Sci. Technol. 27, 1542-1552.
- Ramos C, Carbonell G, García Baudín JM^a y Tarazona JV. (2000). Ecological risk assessment of pesticides in the Mediterranean region. The need for crop-specific scenarios. Sci. Total Environ. 247, 269-278.
- Santos TCR, Rocha JC, Alonso RM, Martínez E, Ibañez C y Barceló D. (1998). Rapid degradation of Propanil in Rice Crop Fields. Environ. Sci. Technol. 32, 3479-3484.
- Shigehisa H and Shiraishi H. (1998). Biomonitoring with shrimp to detect seasonal change in river water toxicity. Environ. Toxicol. Chem. 17, 687-694.
- Takamura K., Nohara S., Kariya T., Okazaki M. y Kinuko I. (1991). Effects of pesticide contamination from rice fields on stream benthic arthropos. Jpn. J. Limnol. 52, 95-103.
- Tinarelli A. (1989). El arroz. 2^a Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Trevisan M., Montepiani C., Ghebbioni C. y Del Re A.A.M. (1991). Evaluation of potential hazard of propanil to groundwater. Chemosphere 22, 637-643.
- Van Dijk H.F.G. *et al.* (2000). Field Research for the authorisation of pesticides. Ecotoxicology. 9, 377-381.
- Werner I., Deanovic L.A., Connor V., de Vlaming V., Bailey H.C. y Hinton D. E. (2000). Insecticide-caused toxicity to *Ceriodaphnia dubia* (cladocera) in the Sacramento-San Joaqui river delta, California, USA. Environ. Toxicol. Chem. 19, 215-227.
- Wilson A.L., Stevens M.M. y Watts R.J. (2000). Acute and chronic toxicity of the herbicide Benzofenap (Taipan 300) to *Chironomus tepperi* Skuse (Diptera: Chironmidae) and *Isidorella newcombi* (Adams and Angas) (Gastropoda: Planorbidae). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 38, 176-181.

SEGUNDA PARTE

Desarrollo de bioensayos multi-especies en sistemas agua-sedimento para valorar la reproducción de invertebrados acuáticos.

El problema de la contaminación de aguas adquiere una nueva dimensión si consideramos que muchas de las sustancias químicas vertidas al agua terminan asociándose de manera reversible a sedimentos. Desde esta perspectiva la contaminación de sedimentos y los efectos sobre la fauna asociada (organismos bénticos) se convierten en nuevos problemas a abordar que requieren el desarrollo de herramientas específicas. Los primeros esfuerzos orientados en este sentido recomiendan por un lado el desarrollo de metodologías para la determinación de la concentración de compuestos asociados a sedimentos y de su distribución entre la columna de agua y el sedimento (dinámica de sorción/desorción hasta el equilibrio); y por otro lado la utilización de bioensayos con organismos propios de sedimento con el fin de valorar con mayor fiabilidad la toxicidad de compuestos asociados a sedimentos (Dickson *et al.*, 1987). Diez años más tarde Ingersoll *et al.* (1997) reconocen que la estructura lógica de las evaluaciones de riesgo (1º: formulación del problema, 2º: valoración de exposición y efectos, y 3º: caracterización del riesgo) es aplicable al caso de compuestos asociados a sedimentos. En este contexto surgen nuevas líneas de investigación para la ERA de sedimentos contaminados, considerándose de máxima prioridad, en el caso de la valoración de efectos, el desarrollo de bioensayos crónicos con sedimentos capaces de valorar tanto efectos letales como efectos subletales sobre el crecimiento, la reproducción y en última instancia efectos a corto y medio plazo sobre las poblaciones.

Si consideramos la complejidad de los ensayos de toxicidad como una línea continua, en un extremo de la línea estarían situados los bioensayos mono-especie, mientras que en el extremo opuesto estarían situados los estudios de campo, entre ambos extremos existe una variedad de posibles ensayos de toxicidad con diferentes niveles de complejidad entre los que se encuentran los ensayos multi-especies. Cairns define en 1985 estos últimos como ensayos en los que dos o más especies interactúan, siendo este tipo de ensayos más realistas desde el punto de vista medioambiental que los bioensayos mono-especie (Buikema y Voshell, 1993). La utilidad de este tipo de ensayos parece clara cuando queremos determinar el rango de toxicidad de una sustancia sobre organismos acuáticos, ya que al valorar efectos sobre varias especies simultáneamente, resultan más eficientes que el empleo de una batería de bioensayos mono-especie (Cairns y Cherry, 1993). La dificultad asociada a la validación y estandarización de este tipo de ensayos ha impedido su uso como herramientas rutinarias en Ecotoxicología, si bien constituyen un grupo de herramientas de gran utilidad en fases intermedias de los procedimientos ERA. En este sentido el diseño de estas nuevas herramientas se orientará hacia la valoración de efectos a nivel poblacional, quedando reservados los estudios de campo para la valoración de efectos sobre comunidades y de la capacidad de éstas para recuperarse tras la exposición a compuestos tóxicos (Campbell *et al.*, 1999).

La selección de las especies utilizadas en los ensayos de toxicidad depende de los objetivos específicos de cada estudio. Buikema y Voshell (1993) consideran necesario el desarrollo de nuevos ensayos con especies de macroinvertebrados, fundamentalmente si el objetivo es valorar efectos crónicos en el crecimiento y en la reproducción, o efectos en los distintos estados del ciclo de vida, ya que actualmente existen pocas especies de macroinvertebrados que se cultiven en el laboratorio. Más del 95% de todas las especies animales son invertebrados. Los invertebrados además de ser un grupo muy abundante tienen importantes funciones tanto desde el punto de vista ecológico como antropocéntrico entre las que destacan su participación en el control de plagas y pestes, en la polinización, facilitan la transferencia de nutrientes en la cadena trófica y son una importante fuente de alimento para muchos vertebrados. Por otro lado los invertebrados son organismos ubicuos y constituyen un grupo de gran biodiversidad lo que les convierte en organismos centinela de posibles modificaciones del hábitat, incluyendo la contaminación ambiental. Los resultados obtenidos en distintos estudios sugieren que los invertebrados son organismos sensibles a los efectos causados por los denominados disruptores endocrinos, los cuales pueden alterar la homeostasis hormonal ocasionando disfunciones en el sistema endocrino (Ankley *et al.* 1998). Por ello se ha enfatizado la necesidad de desarrollar bioensayos con invertebrados en los cuales se consideren diferentes estados del ciclo de vida con el fin de centrar la valoración en los efectos crónicos asociados al desarrollo sexual y la reproducción (CSTEE, 1999).

En los dos siguientes capítulos se desarrollan ensayos multi-especies con invertebrados para valorar efectos crónicos en sistemas agua-sedimento. En el primer capítulo la valoración de efectos sobre dos especies (*Daphnia magna* y *Chironomus prasinus*) con distinto tipo de reproducción (asexual y sexual) se centra en las diferencias debidas a las rutas de exposición a una sustancia química (a través de agua y/o sedimento). En el siguiente capítulo se incluye una nueva especie hermafrodita (*Lymnaea peregra*) en el sistema agua-sedimento y se ponen a punto las condiciones de ensayo y parámetros biológicos a valorar en cada una de las tres especies seleccionadas en función de su ciclo de vida y tipo de reproducción.

Bibliografía

- Ankley G., Mihaich E., Stahl R., Tillitt D., Colborn T., McMaster S., Miller R. *et al.* (1998). Annual Review. Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environ. Toxicol Chem.* 17, 68-87.
- Buikema A.L. y Voshell J.R. (1993). Toxicity studies using freshwater benthic macroinvertebrates. En: Rosenberg DM, Resh VH (eds). *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. Chapman and Hall, New York, pp 344-398.
- Cairns J. y Cherry D.S. (1993). Freshwater multi-species test systems. In: Calow P (ed). *Handbook of Ecotoxicology*, Vol 1. Blackwell Scientific Publications. Oxford, pp 101-116.

Campbell PJ, Arnold DJS, Brock TCM, Grandy NJ, Heger W, Heimbach F, Maund SJ y Streloke M. (1999). Guidance document on higher-tier assessment for pesticides. SETAC-Europe, Brussels.

CSTEE. Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment. (1999). Opinion on Human and Wildlife Health Effects of Endocrine Disrupting Chemicals, with Emphasis on Wildlife and on Ecotoxicology test methods. DG XXIV, European Commission.

Dickson K.L., Maki A.W. y Brungs W.A. (1987). Fate and effects of sediment-bound chemicals in aquatic systems. New York: Pergamon Pr.

Ingersoll C.G., Dillon T. y Biddinger G.R, (eds). (1997). Society of Environmental Toxicology and Chemistry. SETAC. Ecological Risk Assessment of Contaminated Sediments. SETAC Pellston Workshop on Sediment Ecological Risk Assessment; 1995 Apr 23-28; Pacific Grove CA. Pensacola FL:SETAC Pr. 309 pp.

Capítulo III

Desarrollo de un sistema multi-especies para valorar efectos sobre la reproducción y diferencias debidas a la ruta de exposición. Efectos del Pentaclorofenol en *Daphnia magna* y *Chironomus prasinus*¹

¹ Los resultados de este capítulo han sido enviados para su publicación en la revista Chemosphere.

CAPÍTULO III:**DESARROLLO DE UN SISTEMA MULTI-ESPECIES PARA VALORAR EFECTOS SOBRE LA REPRODUCCIÓN Y DIFERENCIAS DEBIDAS A LA RUTA DE EXPOSICIÓN: EFECTOS DEL PENTACLOROFENOL EN *DAPHNIA MAGNA* Y *CHIRONOMUS PRASINUS*.****INTRODUCCIÓN**

En la primera fase de una ERA (Tier I) los resultados obtenidos mediante el empleo de ensayos de laboratorio son directamente extrapolados a situaciones ambientales reales. Sin embargo, los bioensayos mono-especie tienen una capacidad limitada para predecir efectos adversos sobre el ecosistema (Woin, 1998), por lo que la validación en estudios de campo son necesarios para determinar la relevancia ecológica de los datos de toxicidad obtenidos mediante ensayos de laboratorio (Taylor, 1994). El alto coste y complejidad de los estudios de campo ha dado lugar a un gran desarrollo de métodos alternativos, de complejidad intermedia entre estudios de laboratorio y de campo, los cuales incorporan condiciones ambientales más reales a las utilizadas en bioensayos mono-especie estandarizados, permitiendo una ERA más precisa. Dos buenos ejemplos son el empleo de ecosistemas modelizados para el estudio del comportamiento y destino final en los distintos compartimentos ambientales de pesticidas (Miyamoto *et al.*, 1985), y el empleo de mesocosmos en la ERA de alto nivel de compuestos químicos nuevos, especialmente pesticidas (SETAC, 1992). Estos métodos complementarios se han centrado en proporcionar resultados comparativos sobre el comportamiento de los compuestos químicos en el medio y sus efectos sobre los organismos. Además han incorporado nuevos taxones con el fin de cubrir una mayor distribución de la sensibilidad de especies, así como la capacidad de detectar efectos a niveles de organización superior a la de individuo (ej. población, comunidad, etc.). Finalmente estos métodos complementarios deben ser, al igual que los bioensayos mono-especie estandarizados, ensayos cortos y de bajo coste pero con la capacidad de detectar posibles efectos a largo plazo (efectos crónicos) (Watzin *et al.*, 1994 y Woin, 1998).

Los bioensayos multi-especies constituyen una de estas herramientas complementarias. En los bioensayos multi-especies se utilizan unas pocas especies, previamente seleccionadas, para estudiar procesos e interacciones específicos. Existe una amplia gama de posibles diseños experimentales con este tipo de ensayos, por ej. pueden ser diseñados para obtener información sobre efectos que ocurren a nivel población o para estudiar interacciones competitivas entre un pequeño número de especies (Campbell *et al.*, 1999). Por otro lado efectos sobre el crecimiento y la reproducción pueden predecir cambios a

nivel poblacional, así como el empleo de ensayos que cubran el ciclo de vida de una especie pueden considerarse a la hora de valorar efectos a largo plazo (Sibley *et al.*, 1997).

Los invertebrados constituyen un grupo de gran diversidad biológica con importantes funciones en los ecosistemas acuáticos (Gillespie *et al.*, 1998). Dentro de los invertebrados acuáticos se haya representado un amplio rango de grupos taxonómicos y niveles tróficos que habitan distintos compartimentos ambientales, existiendo invertebrados bénticos, epibénticos y pelágicos. Todas estas características los convierten en organismos de gran interés para su utilización en bioensayos. En este sentido la OECD recomienda la incorporación de grupos taxonómicos de invertebrados acuáticos tales como platelmintos, rotíferos, bivalvos, equinodermos e insectos, para el desarrollo de nuevos ensayos estandarizados (OECD, 1998). Las especies de la familia Chironomidae (Cl. Insecta, O. Dípteros) tienen una amplia distribución y un ciclo de vida corto pero complejo que consta de cuatro estadios: huevo, larva, pupa y mosquito. El estadio larva es importante para la productividad del ecosistema ya que las larvas viven enterradas en el sedimento alimentándose de detritus, constituyendo además una importante fuente de alimento para peces (Stewart y Thompson, 1995). Finalmente, diferentes estudios sugieren que estos organismos son sensibles e indicadores de la presencia de contaminantes en sedimentos (Ankley *et al.*, 1994; Day *et al.* 1994).

Si bien los quironómidos pueden ser buenos indicadores de la presencia de contaminantes en sedimentos, especies pelágicas como *Daphnia magna*, pueden no ser apropiadas para este fin, siendo más correcto su uso en estudios con sistemas acuáticos puros (Harkey *et al.*, 1994). Ello ha puesto de relieve la necesidad de estandarizar bioensayos con especies bénticas, como las pertenecientes al género *Chironomus*, con el fin de valorar de una manera más efectiva la contaminación de sedimentos (Schubauer-Berigan y Monson, 1995; OECD 2000a y 2000b). Aunque estas dos especies de invertebrados acuáticos (*Chironomus sp.* y *Daphnia magna*) poseen estrategias y estilos de vida muy diferentes, ya que *Chironomus sp.* se reproduce sexualmente, mientras que *Daphnia magna* en condiciones ambientales favorables se reproduce asexualmente, su ciclo de vida tiene una duración similar. Prueba de ello es que el ensayo de reproducción de *Daphnia magna* se realiza en 21 días (OECD, 1993) y el ensayo de *Chironomus riparius* hasta la emergencia de adultos tiene lugar en un período de 28 días (OECD, 2000a y 2000b).

En este capítulo se desarrolla un ensayo multi-especies con *Daphnia magna* y *Chironomus prasinus*. Puesto que el primero es un organismo filtrador de la columna de agua con reproducción asexual, y el segundo es un organismo béntico detritívoro con reproducción sexual, en este ensayo se combinan dos variables que pueden afectar a la respuesta de un organismo frente a un compuesto tóxico: la ruta de exposición y la estrategia reproductora. Para ello se prepararon sistemas agua-sedimento, a los cuales se les añadieron diferentes dosis de Pentaclorofenol (PCP) en forma de sal sódica (NaPCP). El objetivo de este estudio fue

desarrollar un ensayo multi-especies sencillo, capaz de detectar efectos relevantes en ambas especies expuestas a un compuesto tóxico a través de la columna de agua y/o sedimento.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Mantenimiento y cultivo de organismos

Daphnia magna y *Chironomus cf. prasinus* (Meigen 1804), cultivados durante varias generaciones en el Laboratorio de Ecotoxicología (INIA) fueron las dos especies seleccionadas en este estudio.

El cultivo de *Daphnia magna* se realiza siguiendo las condiciones estandarizadas por la OECD (1993). En el caso de *Chironomus prasinus*, al ser una especie muy cercana a *Chironomus riparius*, condiciones similares a las descritas para el cultivo de esta última especie (ASTM 1992; OECD 2000a y 2000b), resultan aceptables para el mantenimiento en condiciones de laboratorio de *C. prasinus*. El cultivo de *C. prasinus* se realiza en acuarios (20x25[altura]x40 cm) en los que se construye un sistema estático de agua-sedimento a base de arena industrial lavada (2-3 cm) sobre la que se añaden 5 L. de agua de manantial en continua aireación. El fotoperíodo se fija en 16:8 horas de luz:oscuridad y la temperatura ambiente a 20-22°C. Las masas de huevos se colocan en vasos de precipitado previa adición de *Chlorella vulgaris ad libitum*. Tras la eclosión de los huevos (2-3 días), larvas menores de 24 h se transfieren al acuario de cultivo. Las larvas se alimentan con 400 mg de pienso para cíclidos (TetraDiscus®) tres días por semana. Tras siete días desde la eclosión, 400 larvas son contadas y transferidas a un nuevo acuario limpio, el cual se recubre con una malla para impedir la fuga de la fase adulta (mosquito). La cantidad de alimento proporcionada a partir de este momento se aumenta hasta 530 mg de TetraDiscus® tres veces por semana. El agua se renueva semanalmente, previo vacío por bombeo del agua superficial se añade agua limpia permitiendo la remoción del sedimento, pudiéndose de esta manera observar las larvas y el estado de salud del cultivo. Bajo estas condiciones el pico de emergencia de adultos tiene lugar entre los días 17 y 19. La cópula y puesta de huevos tiene lugar en el mismo acuario entre tres y cuatro días después del pico de emergencia de adultos. A partir de este momento los mosquitos se eliminan por aspiración y las masas de huevos se recogen con ayuda de una pipeta, las cuales se transfieren a un vaso de precipitado conteniendo agua de cultivo y *Chlorella vulgaris ad libitum*, iniciándose de esta forma el cultivo de la siguiente generación.

2. Diseño del ensayo multi-especies

El sedimento artificial se preparó con arena industrial lavada y tamizada a través de una malla de luz de 600 µm. A este sedimento se le añadió un 10% en peso húmedo de materia orgánica en forma de estiércol lavado. La exposición al compuesto se realizó

añadiendo 31 ml de diluciones sucesivas de una solución madre (0,2 mg/ml) de la sal sódica del Pentaclorophenol (NaPCP) a 310g de sedimento, obteniéndose las siguientes concentraciones en peso húmedo de sedimento: 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg y 20 mg/kg. 10g de cada dosis se conservaron a -20°C hasta su utilización para determinación analítica de PCP. Los 300 g sobrantes de cada uno de los sedimentos expuestos a NaPCP y dos sin exponer fueron utilizados para preparar los sistemas agua-sedimento.

El ensayo se realizó en vasos de precipitado de 2 L de capacidad. El sistema agua-sedimento se preparó con 300 g de sedimento, estos se cubrieron con un disco de plástico con el fin de no producir alteraciones del sedimento al entrar este en contacto con el agua, sobre este disco se añadieron cuidadosamente 1,2 L de agua de manantial. Una vez completado el volumen de agua superficial el disco de plástico se retiró, y el sistema agua-sedimento se dejó estabilizar durante 48 h.

En cada sistema agua-sedimento se colocaron dos reservorios situados cuatro centímetros por encima de la superficie del sedimento. Cada reservorio consistía en un cilindro de una malla de acero inoxidable con una luz de 160 μm , y una base de cristal, permitiendo la circulación de agua y alimento a través de los reservorios. En la Figura 1 se representa un esquema general del sistema y una foto donde se muestra una vista general de todos los sistemas agua-sedimento.

Tras permitir la estabilización del sistema (48 h) se inició el ensayo (día 1) añadiendo 40 larvas de *Chironomus prasinus* de entre 3 y 4 días de vida, y 40 juveniles de *Daphnia magna* menores de 24 h. Del total de organismos 10 se añadieron a cada reservorio, mientras que el resto (30) quedaron libres en el sistema. Tras la adición de los organismos el sistema se mantuvo en constante aireación La temperatura ambiente se fijó a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la luz a una intensidad de 1000 lux con un fotoperiodo de 16:8 horas de luz:oscuridad.

A las 48 h (día 3) los reservorios se retiraron y se contó el número de organismos en el interior de cada reservorio. En el día 4 se colocó un reservorio en cada sistema dentro del cual se añadieron 10 larvas de 7 días de vida. En el día 8 de ensayo se recuperaron y contaron todas las daphnias (libres y de reservorio) de cada uno de los sistemas, posteriormente se añadieron 25 nuevas daphnias de 11 días (10 en el reservorio y 15 libres). Estos organismos a distintos tiempos durante el período de ensayo pertenecían a la misma generación que los añadidos al inicio del ensayo.

El oxígeno disuelto y el pH del agua superficial se midió a distintos tiempos mediante un pH-metro 507 y un oxímetro OXI330 sensor Cellox325 (Crison). La media y la desviación estándar del oxígeno disuelto en agua superficial fueron de $5,01 \pm 0,15$ mg/l en el día 0, de $5,86 \pm 0,41$ mg/l en el día 1 y de $6,65 \pm 0,28$ mg/l en el día 8.

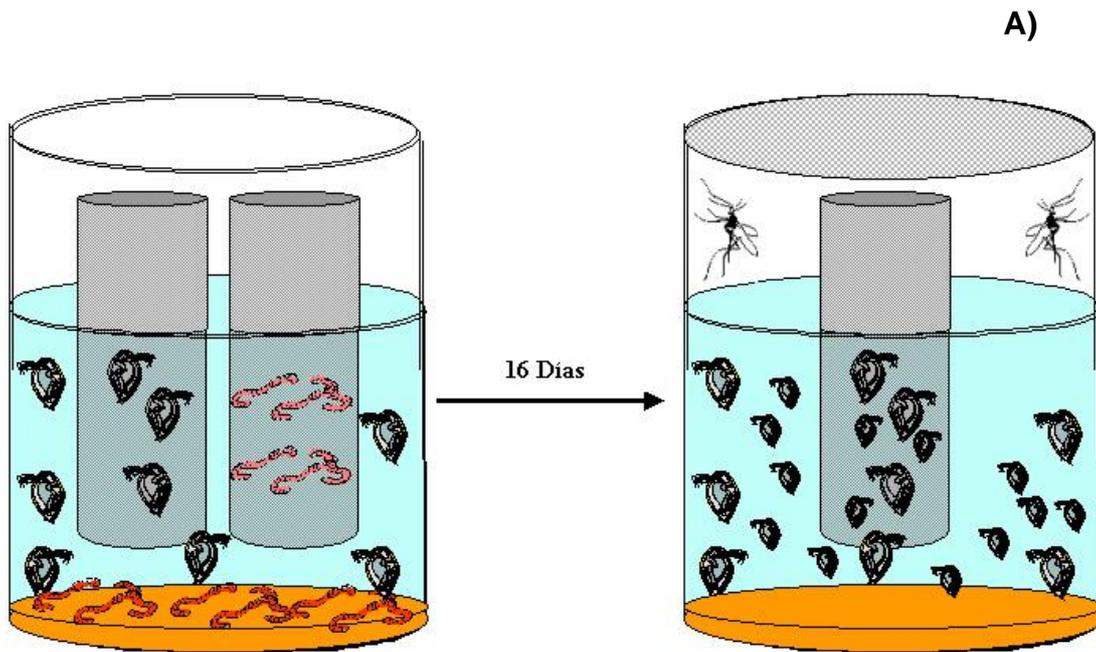


Figura 1: **A)** Esquema general del sistema multi-especies al inicio y final del ensayo. En un principio se colocaron dos reservorios en cada sistema con el fin de observar efectos agudos por exposición al tóxico únicamente a través del agua superficial. Al final del ensayo podían observarse efectos en la reproducción de *D. magna* tanto debidos a la exposición a través de agua y sedimento, como los debidos a la exposición a través del agua únicamente (en el caso de las daphnias situadas en el interior del reservorio). Por otro lado al final del ensayo podían observarse efectos en la capacidad de *C. prasinus* para llegar a la madurez sexual con la fase adulta (mosquito). **B)** Vista general de todos los sistemas agua-sedimento del ensayo multi-especies.

