

**DIAGNÓSTICO ECOTOXICOLÓGICO Y GENOTÓXICO DE LOS AFLUENTES
DEL LAGO YPACARAI, MEDIANTE BIOENSAYOS CON *Daphnia magna* Straus,**

***Danio rerio* , *Lactuca sativa* L y *Allium cepa* L.**

**ECOTOXICOLOGY AND GENOTOXICOLOGY ASSESSMENT OF YPACARAI LAKE'S
TRIBUTARY THROUGH DAPHNIA MAGNA STRAUS, DANIO RERIO, LACTUCA SATIVA L
AND ALLIUM CEPA BIOESSAYS**

- Tomás Rodrigo López Arias ¹
- Deidamia Franco de Diana
- Virginia Fernández Peralta
- César Benítez Torres
- Mónica Benítez
- Fernando Ramond
- María Eva López Vera
- Nathalia Bobadilla Giménez
- Guillermo Kurita
- Rodolfo Acuña
- Rita Caballero
- Danila López

¹ Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biología. Campus Universitario. San Lorenzo- Paraguay. Tel. (0972) 624.860. Tel. (+595-21) 585-600
e-mail: profetomi@gmail.com

DIAGNÓSTICO ECOTOXICOLÓGICO Y GENOTÓXICO DE LOS AFLUENTES DEL LAGO YPACARAI, MEDIANTE BIOENSAYOS CON *DAPHNIA MAGNA* STRAUS, *DANIO RERIO*, *LACTUCA SATIVA* L Y *ALLIUM CEPA*

López Arias, T. R.^{1*}, Franco de Diana, D.^{1,2}, Fernández,^{1,2} V, Benítez, C¹., Sánchez, P¹., López Vera, M.E¹., Kurita, H¹., Benítez, M¹., Ramond, F¹., Bobadilla, N.¹, Acuña K., R³., López, D⁴.

¹ Laboratorio de Mutagénesis, Teratogénesis y Carcinogénesis Ambiental. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Asunción. Campus Universitario. San Lorenzo- Paraguay.

² Investigador del CONACYT.

³ Laboratorio de Calidad de Agua

⁴ Departamento de Matemática, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

* Email: profetomi@gmail.com

RESUMEN

Se analizaron muestras de agua del lago Ypacaraí , sus afluentes (Arroyos Pirayú y Yukyry), y de su efluente (Río Salado), mediante parámetros fisicoquímicos y bioensayos ecotoxicológicos con *Daphnia magna* y *Lactuca sativa*. Mediante el Allium test y el test de Micronúcleos en *Danio rerio* se evaluaron los daños genotóxicos. En *Daphnia magna* se registraron: efectos agudos a las 48 horas de exposición en muestras del Arroyo Pirayú; y efectos crónicos con reducciones del 44%, en la fecundidad de los individuos expuestos a las aguas del lago. El Allium test, arrojó resultados, de elevados índice de micronúcleos, ,en las aguas del Arroyo Pirayu y del Lago. El test en *Danio rerio*, reportó un aumento significativo de Micronúcleos en los organismos expuestos a las muestras de aguas del arroyo Pirayú y en el Río Salado. Parámetros fisicoquímicos ,indican que las aguas analizadas están, entre las Clases II y III

PALABRAS CLAVE: Lago Ypacarai, Ecotoxicidad, Genotoxicidad, *Daphnia magna*, *Danio rerio*.

ECOTOXICOLOGY AND GENOTOXICOLOGY ASSESSMENT OF YPACARAI LAKE'S TRIBUTARY THROUGH DAPHNIA MAGNA STRAUS, DANIO RERIO, LACTUCA SATIVA L AND ALLIUM CEPA BIOESSAYS

ABSTRACT

In this study we analyzed samples of Ypacaraí Lake water, its tributaries (Pirayú and Yukyry stream), and effluent (Salado river), through physicochemical parameters and ecotoxicological bioassays with *Daphnia magna* and *Lactuca sativa*. Genotoxic damages were evaluated in *Allium cepa* and *Danio rerio*. We registered an acute toxicity with *D. magna* at 48 hs in Pirayú's water exposition, and reduction of 44% of fecundity in *D. magna* exposed to Ypacaraí lake water. Genotoxicity and Citotoxicity was evaluated using Allium test, with a high MN index for Yukyru and lake's water. In the other hand, *Danio rerio* test showed positive to the MN test to Pirayú and Salado River's water. Physicochemical parameters indicate that analyzed water is between classes II to III according to SEAM's standards.

KEYWORDS: Ypacaraí Lake, Ecotoxicity, Genotoxicity, *Daphnia magna*, *Danio rerio*

INTRODUCCIÓN

El lago Ypacaraí, presenta tres procesos que están contribuyendo con su deterioro; el primero es la eutrofización progresiva y altamente avanzada, otro de sedimentación debida a la deforestación de la zona de la cuenca y finalmente el de la contaminación. Se considera que las fuentes de contaminación inmediatas son las localidades, casas de campo, asentamientos turísticos e industrias asentadas a su alrededor que diariamente descargan sus aguas negras directamente al lago; las fuentes contaminantes mediatas las constituyen los campos agrícolas que emplean fertilizantes y plaguicidas a granel y sin control, residuos de los cuales son arrastrados por ríos y arroyos al lago (OPS/OMS, 1988; SALAS, 1995). En nuestro país se han llevado a cabo numerosas investigaciones sobre la contaminación del lago y de sus afluentes, y organismos como el SENASA (Servicio Nacional de Saneamiento Ambiental), DIGESA (Dirección General de Salud Ambiental) y la SEAM (Secretaría del Ambiente) realizan periódicamente controles sobre los niveles de contaminación, y calidad de agua del lago, sin embargo existen muy pocas investigaciones sobre el efectos de los contaminantes del Lago sobre la Salud humana y los efectos nocivos sobre las especies que en él viven.

Los ecosistemas están compuestos por grupos de todo tipo de organismos que funcionan conjuntamente e interaccionan con el ambiente físico. A su vez, el conjunto de ecosistemas constituye el entorno. El ciclo y el flujo de materiales mantienen una conexión variable dentro de los sistemas ecológicos, de modo que las alteraciones de un elemento pueden plasmarse en otro elemento aparentemente distinto. En general, los ecosistemas están en un estado de comunicación constante, lo cual facilita los efectos a gran escala de la contaminación. En este sentido la ecotoxicología abarca todos los aspectos de los sistemas terrestres y acuáticos que permiten identificar los efectos ejercidos por la exposición a un contaminante sobre la biota. (KLAASSEN Y WATKINS, 2005).

La ecotoxicología es el estudio del destino de las sustancias tóxicas y de sus efectos sobre un ecosistema, y se basa en investigaciones científicas que emplean tanto prueba sobre el terreno como métodos de laboratorio. La ecogenotoxicología (ibid) estudia los efectos de los contaminantes o de las sustancias químicas sobre el material genético de los organismos. Aunque el material genético puede sufrir daños sin que esto acarree consecuencias para el individuo, también es posible las mutaciones del ADN provoquen efectos somáticos como el cáncer. Uno de los objetivos de la Genética Toxicológica es estimar el riesgo genético que pueden producir los contaminantes ambientales.

FRANCO, D. FERNÁNDEZ, V. Y SEGOVIA, J. en el 2005, encontraron que los contaminantes del lago en las zonas más cercana a la desembocadura del arroyo Pirayu , demostraron tener un efecto citotóxico para células meristemáticas y para eritrocitos de larvas de anfibios, evidenciado por el aumento en la frecuencia de micronúcleos, y el aumento de C-mitosis o C- metafases en células en división de *Allium cepa* respectivamente, y encontrando menor efecto en las muestras provenientes de la playa Municipal de Ypacarai cercana a la desembocadura del arroyo Yukyry.

Para la determinación de los niveles de toxicidad aguda y crónica de las aguas actualmente se disponen de una serie de pruebas con diversos organismos modelos. Estas están concebidas para determinar los efectos inmediatos y tardíos de la exposición química sobre una serie de criterios de valoración, como la supervivencia, la reproducción, y las respuestas bioquímicas y fisiológicas

(KLAASSEN Y WATKINS, 2005). Los organismos seleccionados son *Daphnia magna* y *Lactuca sativa* , *Danio rerio* y *Allium cepa*. Con cada organismo biosensor seleccionado, se aplicaran los test de toxicidad

aguda, y crónica sugeridas por la red Water Tox, UESPA (U.S. Environmental Protection Agency) y la OECD.

Las especies del género *Daphnia* son las más utilizadas como organismos de prueba o de referencia en pruebas de toxicidad. La amplia distribución geográfica, el importante papel que cumplen al interior de la comunidad zooplanctónica, la facilidad de cultivo en el laboratorio, la reproducción partenogenética, y el corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías, han hecho de este grupo un ideal para la evaluación de toxicidad, de carácter universal. (CASTILLO, et al 2004)

los ensayos de toxicidad con *Daphnia magna* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras (GUILHERMINO, DIAMANTINO, SILVA, & SOARES, 2000), aguas residuales domésticas e industriales (BARAL, ENGELKEN, STEPHENS, FARRIS, & HANNIGAN, 2006), lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros. (CASTILLO, et al 2004; WERNERSSON & DAVE, 1997; RODRIGUEZ, MARTINEZ-MADRID, & CID, 2006)). En las pruebas de toxicidad con *D. magna*, se utilizan neonatos menores de 24 h de edad, que son expuestos a los tratamientos, por un periodo de 48 h (test agudo) hasta 21 días (test crónico).

Para estimar los efectos sobre la comunidad vegetal, se disponen de organismos modelos como *Lactuca sativa* y *Allium cepa*. El primero se utiliza para realizar bioensayos de toxicidad aguda, de 120 horas de exposición, lo que permite evaluar los posibles efectos fitotóxicos de las aguas, sedimentos e inclusive de sustancias puras y mezclas, en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas. Se establece como punto final para la evaluación de los posibles efectos tóxicos, la inhibición de la prolongación del crecimiento de la radícula. (CASTILLO, 2004). El segundo es utilizado para evaluar el efecto genotóxico, mediante el Allium test, por la sensibilidad a los componentes del agua y de los sedimentos (FISKESJO, G. 1985). El test con *Allium cepa* L. fue mejorado para ser un modelo experimental in vivo, efectivo para determinar efectos tóxicos y genotóxicos de sustancias y mezclas complejas (POSTALLI, 2010).

Los daños en el ADN por la exposición a concentraciones elevadas de contaminantes ambientales, puede ser estimado mediante el estudio de marcadores en pez cebra. El Análisis de micronúcleos en sangre periférica de peces es un test que se encuentra estandarizado como biomarcador de daño genotóxico de diferentes contaminantes ambientales (BOLOGNESI et al, 2006), a dosis sub tóxicas y a exposición crónicas.