En el caso del pH en el día 0 pudo observarse una relación directamente proporcional entre la dosis de NaPCP y el pH, obteniéndose los siguientes valores de pH en cada uno de los sistemas:

	Control 1	Control 2	1,25 mg/kg	2,5 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
pH	8,64	8,62	8,64	8,66	8,7	8,8	8,91

Este efecto sobre el pH desaparece al día siguiente obteniéndose un rango de pH para los días 1 y 8 de entre 8,2 y 8,4 respectivamente.

Como suplemento alimenticio se añadieron 60 mg de pienso para cíclidos (TetraDiscus®) en los días 3 y 11. Las pérdidas por evaporación se compensaron añadiendo agua desionizada en los días 3 y 7.

Cada vaso de ensayo se cubrió con una red con el fin de retener la fase adulta de *Chironomus prasinus*. A partir del día 9 se observaron diariamente todos los vasos con el fin de contar los mosquitos, diferenciando entre machos y hembras, así como las masas de huevos depositadas.

Al final del experimento (día 16) los mosquitos se eliminaron por aspiración. Posteriormente las daphnias en el interior de los reservorios se contaron y eliminaron mediante pipeta. Una vez eliminados los reservorios, el agua superficial se filtró a través de una malla de 160 μm de luz, quedando aisladas de esta manera las daphnias que se encontraban libres en el sistema. Estas daphnias se contaron diferenciando entre adultos y juveniles. Finalmente se eliminaron y cuantificaron larvas y pupas que no alcanzaron la fase adulta, tras lo cual los sedimentos se retiraron y conservaron a -20°C para la posterior determinación analítica de PCP en cada una de las dosis ensayadas. En la Figura 2 se esquematiza en forma de escala temporal el ensayo completo.

3. Distribución y evolución del Pentaclorofenol en el sistema agua-sedimento

La determinación analítica del PCP se realizó en muestras de sedimento recogidas al inicio (previamente a la construcción del sistema agua-sedimento) y al final (día 16) del ensayo. Además se analizaron muestras de agua recogidas en los días 8 y 16 del ensayo, conservándose a -20°C hasta su análisis.

Las muestras de sedimento (10 gr) y de agua superficial (100 ó 500 ml) fueron procesadas según el método desarrollado por Albanis y Danis (1999) para el análisis de compuestos fenólicos.

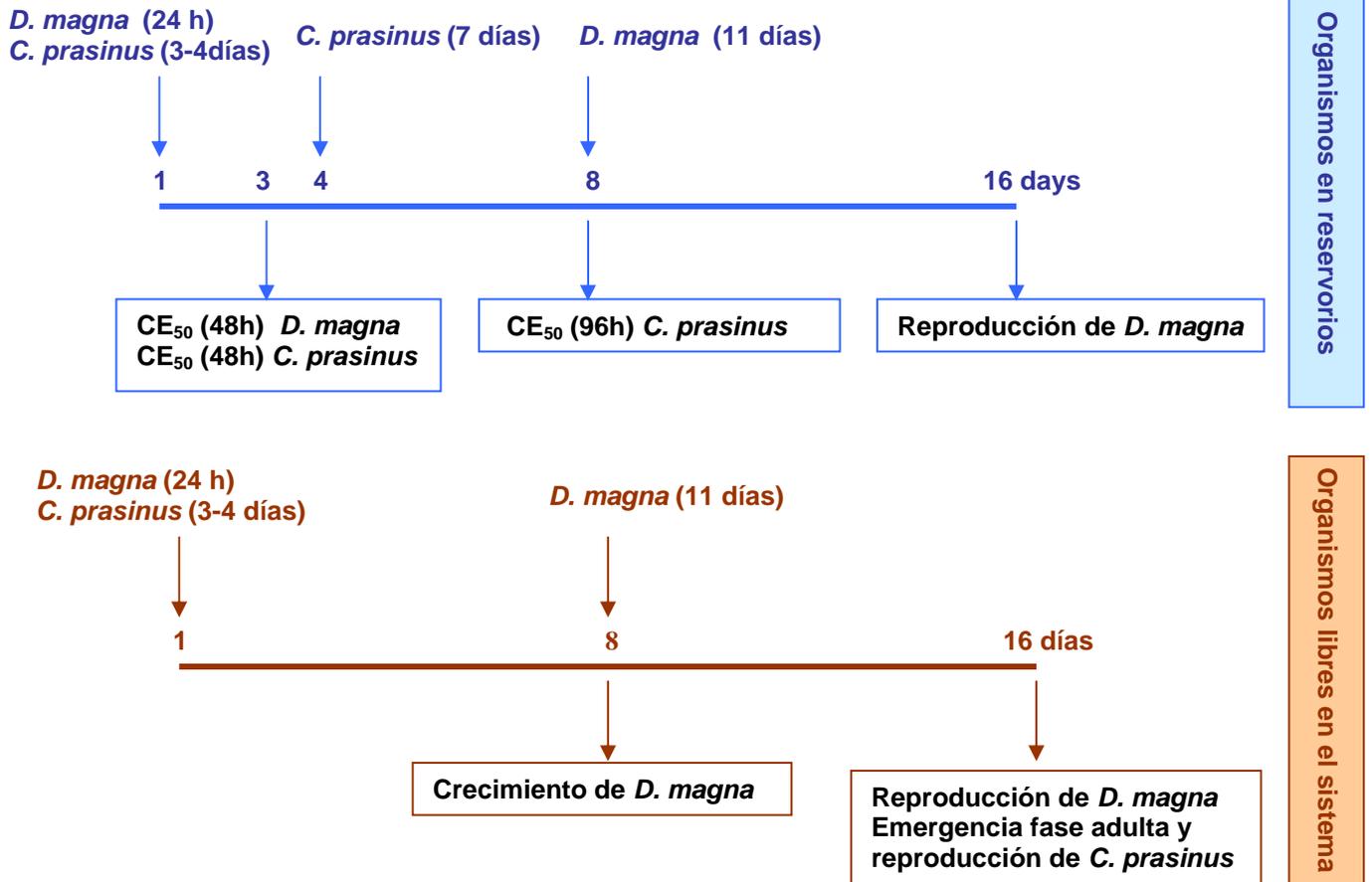


Figura 2: Escala temporal del ensayo multi-especies para el caso de organismos expuestos a PCP únicamente a través del agua superficial (arriba) y para el caso de organismos expuestos a través de agua superficial y sedimento (abajo). Las flechas situadas por encima de la línea temporal indican los días en que se añadieron organismos, indicándose en cada caso la edad correspondiente. Las flechas por debajo de la línea temporal indican los días en que se recuperaron organismos, indicándose en cada caso los parámetros de toxicidad cuantificados.

En el caso de los sedimentos la extracción comienza añadiendo 15 ml de agua destilada, la mezcla se introduce en un baño de ultrasonidos (ultrasonic LC 130H, Elma) durante 10 min., posteriormente se añaden 5 ml de acetona y la nueva mezcla se somete a sonicación durante 15 min. y a agitación mecánica durante 5 min. La mezcla obtenida se centrifuga a 6000 g durante 5 min. Una vez centrifugado, el sobrenadante se recupera, mientras que al pellet se le somete al mismo proceso anteriormente indicado. El sobrenadante obtenido en la segunda centrifugación se mezcla con el anterior, obteniéndose de esta forma una mezcla agua/acetona que se lleva hasta los 500 ml con agua destilada, a la que se añade CINA al 10%. A partir de este punto los pasos para la extracción de PCP a partir de muestras de sedimentos y de agua superficial coinciden. Los 500 ml ó 100 ml (en el caso de la muestra de agua superficial perteneciente al día 8 de ensayo) de muestras se acidifican con H_2SO_4 hasta obtener un pH=2. La extracción en fase sólida se realizó con cartuchos Oasis®HLB 3cc previa activación con: 1) 10 ml de acetona, 2) 10 ml de metanol y 3) 10 ml de agua destilada. Las muestras se hicieron pasar a través de los cartuchos mediante un distribuidor de vacío de 12 puertos Visiprep (57030-U Supelco). Para eluir el extracto contenido en los cartuchos se utilizaron 10 ml x2 de Diclorometano. El extracto se concentró mediante evaporación bajo corriente de N_2 hasta un volumen de 0,5 ml.

La acetilación del extracto se realizó añadiendo 2 ml de acetona seguidos de 3 ml de K_2CO_3 0,1M y 2ml de n-hexano a los que previamente se les añadieron 50 μ l de anhídrido acético. Esta mezcla se agitó en vortex durante 1 min, tras lo cual se permitió la separación de fases durante 30 min a temperatura ambiente. Previo secado con $NaSO_4$ la fase orgánica se recupera y se concentra bajo corriente de N_2 hasta 1,5 ml, los cuáles fueron utilizados para su análisis por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC/MS).

2 μ l del extracto fueron utilizados para determinar la concentración de PCP mediante un cromatógrafo de gases (HP 5890) acoplado a un espectrómetro de masas (HP 5989A), para lo que se utilizó una columna capilar HP-5 Crosslinked 5% PH Me-Siloxano. La detección se realizó en modo SIM (266, 308 m/z). La calibración se realizó mediante una curva de estándar externo con concentraciones de :1,25 μ g/ml, 2,5 μ g/ml, 5,0 μ g/ml y 10 μ g/ml.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Distribución y evolución del Pentaclorofenol en el sistema agua-sedimento

El método de extracción utilizado permitió obtener porcentajes de recuperación de PCP en sedimentos obtenidos al inicio del ensayo (previa a la construcción del sistema agua-sedimento) de entre un 73-91%. Las concentraciones obtenidas de PCP en agua en los días 8 y 16, así como las obtenidas en sedimentos obtenidos al final del ensayo (día 16) se muestran en la Tabla 1. Las concentraciones de PCP en el agua confirman la desorción del PCP desde el sedimento hacia el agua superficial, siendo éstas superiores en el día 16 que en el día 8.

La recuperación total de PCP al final del ensayo, considerando la suma de la concentración en sedimento más la obtenida en agua fue dosis-dependiente, incrementándose desde el 30% en el caso de la dosis de 1,25 mg/kg hasta el 90% en el caso de la dosis de 10 mg/kg. Ello sugiere que la baja tasa de recuperación de la concentración nominal para las concentraciones bajas de PCP puede explicarse por la incorporación del PCP o sus metabolitos a la fracción no extraíble del sedimento, que al estar representada por ligandos químicos es saturable y por ello su relevancia es inversamente proporcional a la concentración inicial. Sin embargo, en el caso de la mayor dosis utilizada (20 mg/kg) el porcentaje de recuperación disminuye. Aunque no se llevaron a cabo análisis específicos, este efecto podría explicarse, teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas del PCP, por una volatilización del compuesto una vez que la capacidad de unión al sedimento y solubilidad en el agua hubiera sido excedida.

El PCP queda adsorbido en los sedimentos, desorbiéndose lentamente hacia el agua. El resultado es el de una exposición crónica para los sistemas acuáticos asociados. Por tanto, el riesgo asociado a este compuesto para los sistemas de agua dulce se debe principalmente a la contaminación de sedimentos con PCP (Muir y Eduljee, 1999). En nuestro estudio se recuperó alrededor del 30 y 40% de la concentración nominal de PCP en el agua, confirmándose la desorción del PCP desde el sedimento hacia el agua. No hubo, sin embargo, una clara relación entre la dosis de PCP utilizada y el porcentaje de desorción, pero sí se observó un aumento relativo en agua con el tiempo. En el caso de la dosis menor (1,25 mg/kg de sedimento) la concentración en agua fue mayor en el día 8, mientras que en el resto de las dosis utilizadas la concentración en agua fue mayor al final del experimento (día 16), siendo este aumento más significativo, aun si consideramos el porcentaje de recuperación para las dosis mayores.

Tabla 1: Concentraciones de PCP obtenidas tras análisis por GC/MS de los extractos correspondientes a muestras de sedimentos y agua superficial. El rendimiento de la extracción puede obtenerse directamente a partir del porcentaje de recuperación en el caso de las concentraciones iniciales en sedimento (muestra obtenida antes de la construcción del sistema). El porcentaje de recuperación en el caso de muestras de agua indica la distribución de PCP en agua considerando la migración total de la concentración nominal añadida al sedimento.

Concentración Nominal en Sedimento (mg/kg)	0 (Control 1)	0 (Control 2)	1,25	2,5	5	10	20
Concentración Inicial en Sedimento (mg/kg)	0,134	0,153	1,067	2,284	4,522	7,272	16,997
Porcentaje de recuperación			85,4	91,3	90,4	72,7	85
Concentración Final en Sedimento (mg/kg)	0,023	0,010	0,061	0,134	1,681	6,209	7,488
Porcentaje de recuperación			4,86	5,37	33,6	62,1	37,4
Concentración en Agua (Día 8) (mg/l)	0,0029	0,0082	0,116	0,155	0,390	0,382	0,638
Porcentaje de recuperación			37,12	24,8	31,2	15,28	12,76
Concentración en Agua (Día 16) (mg/l)	0,0040	0,0028	0,075	0,219	0,571	0,746	1,954
Porcentaje de recuperación			24	35,04	45,68	29,84	39,08

2. Efectos letales y efectos en la reproducción de *Daphnia magna*

No se observaron efectos letales sobre organismos de *D. magna* situados en los reservorios tras 48h de exposición (día 3) a ninguna de las dosis utilizadas, ya que el número de daphnias recuperadas varió entre 8 y 10 juveniles en los distintos reservorios. Los datos de laboratorio referentes a la CL50 del PCP en *D. magna* indican que este valor está comprendido entre 320 y 690 $\mu\text{g/l}$ (Lewis y Horning, 1991; Liber y Solomon, 1994). Estas concentraciones se alcanzaron en agua superficial el día 8 a la máxima dosis utilizada. Puesto que los organismos situados en el interior de los reservorios no están expuestos a PCP a través del sedimento, los efectos observados en nuestro estudio concuerdan con los datos consultados en la literatura.

En el caso de las daphnias libres en el sistema se observaron efectos mortales debidos a daños mecánicos provocados al quedar atrapadas entre los reservorios. Aunque el recuento realizado el día 8 no puede cuantificarse por este motivo, hay que tener en cuenta que se recuperaron daphnias en todas las dosis utilizadas excepto en la mayor (20 mg/kg), lo que podría asociarse a mortalidad producida por PCP. La supervivencia de *D. magna* tras una semana de exposición a PCP no disminuyó a concentraciones de 400 $\mu\text{g/l}$ pero sí a concentraciones de 600 $\mu\text{g/l}$ (Winner, 1988). Estos datos y los resultados obtenidos en este ensayo muestran una buena correlación, ya que la concentración de PCP del agua superficial en el día 8 sólo fue superior a 400 $\mu\text{g/l}$ en el caso de la dosis mayor de PCP (0,638 mg/l, Tabla1).

En la Figura 3 se muestra el número total de organismos el último día del ensayo, diferenciando la reproducción ocurrida dentro y fuera de los reservorios. El mayor número de organismos recuperados que de organismos añadidos al inicio del ensayo en todas las dosis, con excepción de la mayor (20 mg/kg), indica que hubo reproducción en todas esas dosis. No se observaron juveniles, ni en reservorio y ni libres, para las dos dosis superiores (10 y 20 mg/kg) lo que indica una inhibición de la reproducción a estas dosis en los últimos días de exposición. La máxima concentración produjo efectos letales tanto en los organismos situados en reservorio donde no se recuperó ninguna daphnia, como en los que se encontraban libres en el sistema donde solo se recuperaron 10 daphnias adultas. Borgmann *et al.* (1989) observaron que una concentración de 1 mg/l de PCP provocaba un 100% de mortalidad en *Daphnia magna* en un ensayo de 21 días mientras que la reproducción se redujo a una concentración de 0,320 mg/l de PCP. Los efectos letales y la inhibición de la reproducción en nuestro caso se observaron a concentraciones de PCP en agua superficial de 1,954 y 0,746 mg/l respectivamente (Tabla 1), las cuales están en un rango similar a las descritas por Borgmann *et al.* La inhibición de la reproducción en la dosis de 10 mg/kg tuvo lugar entre los días 8 y 16, lo que corresponde a un rango de concentración de entre 0,382 mg/l (día 8) y 0,746 mg/l (día 16) en el agua superficial. Estas concentraciones se sitúan dentro del rango de valores de LC50 obtenidos en la bibliografía.

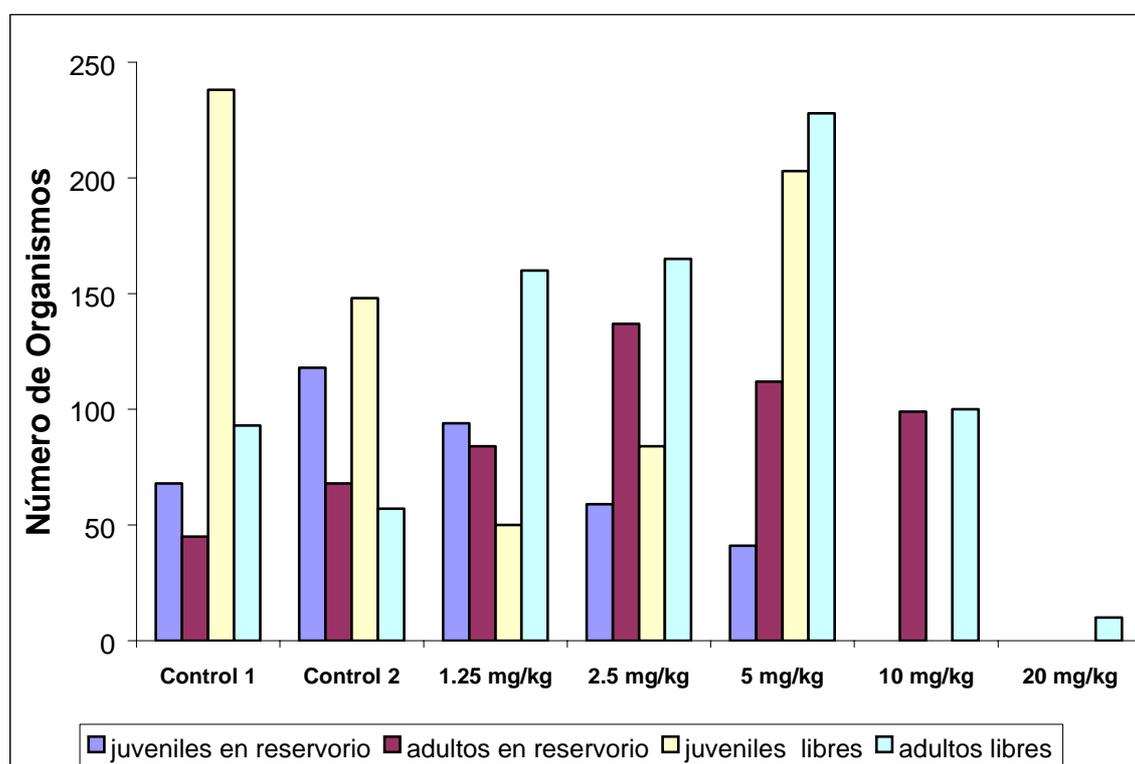


Figura 3: Reproducción de *Daphnia magna* expresada como número total de organismos situados en el interior de los reservorios y número total de organismos libres en el sistema el último día del ensayo multi-especies (día 16).

Aunque *Daphnia magna* no es una especie que habite el sedimento sí puede quedar expuesta a posible contaminación de sedimento a través de material que ingiere en la interfase agua-sedimento, es por ello que este organismo se ha incluido en los ensayos estandarizados para valorar efectos de contaminantes asociados a sedimento (ASTM, 1992). En nuestro ensayo multi-especies la población de daphnias libres en el sistema parece ser menos sensible al PCP que la población contenida en el reservorio. La producción de juveniles en la población de daphnias libres alcanzó un máximo a concentraciones de entre 0,4 y 0,5 mg/l, por otro lado los efectos letales no fueron del 100% ni siquiera en la máxima dosis utilizada, lo que corresponde a una concentración en agua de alrededor de 2 mg/l. Todo esto sugiere que no hubo una exposición adicional a PCP a través de la superficie del sedimento, pudiéndose explicar todos los efectos observados por las concentraciones de PCP alcanzadas en agua, indicando ello que la principal ruta de exposición para daphnias fue el agua, incluso en un sistema agua-sedimento.

3. Efectos letales, emergencia de adultos y reproducción de *Chironomus prasinus*

El número de larvas recuperadas de los reservorios tras 48 h de exposición fue 0, 2, 2, 2, 5, 5 y 8 para el Control 1, Control 2 para las dosis 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg y 20 mg/kg respectivamente. Tras una observación cuidadosa de los reservorios pudo constatarse la fuga de las larvas de los reservorios a través de pequeños espacios comprendidos entre la malla de acero inoxidable y la base de cristal. Las larvas de 7 días de vida añadidas en el día 4 también escaparon de los reservorios a pesar de su mayor tamaño. En el día 7 todas las nuevas larvas añadidas pudieron recuperarse de los reservorios situados en los controles (10), sin embargo no pudo encontrarse ninguna relación dosis/respuesta en el caso de las distintas dosis de PCP. Teniendo en cuenta por tanto que las larvas no recuperadas podrían haberse fugado sin sufrir daño alguno, los índices de emergencia de adultos por unidad de ensayo (número de mosquitos/número de larvas añadidas; OECD, 2000a y 2000b) se obtuvieron como rangos en los cuales el valor mínimo se calculó asumiendo que aquellas larvas no recuperadas de los reservorios migraron al sedimento.

El primer adulto se observó el mismo día tanto para controles como para tratamientos (día 11). Este período relativamente corto hasta la emergencia si comparamos con el tiempo observado en el cultivo de *Chironomus prasinus* (17 días) está relacionado con el alto contenido en materia orgánica de los sedimentos. La calidad y cantidad de alimento son factores críticos que regulan el crecimiento y reproducción de los invertebrados bénticos (Ankley *et al.* 1993; Dubé y Culp, 1996; Liber *et al.*, 1996; Sibley *et al.*, 1997). En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos sobre emergencia de adultos y el número de masas depositadas. El menor número de mosquitos y de masas de huevos se observó en la máxima dosis utilizada (20 mg/kg).

Tabla 2: Número de mosquitos en controles y tratamientos considerados por sexo. El índice de emergencia se calculó teniendo en cuenta que las larvas no recuperadas en los reservorios podrían haber escapado al sedimento y sobrevivir hasta su metamorfosis a mosquito, de ahí que se obtenga un rango para el cual el valor máximo corresponde al caso de no considerar las larvas que escaparon. Finalmente se indican el número de masas depositadas.

	Número de mosquitos			Índice de emergencia	Número de masas de huevos depositadas
	♂	♀	Total		
Control 1	14	18	32	0,8 – 1	11
Control 2	13	18	31	0,82 – 1	8
1,25 mg/kg	20	16	36	0,8 – 1	5
2,5 mg/kg	18	15	33	0,87 – 1	7
5 mg/kg	14	11	25	0,6 – 0,83	4
10 mg/kg	16	15	31	0,86 – 1	5
20 mg/kg	9	12	21	0,55 – 0,7	3

El porcentaje de larvas que llegaron a la fase adulta (mosquito) en los controles fue de entre el 80 y el 100 % (Tabla 2). Estos porcentajes se encuentran por encima del límite superior del rango de índices de emergencia (60 - 71%) para ensayos de ciclo de vida con *Chironomus tentans* en sedimentos control (Benoit *et al.*, 1997), lo que demuestra que las condiciones utilizadas en este ensayo multi-especies fueron apropiadas para el desarrollo de *Chironomus prasinus*. En la dosis de 5 mg/kg se observó una aparente reducción del índice de emergencia, sin embargo el límite superior del rango obtenido para esta dosis se encuentra dentro del rango de índices obtenidos para los controles, por otro lado no existe una relación dosis-respuesta ya que la dosis inmediatamente superior (10 mg/kg) no produjo reducción en este índice, por todo ello este efecto no se puede considerar significativo.

Si consideramos el número de masas de huevos depositadas, el análisis estadístico mediante *t* de Student revela diferencias significativas entre los tratamientos y los controles ($t=3,44$ para 5 grados de libertad; $p<0,01$). El mismo análisis estadístico considerando en esta ocasión la proporción macho/hembra demostró que esta relación fue significativamente superior en los tratamientos que en los controles ($t= -2,21$ para 5 grados de libertad; $p<0,05$), siendo estas diferencias superiores si no se incluye la última dosis (20 mg/kg) en la que hubo una reducción del número total de fase adulta ($t= -6,27$ para 4 grados de libertad; $p<0,005$). Sin embargo no hubo relación dosis-respuesta para ninguno de estos efectos (reproducción y relación macho/hembra).

Los efectos sobre el índice de emergencia y sobre el número de masas depositadas se consideran buenos parámetros para estudios de toxicidad crónica con especies de la familia Chironomidae (Taylor *et al.*, 1993; Postma *et al.*, 1995; West *et al.*, 1997; Benoit *et al.*, 1997). Estos efectos subletales pueden relacionarse con cambios a nivel poblacional, ya que una reducción en número de la fase adulta puede ocasionar una reducción del tamaño poblacional (Liber *et al.*, 1996), lo que puede tener serias consecuencias para la viabilidad de una población a largo plazo (Sherratt *et al.*, 1999). Según Ristola *et al.* (1999) las concentraciones de isómeros del Clorofenol que produjeron efectos adversos (efectos letales en la fase larvaria) sobre *Chironomus riparius* ($> 60\text{mg/kg}$ en peso seco de sedimento) se encuentran raramente en condiciones naturales. Sin embargo los autores reconocen la necesidad de obtener más información sobre la sensibilidad de los organismos bénticos que habitan sedimentos contaminados con clorofenoles incluso los posibles efectos a nivel poblacional. Los resultados de este ensayo multi-especies sugieren que concentraciones de 20 mg/kg en peso húmedo de sedimento podrían producir efectos crónicos sobre una especie de invertebrado béntico (*Chironomus prasinus*). Todo ello hace necesario el desarrollo y utilización de ensayos crónicos a la hora de valorar los efectos potencialmente adversos de sustancias asociadas a sedimentos y de los niveles que puedan alcanzar en los medios receptores (Hickey y Martín, 1995).

Los efectos observados en este ensayo multi-especies sobre la proporción macho/hembra pueden ser producto de una selección al azar de sexos, si bien es importante considerar que estudios con compuestos clasificados como disruptores endocrinos han demostrado la capacidad de estos de producir el cambio de sexo en invertebrados acuáticos (Kahl *et al.*, 1997; CSTE, 1999). Algunas organizaciones (CE, 2001) clasifican al PCP como un compuesto capaz de producir disrupción endocrina, por ello se requieren más estudios para dilucidar si las diferencias estadísticamente significativas observadas en este ensayo entre tratamientos y controles referentes a la proporción macho/hembra y el número de masas depositadas son producto del azar o están asociados a los posibles efectos tóxicos del PCP.

La comparación de las respuestas por parte de cada uno de los organismos utilizados en este ensayo multi-especies nos permite concluir que el insecto *C. prasinus* fue menos sensible al PCP que el cladóceros *D. magna*, ya que las dosis que produjeron inhibición de la reproducción e incluso efectos letales del 100% sobre los adultos de *D. magna*, sólo afectaron ligeramente a la emergencia de la fase adulta de *C. prasinus*.

Este ensayo no se diseñó con el propósito de obtener información específica de la toxicidad del PCP, sino que el principal objetivo fue desarrollar un ensayo multi-especies capaz de detectar diferencias en la respuesta de organismos debidas a la ruta de exposición y a la estrategia reproductora, con el fin de proporcionar un método intermedio entre ensayos mono-especie y mesocosmos capaz de proporcionar información relevante desde un punto de vista ecológico. El ensayo multi-especies desarrollado en este capítulo constituye un ensayo de corta duración, fácil de realizar y capaz de valorar la contribución relativa de varias rutas de exposición, a la vez que ofrece la posibilidad de obtener varios parámetros biológicos asociados a efectos crónicos en un ensayo único. Los resultados obtenidos a partir de este ensayo multi-especies pueden emplearse para valorar niveles de contaminación tanto en sedimentos como en agua capaces de producir efectos adversos a los ecosistemas. Por último el ensayo constituye una herramienta alternativa y de bajo coste a tener en cuenta en la redefinición de un proceso ERA.

En el caso de *C. prasinus* la reproducción puede ser valorada directamente contando las masas de huevos depositadas por parte de las hembras que tiene lugar a los 2 ó 3 días de la primera emergencia de adultos. Esto constituye una clara ventaja respecto de otros ensayos que contemplan el ciclo completo de *Chironomus sp.*, ya que la mayoría de estos ensayos se han realizado con *Chironomus tentans*, una especie que además de tener ciclo de vida de mayor duración que *Chironomus prasinus* la emergencia de machos y hembras es asincrónica, por lo que para valorar reproducción en ensayos de ciclo de vida es necesario proporcionar nuevos machos durante el ensayo, con el fin de que fecunden a las hembras que emergen días después.

Por otro lado la posibilidad de valorar efectos asociados a la disrupción endocrina mediante el uso de este ensayo multi-especies constituye una ventaja adicional ya que hasta el momento existen muy pocos ensayos con invertebrados capaces de valorar efectos producidos por esta clase de compuestos.

A la vista de los resultados obtenidos y la experiencia adquirida con este ensayo multi-especies se proponen diseños alternativos orientados a la valoración de aquellos parámetros biológicos que nos proporcionen una mayor información en función del tipo de estudio:

- 1) Los efectos agudos debidos a las concentraciones en agua para el caso de *Chironomus prasinus* no pudieron valorarse debido a la fuga de las larvas desde los reservorios. Todos los esfuerzos encaminados a reducir este hecho fracasaron. Por ello y en futuros experimentos se recomienda realizar este tipo de valoración en un ensayo paralelo e independiente utilizando muestras de agua superficial obtenidas del sistema agua-sedimento.
- 2) Los efectos agudos debidos a las concentraciones en agua para el caso de *Daphnia magna* se pueden valorar de una manera sencilla. Así mismo pueden valorarse la supervivencia y reproducción de organismos de *D. magna* situados en reservorios. Teniendo en cuenta esto se proponen tres diseños diferentes a considerar dependiendo de los objetivos específicos de cada estudio:
 - a) un ensayo estandarizado de reproducción de *D. magna* con los organismos añadidos a los reservorios al inicio del ensayo. De esta manera se valorarían CL50 a las 48 h, crecimiento hasta el día 8 y reproducción hasta el día 16 ó 21 como recomienda la OECD.
 - b) recuperación de los adultos de los reservorios tras la primera puesta permitiendo el crecimiento de su descendencia. De este modo podría valorarse supervivencia y crecimiento de la F₁.
 - c) Finalmente, tal y como se realizó en este ensayo: añadir adultos de *D. magna* en el día 8 para valorar efectos sobre la reproducción debidos a concentraciones del compuesto en agua.

En todos los casos podrían añadirse en el día 8 adultos de *D. magna* libres en el sistema y valorar la reproducción al final de los ensayos. Este diseño en combinación con la propuesta c) permitiría comparar exposición a través del agua y exposición a través de agua y partículas de sedimento, como era nuestro caso de estudio. Para el caso de *Chironomus prasinus*, las larvas añadidas al sistema migrarían de manera natural al sedimento, pudiéndose valorar al final del ensayo bien crecimiento de las larvas o bien maduración sexual y reproducción.

Bibliografía

- Albanis T.Aa y Danis T.G. (1999). Analysis of phenolic compounds in soil and sediment by using SPE-disks and gas chromatography techniques. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 74, 55-67.
- Ankley G.T., Benoit D.A., Balogh J.C., Reynoldson T.B., Day K.E. y Hoke R.A. (1994). Evaluation of potential confounding factors in sediment toxicity tests with three freshwater benthic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 627-635.
- Ankley G.T., Benoit D.A., Hoke R.A., Leonard E.N., West C.W., Phipps G.L. Mattson V.R. y Anderson LA. (1993). Development and evaluation of test methods for benthic invertebrates in sediments: Effects of flow rate and feeding on water quality and exposure conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 12-19.
- ASTM. American Society for Testing and Materials. (1992). Standard guide for conducting sediment toxicity test with freshwater invertebrates. E 1383-92. In *ASTM Annual Book of Standards*, Vol. 11. 04. ASTM, Philadelphia, PA, pp. 1116-1138.
- Benoit D.A., Sibley P.K., Juenemann J.L. y Ankley G.T. (1997). *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluations for use in assessing toxicity of contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1165-1176.
- Borgmann U., Ralph K.M. y Norwood W.P. (1989). Toxicity test procedures for *Hyalella azteca*, and chronic toxicity of cadmium and pentachlorophenol to *H. azteca*, *Gammarus fasciatus* and *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 756-764.
- Campbell P.J., Arnold D.J.S., Brock T.C.M., Grandy N.J., Heger W., Heimbach F., Maund S.J. y Streloke M. (1999). Guidance document on higher-tier assessment for pesticides. SETAC-Europe, Brussels.
- CE. (2001). Comisión Europea. Communication from the Commission to the Council and the European Parliament "on the implementation of the Community Strategy for endocrine disrupters- a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife". COM 262 final- Brussels.
- CSTEE. Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment. (1999). Opinion on Human and Wildlife Health Effects of Endocrine Disrupting Chemicals, with Emphasis on Wildlife and on Ecotoxicology test methods. DG XXIV, European Commission.
- Day K.E., Kirby R.S. y Reynoldson T.B. (1994). Sexual dimorphism in *Chironomus riparius* (Meigen): impact on interpretation of growth in whole-sediment toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 35-39.
- Dubé M.G. y Culp J.M. (1996). Growth responses of periphyton and chironomids exposed to biologically treated bleached-kraft pulp mill effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 2019-2027.
- Gillespie W.B., Rodgers J.H. y Dorn P.B. (1998). Responses of aquatic invertebrates to a linear alcohol ethoxylate surfactant in stream mesocosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 215-221.
- Harkey G.A., Landrum P.F. y Klaine S.J. (1994). Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1315-1329.
- Hickey C.W. y Martin M.L. (1995). Relative sensitivity of five benthic invertebrates species to reference toxicants and resin-acid contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1401-1409.
- Kahl M.D., Makynen E.A., Kosian P.A. y Ankley G.T. (1997). Toxicity of 4-Nonylphenol in a life-cycle test with the midge *Chironomus tentans*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38, 155-160.

- Lewis P.A. y Horning II W.B. (1991). Differences in acute toxicity test results of three reference toxicants on *Daphnia* at two temperatures. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1351-1357.
- Liber K., y Solomon K.R. (1994). Acute and chronic toxicity of 2,3,4,6-tetrachlorophenol and pentachlorophenol to daphnia and rotifers. *Arch. Environ. Contam. Toxicology.* 26, 212-221.
- Liber K., Call D.J., Dawson T.D., Whiteman F.W. y Dillon T.M. (1996). Effects of *Chironomus tentans* larval growth retardation on adult emergence and ovipositing success: implications for interpreting freshwater sediment bioassays. *Hydrobiologia.* 323, 155-167.
- Miyamoto J., Klein W., Takimoto Y. y Roberts T.R. (1985). Critical Evaluations of Model Ecosystems. *Pure and Appl. Chem.* 57, 1523-1536. IUPAC Reports on Pesticides (20). International Union of Pure and Applied Chemistry. Applied Chemistry Division Commission on Pesticide Chemistry.
- Muir J. y Euljee G. (1999). PCP in the freshwater and marine environment of the European Union. *Sci. Total Environ.* 236, 41-56.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. (1993). *Daphnia sp.* acute immobilisation test and reproduction test. Guideline for testing of chemicals, N° 202. Volume 1. Paris France.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. (1998). Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 11. Detailed Review Paper on Aquatic Testing Methods for Pesticides and Industrial Chemicals. Part 1: Report. Paris.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. (2000b). Guidelines for the testing of chemicals. Proposal for a new guideline 219. Sediment-water chironomid toxicity test using spiked water. Draft Document.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. (2000a). Guidelines for the testing of chemicals. Proposal for a new guideline 218. Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment. Draft Document.
- Postma F.J., Mol S., Larsen H. y Admiraal W. (1995). Life-cycle changes and zinc shortage in cadmium-tolerant midges, *Chironomus riparius* (diptera), reared in the absence of cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 117-122.
- Ristola T., Kukkonen J.V.K. y Pellinen J. (1999). Body residues and responses of the midge *Chironomus riparius* to sediment-associated 2,4,5-Trichlorophenol in subchronic and chronic exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 42-49.
- SETAC. Society of Environmental Toxicology and Chemistry-Europe. (1992). Guidance Document on Testing Procedures for Pesticides in Freshwater Mesocosms, pp. 46. SETAC-Europe, Brussels.
- SETAC. Society of Environmental Toxicology and Chemistry-Europe. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. Hill I.A., Matthiessen P. y Heimbach F. (Eds.)
- Sherratt T.N., Roberts G., Williams P., Whitfield M., Biggs J., Shillabeer N. y Maund S.J. (1999). A Life-history approach to predicting the recovery of aquatic invertebrate populations after exposure to xenobiotic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2512-2518.
- Shuabuer-Berigan M.K. y Monson P.D. (1995). Influence of pH on the toxicity of ammonia to *Chironomus tentans* and *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 713-717.

- Sibley P.K., Benoit D.A. y Ankley G.T. (1997). The significance of growth in *Chironomus tentans* sediment toxicity tests: relationship to reproduction and demographic endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 336-345.
- Stewart K.M. y Thompson R.S. (1995). Fluoranthene as a model toxicant in sediment studies with *Chironomus riparius*. *J. Aquat. Ecosyst. Health* 4, 231-238.
- Taylor E.J., Blockwell S.J., Maund S.J. y Pascoe D. (1993). Effects of lindane on the life-cycle of a freshwater macroinvertebrate *Chironomus riparius* Meigen (Insecta:Diptera). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24, 145-150.
- Taylor E.J., Maund S.J, Bennett D. y Pascoe D. (1994). Effects of 3,4-Dichloroaniline on the growth of two freshwater macroinvertebrates in a stream mesocosm. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 29, 80-85.
- Watzin M.C., Roscigno P.F. y Burket D. (1994). Community-level field method for testing the toxicity of contaminated sediments in estuaries. *Environ. Toxicol. and Chem.* 13, 1187-1193.
- West C.W., Ancley G.T., Nichols J.W., Elonen G.E. y Nessa D.E. (1997). Toxicity and bioaccumulation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in long-term tests with the freshwater benthic invertebrates *Chironomus tentans* and *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1287-1294.
- Winner R.W. (1988). Evaluation of the relative sensitivities of 7-d *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* toxicity tests for cadmium and sodium Pentachlorophenate. *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 153-159.
- Woin P. (1998). Short- and Long-Term effects of the pyrethroid insecticide fenvalerate on a invertebrate pond community. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 137-156.

Capítulo IV

Desarrollo de un sistema multi-especies para valorar efectos sobre la reproducción en invertebrados acuáticos.

Un caso de estudio con *Daphnia magna*,
Chironomus prasinus y *Lymnaea peregra*¹

¹ Los resultados de este capítulo han sido aceptados para su publicación en: Sánchez P. and Tarazona J.V. (2002). Development of a multispecies system for testing reproductive effects on aquatic invertebrates. Experience with *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* and *Lymnaea peregra*. Aquatic Toxicology. En prensa.

CAPÍTULO IV:

DESARROLLO DE UN SISTEMA MULTI-ESPECIES PARA VALORAR EFECTOS SOBRE LA REPRODUCCIÓN EN INVERTEBRADOS ACUÁTICOS. UN CASO DE ESTUDIO CON *DAPHNIA MAGNA*, *CHIRONOMUS PRASINUS* Y *LYMNAEA PEREGRINA*.

INTRODUCCIÓN

Los bioensayos mono-especie han sido tradicionalmente el método por excelencia utilizado para la valoración de efectos biológicos producidos por un contaminante. Sin embargo la información obtenida con este tipo de ensayos no es suficiente para predecir los efectos de una sustancia química sobre los ecosistemas. Ello ha puesto de relieve la necesidad de desarrollar nuevos ensayos de toxicidad que incorporen niveles biológicos de organización superiores, entre los cuales se incluyen los ensayos multi-especies (Cairns *et al.*, 1996). Cuando una sustancia química no cumple con los requisitos de la fase preliminar del proceso ERA, los ensayos multi-especies constituyen alternativas disponibles para refinar la caracterización del riesgo. Entre otros objetivos los ensayos multi-especies pueden diseñarse con el fin de demostrar cuán específica es la respuesta de un número reducido de poblaciones a un determinado compuesto tóxico (Campbell *et al.*, 1999).

La reproducción es la función más importante del ciclo de vida de un organismo, su éxito en la reproducción es indicativo de un buen estado de salud (Woin y Brönmark, 1992). Los efectos adversos sobre la reproducción de una especie se trasladan a cambios en las poblaciones (Benoit *et al.*, 1997; Sherratt *et al.*, 1999), cambios que pueden afectar a la abundancia y distribución de dicha especie. Resulta por tanto esencial estudiar los efectos causados por una sustancia sobre la reproducción, y conocer en último lugar los impactos sobre los ecosistemas asociados a su permanencia en el medio durante un largo período. Varios grupos de expertos han concluido que existe una evidencia creciente de efectos adversos potenciales sobre la reproducción humana y la del resto de vida animal producidos por los compuestos llamados disruptores endocrinos (Harrison *et al.*, 1995; Toppari *et al.*, 1995; Weybridge, 1996). Hasta el momento los estudios sobre este tipo de compuestos se han centrado en los efectos producidos a nivel individuo, pero se conoce poco sobre los posibles efectos a nivel poblacional, en parte debido a la falta de metodologías disponibles ya que los bioensayos convencionales no resultan válidos para este fin.

Estudios realizados con invertebrados muestran la capacidad de estos para responder a compuestos clasificados como disruptores endocrinos. La inducción de cambios fisiológicos de tipo masculinización, o desarrollo de órganos sexuales masculinos en hembras

(imposex/intersex), observado en moluscos gasterópodos representa el mejor ejemplo de disrupción endocrina en invertebrados asociada a la presencia de contaminantes en el medio ambiente (Matthiessen y Gibbs, 1998; Davies *et al.*, 1999), y con consecuencias a escala poblacional derivadas de alteraciones en la reproducción. Los estudios de Oehlmann *et al.* (2000) muestran la sensibilidad del caracol de agua dulce *Marisa cornuarietis* expuesto, bajo condiciones de laboratorio y durante un ciclo de vida completo, a dos compuestos xeno-estrogénicos en concentraciones presentes en el medio ambiente, por lo que proponen la utilización de este ensayo como modelo para la identificación de efectos producidos por disruptores endocrinos en invertebrados.

Los disruptores endocrinos también pueden ejercer efectos adversos en el desarrollo de especies de insectos, ya que la muda durante la fase larvaria, la pupación y metamorfosis hasta la fase adulta está regulada hormonalmente (Subramanian y Varadaraj, 1993; Meregalli *et al.*, 2001). Los bioensayos con especies pertenecientes al género *Chironomus sp.* son comunes en estudios sobre toxicidad de compuestos asociados a sedimentos. Este tipo de ensayos están diseñados normalmente para determinar las concentraciones del compuesto que producen mortalidad en larvas, afectan al crecimiento larvario o al desarrollo hasta la fase adulta de mosquito. Sin embargo hasta el momento solamente existen unos pocos estudios aislados diseñados para valorar efectos de compuestos asociados a sedimento considerando el ciclo completo de estos organismos, incluyendo el fenómeno de la reproducción (Ristola *et al.*, 2001). Sibley *et al.* (2001) han estudiado los factores que afectan a la reproducción de *Chironomus tentans* realizando la importancia de llevar a cabo ensayos de ciclo de vida completo cuando la valoración de efectos se centre en parámetros de toxicidad asociados al fenómeno de la reproducción.

Existen asimismo estudios que demuestran la capacidad de determinados compuestos disruptores endocrinos de interferir en el metabolismo hormonal, inducir la masculinización, reducir la fecundidad y en última instancia afectar la reproducción de *Daphnia magna* (Baldwin *et al.*, 1997; Gerritsen, 1997; Ankley *et al.*, 1998).

Con el fin de establecer las condiciones óptimas de un ensayo multi-especies con tres especies de invertebrados de distinta estrategia reproductora: *Daphnia magna* (Cl. Crustacea, Subo. Cladocera), *Chironomus prasinus* (Cl. Insecta, O. Dípteros) y *Lymnaea peregra* (Cl. Gastropoda, O. Basommatophora) se realizaron una serie de experimentos con sistemas agua-sedimento sin exposición a compuestos tóxicos. Teniendo en cuenta la duración del ciclo de vida de cada especie y los distintos tipos de reproducción: asexual por partenogénesis en el primer caso, sexual con dimorfismo sexual de la fase adulta en el caso de *C. prasinus* y hermafroditismo con fecundación cruzada en el caso de *L. peregra*, se aborda la elección de los estados del ciclo de vida a considerar en el ensayo así como los parámetros biológicos capaces de detectar cualquier efecto relevante en la reproducción de cada especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Selección de organismos utilizados en el ensayo multi-especies

Daphnia magna fue seleccionada como especie representativa de la columna de agua y con reproducción asexual en nuestro ensayo multi-especies. Esta especie se cultiva en el Laboratorio de Ecotoxicología (INIA) de acuerdo con las recomendaciones de la OECD. Bajo estas condiciones *Daphnia magna* se reproduce asexualmente por partenogénesis, proporcionando individuos juveniles y adultos durante todo el año.