Para el presente estudio se seleccionan tres organismos modelo, que permitirán estimar de manera representativa, los posibles efectos tóxicos y genotóxicos de las aguas del Lago Ypacarai y sus principales afluentes, sobre la comunidad zooplanctónica, la vegetal y la de peces.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Área de Estudio y de los puntos de muestreo:

El área total de la Cuenca del Lago es de 1.109 Km², conformados a las sub-cuencas de Pirayú con 335,21 Km² (32%), Costa Este con 61,17 Km² (5,51%), Costa Oeste con 74,31 Km² (6,70%), Yuquyry con 350,62 Km² (31,61%), Salado con 212,15 Km² (19,12%) y el Lago con 5,06 Km² (0,45%). Todas las sub-cuencas mencionadas son afluentes del lago excepto el del Salado que es su efluente.

Se seleccionaron cuatro puntos para el levantamiento de las muestras de agua (Fig. 1) El primero, ubicado en el Arroyo Yukyry (AY1, 25°15'52.43"S, 57°25'32.59"O), en una zona límite entre las ciudades de Aregua y Luque; el segundo en el Arroyo Pirayú (AP2, 25°23'19.54"S, 57°16'8.52"O), en la intersección con la Ruta N° 2, en la Ciudad de Ypacaraí; el tercero correspondiente a una zona cercana al centro del Lago Ypacarai (LY3, 25°19'20.38"S, 57°18'45.01"O); y el cuarto punto corresponde al Río Salado (RS4, 25°12'24.38"S, 57°22'26.86"O), en el tramo que une las ciudades de Luque y San Bernardino.

Recogida y traslado de las muestras

Se realizaron dos muestreos, el primero en el mes de mayo, y el segundo en el mes de Julio de 2013. Se tomaron muestras puntuales, en forma manual con muestreador tipo Van Dorn. Las muestras de agua fueron colectadas y conservadas a 4° C hasta su estudio, en envases de polipropileno de 5 L, y en frascos de vidrio color ámbar de 200 ml de capacidad.

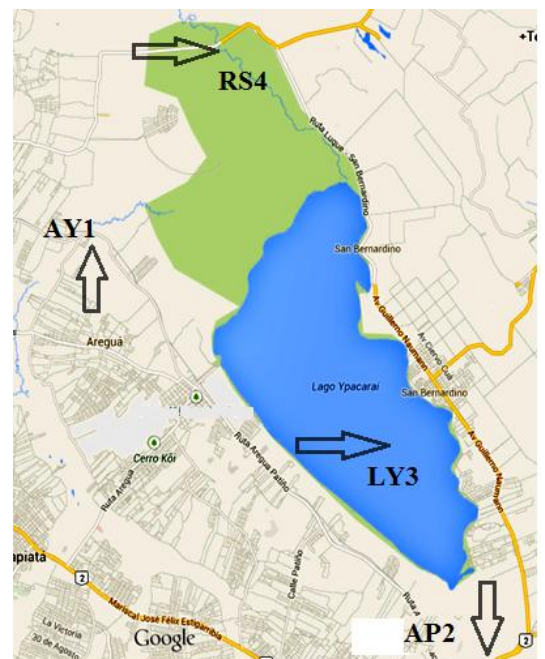


Figura 1: Ubicación de los puntos de muestreo (Google Maps, 2013).

Análisis fisicoquímico

Se realizaron determinaciones In Situ de los siguientes parámetros: Temperatura, pH, conductividad, oxígeno disuelto. Otros parámetros como de DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno), DQO (demanda química de Oxígeno), nitrógeno total y fósforo total, se determinaron en el Laboratorio de Calidad de Agua, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, aplicando las técnicas mencionadas en el *Standar Methods for the examination of wáter and wast-wasters* (APHA, 1998)

Bioensayos

Los bioensayos ecotoxicológicos y genotóxicos se realizaron en el Laboratorio de Mutagénesis Ambiental, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad Nacional de Asunción). Las pruebas de toxicidad aguda se efectuaron siguiendo los protocolos de Environmental Protection Agency (EPA) (2002), de la red Water Tox, del Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo (2004) y de la OECD OE (Organization for Economic Cooperation and Development, 1998 y 2011)

Bioensayos de Ecotoxicidad

Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna* Straus

Cultivo de *D. magna*

Los individuos utilizados fueron originalmente obtenidos del Centro de Investigación del Medio Ambiente (CIMA) de la Universidad de la Plata, Argentina. Los cultivos se mantienen en el Laboratorio de Mutagénesis Ambiental, en sistemas discontinuos a base de agua dura reconstituida (APHA, 1998), alimentadas con la microalga *Chlorella sp.* La microalga, a su se mantiene en medio de cultivo a base de un fertilizante foliar NPK (20:20:20). Las condiciones de mantenimiento fueron las siguientes: fotoperiodo de luz/oscuridad de 16/8 horas, temperatura de 20 °C, pH 7-8, y una dureza de 160-180 mg CaCO₃/L (NMX-AA-087-SCFI-2010)

Test de de toxicidad aguda por inmovilización de *Daphnia*

Las pruebas se realizaron aplicando el diseño DBCA 7×3, con dos controles y cinco concentraciones por cada muestra: 100 %, 50 %, 25 %, 12.5 % y 6,25 % (% v/v). Las diluciones fueron preparadas con agua dura

reconstituida (APHA, 1998). Por cada tratamiento, se prepararon 3 réplicas, cada una con 30 ml de la muestra y 10 neonatos menores a 24 horas de nacidas. La sensibilidad del organismo de prueba fue corroborada con dos controles: el positivo, corresponde a una solución de 2 mg/L de Dicromato de potasio; y el negativo, a base de agua dura reconstituida. Solo se aceptaron los resultados si la supervivencia en el control negativo era superior al 90 %, y la mortalidad del 100 % frente al control positivo (NMX-AA-087-SCFI-2010)

Transcurridas las 48 horas del inicio de los ensayos, se procedió a la revisión de la variable respuesta, que consistió en la muerte o inmovilidad de los organismos en cada envase. Previo al conteo, se agitaron suavemente por 10 segundos cada vaso, y posteriormente se contabilizaron los organismos inmóviles por cada réplica. Se seleccionó como medida de punto final la CE_{50} que representa la concentración de la muestra que produce la inmovilidad o muerte del 50% de los individuos expuestos al tratamiento. Los resultados biológicos fueron analizados estadísticamente mediante la regresión Probit, para establecer la $C.E_x$.

Test de Toxicidad crónica en Daphnia

Para los ensayos crónicos se empleo un diseño semi-estático, las pruebas se realizaron acorde a la guía propuesta por la OECD 211(OECD 1998). Se trabajó con concentraciones al 100 %, cuando no se existía de toxicidad aguda, a excepción de la muestra AP2, de la primera campaña, que fue diluida hasta un 40%. Se utilizaron 10 neonatos menores a 24 horas de nacidas (uno por recipiente) para el control y para cada muestra de agua. A cada recipiente se le adicionó 100 mL de la muestra en cada caso. Se evaluaron los efectos sobre la supervivencia y reproducción por 21 días. Durante el periodo de estudio, los individuos fueron alimentados con *Chlorella sp.* cada dos días y el recambio de agua se realizó dos veces por semana. Se contabilizaban y retiraban los neonatos cada 3 días, durante el tiempo de duración del test.

El criterio de aceptación de los resultados fue la supervivencia en los controles negativos $\geq 80\%$. Los resultados biológicos fueron expresados como promedios $\pm S.D$, y se analizaron estadísticamente usando el análisis de varianza (ANOVA de una vía) para determinar las diferencias significativas entre el control y los distintos tratamientos, seguido de la comparación múltiple de Dunnett, que fue realizado empleando el software SPSS 11.0. Se consideró un nivel de probabilidad menor a 0,05 como significativo.

Ensayo de toxicidad aguda con semillas de *Lactuca sativa* L. por inhibición de la elongación radicular

La fitotoxicidad de las aguas fue determinada mediante ensayos con *Lactuca sativa* (DUTKA, et al., 1989). Se trabajó con un control negativo, y cuatro concentraciones diferentes por cada muestra, y un factor de dilución de 0,5; a partir de la muestra se prepararon soluciones al 50 %, 25 % y 12.5 % (% v/v). Se utilizaron cápsulas de Petri de plástico descartables estériles, con papel filtro Qualy, de 14 micras de poro y 12.5 cm de diámetro. Se colocaron con ayuda de una pinza, 20 semillas por placa. Cada preparado fue embebido con 4 ml de del tratamiento, envueltas en bolsas plásticas, a fin de evitar la pérdida de humedad, a su vez estas fueron colocadas en cajas para evitar el contacto con la luz (CASTILLO, G. 2004) Posteriormente se incubaron los preparados en una estufa LAB-LINE, modelo AMBI-HI-LO, a 20 ± 2 °C, a oscuridad total, por un periodo de 120 horas.

El porcentaje de inhibición de la prolongación de la raíz (IP) se estimó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición (IP)} = \frac{\text{Muestra} - \text{Control}}{\text{Control}} \times 100$$

Donde: IP negativa: Tóxica (inhibición de la prolongación de la raíz).

IP positiva: Se considera estimulación del crecimiento.

IP = 0 : No tóxica.

El criterio de aceptación de los resultados fue la germinación en los controles negativos $\geq 90\%$.

Bioensayos de genotoxicidad

Ensayo de toxicidad crónica con *Danio rerio*. Ensayo de Micronúcleos.

Los ejemplares del pez *Danio rerio*, fueron adquiridos comercialmente de una granja de piscicultura y aclimatados en el laboratorio a una temperatura controlada (26 ° C) y fotoperiodo (16 h luz y 8 h de oscuridad) durante 4 semanas antes de los experimentos. Después de la aclimatación se establecieron grupos experimentales de 8 peces para cada pecera, el grupo control lo constituían los peces a los que solamente se les inyectó (suero fisiológico) en forma intraperitoneal. El grupo de la muestra es expuesto al agua en estudio por un periodo de 14 días de tratamiento, se realizó la extracción de sangre de las branquias de los peces, que fueron sacrificados por congelamiento. (OECD 204)

Para la obtención de la muestra, se procedió a cortar con una tijera una de las branquias, posteriormente con una micropipeta, se extrajo la muestra de sangre y de inmediato se realizó un frotis (BOLOGNESI et al , 2006), Las preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas. Se fijó en metanol, luego las preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas.

La tinción de las preparaciones son con colorante Giemsa al 6%, disuelto en buffer Sorensen, luego se lava en agua destilada, estas preparaciones se dejan secar a temperatura ambiente por 24 horas. Las preparaciones se dejan descansar por 48 horas, antes de proceder a la observación.

Se analizaron al azar dos mil eritrocitos por cada pez (Fig. 3, A), con el propósito de detectar la presencia de micronúcleos (Fig. 3, B), todo por triplicado. Se determinó la toxicidad mediante el análisis de relación eritrocitos maduros versus eritrocitos policromático, esta relación no debe ser inferior a 0,1, para afirmar que el agente no tiene una toxicidad, dirigida sobre los eritrocitos policromátidos.