Chironomus prasinus fue elegida como especie representativa de sedimento y con reproducción sexual. Esta especie se cultiva en el Laboratorio de Ecotoxicología (INIA) siguiendo las condiciones de cultivo descritas en el apartado de material y métodos del Capítulo III.

Finalmente la tercera especie a incluir en el ensayo multi-especies debía cumplir dos requisitos: ser de agua dulce y hermafrodita, ello condujo a considerar una especie del género *Lymnaea*, gasterópodo de agua dulce utilizado en Ecotoxicología, específicamente *Lymnaea peregra*. Organismos de esta especie fueron recolectados en el arroyo Valdejudíos, cuyas aguas confluyen en el río Jarama (Madrid) e identificados en el Museo Nacional de CC. Naturales.

2. Diseño del ensayo multi-especies con tres especies seleccionadas

El ensayo se realizó en tres sistemas agua-sedimento preparados en sendos acuarios de cristal (20x25[altura]x40cm). Como sedimento se utilizó arena industrial lavada añadida hasta un espesor de entre 2 y 3 cm. Sobre el sedimento se añadieron 5 L de agua de manantial, los cuales se mantuvieron en aireación constante durante todo el experimento. La temperatura se ajustó a 20°C \pm 2 y la luz a una intensidad de 1000 lux con un fotoperiodo de 16:8 horas de luz:oscuridad.

A cada acuario se añadieron: 10 juveniles menores de 24 h de *Daphnia magna* y 30 quironómidos en el 4^o estadio de su fase larvaria (estadio previo a la pupación). En el caso de *Lymnaea peregra* se escogieron adultos con una longitud de 10 \pm 2 mm y se añadieron 20 individuos en cada acuario. No se consideró necesario un período de acondicionamiento para *Lymnaea peregra*, ya que las características físico-químicas del agua superficial eran similares a las del arroyo de donde procedían los individuos, y por otro lado no iban a ser expuestos a ningún compuesto tóxico durante el experimento. En la Figura 1 se muestra un esquema del sistema y fotos de las replicas de los acuarios.

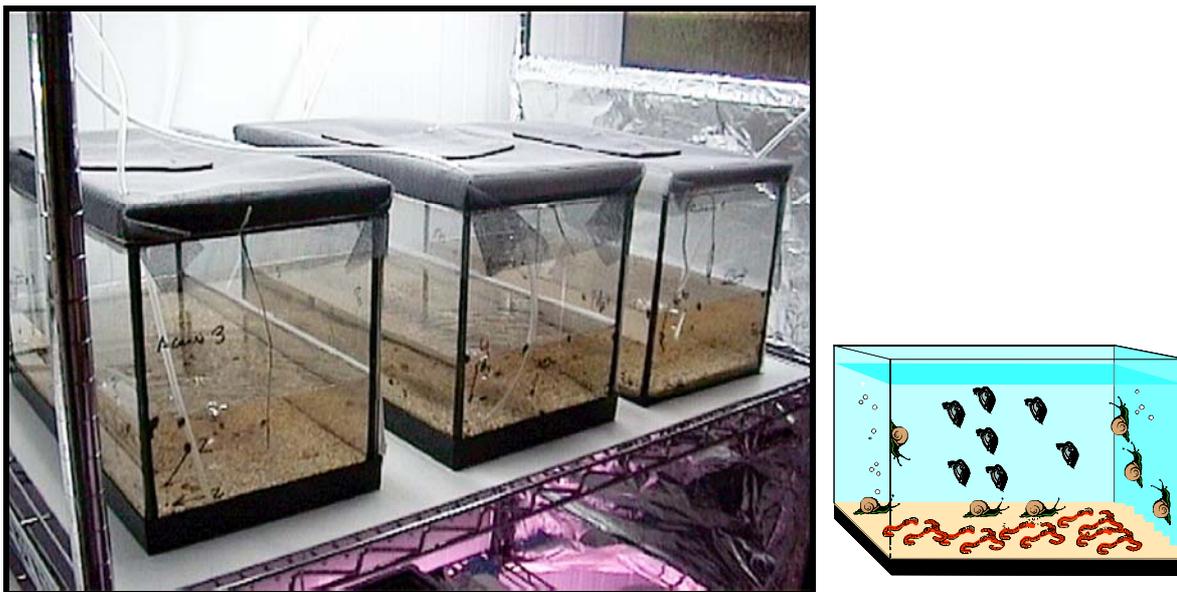


Figura 1: Ensayo multi-especies en sistemas agua-sedimento preparados en acuarios. En el interior de cada acuario, tal y como se muestra en el esquema (arriba a la derecha), se añadieron organismos de las especies *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* y *Lymnaea peregra*. Al lado se muestra un acuario en detalle.



El día de inicio del ensayo se añadieron a cada acuario 70 mg de pienso para cíclidos (TetraDiscus®) y 40 ml de *Chlorella vulgaris* (1,25 mg C/ml). A partir del día 15 y hasta el día 30 de ensayo la cantidad de TetraDiscus® se aumentó hasta 200 mg, mientras que la cantidad añadida de alga se mantuvo en 40 ml. Desde el día 30 y hasta el final del ensayo no se añadió *Chlorella vulgaris* y se aumentó la cantidad de TetraDiscus® hasta 400 mg. Estos aportes alimenticios se realizaron todos los lunes, miércoles y viernes de duración del ensayo.

La duración total del ensayo multi-especies fue de 46 días. Las pérdidas de agua por evaporación fueron compensadas regularmente con agua Mili Q. En los días previos a la emergencia de la fase mosquito de la generación F₀ y F₁ de *Chironomus prasinus*, los acuarios se cubrieron con mallas para impedir su fuga.

3. Selección de parámetros biológicos a valorar en cada una de las tres especies

La selección de parámetros biológicos se centró en la valoración del fenómeno de la reproducción, sin embargo considerando la duración total del ensayo y el ciclo de vida de cada una de las especies, el ensayo podría caracterizarse como: a) ensayo multigeneracional en el caso de *Daphnia magna*, b) ensayo de ciclo de vida completo para el caso de *Chironomus prasinus* y c) ensayo de reproducción en el caso de *Lymnaea peregra*.

Para valorar la reproducción y crecimiento de la población de *Daphnia magna* se utilizaron dos métodos diferentes:

Método A: A partir del Día 15 de ensayo, dos veces por semana se realizaron fotografías con una cámara digital (Sony, DCR-PC5E) en cuatro posiciones diferentes de la columna de agua utilizando para el enfoque un fondo de cuadrícula 4x4 mm situado en el exterior de una de las paredes mayores de cada acuario (Figura 2). Las imágenes se grabaron y descargaron con la ayuda del software asociado PictureGear 4.1 Lite, para su posterior análisis. Las fotografías se analizaron en un programa de tratamiento de imágenes (Adobe® Photoshop® 4.0 LE) mediante el cual se determinó la densidad de daphnias (daphnia/cuadrado) en cada imagen.

Método B: A partir del Día 24 de ensayo, dos veces por semana y mediante una bomba de vacío de membrana a un flujo de 6 L/min (Dinko D-95) se tomaron cuatro muestras de 250 ml de agua superficial, en distintos puntos y a la misma profundidad de cada acuario. En cada muestra se contaron juveniles y adultos de *Daphnia magna*, tras lo cual las muestras de agua conteniendo los individuos se devolvieron a su respectivo acuario.

El último día del ensayo (Día 46) el agua superficial se filtró a través de una malla de 160 µm de luz, determinándose el peso húmedo de la biomasa en la columna de agua y peso seco tras mantener durante 24 h en desecador.

La reproducción de *Chironomus prasinus* se valoró determinando el número de larvas F_0 (añadidas al inicio del ensayo) que alcanzaron la fase mosquito (emergencia F_0) diferenciando entre machos y hembras, así como el número de masas de huevos F_1 depositadas (Figura 3). La fase mosquito fue retirada por aspiración, permitiendo el desarrollo de las masas de huevos F_1 . La emergencia de adultos F_1 y el número de masas de huevos F_2 se determinaron igualmente. Las larvas F_1 fueron contadas tras ser recuperadas al final del ensayo mediante remoción de los sedimentos con agua a presión y posterior filtrado de ésta a través de una malla de 160 μm de luz.

Para la valoración de la reproducción de *Lymnaea peregra* se consideraron puestas de huevos, eclosiones y número de caracoles juveniles. Las masas de huevos depositadas por los adultos en las paredes del acuario se identificaron y marcaron para ser fotografiadas a distintos tiempos mediante una cámara digital (Sony, DCR-PC5E). Las fotografías se descargaron con la ayuda del Software asociado PictureGear 4.1 Lite. De esta manera obtenemos imágenes seriadas del desarrollo de las masas de huevos. Las imágenes grabadas fueron recuperadas mediante Adobe® Photoshop® 4.0 LE pudiéndose determinar el número de huevos (Figura 4) y de eclosiones por masa. Por otro lado a partir del día 24 de ensayo se determinó dos veces por semana el número de caracoles juveniles (F_1) presentes en las paredes del acuario, considerando bien la mitad o bien la cuarta parte de la superficie total del acuario. Por otro lado se determinaron densidades de caracoles juveniles F_1 utilizando las imágenes obtenidas para la determinación de densidades de *Daphnia magna* en la columna de agua (método A) y siguiendo por tanto el mismo procedimiento anteriormente descrito. Al final del ensayo (Día 46) se recuperaron y contaron caracoles adultos (F_0) añadidos al inicio y juveniles (F_1).

4. Tratamiento de datos y análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATGRAPHICS Plus versión 4.1.

Daphnia magna

La densidad de población de *Daphnia magna* se expresó como daphnia/cuadrado para el método A y daphnia/volumen para el método B. Las medias de dichos valores correspondientes a cada día se ajustaron mediante regresión lineal simple y el análisis de correlación entre ambos métodos mediante una transformada de Fisher.

Para cada uno de los métodos (A y B) las diferencias entre acuarios y/o debidas al tiempo transcurrido desde el inicio del ensayo se analizaron mediante Análisis de Varianza (ANOVAs) de una vía y/o dos vías, tanto para el conjunto de valores obtenidos a lo largo del experimento, como para las medias obtenidas en cada día de medida.

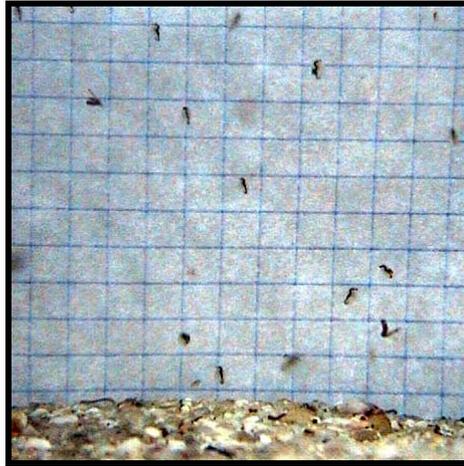


Figura 2: Imagen para determinar densidades expresadas como daphnia/cuadrado (Método A)

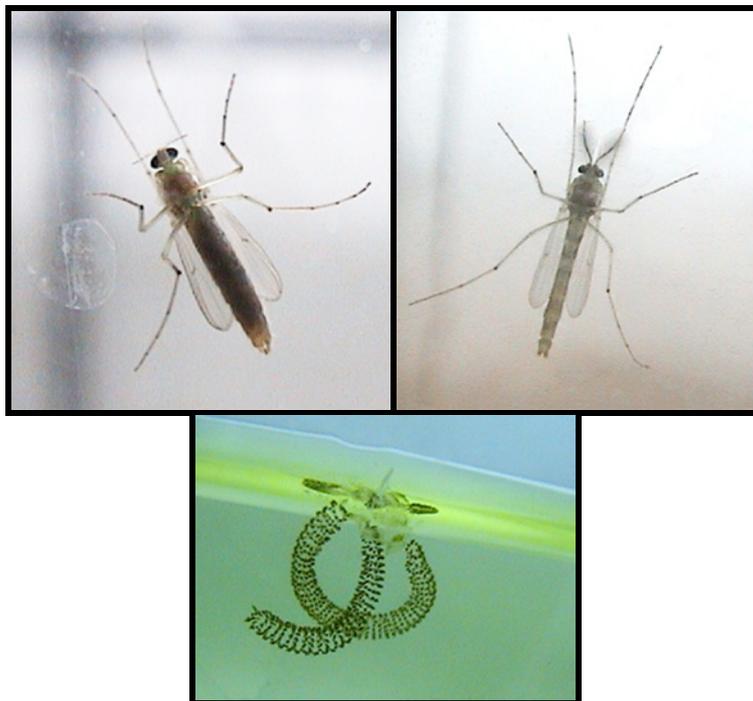


Figura 3: Fase adulto hembra (a la izquierda) y macho (a la derecha) de *Chironomus prasinus*, y dos masas de huevos depositadas (abajo).

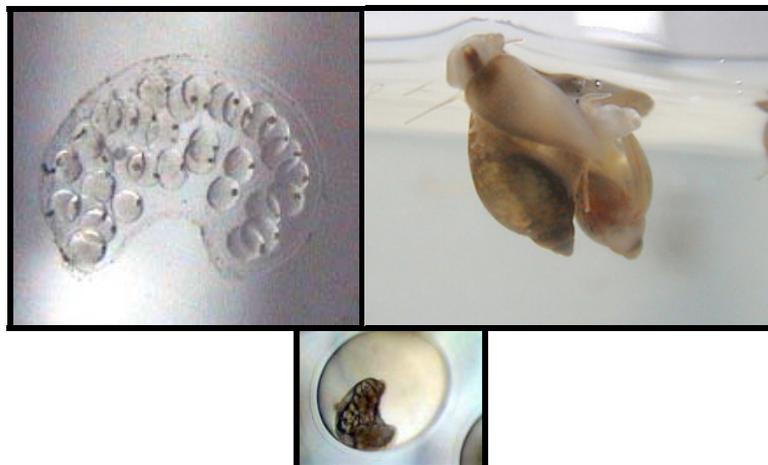


Figura 4: Masa de huevos (izquierda), pareja precópula y detalle de huevo (abajo) de *Lymnaea peregina*

Chironomus prasinus

Los valores obtenidos de emergencia de fase adulta F_1 se representaron como número acumulativo en el tiempo, obteniéndose curvas de maduración de F_1 para cada uno de los acuarios.

Lymnaea peregra

Todas las correlaciones entre abundancia o densidad de caracoles F_1 obtenidas por conteo in situ para $\frac{1}{2}$ ó $\frac{1}{4}$ de la superficie total del acuario, o por el método A, fueron correlacionadas como se ha indicado para el caso de los métodos A y B utilizados para *Daphnia magna*.

Las diferencias en abundancia o densidad de caracoles F_1 entre acuarios se analizaron mediante Análisis de Varianza (ANOVAs) de una vía.

Los valores obtenidos del número de huevos F_1 se representaron como valores acumulados en el tiempo, obteniéndose curvas de reproducción para cada uno de los acuarios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Reproducción y crecimiento de la población de *Daphnia magna*

Buikema y Voshell (1993) recomiendan la utilización de variables poblacionales del tipo biomasa y densidad en ensayos multi-especies, por lo que ambos parámetros fueron determinados en la columna de agua para valorar el crecimiento y reproducción de *Daphnia magna* (Tabla 1). Sin embargo, cuando se recuperó la biomasa del agua superficial se observó que esta correspondía tanto a *Daphnia magna* como a ejemplares de *Lymnaea peregra*, por lo que este parámetro hacía referencia a la abundancia en la columna de agua de ambas especies. Teniendo en cuenta que el peso/individuo de ambas especies es muy diferente, la biomasa como parámetro único no resulta conveniente para determinar la abundancia de *Daphnia magna*. La abundancia relativa de ambas especies podría determinarse mediante la relación entre peso húmedo y peso seco de biomasa en agua. La medida adicional de relaciones Ca/C, Ca/N o Ca/Proteínas incrementaría la validez de dicho parámetro.

Si bien la biomasa no resultó un parámetro *per se* apropiado para determinar la abundancia de *Daphnia magna*, la densidad obtenida como daphnia/cuadrado y daphnia/ml (métodos A y B, respectivamente) permitió una valoración efectiva del crecimiento y reproducción de *Daphnia magna*, proporcionando información sobre el estado de la población en el tiempo (Tabla 1).

Tabla 1: Parámetros biológicos determinados para *Daphnia magna* en el ensayo multi-especies, y peso de la biomasa recuperada de la columna de agua.

PARÁMETROS BIOLÓGICOS		Acuario 1 (n=4)	Acuario 2 (n=4)	Acuario 3 (n=4)
daphnias/cuadrado (Método A)	Día 15	0,104 ±0,027	0,131 ±0,072	0,179 ±0,134
	Día 22	0,133 ±0,061	0,211 ±0,092	0,180 ±0,108
	Día 25	0,073 ±0,035	0,428 ±0,238	0,208 ±0,025
	Día 29	0,143 ±0,052	0,291 ±0,085	0,096 ±0,055
	Día 32	0,149 ±0,033	0,351 ±0,228	0,199 ±0,056
	Día 37	0,253 ±0,057	0,417 ±0,196	0,124 ±0,037
	Día 44	0,336 ±0,048	0,519 ±0,214	0,160 ±0,050
	Media	0,17 ±0,09	0,33 ±0,13	0,16 ±0,04
daphnias/ml (Método B)	Día 24	0,224 ±0,16	0,119 ±0,076	0,085 ±0,037
	Día 26	0,21 ±0,097	0,233 ±0,116	0,128 ±0,082
	Día 30	0,159 ±0,131	0,399 ±0,456	0,201 ±0,206
	Día 33	0,243 ±0,16	0,221 ±0,149	0,099 ±0,044
	Día 38	0,396 ±0,256	0,333 ±0,356	0,224 ±0,141
	Día 40	0,328 ±0,228	0,441 ±0,324	0,194 ±0,023
	Media	0,26 ±0,09	0,29 ±0,12	0,15 ±0,06
BIOMASA (gr)	Peso seco	0,3382	0,1521	0,199
	Peso húmedo	6,4496	4,6834	2,862

Las diferencias obtenidas entre los valores de biomasa en la columna de agua no se confirman con los resultados de densidades obtenidos por ambos métodos, ya que todas las medias de densidades por acuario variaron dentro de un factor de 2.

El conjunto de valores obtenidos por el método A (daphnia/cuadrado) y por el método B (daphnia/ml) emparejados por días similares de medida se ajustaron a una recta mediante una regresión lineal simple ($Y = 0,114 + 0,505X$; $R = 0,59$). En la Figura 5 se representa la recta resultante de dicho ajuste y la obtenida considerando la intersección en el origen de coordenadas. El resultado del análisis de correlación demostró que existe una relación positiva estadísticamente significativa entre ambos métodos ($F = 8,34$ para 17 grados de libertad; $p = 0,0107$). En la Tabla 2 se resumen los análisis de varianza realizados con el conjunto de datos de densidades (daphnia/cuadrado y daphnia/ml) obtenidos por ambos métodos, demostrando que la sensibilidad del método A fue mayor que la del método B. Para el método A existieron diferencias significativas entre acuarios tanto para el conjunto de datos ($n=84$; $F = 14,43$ para 2 y 81 grados de libertad; $p = 0,0000$), como para las medias correspondientes a cada día de medida ($n=21$; $F = 7,06$ para 2 y 18 grados de libertad; $p = 0,0054$), mientras que en el caso del método B no existen diferencias entre acuarios ni para el conjunto de datos ($n=72$; $F = 3,02$ para 2 y 69 grados de libertad; $p = 0,055$), ni para la media de cada día ($n=18$; $F = 3,58$ para 2 y 15 grados de libertad; $p = 0,054$).

La principal ventaja del método A es que es un método no invasivo por lo que no produce ninguna perturbación en el sistema, por otro lado las imágenes obtenidas pueden guardarse y almacenarse para su análisis después del ensayo. Sin embargo su mayor sensibilidad respecto del método B puede asociarse también a la presencia de falsos positivos. El método B resulta ventajoso al permitir una estimación de la estructura de la población, ya que es posible diferenciar entre abundancia de juveniles y de adultos. Por lo tanto se puede concluir que la mejor opción para el protocolo final es la combinación de ambos métodos. El protocolo propuesto consistiría en realizar fotografías diariamente (12 por acuario) y recoger muestras de agua una vez por semana. El crecimiento de la población de *Daphnia magna* se cuantificaría utilizando cuatro fotografías digitales escogidas al azar de entre las doce realizadas en un mismo día, el resto de fotografías se conservarían para su posterior análisis en el caso de que fuera necesario confirmar posibles diferencias. Por otro lado la estructura de la población se determinaría contando en muestras de 250ml, recogidas semanalmente y cuatro por acuario, el número de neonatos (para confirmar la reproducción en ese momento) y el número de nuevos adultos (para confirmar que alcanzan la madurez para reproducirse). Esta propuesta supone una alternativa de bajo coste y permite además valorar la evolución de la población (crecimiento y estructura) sin ocasionar grandes perturbaciones en el sistema.

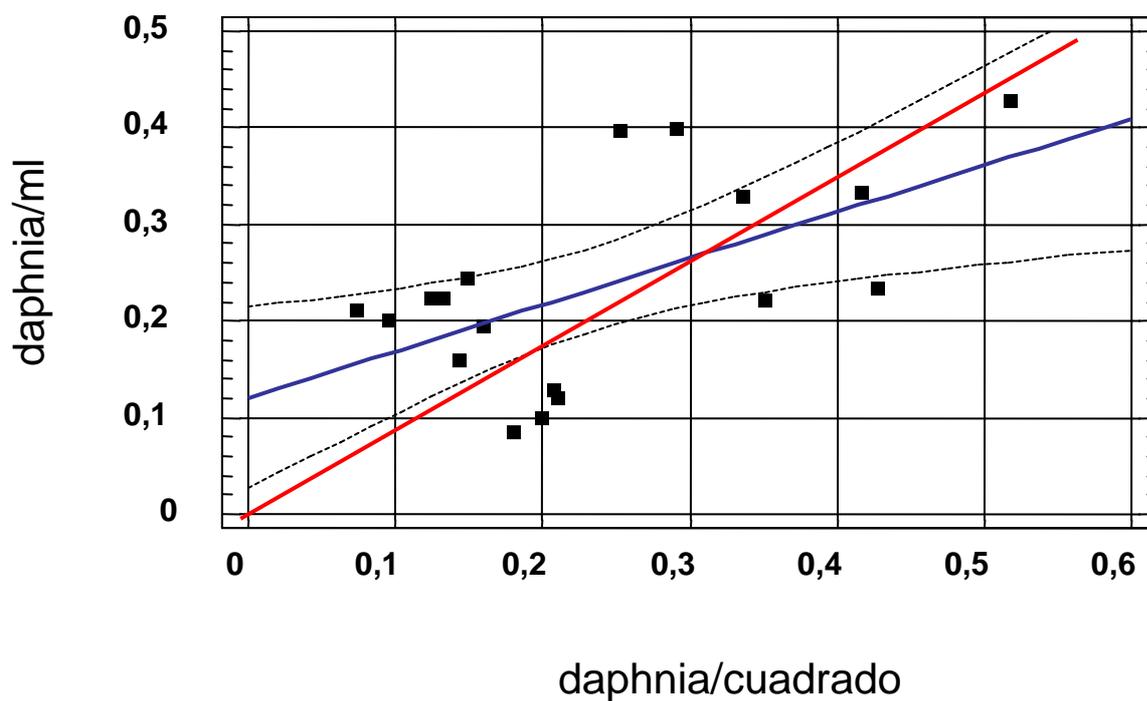


Figura 5: Correlación entre los dos métodos utilizados (A y B) para calcular la densidad de población de *Daphnia magna* en la columna de agua. Se representan en azul el ajuste a la ecuación de una recta: $[(\text{daphnia/ml}) = 0,114 + 0,505 \times (\text{daphnia/cuadrado})]$; y los límites de confianza del 95% (línea de puntos). En rojo se representa el ajuste considerando la intersección en el origen de coordenadas siendo la ecuación:

$$[(\text{daphnia/ml}) = 0,883 \times (\text{daphnia/cuadrado})].$$

Tabla 2: Resultados de los ANOVAs (una vía y/o dos vías) para densidades de *Daphnia magna* determinadas por los métodos A y B considerando todos los valores o las medias correspondientes a cada día de medida. Se consideran las variables tiempo (día desde el inicio del ensayo) y/o acuario.