El análisis de las preparaciones se realizó al microscopio con un aumento de 100X, utilizando el objetivo con aceite de inmersión. el índice de genotoxicidad comparando el control negativo (Suero fisiológico) inyectado, con las diferentes muestras de agua estudiadas. El análisis estadístico se realizó mediante Prueba de Kruskal-Wallis, para detectar las diferencias significativas entre los grupos de estudio.

Allium test. Determinación del efecto genotóxico y citotóxicos en células vegetales

Tratamiento del control negativo:

Para cada muestreo, se seleccionaron 40 bulbos de *Allium cepa*, estos fueron puestos en agua corriente por una hora, para la eliminación de las catáfilas y de las raíces viejas del disco. Luego de este procedimiento éstos fueron colocados en recipientes especiales en la incubadora a una temperatura 19° - 22° C, con oxigenación continua. (ROLDAN, R.M. et al; 2007, FERNÁNDEZ,V . et al;2011) .De los 40 bulbos, se seleccionaron 15 para los diferentes tratamientos. Previamente se seleccionaron las raíces de buen desarrollo y se colocaron en fijador Carnoy, para su posterior coloración con Orceína Acétoclorhidrica obteniendo así muestras de control negativo.

Tratamiento con las muestras de agua:

Para cada estación se prepararon recipientes con tres bulbos en cada uno, los cuales fueron mantenidos en condiciones estándar (ROLDAN, R.M. ET AL; 2007. FERNÁNDEZ, V . et al;2011)

Luego de 24 hs de tratamiento, se seleccionaron raíces con crecimiento óptimo de dos a tres centímetros, (FERNÁNDEZ et al. 2000), éstas fueron cortadas y fijadas en solución Carnoy para su posterior coloración con Orceína (MERCK) Acetoclorhídrica. Este procedimiento fue repetido a las 48 hs y 72hs de exposición.

Preparación de láminas:

Las raíces fijadas, fueron hidrolizadas con Ácido Clorhídrico 1N por 8 minutos a 60° C y posteriormente coloreados con orceína acetoclorhídrica por 5 minutos sobre una lámina portaobjetos, realizándose el aplastamiento o squash (MACGREGOR, n.d.) con ayuda de laminillas.

Determinación del Índice mitótico, de fases (IF) y aberraciones (IA) en células meristemáticas de A. cepa.

Los preparados fueron observados a través de microscopía óptica a un aumento de 1000x, registrándose las fases y anomalías presentes en el ciclo celular en un total de 2000 células en triplicado. Fueron calculados el índice mitótico (IM) (a) índice de fases (b) y el índice de aberraciones (c), a partir de las siguientes fórmulas:

$$IM = \text{N}^\circ \text{ de células en mitosis} / \text{total de células} \quad (a)$$

$$IF = \text{N}^\circ \text{ de células en cada fase} / \text{total de células en mitosis} \quad (b)$$

$$IA = \text{N}^\circ \text{ de células con cada aberración} / \text{total de células} \quad (c)$$

Se determinó el grado de significancia mediante la Prueba de Tuckey para muestras homogéneas y Prueba de Mann-Whitney para muestras heterogéneas a partir de los datos obtenidos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros fisicoquímicos

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de las aguas de los cuatro sitios. Primer y segundo muestreo.

Parámetro	AY1		AP2		LY3		RS4		Ref.- Res. N°222/02 SEAM. Clase 2 ^a
	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	
pH UpH	7,6	7,6	7,8	7,6	8,8	8,4	7,57	7,5	6,0-9,0
Temperatura °C	20,2	17,7	18,7	19,5	23,4	24	20,9	21,7	-
Conductividad µS/cm	540	-	57	70	245	195	760	215	-
O.D mgO ₂ /l	-	-	8,7	7,6	9,1	8,1	1,5	3,1	>5 mg/l O ₂
DBO5 mgO ₂ /l	16,8	6,3	3,0	1,8	10,8	4,4	3,6	1,5	≤5 mg/l
DQO mg/l	32,1	20,2	45,5	21,6	69,0	46,6	79,99	23,5	-
Fosforo Total mgP/l	0,54	0,6	0,11	0,16	0,17	0,045	0,11	0,05	<0,05 mg/l
N-Orgánico Total mg/L	2,26	0,6	3,67	0,37	1,53	0,5	3,225	0,70	<0,6 mg/l

^a**Clase 2.** Establecida por la Resolución N° 222/02 de la SEAM- Aguas destinadas: a) Para abastecimiento doméstico después de los tratamientos convencionales. b) Para protección de las comunidades acuáticas. c) Para recreación de contacto primario (esquí acuático, natación). d) La irrigación de hortalizas que son consumidas crudas, las frutas que crecen en los suelos y que sean ingeridas crudas sin la remoción de la película. e) La cría natural y/o intensiva (acuicultura), de especies destinadas para la alimentación humana.

Los resultados de los análisis fisicoquímicos determinados In situ, así como en el laboratorio se compararon con los niveles permitidos para aguas superficiales establecidos por la SEAM, a través de la Res. N° 222/02 que reglamenta el Padrón de calidad de las aguas en el territorio nacional. Los valores determinados en el primer, y en el segundo muestreo de agua, así como los niveles máximos permisibles se muestran en la tabla 1.

Las determinaciones fisicoquímicas realizadas indican que en la mayoría de los casos, las aguas pertenecen a la Clase II del padrón nacional de calidad de aguas, promulgada en la resolución 222/02 de la SEAM. Algunos valores sobrepasaron levemente dichos límites en el primer muestreo, con características de aguas de Clase III; más en el segundo muestreo, vuelven a acercarse a los valores normales.

Los parámetros que sobrepasan los valores de la Clase II, son: la DBO₅, en el 37% de los casos en AY1 y LY3, con concentraciones más elevadas en el primer muestreo (Fig. 4); los niveles de fósforo orgánico total y de nitrógeno orgánico total sobrepasaron en el 75% de los casos (Fig. 5 y fig. 6.).

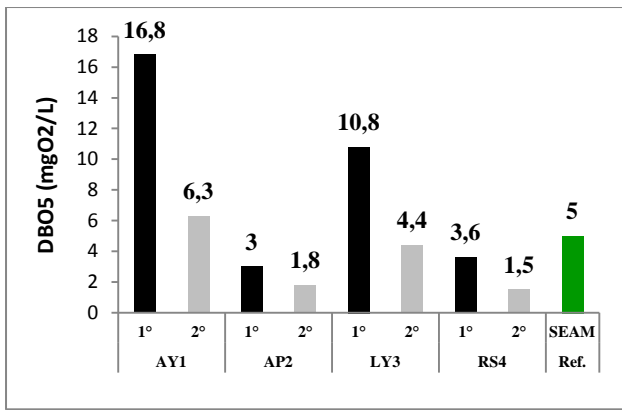


Figura 4. Valores de Demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) en los sitios de muestreo para el primer y segundo muestreo.

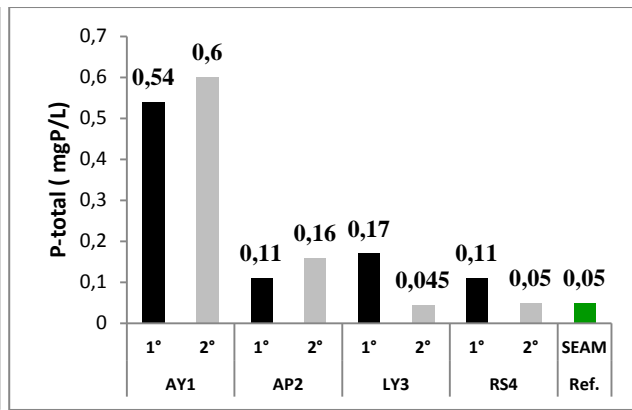


Figura 5. Valores de Fosforo Total en los sitios de muestreo para el primer y segundo muestreo.

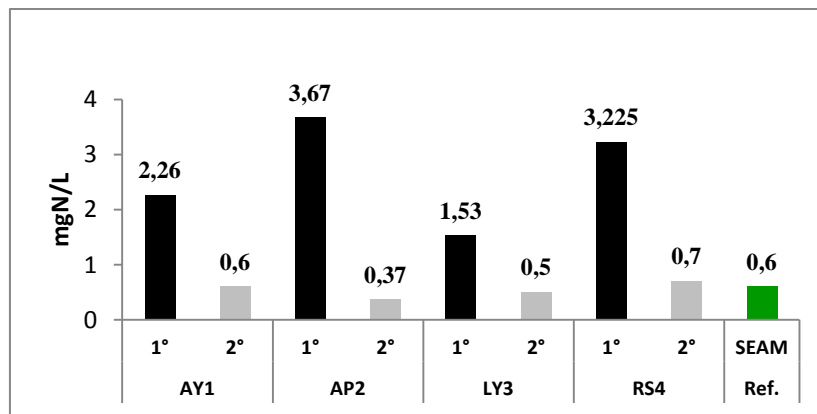


Figura 6. Valores de Nitrogeno orgánico total en los sitios de muestreo para el primer y segundo muestreo.

Test agudo en *D. magna*

En la tabla 2, se presentan los resultados de la evaluación convencional de los ensayos agudos de mortalidad/inhibición del movimiento, registrados con los neonatos menores a 24 h de edad, en las pruebas realizadas a las muestras de agua, después de primer y del segundo muestreo, tras 48 horas de exposición en cada caso. En la mayoría de los casos, las aguas estudiadas no resultar ser tóxicas para el biosensor. Los ensayos con los controles para ambas campañas validaron los test; el negativo realizado con agua dura reconstituida, presentó valores de supervivencia superiores al 90%; y la mortalidad con el dicromato de potasio, 2 mg/L arrojó valores de mortalidad del 100 % de los individuos expuestos

Tabla 2. Toxicidad aguda en *D. magna* a las 48 horas de exposición

Sitio de muestreo	C.E en % de la muestra que produce inhibición/mortalidad	
	1° campaña de muestreo	2° campaña de muestreo
AY1	N.D	N.D
AP2	C.E ₄₀ = 98,38 %	N.D
LY3	N.D	N.D
RS4	N.D	N.D

Nota: N.D.: Efecto tóxico no detectado. C.E.: Concentración efectiva (% v/v).

La prueba de toxicidad aguda solo produjo una respuesta positiva en el sitio AP2 durante la primera campaña (Tabla 2) llegando hasta una CE₄₀ al 98,38 % , y límite de confianza al 95% , esto indica la presencia en bajas concentraciones de sustancias tóxicas, a las que son sensibles *D. magna*; no obstante la inhibición de la movilidad no alcanzó el valor umbral definido al comienzo del estudio. En ambas campañas de muestreo, no se detectaron efectos tóxicos agudos importantes, en los demás sitios. Las aguas analizadas durante los dos muestreos no resultaron ser tóxicas para el biosensor, teniendo en cuenta la CE₅₀ como medida de punto final.