ANOVAs	FACTOR	METODO A (daphnias/cuadrado)	METODO B (daphnias/ml)
Conjunto de datos	Número de Acuario Tiempo	n=84 $F=17,1$ (2 grados de libertad) $p=0,0000$ $F=3,50$ (6 grados de libertad) $p=0,0042$	n=72 $F=3,18$ (2 grados de libertad) $p=0,0484$ $F=1,72$ (5 grados de libertad) $p=0,1437$
Conjunto de datos	Número de Acuario	n=84 $F=14,43$ (2 y 81 grados de libertad) $p=0,0000$	n=72 $F=3,02$ (2 y 69 grados de libertad) $p=0,0554$
Medias de cada día	Número de Acuario	n=21 $F=7,06$ (2 y 18 grados de libertad) $p=0,0054$	n=18 $F=3,58$ (2 y 15 grados de libertad) $p=0,0537$
Conjunto de datos (A1)	Tiempo	n=28 $F=15,45$ (6 y 21 grados de libertad) $p=0,0000$	n=24 $F=0,92$ (5 y 18 grados de libertad) $p=0,4912$
Conjunto de datos (A2)	Tiempo	n=28 $F=2,35$ (6 y 21 grados de libertad) $p=0,0678$	n=24 $F=0,73$ (5 y 18 grados de libertad) $p=0,6083$
Conjunto de datos (A3)	Tiempo	n=28 $F=1,13$ (6 y 21 grados de libertad) $p=0,3780$	n=24 $F=1,12$ (5 y 18 grados de libertad) $p=0,3847$

2. Crecimiento y reproducción de *Chironomus prasinus* durante un ciclo de vida completo

Los ensayos que contemplan el ciclo de vida completo de quironómidos son capaces de detectar toxicidad subletal, ya que permiten valorar efectos sobre todas las fases del ciclo de vida, incluyendo aquellas que pueden ser más sensibles a determinados compuestos químicos (ej. la primera fase larvaria) (Benoit *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 2000). Los resultados de los parámetros biológicos obtenidos en este ensayo multi-especies para el caso de *Chironomus prasinus* se presentan en la Tabla 3. La emergencia de adultos F_0 y la puesta de masas de huevos F_1 fue similar en todos los acuarios. Estos resultados confirman que la presencia de *Daphnia magna* y *Lymnaea peregra* no interfiere en el desarrollo de las larvas del insecto.

La emergencia acumulativa de adultos F_1 se representa en la Figura 6. En el Acuario 1 se observó la mayor emergencia, la cual mostró una relación inversa con respecto al número de larvas F_1 recuperadas en los sedimentos al final del experimento (Tabla 3). Estos resultados indican que el menor número de individuos que alcanzaron la fase adulta no fue debido a una reducción de la reproducción en el acuario, sino a una mayor duración del ciclo de vida. La primera emergencia de la fase adulto F_1 tuvo lugar el día 32 en el Acuario 3, mientras que en los Acuarios 1 y 2 la fase mosquito F_1 fue observada por primera vez los días 24 y 26, respectivamente. La pendiente de la fase exponencial de maduración de las curvas de la Figura 5 consideradas a partir del día 37 fueron 69,8; 47,6 y 25,5 para el Acuario 1, el Acuario 2 y el Acuario 3 respectivamente, indicando un desarrollo más rápido en el Acuario 1. Este efecto puede relacionarse con la disponibilidad de alimento y la densidad de larvas.

La cantidad de alimento añadido a cada acuario fue la misma, sin embargo esta cantidad constituye un menor aporte alimenticio por larva en los acuarios 2 y 3. Estudios previos han demostrado que la escasez de alimento puede producir un retraso del ciclo de vida de quironómidos, requiriéndose un mayor período de tiempo para completarlo (Liber *et al.*, 1996; Sibley *et al.*, 1997; Ristola *et al.* 2001). Por tanto, para evitar la variabilidad dependiente del número de larvas F_1 entre acuarios se propone retirar las masas de huevos F_1 de cada acuario y permitir la eclosión de los huevos en vasos de precipitado que contengan agua recogida de los respectivos acuarios. Una vez eclosionados los huevos F_1 se cuentan 30 larvas F_1 menores de 48 h, las cuales serán añadidas a sus respectivos acuarios, pudiéndose valorar el desarrollo y reproducción de F_1 .

Table 3: Parámetros biológicos determinados para *Chironomus prasinus* en el ensayo multi-especies. El número de larvas F₁ fue determinado al final del ensayo

PARÁMETROS BIOLÓGICOS		Acuario 1	Acuario 2	Acuario 3	
Emergencia de mosquitos F ₀	Día 3	♂		2	
		♀		3	
	Día 4	♂		1	5
		♀	5	8	13
	Día 5	♂	1	3	6
		♀	14	11	15
	Día 8	♂	3	2	2
		♀	16	16	9
		†	2	7	9
	Total		21	25	20
Masas de Huevos F ₁		9	11	10	
Emergencia de mosquitos F ₁		686	470	232	
Masas de huevos F ₂		99	28	17	
Larvas F ₁		269	902	2448	

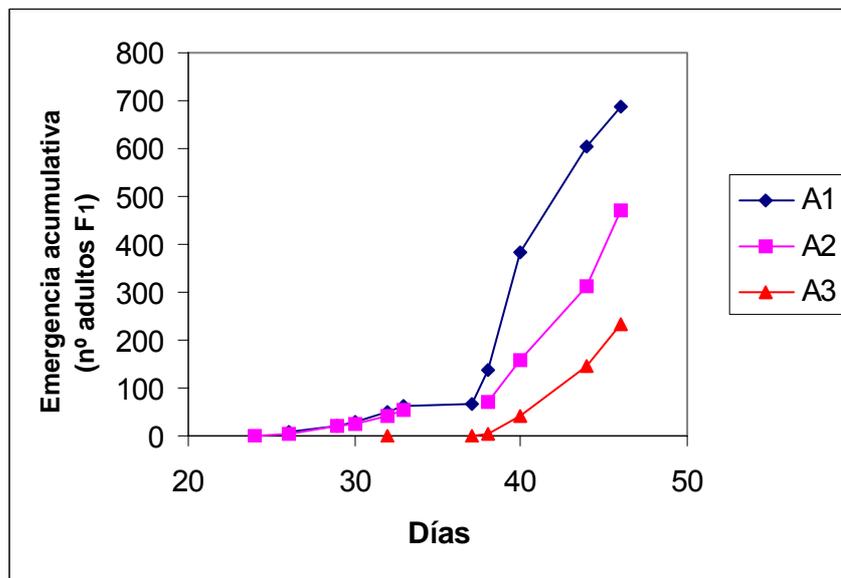


Figura 6: Curva de maduración de *Chironomus prasinus* para la generación F₁ obtenida como número acumulativo de la fase adulta hasta el final del ensayo multi-especies.

3. Crecimiento y reproducción de *Lymnaea peregra*

Los parámetros biológicos obtenidos para *Lymnaea peregra* se representan en la Tabla 4. No hubo diferencias significativas entre acuarios ni para el número de caracoles F_1 encontrados en la mitad de la superficie total ($n=21$; $F = 1,08$ para 2 y 18 grados de libertad; $p = 0,3603$) ni para el número de caracoles encontrados en la cuarta parte de la superficie total del acuario ($n=18$; $F = 0,54$ para 2 y 15 grados de libertad; $p = 0,5958$). Existe además una correlación estadísticamente significativa entre los valores obtenidos para ambas unidades de superficie ($F = 9,33$ para 14 grados de libertad; $p = 0,0092$) cuando se ajustan a una recta emparejando valores pertenecientes al mismo día de medida ($Y = 30,13 + 1,2X$; $R = 0,65$). La densidad de caracoles F_1 fue también calculada por el método A utilizado para determinar densidades de *Daphnia magna*. Sin embargo, este método no resultó apropiado para valorar la densidad de *Lymnaea peregra*. No existe una correlación estadísticamente significativa entre la abundancia de caracoles F_1 obtenida por los dos métodos utilizados (conteo *in situ* o densidades obtenidas mediante imágenes de la columna de agua) ($R = 0,398$; $F = 3,01$ para 17 grados de libertad; $p = 0,1018$).

La producción de huevos y su viabilidad asociada a un correcto desarrollo embrionario y al número de eclosiones, son parámetros sensibles para la valoración de efectos en la reproducción de especies como *Isidorella newcombi* y *Lymnaea stagnalis* (Woin y Brönmark, 1992; Gomot, 1998; Wilson *et al.* 2000). El número acumulativo de huevos depositados por *Lymnaea peregra* en el ensayo multi-especies se representa en la Figura 6. La mayor producción de huevos tuvo lugar en el Acuario 1 con un total de huevos en las masas identificadas de 549. Cada curva de la Figura 7 se ajustó a una recta cuya pendiente fue 19,8; 13,3 y 15,9 para el Acuario 1, Acuario 2 y Acuario 3 respectivamente. Las diferencias obtenidas entre acuarios relativas al número de huevos F_1 acumulativo pueden relacionarse directamente con la mortalidad de adultos F_0 observada.

En los estudios de Segué y Bluzat (1983) la fecundidad de *Lymnaea stagnalis* se determinó como una relación entre el número de huevos y el total de adultos. En nuestro ensayo multi-especies se alcanzó en el caso del Acuario 3 una mortalidad de adultos F_0 del 30% en el día 15, mientras que en el Acuario 1 y Acuario 2, ambos con una reproducción mayor que la observada en el Acuario 3, este porcentaje se alcanzó el día 22. Por otro lado en el Acuario 3 se observó la mayor mortalidad de adultos F_0 al final del experimento (80%) y a su vez el menor valor acumulativo de huevos F_1 (285).

El alto porcentaje de mortalidad de adultos F_1 observado al final del ensayo multi-especies en todos los acuarios (Tabla 4) puede deberse al empleo de organismos recolectados en campo los cuales son más sensibles a las condiciones de laboratorio que organismos criados en el laboratorio (Woin y Brönmark, 1992).

Table 4: Parámetros biológicos determinados para *Lymnaea peregra* en el ensayo multi-especies. El número de juveniles F₁ (densidad en la superficie del acuario) y eclosiones/día se determinaron mediante un seguimiento periódico, los tres parámetros restantes se determinaron al final del ensayo.

PARÁMETROS BIOLÓGICOS	Acuario 1	Acuario 2	Acuario 3
Número de juveniles F ₁	½ superficie total n=7	77 ±17 n=7	87 ±35 n=7
	¼ superficie total n=6	44 ±12 n=6	37 ±12 n=6
Eclosiones/día	2,53 ±1,64 n=27	1,89 ±0,57 n=21	2,58 ±1,18 n=6
Adultos F ₀	10	8	4
Masas de huevos F ₁	37	30	9
Juveniles F ₁	473	152	147

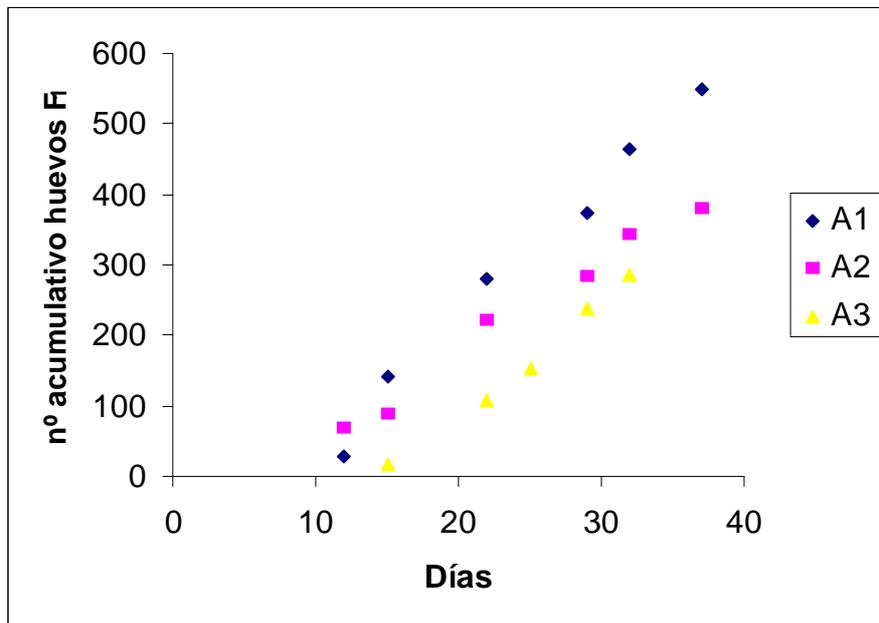


Figura 7: Curva de reproducción de *Lymnaea peregra* obtenida como número acumulado de huevos F₁.

Lam y Calow (1988) al estudiar la contribución de factores ambientales en las variaciones de la forma de las conchas entre distintas poblaciones naturales de *Lymnaea peregra*, observan diferencias para este parámetro biológico entre poblaciones cultivadas en laboratorio y poblaciones naturales. Otro de los factores que pueden haber producido una alta mortalidad de adultos F_0 puede ser la condición de semelparidad (los adultos se reproducen una sola vez en su vida tras lo cual mueren), descrita en algunas especies de caracoles de agua dulce como *Lymnaea stagnalis* (Geraerts y Joosse, 1984). Por ello se propone la utilización de poblaciones mantenidas en laboratorio, lo que permitiría relacionar la producción de huevos con la mortalidad de adultos y obtener así datos de fecundidad. Aunque no existen métodos estandarizados para el cultivo de especies del género *Lymnaea*, la experiencia adquirida en nuestro laboratorio y la existencia de estudios aislados con especies de la familia Lymnaeidae (Madsen y Monrad, 1981; Sánchez *et al.*, 1995; Agrawal, 1999; Pereira de Souza y Magalhaes, 2000) demuestran que es posible mantener y cultivar bajo condiciones de laboratorio *Lymnaea peregra*.

Las diferencias observadas en los tiempos de eclosión entre poblaciones naturales de *Lymnaea peregra* se atribuyen a factores ambientales, específicamente a cambios de temperatura del agua (Lam y Calow, 1989). En la Tabla 4 se presentan los resultados para el número de eclosiones por día en el ensayo multi-especies. No se encontraron diferencias significativas entre acuarios para este parámetro biológico ($n=11$; $F = 0,37$ para 2 y 8 grados de libertad; $p = 0,7016$). El ensayo multi-especies está exento de variaciones de temperatura por lo que los resultados concuerdan con las observaciones de Lam y Calow. El número de eclosiones por día es por tanto, en este tipo de ensayos, un parámetro relevante para valorar la reproducción de *Lymnaea peregra* y de fácil determinación.

El número de eclosiones y la densidad de caracoles fueron similares en los tres acuarios (Tabla 4) sin embargo, los parámetros obtenidos al final del experimento y el número acumulativo de huevos indican una mayor reproducción en el Acuario 1. Este efecto puede estar asociado a la abundancia relativa de especies, puesto que el número de individuos pertenecientes a la especie *Chironomus prasinus* fue superior en el Acuario 3. Considerando que el aporte alimenticio fue el mismo en los tres acuarios, este efecto podría estar asociado a una competencia por el alimento entre las dos especies, que habría ocasionado un menor crecimiento de la población de *Lymnaea peregra*. En definitiva la abundancia relativa de especies podría explicar las diferencias entre acuarios, por lo que cualquier mejora orientada a la reducción de esta variable aumentaría la eficacia de este ensayo multi-especies.

Los ensayos multi-especies constituyen herramientas para la valoración de efectos previa a la realización de estudios de mayor coste (ej. mesocosmos y estudios de campo). La incertidumbre sobre su estandarización impide, sin embargo, su integración en los procesos ERA (Buikema y Voshell, 1993; Cairns y Cherry, 1993). Hasta el momento la utilización de los

ensayos multi-especies se incluye en las etapas de refinamiento del proceso y está basado en un análisis caso por caso (EU, 1996; Campbell *et al.*, 1999). La mayoría de los ensayos multi-especies se han realizado con especies pertenecientes a grupos taxonómicos muy diferentes con el fin de cubrir relaciones de tipo depredador/presa. En este sentido el ensayo multi-especies desarrollado en este capítulo supone una innovación ya que en él se representa un único grupo (invertebrados acuáticos) que cubre tres estrategias reproductoras muy diferentes, permitiendo además valorar diferentes rutas de exposición.

Los Comités Científicos de Plantas (SCP) y de Toxicología, Ecotoxicología y Medio Ambiente (CSTEE) de la UE, tras abordar la problemática de la disrupción endocrina, recomiendan el desarrollo de nuevos métodos centrados en la valoración de efectos sobre la reproducción de invertebrados (CSTEE, 1999; SCP, 1999). Los grupos de organismos identificados como mejores candidatos para alcanzar este objetivo son tres: gasterópodos, insectos y crustáceos (deFur *et al.*, 1999). Nuestro ensayo multi-especies incluye una especie de cada uno de los grupos anteriores (*Lymnaea peregra*, *Chironomus prasinus* y *Daphnia magna*), permite determinar parámetros biológicos de relevancia ecológica centrados en la valoración de la reproducción en cada una de las especies seleccionadas, las cuales tienen estrategias de vida muy diferentes. Lo que confirma la validez y capacidad de este método para valorar efectos en la reproducción de invertebrados cubriendo diferentes rutas de exposición. El protocolo final del estudio propuesto se presenta a continuación:

Descripción del sistema: Sistema agua-sedimento preparado con agua de dureza media y arena industrial

Organismos: Juveniles de *Daphnia magna* de menos de 24 h, 4^o estadio larvario de *Chironomus prasinus* y adultos de *Lymnaea peregra*. Las masas de huevos F₁ de quironómidos se transfieren junto con 200ml de agua del sistema a vasos de precipitado. Tras la eclosión 30 larvas se transfieren de nuevo a cada acuario.

Duración del ensayo: Hasta el 80% de emergencia de *Chironomus prasinus* F₁ (alrededor de los 46 días).

Alimentación: Según lo descrito en el apartado de material y métodos

Parámetros biológicos:

<i>Daphnia magna</i>	Evolución de la población (método A)
	Estructura de la población (método B)

Chironomus prasinus Emergencia de mosquitos F_0 y F_1 , y producción de masas de huevos F_2 .
Índices de emergencia de mosquitos F_0 y F_1 .

Lymnaea peregra Evolución de la población (abundancia en superficie por conteo *in situ*)
Número de huevos F_1 acumulativo
Eclosiones/día

Bibliografía

- Agrawal M.C. (1999). New methods of maintenance of freshwater snails for schistosome infections in the laboratory. *Indian J. Anim. Sci.* 69, 301-303.
- Ankley G., Mihaich E., Stahl R., Tillitt D., Colborn T., McMaster S., Miller R. *et al.* (1998). Annual Review. Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environ. Toxicol Chem.* 17, 68-87.
- Baldwin W.S., Grahan S.E., Shez D. y LeBlanc G.A. (1997). Metabolic androgenization of female *Daphnia magna* by the xenoestrogen 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1905-1911
- Benoit D.A., Sibley P.K., Juenemann J.L. y Ancley G.T. (1997). *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluations for use in assessing toxicity of contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1165-1176.
- Buikema AL Jr y Voshell JR Jr (1993). Toxicity studies using freshwater benthic macroinvertebrates. En: Rosenberg DM, Resh VH (eds). *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. Chapman and Hall, New York, pp 344-398.
- Cairns J Jr y Cherry Ds (1993). Freshwater multi-species test systems. En : Calow P (ed). *Handbook of Ecotoxicology*, vol 1. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 101-116.
- Cairns J., Bidwell J.R. y Arnegard M.E. (1996). Toxicity testing with communities: microcosms, mesocosms, and whole-system manipulations. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 147, 45-69.
- Campbell P.J., Arnold D.J.S., Brock T.C.M., Grandy N.J., Heger W., Heimbach F., Maund S.J y Strelake M. (1999). Guidance document on higher-tier aquatic risk assessment for pesticides. SETAC-Europe, Brussels.
- CSTEE. Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment. (1999). Opinion on Human and Wildlife Health Effects of Endocrine Disrupting Chemicals, with Emphasis on Wildlife and on Ecotoxicology test methods. DG XXIV, European Commission.
- Davies I.M., Minchin A., Bauer B., Harding M.J. y Wells D.E. (1999). QUASIMENE laboratory performance study of the biological effects of tributyltin (imposex and intersex) on two marine gastropod molluscs. *J. Environ. Monit.* 1, 233-238.
- DeFur P.L., Crane M., Ingersoll C. y Tattersfield L. (Eds). (1999). Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, testing and assessment. In *Proceedings of the Workshops on Endocrine Disruption in invertebrates*. 12-15 Dec. 1998, Noordwijkerhout, The Netherlands, Pensacola. SETAC Press
- EU (1996). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and Commission Regulation (EC) 1488/94 on risk assessment for existing substances. PARTS I, II, III and IV. Document. ISBN 92-827-8011-2. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- Geraerts, W.P.M. y Joosse J. (1984). Freshwater snails (Basommpatophora). En: *The Mollusca*, vol. 7, Reproduction (ed. A. S. Tompa, N.H. Verdonk y J.A.M. van den Biggelaar), pp.141-207. New York: Academic Press.
- Gerritsen A. (1997). The influence of body size, life stage and sex on toxicity of alkylphenols to *Daphnia magna*. PhD-thesis, University of Utrecht. The Netherlands, 109 pp.