Test crónico en *D. magna*

En las tablas 3 y 4, muestra los efectos de la exposición a las muestras de aguas de cada sitio de estudio sobre la reproducción y la supervivencia de *D. magna*. Se presentan los valores promedios±D.E, de la madurez sexual (primera camada), los números de neonatos nacidos en 21 días, por día y por adulto, así como la longevidad de los individuos sometidos al estudio.

Tabla 3. Test de toxicidad crónica en *D. magna* de la primera campaña. Efectos de las aguas sobre el ciclo de vida.

	Madures sexual	N° de neonatos/21 días	N° de neonatos/días	Neonatos/ adulto	Longevidad /días
Control	10,4 ± 0,91	95,2 ± 12,2	4,53 ± 0,55	9,52 ± 1,15	20,6 ± 0,76
AY1	7,7 ± 0,45*	95,1 ± 19,2	4,52 ± 0,86	9,51 ± 1,82	20 ± 1,2
AP2	9,1 ± 0,3*	76,9 ± 11,2*	3,66 ± 0,5*	7,69 ± 1,06*	19,4 ± 1,81
LY3	8,87 ± 0,33*	53,75 ± 10,3*	2,04 ± 0,5*	4,3 ± 2,31*	17,6 ± 5,86
RS4	7,8 ± 0,4*	78,5 ± 16,1*	3,73 ± 0,72*	7,85 ± 1,5*	19,9 ± 0,66

Nota: valores medio± desviación estándar. *Las diferencias son significativas para p<0,05 (Método de Dunnett)

Tabla 4. Test de toxicidad crónica en *D. magna* de la primera campaña. Efectos de las aguas sobre el ciclo de vida.

	Madures sexual	N° de neonatos/21 días	N° de neonatos/días	Neonatos/adulto	Longevidad /días
Control	10,3 ± 1,33	99,1 ± 9,1	4,71 ± 0,41	9,91 ± 0,86	20,4 ± 1,14
AY1	9,5 ± 1,08	93,4 ± 15,2	4,46 ± 0,68	9,34 ± 1,43	19,4 ± 1,54
AP2	11,37 ± 1,40	73,75 ± 19,02*	3,51 ± 0,84*	7,37 ± 1,77*	16,6 ± 7,52
LY3	9,87 ± 0,35	70 ± 15,98*	3,33 ± 0,71*	7 ± 1,49*	15,9 ± 7,41
RS4	10,9 ± 0,87	85,1 ± 18,54	4,05 ± 0,8	8,52 ± 1,75	20 ± 1,05

Nota: valores medio ± desviación estándar. *Las diferencias son significativas para $p < 0,05$ (Método de Dunnett)

Se siguió el criterio de aceptabilidad de los resultados propuesto por LIU et al (2012), basada en la supervivencia (> 80%) y la reproducción (> 60 neonatos por hembra al final del test) Los individuos del grupo control, bajo las condiciones de ensayo presentaron una fecundidad promedio de $95,2 \pm 12,16$, individuos por cada hembra adulta de y longevidad de $20,6 \pm 0,76$ días al finalizar la prueba del primer muestreo; y valores promedios de $99,1 \pm 9,1$ neonatos por hembra; y $20,4 \pm 1,14$ días de longevidad, en el segundo muestreo (Tabla 3 y 4)

Trascurridos los 21 días de la prueba crónica, *Daphnia magna* produjo menor número de descendencia en las aguas del sitio LY3, durante el primer muestreo, con un valor medio de 53,75 neonatos, y en el segundo muestreo con 70 individuos. Estos valores representa el 56% y el 70%, comparados con el control en ambos casos. Los demás parámetros de crecimiento como el número de neonatos por día, neonatos por adulto y la longevidad también fueron menores en LY3, en ambas campañas de muestreo (Tabla 3)

Mostraron disminución para ambos muestreo en los parámetros: números de neonatos a los 21 días, neonatos por día, neonatos por adulto y longevidad, en el siguiente orden: LY3 > AP2 > RS4 > AY1. Siendo las aguas del lago (LY3) las que presentaron los menores valores en todos los casos; en cambio el afluente con menores resultados fue AP2.

El análisis estadístico de los resultados (ANOVA) del primer muestreo, puso de manifiesto diferencias significativas (nivel 0,05; método de Dunnett) entre el control y los tratamientos de LY3 en la producción de neonatos a los 21 días (Fig. 7.A), los neonatos por día, y de neonatos por adulto con valores de ($p=0,001$), AP2 ($p=0,023$) y RS4 ($p=0,043$). No mostraron diferencias significativas en los tratamientos la

longevidad, con p-valor en AY1 ($p=0,99$) , AP2 ($p=0,195$) , LY3($p=0,222$) y RS4($p=0,643$). La muestra con menor efecto negativo determinada en la prueba crónica con *D. magna* fue la AY1(Arroyo Yukyry), que solo presentó diferencias significantes en el parámetro definido como primera camada de neonatos ($p=0,001$)

Los datos para el segundo muestreo arrojaron diferencias significativas en la producción de neonatos a los 21 días (tabla 4), los neonatos por día, y de neonatos por adulto en AP2 ($p=0,023$) y en LY3 ($p=0,001$) (Fig. 7.B). No se encontraron diferencias significativas en los tratamientos en los parámetros longevidad, y primera camada para ninguno de los sitios estudiados. Tanto AY1 como RS4, no mostraron diferencias significativas respecto al control en ningún parámetro.