- Gomot A. (1998). Toxic effects of Cadmium on reproduction, development and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 288-297.
- Harrison P.T.C., Humfrey C.D.N., Litchfield M., Peakall D. y Shuker L.K. (1995). IEH Assessment on Environmental Oestrogens: Consequences to human health and wildlife. Medical Research Council, Institute for Environment and Health, Page Bros, Norwich, 107 pp.
- Lam P.K.S. y Calow P. (1988). Differences in the shell shape of *Lymnaea peregrina* (Müller) (Gastropoda: pulmonata) from lotic and lentic habitats; environmental or genetic variance?. *J. Moll. Stud.* 54, 197-207.
- Lam P.K.S. y Calow P. (1989). Intraspecific life-history variation in *Lymnaea peregrina* (Gastropoda: Pulmonata). I. Field study. *J. anim. ecol.* 58, 571-588.
- Liber K., Call D.J., Dawson T.D., Whiteman F.W., y Dillon T.M. (1996). Effects of *Chironomus tentans* larval growth retardation on adult emergence and ovipositing success: implications for interpreting freshwater sediment bioassays. *Hydrobiologia* 323, 155-167.
- Madsen H. y Monrad J. (1981). A method for laboratory maintenance of *Lymnaea natalensis* and for mass production of *Fasciola gigantica* metacercariae. *J. Parasitol* 67, 735-737
- Matthiessen P. y Gibbs P.E. (1998). Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 37-43.
- Meregalli G., Pluymers L., Ollevier F. (2001). Induction of mouthpart deformities in *Chironomus riparius* larvae exposed to 4-n-nonylphenol. *Environ. Pollut.* 111, 241-246.
- Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Tillmann M. y Market B. (2000) Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and Octylphenol as Xeno-Estrogens. *Ecotoxicology*, 9, 383-397.
- Pereira de Souza C. y Magalhaes K.G. (2000). Rearing of *Lymnaea columella* (Say, 1817), intermediate host of *Fasciola hepática* (Linnaeus, 1758). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 95, 739-741.
- Ristola T., Parker D. y Kukkonen J.V.K. (2001). Life-cycle effects of sediment-associated 2,4,5-trichlorophenol on two groups of the midge *Chironomus riparius* with different exposure histories. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1772-1777.
- Sánchez R.S., Perera G. y Sánchez J. (1995). Cultivo de *Fossaria cubensis* (Pfeiffer) (Pulmonata : Lymnaeidae) hospedero intermediario de *Fasciola hepática* en Cuba. *Rev. Cubana Med. Trop.* 47, 71-73.
- SCP. (1999). Opinion of the Scientific Committee on Plants on Endocrine disruption relevance in the context of Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market (opinion expressed by the Scientific Committee on Plants on 2 December 1999). http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/out55_en.html
- Seugé J. y Bluzat R. (1983). Chronic toxicity of three insecticides (carbaryl, fenthion and lindane) in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Hydrobiologia.* 106, 65-72.
- Sherratt T.N., Roberts G., Williams P., Whitfield M., Biggs J., Shillabeer N. y Maund S.J. (1999). A Life-history approach to predicting the recovery of aquatic invertebrate populations after exposure to xenobiotic chemicals. *Environ Toxicol Chem.* 18, 2512-2518.

- Sibley P.K., Benoit D.A. y Ankley G.T. (1997). The significance of growth in *Chironomus tentans* sediment toxicity tests: relationship to reproduction and demographic endpoints. *Enviro. Toxicol. Chem.* 16, 336-345.
- Sibley P.K., Ankley G.T. y Benoit D.A. (2001). Factors affecting reproduction and the importance of adult size on reproductive output of the midge *Chironomus tentans*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1296-1303.
- Subramanian M.A. y Varadaraj G. (1993). The effect of industrial effluents on moulting in *Macronia cingulata* (Rambur) (Anisoptera: Corduliidae). *Odonotologica.* 22, 229-232.
- Toppari J., Larsen J.C., Christiansen P., Giwercman A., Grandjean P., Guillette L.J., Jegou B., Jensen T.K., Jouannet P., Keiding N., Leffers H., MacLachlan J.A. *et al.* (1995). Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects. Danish Environmental Protection Agency, Copenhagen, 166 pp.
- Weybridge. (1996). Proceedings European Workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife, 2-4 December 1996, Weybridge, U.K.
- Wilson AL, Stevens MM y Watts RJ. (2000). Acute and chronic toxicity of the herbicide benzofenap (Taipan 300) to *Chironomus tepperi* Skuse (Diptera:Chironomidae) and *Isidorella newcombi* (Adams and Angas) (Gastropoda: Planorbidae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 176-181.
- Woin P. y Brönmark C. (1992) Effect of DDT and MCPA (4-Chloro-2-Methylphenoxyacetic Acid) on Reproduction of the pond snail, *Lymnaea stagnalis* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 7-13.

TERCERA PARTE

**Discusión sobre la incorporación de los
ensayos desarrollados en los protocolos de
Evaluación del Riesgo Ambiental**

Los invertebrados han colonizado multitud de habitats y explotado una gran variedad de fuentes de recursos, lo que permite encontrar especies de características muy diferentes respecto de su movimiento (móvil y sesil), fuente y hábitos alimenticios (predadores, herbívoros, saprófagos) y ciclo de vida (estrategias de reproducción sexual y asexual). El valor de los invertebrados como especies centinela es incuestionable ya que ocupan niveles diferentes en la cadena trófica y juegan un papel funcional clave en los ecosistemas acuáticos y terrestres. Estas características han permitido que durante décadas los invertebrados se hayan utilizado para monitorizar los efectos de los compuestos químicos en el medio ambiente (Resh *et al.*, 1995). Del mismo modo, el desarrollo de bioensayos con estos organismos ha estado estimulado por ser especies de pequeño tamaño, alta tasa de fecundidad y ciclo de vida corto, pudiéndose cultivar en laboratorio de una manera sencilla y a bajo costo (Persoone y Janssen, 1993). Existen, sin embargo, pocas especies de invertebrados que se cultiven en laboratorio, por lo que se recomienda el incremento del número de especies utilizadas en nuevos métodos de ensayo, particularmente para valorar efectos crónicos sobre el crecimiento y la reproducción, así como la sensibilidad de cada estado del ciclo de vida a los efectos tóxicos de un compuesto (Buikema y Voshell, 1993)

La utilización de matrices como sedimento y suelo en bioensayos con invertebrados bénticos ha permitido valorar de un modo fiable la toxicidad de compuestos que tienden a unirse a estos sustratos (Steinberg *et al.*, 1994). Prueba de ello es la estandarización de bioensayos con sedimentos (ver Segunda Parte) y suelos. Además de valorar toxicidad a nivel especie, los invertebrados pueden ser empleados para detectar posibles procesos de bioacumulación y biomagnificación ya que son fuente de alimento de predadores superiores. Más recientemente los estudios con invertebrados se han orientado a establecer relaciones entre las respuestas individuales y los efectos a nivel poblacional y de comunidad (Lagadic y Caquet, 1998). Ello está especialmente representado por el gran número de mesocosmos o estudios de campo en los que se han utilizado invertebrados para la ERA de compuestos químicos (Buikema y Voshell, 1993; Shaw y Kennedy, 1996). Por último y debido a la brevedad de sus ciclos de vida, los invertebrados se han revelado como un grupo prometedor para la ERA de disruptores endocrinos, ya que estos pueden afectar a la capacidad reproductiva sin afectar al crecimiento o a la supervivencia (Kavlock *et al.*, 1996; CSTE, 1999).

La comunidad científica ha reconocido la necesidad de integrar, junto a los ensayos mono-especie, estudios alternativos y de mayor complejidad en los protocolos ERA (ensayos multi-especies, microcosmos y mesocosmos). Desde un punto de vista ecológico la principal ventaja de estos ensayos es la incorporación de condiciones ambientales más realistas, lo que permite obtener una mayor información sobre los efectos de compuestos químicos en la estructura y función de los ecosistemas (Caquet *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 2002). La dificultad en la interpretación de los resultados obtenidos mediante el empleo de ensayos multi-especies,

así como la falta de consenso a cerca de su utilización en la toma de decisiones (Van Dijk *et al.*, 2000) ha originado que en la actualidad la ERA de compuestos químicos permanezca basada principalmente en resultados obtenidos con ensayos mono-especie. Si bien, reuniones específicas como los workshops “Higher Tier Aquatic Risk Assessment for Pesticides” (HARAP, 1998) y “Community Level Aquatic System Studies-Interpretacion Criteria” (CLASSIC, 1999) organizados por SETAC, OECD y la UE facilitarán su utilización en el futuro.

En la Segunda Parte de esta Tesis se desarrollaron ensayos multi-especies orientados a la valoración de efectos relevantes desde un punto de vista ecológico. La valoración de efectos sobre la reproducción de tres especies de invertebrados en un mismo ensayo representa una innovación y proporciona información para predecir efectos en la población. Las ventajas de su utilización son reducción de coste, por obtener los resultados para cada especie en un mismo ensayo, así como posibilidad de comparar la sensibilidad de las especies bajo condiciones de exposición idénticas. El ensayo con *Daphnia magna* y *Chironomus prasinus* (Capítulo III) permite, en un tiempo similar a la duración del ensayo crónico estandarizado con *Daphnia magna*, obtener parámetros de toxicidad aguda y crónica para dos especies, así como información sobre las rutas de exposición. Los resultados de este ensayo pueden emplearse para el desarrollo de criterios de calidad tanto en agua como en sedimentos. El ensayo con tres especies (Capítulo IV) posibilita estudiar efectos en varias generaciones de *Daphnia magna*, dos generaciones de *Chironomus prasinus* y reproducción de *Lymnaea peregra* (especie para la que no existe ningún ensayo estandarizado en la actualidad). Ambos ensayos multi-especies constituyen métodos alternativos sencillos y de bajo costo aplicables a la ERA de compuestos de diferente mecanismo de acción, incluidos los disruptores endocrinos.

En la Primera Parte se adaptaron ensayos mono-especie estandarizados a un estudio de campo con productos fitosanitarios (Capítulo I y II). Finalmente en esta Tercera Parte se discute su utilización en las ERAs, para ello se expone un escenario de ERA para productos fitosanitarios utilizados en el cultivo de arroz, el cual incluye evaluaciones basadas en resultados obtenidos a partir de estudios de semi-campo y campo.

Bibliografía

- Buikema AL Jr y Voshell JR Jr (1993). Toxicity studies using freshwater benthic macroinvertebrates. In: Rosenberg DM, Resh VH (eds). *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. Chapman and Hall, New York, pp 344-398.
- Caquet T., Lagadic L., Jonot O., Baturo W., Kilanda M., Simon P., Le Bras S., Echaubard M. y Ramade F. (1996). Outdoor experimental ponds (mesocosms) designed for long-term ecotoxicological studies in aquatic environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 34, 125-133.
- CLASSIC. (1999). Workshop on Community Level Aquatic System Studies Interpretation Criteria (CLASSIC), Schmallenberg (Germany), May 30 – June 2, 1999. Workshop documentation.
- CSTEE. Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment. (1999). Opinion on Human and Wildlife Health Effects of Endocrine Disrupting Chemicals, with Emphasis on Wildlife and on Ecotoxicology test methods. DG XXIV, European Commission.
- HARAP. (1998). SETAC-Europe / OECD / EC Workshop on Higher Tier Aquatic Risk Assessment for Pesticides (HARAP), Bordeaux (France), April 20-22, 1998. Workshop documentation.
- Kavlock R.J., Daston G.P., DeRosa C., Fenner-Crisp P., Earl Gray L., Kaattari S., Lucier G., Luster M., Mac M.J., Maczka C. *et al.* (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 104, 715-740.
- Lagadic L. y Caquet T. (1998). Invertebrates in testing of environmental chemicals: are they alternatives?. *Environ. Health. Perspect.* 106, 593-611.
- Persoone G. y Jansen C.R. (1993). Freshwater invertebrate toxicity tests. En: Calow P (ed). *Handbook of Ecotoxicology*, Vol 1. Blackwell Scientific Publications. Oxford, pp 51-65.
- Resh V.H., Norris R.H., Barbour M.T. (1995). Design and implementation of rapid assessment approaches for water resource monitoring using benthic macroinvertebrates. *Aust. J. Ecol.* 20, 108-121.
- Shaw J.L. y Kennedy J.H. (1996). The use of aquatic field mesocosm studies in risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 605-607.
- Steinberg C.E.W., Geyer H.J. y Kettrup A.A.F. (1994). Evaluation of xenobiotic effects by ecological techniques. *Chemosphere* 28, 357-374.
- Van Dijk H.F.G., Brussaard L., Stein A., Baerselman F., de Heer H., Brock T.C.M., Van der Gaag M.A., Van Gestel C.A.M., Van der Hoeven N., de Jong F.M.W., Van der Linden A.M.A., Van Noort P.C.M., Oomen P.A. y Van Vliet P.J.M. (2000). Field Research for the authorisation of pesticides. *Ecotoxicology*. 9, 377-381.
- Williams P., Whitfield M., Biggs J., Fox G., Nicolet P., Shillabeer N., Sherratt T., Heneghan P., Jepson P. y Maund S. (2002). How realistic are outdoor microcosms? A comparison of the biota of microcosms and natural ponds. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 143-150.

Capítulo V

Escenarios para la Evaluación del Riesgo de productos fitosanitarios utilizados en el cultivo de arroz¹

¹ Parte de los resultados de este trabajo han sido publicados en: Sánchez P., Nájera I., Ramos C., Carbonell G., Fernández C., Pablos M.V. and Tarazona J.V. (1999). "Ecological Risk Assessment for Rice Pesticides. Spanish proposal for the development of a generic exposure scenario". En: *Environmental Risk Parameters for Use of Plant Protection Products in Rice. European Crop Protection Association. Workshop Proceedings*. Pp 33-43

CAPÍTULO V:**ESCENARIOS PARA LA EVALUACIÓN DEL RIESGO DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS UTILIZADOS EN EL CULTIVO DE ARROZ****INTRODUCCIÓN**

En Europa, la autorización y registro de productos fitosanitarios están regulados por la Directiva 91/414/CEE, modificaciones posteriores (Directivas 96/12/CE y Directivas 95/36/CE) y la Directiva 97/57/CE en la que se establecen los “principios uniformes”. Según esta reglamentación los productos fitosanitarios se someten a un proceso ERA, que tiene como objetivo asegurar que aquellos plaguicidas que se incorporan al mercado no suponen un riesgo para los cultivos, el hombre, las plantas y los animales (con excepción de organismos diana), ni para la calidad de aguas y suelos. Este proceso comienza con una fase de evaluación preliminar (Tier I) basada en cálculos matemáticos tanto para la valoración del comportamiento y destino final del compuesto en el medio ambiente, como para la valoración de efectos sobre los organismos considerando datos de toxicidad obtenidos en condiciones de laboratorio (Van Dijk *et al.*, 2000).

Como ya se indicó en el Capítulo II al abordar la valoración ecotoxicológica de productos fitosanitarios utilizados en arrozales, el cultivo de arroz constituye una excepción, ya que se realiza en condiciones de inundación del terreno. Esta práctica agrícola origina la emisión de plaguicidas hacia aguas conectadas con los arrozales desde los canales de drenaje. Por ello la ERA de plaguicidas utilizados en este tipo de cultivo merece una especial atención.

A pesar de que como ya se ha indicado existe una práctica común para el cultivo de arroz que consiste en la inundación del terreno, las técnicas agrícolas varían entre países, así en Europa el terreno del arrozal se mantiene continuamente inundado, mientras que en zonas tropicales y ecuatoriales los ciclos de inundación pueden alternarse con ciclos de cultivo no inundado. Las causas por las que difieren las técnicas agrícolas empleadas en el cultivo de arroz son muy variadas, algunas de ellas son: condiciones climáticas, características del suelo, modelo productivo de la explotación agrícola, situación geográfica y ecosistema que rodea y del que forma parte la explotación (Tinarelli, 1989). Por ejemplo, en Japón la altura de la columna de agua del arrozal se mantiene entre 3-4 cm, mientras que en EEUU y la UE la altura se mantiene entre 10 y 12 cm (Armbrust, 1999). Todo ello va a condicionar el comportamiento, disipación y destino final del plaguicida aplicado en el arrozal.

El procedimiento a escala europea de evaluación de los riesgos ecológicos considera escenarios genéricos de exposición para la estimación de los niveles de concentración que las sustancias alcanzan en los distintos compartimentos medioambientales. Durante los últimos años se han desarrollado una serie de escenarios para la fase preliminar de ERA basados en el peor de los casos posibles que pueden darse cuando una sustancia es vertida al medio, considerando siempre condiciones ambientales genéricas en el territorio europeo. Algunos ejemplos de escenarios son los desarrollados para sustancias industriales (UE, 1996a; ECB, 1997), medicamentos veterinarios (EMEA, 1997) y productos fitosanitarios (ECCO, 1998). En el caso de productos fitosanitarios se reconocen dos principales rutas de exposición para las aguas superficiales como consecuencia de la aplicación aérea o fumigación: la deriva y la escorrentía. Sin embargo únicamente en el caso de la deriva existe un método armonizado para la estimación de las concentraciones que el producto fitosanitario alcanzará en aguas superficiales (PEC-Predicted Effect Concentration). Estas se estiman aplicando el modelo desarrollado por Ganzelmeier *et al.* (1995), en el que se asume que parte de la dosis pulverizada (entre un 0,1 y un 30%) alcanzará una laguna de 1 Ha de superficie y de una profundidad media de 30 cm, dependiendo el porcentaje de la dosis que alcanza dicha laguna de las características del cultivo, y de su distancia al medio receptor. En el caso de la escorrentía no existe un único escenario sino que la estimación se realiza caso por caso, existiendo algunos escenarios desarrollados por el grupo FOCUS (Forum for the Co-ordination of Pesticide Fate Models and their Use) que incluyen, junto a la deriva y la escorrentía, una nueva ruta de exposición no considerada anteriormente: el drenaje (FOCUS, 1996; Linders *et al.*, 1999).

Los escenarios genéricos pueden ser una buena aproximación para la estimación inicial basada en el peor de los casos posibles, pero no representan una situación real para todas las regiones de la Unión Europea (Ramos *et al.* 2000a). En la mayoría de los casos, como es propio de una estimación basada en el peor de los casos posibles, la aplicación de estos escenarios genéricos tiene como consecuencia la sobre valoración del riesgo ecológico. En el caso de los cultivos mediterráneos la sobre valoración puede ser mayor que para cultivos propios de Europa central, o por el contrario dar lugar a un infravaloración del riesgo real, ya que los valores por defecto que asumen estos escenarios genéricos no consideran las condiciones climáticas y ecológicas exclusivas del área mediterránea. Todo ello pone de relieve la necesidad de desarrollar escenarios específicos que consideren condiciones ambientales más próximas a las reales para los cultivos propios de los países mediterráneos (Pablos *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2000b), de lo contrario la autorización o prohibición de productos fitosanitarios en este tipo de cultivos estarán basados en un proceso de escasa base científica.

En este Capítulo se aborda la problemática en torno a la aplicación de productos fitosanitarios sobre un cultivo típicamente mediterráneo: el cultivo de arroz, proponiéndose un escenario genérico de exposición y un modelo conceptual para la ERA.

BASES PARA LA EVALUACIÓN DEL RIESGO ECOLÓGICO EN LA REGION MEDITERRÁNEA

El comportamiento de las sustancias en los compartimentos agua y suelo puede verse afectado por las diferencias en las condiciones ambientales a través de toda Europa. Los factores que van a influir este comportamiento son: prácticas agrarias (dosis y forma de aplicación, tipo de cultivos y estación del año), climatología (temperatura, humedad, predominio de vientos y lluvias), propiedades físico-químicas del plaguicida (volatilidad y solubilidad en agua), características de las masas de aguas receptoras (extensión de la cuenca, profundidad y caudal) y características de las zonas próximas a cultivos (tipo de suelo, cubierta vegetal, pendiente y proximidad de los cultivos a aguas superficiales). En la valoración de efectos deben considerarse factores como la ecología de las poblaciones diana, habitats, ciclos de vida, dinámica de poblaciones y capacidad de recuperación, incluyendo fluctuaciones que ocurren de manera natural (Punja, 1998). Todos ellos son aspectos relevantes en la valoración de riesgos. En el caso de la región mediterránea se han identificado una serie de factores clave para el desarrollo de escenarios (Tarazona *et al.*, 2001):

1. Climatología

- Escasa precipitación media anual
- Elevada frecuencia de lluvias torrenciales
- Elevada temperatura media anual
- Elevado potencial de evapotranspiración

2. Factores geo-sociológicos

- Cuencas con una mayor relación superficie/flujo de agua
- Grandes fluctuaciones estacionales de caudales
- Elevada erosión de suelos
- Abundancia de reservorios artificiales (embalses, etc)
- Condiciones particulares de producción agrícola y ganadera

3. Especificidad ecológica

- Altos índices de biodiversidad donde se incluyen un gran número de especies endémicas
- Abundancia de especies amenazadas
- Escasez de recursos hídricos aunque de alto valor ecológico
- Existencia de reservas esenciales para la protección de especies migratorias

Aspectos como la erosión del suelo y el transporte de sustancias unidas a partículas de suelo, la posterior sedimentación en reservorios artificiales, los riesgos asociados a cursos que experimentan gran disminución de caudal durante la época estival, el riesgo para aquellas áreas de alto valor ecológico, etc., en definitiva, la combinación de todos estos factores junto a otros que aquí no se mencionan deben considerarse en el desarrollo de escenarios para las condiciones mediterráneas.

EVALUACIÓN DE RIESGO DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS UTILIZADOS EN EL CULTIVO DE ARROZ.

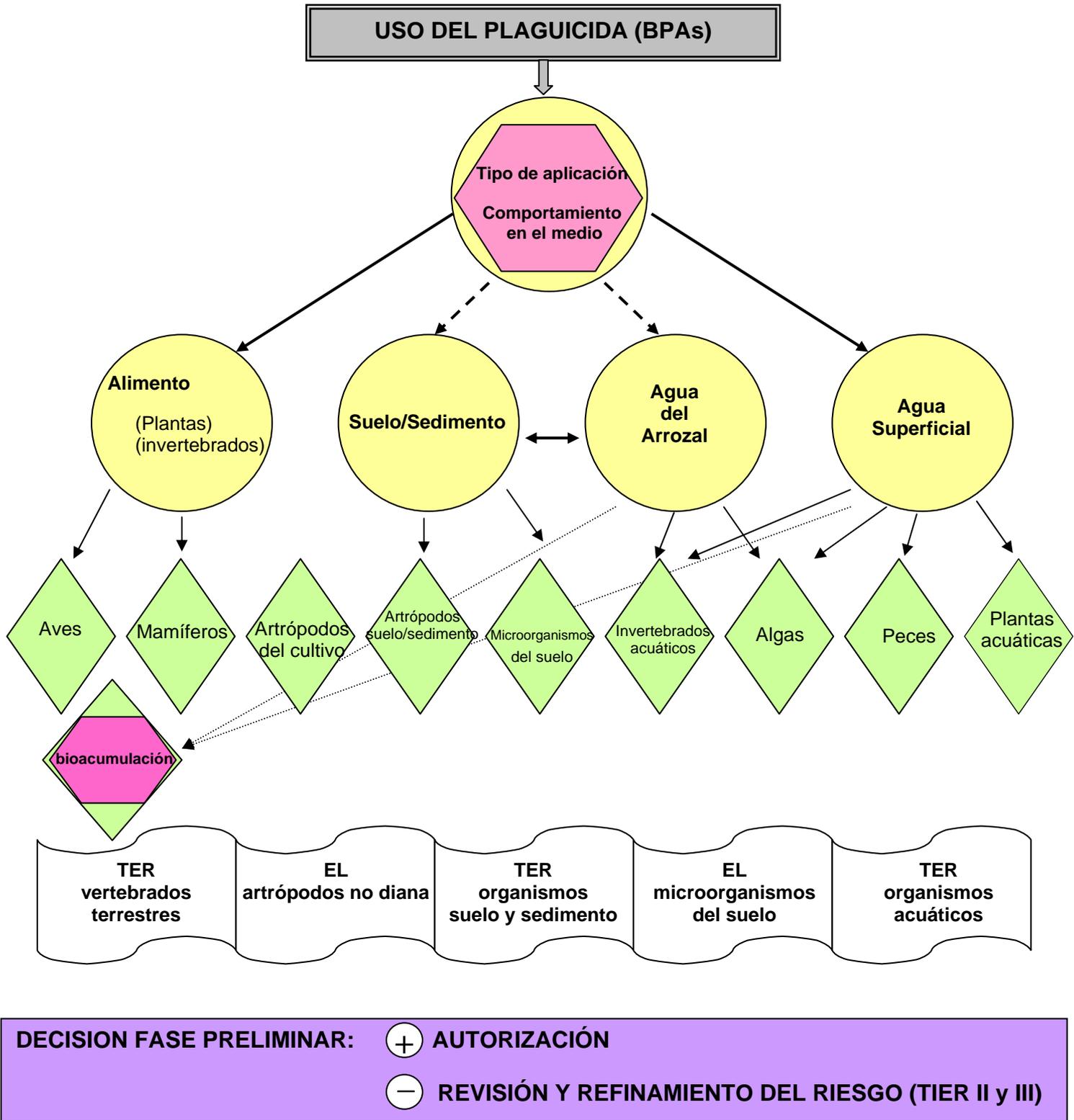
El fracaso en la adaptación de los escenarios existentes para la ERA en el caso específico de plaguicidas aplicados en arroz, puso de relieve la necesidad de desarrollar nuevos escenarios. Como consecuencia han surgido propuestas de escenarios genéricos (Sánchez *et al.*, 1999) y se ha constituido un nuevo grupo europeo de trabajo (MED-RICE) cuyo cometido es el de desarrollar un escenario armonizado para productos fitosanitarios utilizados en el cultivo de arroz en la Unión Europea.

Los requisitos para la autorización de un producto fitosanitario contenidos en el Anexo II y III de la Directiva 91/414/CEE no contempla dos características esenciales de los cultivos de arroz: la presencia de una capa de agua sobre el suelo de cultivo y la peligrosidad asociada al drenaje de aguas desde los arrozales conteniendo productos fitosanitarios. Las condiciones de inundación en las que se realiza el cultivo de arroz son únicas y por tanto deben ser consideradas en el desarrollo de un escenario específico de productos fitosanitarios aplicados sobre arrozales. A continuación se expone un modelo conceptual para la ERA que incluyen la fase preliminar del proceso (Tier I) y valoraciones de alto nivel (Tier II y Tier III).

1. Fase preliminar (Tier I). Escenario de Exposición.

El escenario genérico para la fase preliminar de una ERA se representa en forma de esquema en la Figura 1. Tras la aplicación del plaguicida, según un Código de Buenas Prácticas Agrarias (BPAs), el tipo de aplicación (sobre campos drenados o sobre campos inundados) y el comportamiento del plaguicida en el medio determinará los niveles de exposición en los distintos compartimentos: alimento, suelo/sedimento, agua del arrozal y agua superficial. Las diferencias básicas entre el resto de escenarios y el aquí propuesto es la existencia durante la inundación de sedimento y de agua del arrozal. No se ha considerado el compartimento agua subterránea por su escasa relevancia ante la necesidad de utilizar suelos poco permeables para reducir la pérdida de agua.

Aves y mamíferos pueden quedar expuestos al plaguicida a través del alimento, el cual puede consistir en plantas e invertebrados pulverizados con el plaguicida. Por tanto la valoración de efectos sobre vertebrados terrestres y artrópodos no diana propios del cultivo es común al resto de productos fitosanitarios (SETAC, 1995; ECCO, 1998). La caracterización del riesgo para aves y mamíferos se basa en el cálculo de TERs (Toxicity Exposure Ratios), los cuales deben cumplir los límites establecidos (UE, 1996b; UE, 1997).



Identificación del peligro
 Valoración de la exposición
 Valoración de efectos
 Caracterización de riesgo

Figura 1: Modelo conceptual y plan de análisis para la estimación del riesgo de fitosanitarios en arroz

La caracterización del riesgo para el caso de artrópodos no diana distintos de abejas, particularmente los artrópodos beneficiosos para el cultivo viene expresada en términos de un límite de efectos observados (EL-Effect Limit), de modo que no se concederá autorización alguna para aquellos plaguicidas que a la dosis recomendada ejerzan un efecto superior al 30% en ensayos de laboratorio letales y subletales (UE, 1997).

En el caso de organismos de suelo, la valoración y caracterización del riesgo, esta basada en el cálculo de TERs, y es idéntica al resto de productos fitosanitarios (UE 1996b; UE 1997). Sin embargo, dado que el suelo de estos cultivos se inunda, el primer horizonte del suelo pasará a ser sedimento, por lo que debe incluirse en este compartimento valoraciones sobre organismos propios del sedimento. La normativa para la comercialización de productos fitosanitarios contempla estudios ecotoxicológicos para valorar efectos sobre organismos que viven en sedimento cuando sea probable que la sustancia activa se acumule y se mantenga en los sedimentos (UE, 1996b). En el caso de productos fitosanitarios aplicados en arroz este tipo de ensayos serán siempre necesarios. La caracterización de riesgo podrá realizarse mediante la obtención de TERs aplicándose los mismos límites que para otros invertebrados acuáticos. Finalmente en el compartimento suelo se incluyen valoraciones sobre microorganismos quedando condicionada la autorización del producto, tal y como se establece en la Directiva 97/57/CE, a un EL (Effect Limit) de modo que no resulten afectados en más de un 25% los procesos de mineralización del nitrógeno o del carbono en estudios de laboratorio.

Las principales diferencias entre la valoración de riesgo de productos fitosanitarios utilizados en el cultivo de arroz y el resto de plaguicidas las encontramos en la valoración de efectos sobre las comunidades acuáticas, ya que debe contemplar dos niveles: 1º Efectos sobre la comunidad propia del arrozal y 2º Efectos sobre las comunidades de las aguas receptoras. En lo que se refiere al 2º nivel es importante añadir además que los cultivos de arroz suelen estar próximos y en ocasiones íntimamente relacionados con humedales o marismas, y que a pesar de ser sistemas artificiales en muchos casos son lugares importantes para la alimentación, el refugio y cría de aves acuáticas (Figura 2). Los niveles de protección para ambos tipos de comunidades deben ser obviamente diferentes, requiriéndose en el segundo caso (comunidades de aguas receptoras) un nivel de protección superior, sin desestimar el papel ecológico de las comunidades presentes en el cultivo. Por ejemplo, las comunidades de zooplancton juegan un papel esencial en el equilibrio de las comunidades de fitoplancton, si las anteriores se ven muy afectadas por uso indiscriminado de un plaguicida pueden tener lugar blooms de algas, los cuales obligan al uso adicional de herbicidas. Finalmente como ya hemos indicado muchas aves buscan alimento en los arrozales quedando de esta manera expuestas a productos fitosanitarios, la toxicidad y bioacumulación ocasionadas por este motivo deben ser igualmente contempladas.

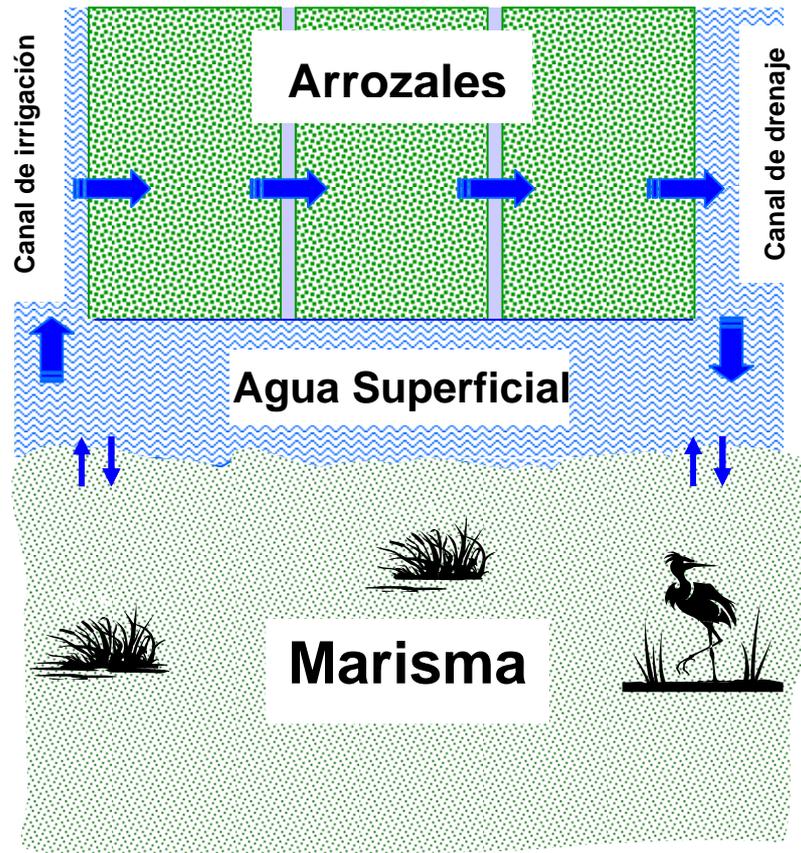


Figura 2: Situación genérica de los cultivos de arroz en España. Las principales zonas arroceras españolas se sitúan próximas a marismas (ej. Delta del Ebro, La Albufera y el Parque Nacional de Doñana). Las flechas indican las conexiones con aguas superficiales. A través del canal de irrigación se suministra el agua necesaria para inundar el campo. El posterior drenaje se realiza directamente hacia el canal de drenaje o bien a través de canales intermedios que a su vez se conectan con otros arrozales. Finalmente, los cauces receptores de agua procedente de arrozales pueden comunicarse con zonas de marisma.

Como ya se indicó los escenarios actuales para la valoración de riesgo de productos fitosanitarios en Europa consideran dos rutas de exposición en el compartimento agua: deriva y escorrentía. En el Capítulo II también se indicó que como consecuencia de la práctica común de inundación de los campos, el posterior drenaje constituye una fuente directa de emisión de plaguicidas hacia aguas receptoras. Teniendo en cuenta estos aspectos y considerando la situación genérica de la Figura 2, se pueden considerar dos rutas principales de contaminación de aguas superficiales en la aplicación de plaguicidas para el cultivo de arroz: la deriva y el drenaje de aguas desde el arrozal. En el caso de la deriva las estimaciones no difieren del resto de cultivos. Se considerará por tanto un porcentaje de la dosis pulverizada del plaguicida (ej. 100% para aplicaciones aéreas), o las recomendaciones del grupo ECCO (1998) basadas en el escenario propuesto por Ganzelmeier *et al.* (1995), básicamente el 4% para una distancia de 1 m entre el cultivo y las aguas superficiales.

Para valorar la exposición debida al drenaje se desarrolla y propone un escenario genérico de exposición que permite calcular las PECs en agua, tanto en el propio cultivo como en las aguas receptoras. Distinguiremos dos situaciones posibles: 1) aplicaciones en suelo (previo drenaje del arrozal) y 2) aplicaciones sobre los campos inundados. La Figura 3 representa las dos posibles situaciones después del tratamiento con el plaguicida. En las aplicaciones sobre campos drenados, la degradación en suelo condicionará la cantidad de sustancia activa y de metabolitos en suelo en el momento de la inundación del campo. Teniendo en cuenta las prácticas agrícolas el suelo de los arrozales tiene un gran porcentaje de humedad, pudiendo llegar incluso hasta la saturación, y con una gran carga de materia orgánica si se utilizan fertilizantes orgánicos, predominando por tanto las condiciones anaerobias. Por tanto para el cálculo de PEC en suelo se considerará el valor DT50 (tiempo para la degradación del 50% del compuesto) bajo condiciones de degradación anaerobia en los primeros 5 cm del suelo, durante un período de dos días por defecto previo a la apertura de la compuerta del canal de irrigación. Tras una nueva inundación la profundidad de la columna de agua puede variar atendiendo a las prácticas agrícolas de cada zona. Si no existen especificaciones al respecto en el Código de BPAs (Buenas Prácticas Agrícolas) se considerará una columna de agua de 10 cm. Por tanto para calcular la PEC inicial en agua del arrozal se considerará un 100% de desorción de la PEC en suelo (peor caso posible) en el momento de la inundación. De nuevo y si no existen especificaciones, se considerará un periodo de dos días por defecto para iniciar el drenaje del campo.

En las aplicaciones sobre campos inundados, la degradación en agua y la distribución y equilibrio entre agua y sedimento condicionarán la PEC en el agua del arrozal. Como valor por defecto para calcular la PEC en el agua del arrozal se considerará una altura de la columna de agua de 10 cm, y un periodo de dos días para permitir que el plaguicida ejerza sus efectos y reiniciar el drenaje.

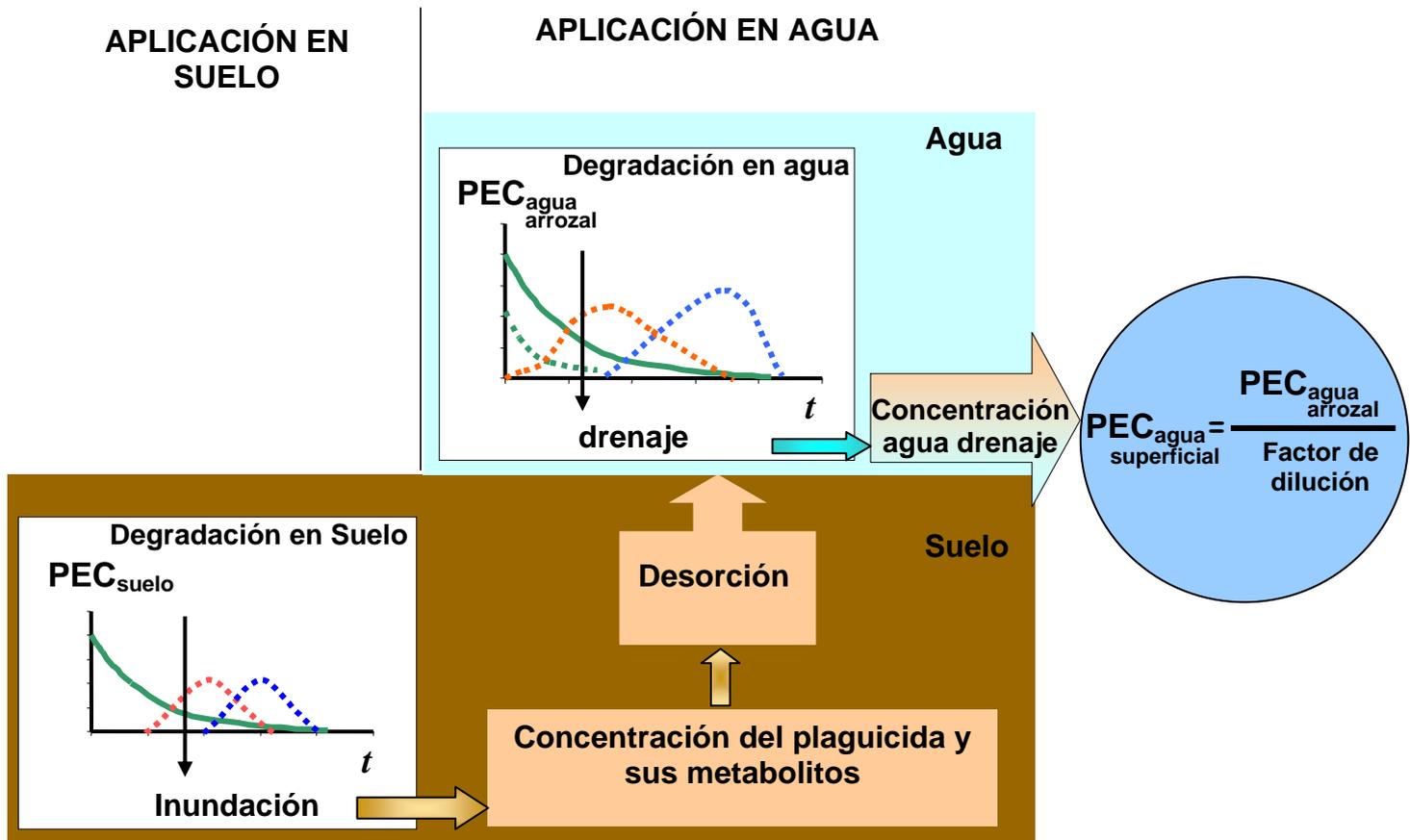


Figura 3: Propuesta de escenario de exposición para plaguicidas aplicados sobre arrozales. A la izquierda se representa el caso de aplicación sobre campos drenados. La PEC en suelo dependerá de la degradación en suelo de la sustancia activa (línea continua en el gráfico de degradación) y de los metabolitos (líneas discontinuas). A la derecha se representa el caso de aplicación sobre campos inundados, estando condicionada en este caso la PEC en el agua del arrozal por la degradación en agua del nuevo plaguicida (línea continua en el gráfico) y de los metabolitos y compuestos desorbidos desde el suelo (líneas discontinuas). Finalmente la PEC en aguas superficiales vendrá determinada por la PEC en el agua del arrozal en el momento de drenaje, teniendo en cuenta un factor de dilución.

Los ensayos sobre degradación en agua y sobre distribución y equilibrio entre agua y sedimento se realizarán de acuerdo a los procedimientos desarrollados por la SETAC (SETAC, 1995) tal y como establece el Anexo II sobre alcance y comportamiento en el medio ambiente (UE, 1995).

Finalmente para la estimación de la concentración en aguas superficiales se propone utilizar un factor de dilución de 10, ya que este factor es el que normalmente se aplica en el caso de emisiones puntuales en la Unión Europea (UE, 1996a). Se recomienda, asimismo realizar la caracterización del riesgo para comunidades acuáticas mediante el cálculo de TERs como en el resto de productos fitosanitarios.

2. Redefinición del Proceso de Evaluación. Tier II y Tier III

En caso de incumplimiento de los requisitos contenidos en la fase preliminar de la valoración de riesgo es preciso revisar y redefinir el proceso. En las siguientes fases, denominadas valoraciones de alto nivel, el solicitante aportará nueva información la cual contribuirá a reducir el grado de incertidumbre propio de la fase preliminar. Normalmente esta nueva información se obtiene a partir de estudios de campo. Este tipo de estudios proporcionan datos valiosos sobre el producto fitosanitario como son comportamiento en condiciones de campo, exposición de organismos no diana, y efectos a nivel de población, comunidad y ecosistema. Si bien para la fase preliminar existen criterios perfectamente regulados para la toma de decisiones, hasta el momento los resultados obtenidos con estudios de campo han sido de difícil interpretación (Van Dijk *et al.*, 2000), por lo que la decisión para la autorización de los productos fitosanitarios a este nivel se realiza caso por caso. La EAC (Ecologically Acceptable Concentration) o concentración a la que la estructura de las comunidades y sus funciones ecológicas no resultan afectadas, y la recuperación o capacidad de recuperación de las comunidades, son algunos de los parámetros que se han propuesto (Campbell *et al.*, 1999 y Van Dijk *et al.*, 2000).

En el caso de los productos fitosanitarios utilizados en el cultivo de arroz se proponen dos fases para la valoración de alto nivel. La primera fase de la valoración de alto nivel (Tier II) consiste en un estudio de semi-campo en el que la valoración de efectos se realiza mediante el empleo de bioensayos con muestras obtenidas durante un estudio de campo, según las pautas establecidas en el Capítulo II. La última fase o Tier III consistiría en un estudio de campo o semi-campo en el que la valoración de efectos se realiza en función de la respuesta observada en las poblaciones expuestas (Figura 4).

TIER II




AUTORIZACIÓN E INCLUSIÓN EN EL ANEXO I



TIER III

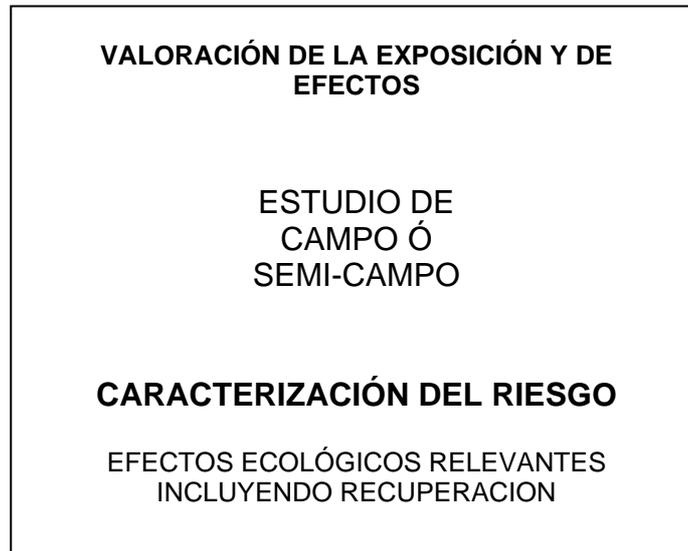


Figura 4: Refinamiento del proceso de Evaluación de Riesgo de productos fitosanitarios aplicados a cultivos de arroz.

- **Tier II. Incorporación de valoraciones ecotoxicológicas ex situ en estudios de degradación y disipación en condiciones de campo.** La aplicación del producto fitosanitario bajo condiciones ambientales reales permitirá determinar la concentración real en agua, suelo y alimento a la que se verán expuestas las distintas poblaciones. Existen guías técnicas para la realización de estudios de disipación en suelo (EPPO, 1993; SETAC 1995), los cuales deberán adaptarse para el caso concreto de arrozales. En el caso de vertebrados (aves y peces) y artrópodos beneficiosos la valoración de efectos mediante bioensayos se realizará en base a las concentraciones reales determinadas mediante el análisis de los elementos que representan la ruta de exposición de estos organismos. La caracterización del riesgo para vertebrados obtenida mediante el cálculo de TERs, deberá cumplir los principios uniformes del Anexo VI (UE, 1997).

La valoración ecotoxicológica ex situ de muestras ambientales constituye una herramienta prometedora para el control y regulación de la contaminación, ya que ofrece la posibilidad de elaborar límites de toxicidad locales, esto es de particular importancia en el caso de compuestos cuya toxicidad y biodisponibilidad depende en gran parte de las condiciones específicas del medio. Hasta el momento esta herramienta ha sido aplicada en el control de vertidos y de calidad de cauces receptores, e incluso a estudios de toxicidad en sedimentos, recibiendo una menor atención el compartimento suelo (Tarazona, 1998). La utilidad de esta nueva herramienta para la valoración de efectos en comunidades acuáticas del arrozal quedó demostrada en el estudio de validación del Capítulo II, sobre *Daphnia magna* y *Chlorella vulgaris*. Esta metodología puede incorporarse del mismo modo a los compartimentos sedimento y suelo. Por tanto la valoración de efectos en el resto de taxones se basará en la realización de bioensayos con muestras de agua, sedimento y suelo obtenidas durante el transcurso del estudio de campo. La valoración de riesgo para las comunidades, exceptuando las de vertebrados y artrópodos beneficiosos, está basada en un margen de seguridad compatible con los principios uniformes. En el caso de utilización de ensayos crónicos este margen será igual o mayor a 10, lo que permite interpretar que si no existe toxicidad crónica en las muestras obtenidas durante el estudio de campo a una dosis 10 veces superior a la recomendada el riesgo potencial es aceptable.

- **Tier III. Estudio de campo o semi-campo con evaluación *in situ* de efectos.** La valoración de la exposición en esta fase coincide con la anterior, sin embargo es en la valoración de efectos donde encontramos las diferencias básicas entre ambas fases de la valoración de alto nivel. El estudio de campo está orientado hacia la detección de efectos sobre la comunidad, de la aparición de efectos indirectos y la capacidad de recuperación de las poblaciones y comunidades tras la exposición al producto fitosanitario. Todo ello mediante valoraciones *in situ*, a diferencia del Tier II.

Cada estudio de campo es único, su diseño dependerá de objetivos específicos dictados de acuerdo a resultados obtenidos en fases previas de la ERA. Existen no obstante un gran

número de estudios y documentos técnicos que aportan información sobre dimensiones, taxones, regímenes de exposición, parámetros biológicos poblacionales y de comunidades, así como criterios para la interpretación de los resultados (relevancia ecológica de los efectos observados y potencial de recuperación) que pueden ayudar en el diseño de un estudio de campo (ej.: SETAC/RESOLVE 1991a; SETAC-Europe 1991b; EWOFFT, 1992; Crossland *et al.*, 1994; Caquet *et al.*, 1996; OECD, 1998; Campbell *et al.*, 1999). Hasta la fecha de las trece sustancias activas incluidos en el Anexo I tan solo en cuatro de ellas (Esfenvalerate, Lambda-cyhalothrin, Kresoxim-methyl, Spiroxamine) se han incluido estudios de mesocosmos, estudios de semi-campo y/o estudios de campo durante el proceso de evaluación. En los cuatro casos se realizaron estudios de semi-campo y de campo para valorar efectos sobre abejas y otros artrópodos no diana del cultivo. En dos de ellos se realizaron estudios de mesocosmos para valorar efectos sobre organismos acuáticos y de sedimento, incorporándose en un caso la EAC para invertebrados acuáticos (CE, 1998, 1999, 2000, 2001).

Bibliografía

- Armbrust K.L. (1999). Photochemical Processes Influencing Pesticide Degradation in Rice Paddies. *J. Pesticide Sci.* 24, 69-73.
- Campbell P.J., Arnold D.J.S., Brock T.C.M., Grandy N.J., Heger W., Heimbach F., Maund S.J y Streloke M. (1999). Guidance document on higher-tier aquatic risk assessment for pesticides. SETAC-Europe, Brussels.
- Caquet TH., Lagadic L., Jonot O., Baturu W., Kilanda M., Simon P., Le Bras S., Echaubard M. y Ramade F. (1996). Outdoor experimental ponds (mesocosms) designed for long-term ecotoxicological studies in aquatic environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 34, 125-133.
- Crossland N.O., Heimbach F., Hill I.R., Boudou A., Leeuwangh P., Mathiessen P. y Persoone G. (1994). Summary and recommendations of the European workshop on freshwater field test (EWOFTT). En: *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals.* (I.R. Hill, F. Heimbach, P. Leeuwangh y P. Mathiessen P. editors). pp XXV-XXXVII. Lewis, Boca Raton, FIL.
- CE. (1998,1999, 2000, 2001). Comisión Europea.
http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph_ps/pro/inex_en.htm
- ECB. European Chemicals Bureau. (1997). EUSES: European Union System for the Evaluation of Substances. Version 1.00, February 1997. Joint Research Centre, Environment Institute. EUR 17308 EN.
- ECCO. (1998). Guidance document on Terrestrial Ecotoxicity developed in the ECCO 39 Meeting. Draft. European Commission. Directorate General for Agriculture VI B II.1.
- EMEA. (1997). Note for guidance: Environmental risk assessment for veterinary medicinal products other than GMO-Containing and immunological products. EMEA/CVMP/055/96-FINAL.
- EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organisation. (1993). Decision-making scheme for the environmental risk assessment of plant protection products. EPPO Bulletin, 23, 1-165.
- EWOFTT. European Workshop on Freshwater Field Test. (1992). Summary and Recommendations Report. Potsdam. Germany.
- FOCUS. (1996). Draft Report on Surface Water Models and EU Registration of Plant Protection Products (FOCUS Steering Committee, June 1996, pages 221).
- Ganzelmeier H., Rautmann D., Spangenberg R. *et al.* (1995). Studies on the spray drift on plant protection products. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Heft 305.* Berlin/Wien: Blackwell Wissenschaftsverlag GmbH.
- Linders J. (1999) Focus Surface Water Scenarios. En "Guidance Document on Higher-tier Aquatic Risk Assessment for Pesticide (HARAP)". Campbell PJ, Arnold DJS, Brock TCM, Grandy NJ, Heger W, Heimbach F, Maund SJ and Streloke M. eds. Society of Environmental Toxicology and Chemistry-Europe. Bruselas. pp 164-165.
- OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. (1998). Guidance document for freshwater lentic field tests. Draft Report. Paris, France.
- Pablos M.V., Ramos C., Carbonell G y Tarazona J.V. (1998). Evaluación del riesgo ambiental de fármacos de uso veterinario: desarrollo de escenarios para sistemas ganaderos intensivos y extensivos. *Cuad. Invest. Biol.* 20, 507-510.

- Punja N. (1998). Regulations and risk assessments of the ecotoxicological impact from the use of plant protection products in the European Union. En: Pugh DM y Tarazona JV (editors). Regulation for chemical safety in Europe: análisis, comment and criticism. Kluwer Academic Publishers. pp 157-169
- Ramos C., Pablos M.V., San Andrés M.D., Carbonell G., Ballesteros C., Tarazona J.V. y San Andrés M.I. (2000a). Desarrollo de nuevos escenarios para la evaluación de los riesgos ambientales de productos zoo y fitosanitarios. En: Globalización medioambiental. Perspectivas agrosanitarias y urbanas. Secretaría General Técnica, MAPA. Madrid. Pp. 695-704.
- Ramos C, Carbonell G, García Baudín JM^a y Tarazona JV. (2000b). Ecological risk assessment of pesticides in the Mediterranean region. The need for crop-specific scenarios. Sci. Total Environ. 247, 269-278.
- Sánchez P., Nájera I., Ramos C., Carbonell G., Fernández C., Pablos M.V. y Tarazona J.V. (1999). "Ecological Risk Assessment for Rice Pesticides. Spanish proposal for the development of a generic exposure scenario". En: Environmental Risk Parameters for Use of Plant Protection Products in Rice. European Crop Protection Association. Workshop Proceedings. Pp 33-43.
- SETAC/RESOLVE. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. (1991a). Workshop on aquatic microcosms for ecological assessment of pesticides. Report from a meeting held at Wintergreen Virginia, USA. October 11, 1991.
- SETAC-Europe. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. (1991b). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. Edited by D Arnold, I Hill, P Matthiessen, R Stephenson.
- SETAC. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Edited by M.R. Lynch. Brussels, Belgium.
- Tarazona J.V. (1998). Scientific concepts and uncertainties in the identification of ecotoxicological thresholds of acceptability and danger. En Pugh DM y Tarazona JV (editores). Regulation for chemical safety in Europe: análisis, comment and criticism. Kluwer Academic Publishers. pp 41-63.
- Tarazona J.V., Ramos C., Pablos V., Fernández C., Vega M.M. and Carbonell G. (2001). Development of scenarios for ecological risk assessment of chemicals in the mediterranean area. En: Mediterranean Conference for Agricultural Research Cooperation. Hervieu B., Maraveyas N. y Vizantinopoulos S. (editores). National Agricultural Research Foundation. Papazissis Publishers IFCF. Athens.
- Tinarelli A. (1989). El arroz. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- UE. (1991). Directiva 91/414/CEE relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.
- UE. (1995). Directiva 95/36/CE por la que se modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo relativa a la comercialización de productos fitosanitarios
- UE. (1996a). Technical guidance document in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and Commission Regulation (EC) 1488/94 on risk assessment for existing substances. Parts I, II, III and IV. Document ISBN 92-827-8011-2. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- UE. (1996b). Directiva 96/12/CE por la que se modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.

- UE. (1997). Directiva 97/57/CE por la que se establece el Anexo VI de la Directiva 91/414/CEE relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.
- Van Dijk H.F.G., Brussaard L., Stein A., Baerselman F., de Heer H., Brock T.C.M., Van der Gaag M.A., Van Gestel C.A.M., Van der Hoeven N., de Jong F.M.W., Van der Linden A.M.A., Van Noort P.C.M., Oomen P.A. y Van Vliet P.J.M. (2000). Field Research for the authorisation of pesticides. *Ecotoxicology*. 9, 377-381.

RECAPITULACIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se ha pretendido abordar una serie de objetivos que incluían tanto el desarrollo de nuevos métodos ecotoxicológicos dirigidos a la valoración de efectos de compuestos químicos a medio y largo plazo en el medio acuático, como el desarrollo de escenarios e incorporación de los métodos desarrollados a los procesos de Evaluación del Riesgo Ambiental. A continuación se describen de manera breve los resultados obtenidos en cada una de estas partes:

PRIMERA PARTE: Incorporación de bioensayos mono-especie a estudios de campo para el seguimiento de efectos ecotoxicológicos.

Numerosos autores han demostrado la capacidad de los ensayos mono-especie para valorar la toxicidad de muestras complejas, especialmente de efluentes. Por otro lado los protocolos ERA de productos fitosanitarios incluyen en muchos casos estudios de disipación en campo para evaluar de forma más realista los niveles de exposición esperados. En la Primera Parte se propone la incorporación de los ensayos mono-especie como una herramienta adicional en estos estudios, lo que permitiría la caracterización simultánea de efectos en estudios de campo con plaguicidas. Como ejemplo se escogió el caso particular de aguas empleadas en el cultivo de arroz.

En el capítulo I se estudió la adaptación de los ensayos estandarizados de inhibición del crecimiento de *Chlorella vulgaris* (OECD 201) y de reproducción de *Daphnia magna* (OECD 202) para la valoración de efectos de aguas procedentes de arrozales. Puesto que las características de este tipo de muestras modifica la respuesta de ambos organismos, la validación de estas adaptaciones requirió un adecuado diseño experimental. Dicha validación se realizó en el Capítulo II, mediante un estudio de semi-campo que consistió en la aplicación de cuatro productos fitosanitarios (tres controles positivos y un nuevo herbicida problema) sobre pequeñas parcelas de arrozal y bajo condiciones de campo. Tras las aplicaciones se realizó una valoración de la toxicidad *ex situ* de las muestras recogidas a distintos tiempos utilizando los ensayos anteriormente adaptados. Los resultados obtenidos en el estudio de semi-campo para el caso de los controles positivos (Azimsulfuron, Propanil y Malathion) fueron comparables a los resultados esperables obtenidos mediante una estimación basada en datos procedentes de ensayos de laboratorio consultados en la bibliografía. No obstante la reducción de la toxicidad con el tiempo fue más rápida de lo estimado en función de los datos de degradación en laboratorio, probablemente debido a una degradación más rápida en condiciones de campo. El herbicida problema no produjo efectos significativos a la dosis recomendada, sólo se observaron efectos puntuales sobre *Chlorella vulgaris* a dosis 3 y 9 veces superiores a la recomendada.

SEGUNDA PARTE: Desarrollo de bioensayos multi-especies en sistemas agua-sedimento para valorar la reproducción de invertebrados acuáticos.

Las aguas de arrozal, como las de otros sistemas lenticos poseen una destacable proporción de interfase agua-sedimento, siendo la dinámica de equilibrio entre las fases agua y sedimento de particular importancia en el estudio de la toxicidad de compuestos vertidos. El hecho de que muchos compuestos tiendan a acumularse en sedimentos y que sean liberados lentamente hacia el agua, ha impulsado el desarrollo de ensayos de toxicidad con especies de sedimento orientados a la valoración de la toxicidad crónica. La estandarización de los ensayos con *Chironomus tentans* y *Chironomus riparius* por organizaciones como la U.S. EPA, ASTM u OECD, y la enorme cantidad de estudios realizados con estos organismos lo confirman.

En el Capítulo III siguiendo las recomendaciones de la OECD sobre bioensayos con quironómidos, se diseña un nuevo ensayo con la especie *Chironomus prasinus*, recolectada en aguas afluentes del río Jarama (Madrid) y cultivada en laboratorio. Este nuevo ensayo incluye además otra especie, *Daphnia magna*. El objetivo fue valorar simultáneamente los efectos en una especie típica de sedimento y otra propia de la columna de agua expuestas a un compuesto añadido al sedimento: la sal sódica del Pentaclorophenol (NaPCP). En el diseño se incluyó asimismo la posibilidad de valorar los efectos de cada especie expuesta únicamente a través del agua para lo cual se introdujeron sendos reservorios. La valoración se centró en efectos sobre el crecimiento y la reproducción de ambas especies, realizándose en paralelo un estudio del comportamiento y distribución del NaPCP en el sistema agua/sedimento. En un periodo similar a la duración del ensayo de reproducción de *Daphnia magna* pudieron valorarse los efectos agudos y sobre la reproducción de *Daphnia magna* producidos por el NaPCP, debidos tanto a la exposición a través de agua como a la exposición añadida por contacto con sedimento. Simultáneamente, se valoraron bajo las mismas condiciones de exposición los efectos sobre emergencia de fase adulta y reproducción de *Chironomus prasinus* por exposición a NaPCP a través de sedimento. Los efectos observados en *Daphnia magna* fueron comparables a los resultados obtenidos por otros autores utilizando ensayos mono-especie clásicos. Por otro lado, los resultados obtenidos con *Chironomus prasinus* no pudieron ser comparados por la falta de estudios similares en la bibliografía y por tratarse de una nueva especie de ensayo. No obstante pudo observarse que bajo las mismas condiciones de exposición la sensibilidad de *Chironomus prasinus* es menor que la de *Daphnia magna*, mientras la máxima concentración utilizada (20 mg PCP/kg de sedimento) tuvo efectos letales sobre *Daphnia magna*, en *Chironomus prasinus* solo se observó una reducción del índice de emergencia de adultos y de la reproducción.

Actualmente existe una tendencia clara hacia la utilización de métodos adicionales a los clásicos ensayos mono-especie en la ERA de un compuesto. Los ensayos multi-especies

son herramientas alternativas, ya que la información que aportan puede ser empleada previamente a la realización de estudios más complejos y costosos como son los mesocosmos. Los resultados satisfactorios obtenidos con el ensayo de dos especies desarrollado en el Capítulo III, permitieron utilizar esta experiencia para poner a punto las condiciones de un nuevo ensayo multi-especies. La posibilidad de valorar en un mismo ensayo efectos sobre dos especies para las que las rutas de exposición y estrategias de reproducción son muy diferentes, indujo a plantear un nuevo ensayo con una nueva especie de invertebrado que aportara información adicional.

Los invertebrados constituyen un grupo muy heterogéneo de taxones, su utilización en bioensayos ha sido recomendada por muchos autores, incluso para el estudio de la disrupción endocrina. Por ello la tercera especie que se consideró para el nuevo ensayo multi-especies fue una especie de gasterópodo hermafrodita (*Lymnaea peregra*). En el Capítulo IV se estudiaron las condiciones de un ensayo multi-especies con *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* y *Lymnaea peregra*. Por ser especies de distinta duración de ciclo de vida y estrategia reproductora (partenogénesis, sexual y hermafrodita, respectivamente), el estudio se centró a tres niveles diferentes: multigeneracional en el caso de *Daphnia magna*, ciclo de vida completo en el caso de *Chironomus prasinus* y reproducción en el caso de *Lymnaea peregra*. La puesta a punto de este nuevo ensayo incluyó la identificación y caracterización de nuevos parámetros ecotoxicológicos orientados a proporcionar información relevante desde el punto de vista ecológico: densidad para *Daphnia magna*; crecimiento hasta la madurez sexual y reproducción para *Chironomus prasinus*; y densidad, número acumulativo de huevos y eclosiones/día para *Lymnaea peregra*. Así mismo se establece el protocolo final donde se especifican las condiciones de ensayo: estadios, número de individuos, luz, temperatura, duración, etc. Este protocolo responde a las necesidades planteadas por los Comités Científicos de la UE (CSTEE y SCP), y la publicación de los resultados en *Aquatic Toxicology* indica la relevancia de este trabajo.

TERCERA PARTE: Discusión sobre la incorporación de los ensayos desarrollados en los protocolos ERA.

Finalmente en la Tercera Parte se aborda la aplicabilidad de los ensayos desarrollados a las ERAs de compuestos químicos. En el caso de los ensayos multi-especies es sencillo pensar en una aplicación directa a la ERA, ya que proporcionan mayor información sin necesidad de realizar grandes cambios en cuanto a ejecución y costo respecto de los ensayos mono-especie correspondientes. Puesto que ambos ensayos multi-especies se realizaron en sistemas agua-sedimento, las condiciones de exposición son más reales, particularmente para extrapolación al caso de sistemas lenticos. El ensayo con tres especies permite obtener parámetros ecotoxicológicos relevantes desde el punto de vista ecológico: información sobre

efectos en la reproducción y sobre sucesivas generaciones. La dificultad a la hora de clasificar y autorizar compuestos que actúan como disruptores endocrinos demanda la necesidad de nuevos métodos. El ensayo con tres especies de invertebrados supone una innovación ya que cubre tres tipos diferentes de reproducción, lo que permitiría detectar efectos debidos a una amplia variedad de mecanismos de acción, incluidos los efectos asociados a la disrupción endocrina.

El estudio de semi-campo realizado con plaguicidas utilizados en el cultivo de arroz constituye un método nuevo y adicional incluido dentro de un proceso ERA específico para estos productos fitosanitarios, y propuesto en el Capítulo V. Las condiciones excepcionales en que se realiza el cultivo de arroz justifican la necesidad de un proceso ERA específico. El desarrollo de un escenario ERA armonizado para toda Europa esta siendo objeto de debate, ya que el actual escenario genérico ERA para el resto de plaguicidas no puede aplicarse al caso del arroz. Dentro de esta línea, el modelo conceptual y escenario de exposición propuesto en el último capítulo constituyen una aportación basada en la experiencia práctica adquirida con el estudio de semi-campo (Capítulo II). El estudio de semi-campo queda incluido dentro del usual esquema iterativo ERA, por el cual la falta de datos (obtenidos básicamente a partir de ensayos de laboratorio) o la gran incertidumbre asociados a una evaluación de primer nivel puede originar la necesidad de un refinamiento del proceso. El refinamiento del proceso ERA propuesto consiste en dos fases de alto nivel: Tier II y Tier III. En la fase intermedia ó Tier II se incorporan las valoraciones ecotoxicológicas *ex situ* en estudios de degradación y disipación en campo.

La metodología propuesta ha sido ya reconocida para la autorización de dos herbicidas de arroz, y se ha enviado una propuesta basada en estos resultados para el desarrollo de las recomendaciones europeas.

A la vista de los resultados obtenidos puede concluirse:

1. Los ensayos estandarizados de inhibición del crecimiento de *Chlorella vulgaris* y de reproducción de *Daphnia magna* pueden adaptarse para valorar los efectos tóxicos de muestras ambientales de agua procedentes de cultivos de arroz. Si bien, las características físico-químicas y biológicas de dichas muestras producen un comportamiento diferente respecto de controles de laboratorio, particularmente un crecimiento comparativamente superior debido al elevado contenido de nutrientes. Este efecto puede ser contrarrestado con una adecuada elección de controles positivos.
2. La incorporación de valoraciones ecotoxicológicas *ex situ*, mediante la utilización de los ensayos adaptados, a los estudios de disipación en campo con productos

fitosanitarios constituye una herramienta válida para la caracterización de efectos. Los resultados obtenidos mediante esta herramienta pueden compararse con los resultados obtenidos con ensayos mono-especie clásicos, y establecer diferencias entre efectos bajo exposiciones en condiciones controladas de laboratorio y exposiciones más reales en condiciones de campo. Esta nueva herramienta permite valorar simultáneamente los efectos del producto fitosanitario y sus metabolitos, así como los posibles efectos sinérgicos, antagónicos y aditivos entre estos u otros compuestos aplicados sobre el cultivo. Finalmente, la información sobre la duración de los efectos tóxicos y su desaparición puede contribuir al establecimiento de tiempos específicos de 1) retención y drenaje del arrozal y 2) de aplicaciones sucesivas.

3. El estudio de semi-campo puede incluirse dentro de un proceso ERA para productos fitosanitarios utilizados en el cultivo de arroz, constituyendo una fase intermedia de evaluación. Tras la fase preliminar de evaluación y una vez identificados los grupos taxonómicos para los que puede existir un riesgo, el estudio de semi-campo puede utilizarse en el refinamiento del proceso. Si bien nuestro estudio se centró en la valoración sobre especies acuáticas, la valoración ecotoxicológica *ex situ* puede realizarse sobre especies posiblemente afectadas e identificadas en la fase preliminar. Esto último puede suponer la realización de ensayos con muestras de sedimentos o suelo recolectadas, con las correspondientes adaptaciones.
4. La especie *Chironomus prasinus* puede ser cultivada en laboratorio y utilizada en ensayos ecotoxicológicos con sedimentos. La utilización de esta nueva especie proporciona dos ventajas importantes respecto del ensayo con especies de ensayos estandarizados: reducción del periodo de ensayo y posibilidad de valorar reproducción como puestas de masas de huevos sin ninguna manipulación del sistema.
5. El ensayo con dos especies (*Daphnia magna* y *Chironomus prasinus*) permite valorar la contribución relativa de dos rutas diferentes de exposición: a través de sedimento y a través de la columna de agua. La utilización de reservorios resulta ventajosa tanto para valorar efectos debidos a la exposición única a través de agua, así como para obtener diferentes parámetros ecotoxicológicos mediante la adición y recuperación de organismos (efectos letales, crecimiento y reproducción). El ensayo es rentable por proporcionar en un único ensayo información adicional a la obtenida mediante los dos ensayos mono-especie correspondientes: distribución en el sistema agua-sedimento del compuesto, crecimiento de la nueva generación de *Daphnia magna* y reproducción en *Chironomus prasinus*.

6. Se ha desarrollado un nuevo ensayo multi-especies con *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* y *Lymnaea peregra*. Este ensayo proporciona nuevos parámetros ecotoxicológicos en cada una de las especies extrapolables a efectos sobre la población. Incorpora la capacidad de valorar efectos en sistemas agua-sedimento sobre tres especies de invertebrados con tres estrategias de reproducción distintas: partenogénesis, reproducción sexual con dimorfismo de la fase adulta y hermofroditismo. La posibilidad de valorar efectos asociados a la disrupción endocrina o cualquier otro mecanismo convierten a este ensayo en una herramienta aplicable a los procesos ERA.