Los test de reproducción son considerados parámetros muy sensibles a la presencia de tóxicos (VILLARROEL et al 2003; ZALIZNIAK and NUGEGODA 2006; LIU et al 2012). En el presente estudio se corrobora que los niveles tóxicos no detectados con el test agudo, son revelados con el test crónico, y que la tasa de fecundidad, junto otros parámetros como el número de neonatos por adulto, por día y la longevidad resultaron ser marcadores representativos de los efectos a largo plazo sobre el biosensor.

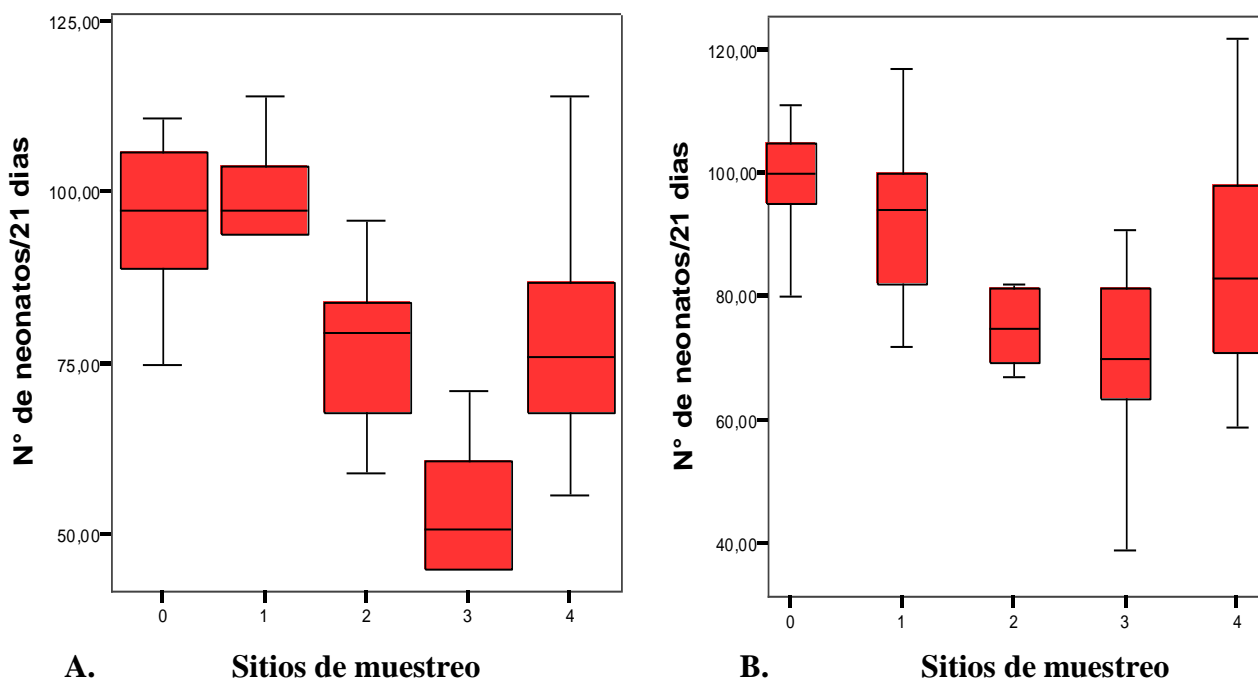


Figura 7 .Gráfico Box-Plot de los números de neonatos durante los 21 días de estudio.(0,control; 1- AY1; 2-AP2 ; 3- LY3, y 4- RS4) A. Primer muestreo. B. segundo muestreo

Test agudo en *L. sativa*

Las semillas expuestas a los tratamientos no exhibieron indicios importantes de inhibición de la prolongación radicular en *L. sativa* (Tablas 5 y 6). Se aprecia una leve tendencia a un mejor crecimiento de las raicillas mantenidas en las aguas, a excepción de las crecidas en RS4 en el primer muestreo, en la que se presentó una ligera diferencia negativa con respecto al control ($1,78 \pm 0,6$ cm). Las muestras estudiadas, no ejercieron efecto tóxico agudo sobre *Lactuca sativa*. El control negativo presentó valores de germinación >al 90% en todos los casos, lo permite validar los test en cada caso (DUTKCA, et al., 1989)

Tabla 5. Valores correspondientes a IP en los tratamientos con *L. sativa*, relativos al control negativo de la Primera campaña

Sitios	I.P ^a para las distintas diluciones del las muestras (% v/v).			
	12,5% ^b	25% ^b	50% ^b	100% ^b
AY1	0,15	0,15	-6,06	0,31
AP2	0,13	0,1	0,1	0,21
LY3	0,18	5,5	-3,1	1
RS4	0,15	-7,3	-4,09	-10

Nota:

^aI.P (inhibición de la prolongación de la raíz): IP negativa: Tóxica; IP positiva, Se considera estimulación del crecimiento; IP = 0, No tóxica.

^b concentración de la muestra en agua dura reconstituida (% v/v).

Tabla 6. Valores correspondientes a IP en los tratamientos con *L. sativa*, relativos al control negativo de la Primera campaña

Sitios	I.P ^a para las distintas diluciones del las muestras (% v/v).			
	12,5% ^b	25% ^b	50% ^b	100% ^b
AY1	3,64	0,13	2,72	2,34
AP2	18,48	4,79	10,68	35,68
LY3	3,40	4,31	5,73	4,96
RS4	-5,60	-2,61	14,63	17,01

Nota: ^aI.P (inhibición de la prolongación de la raíz): IP negativa: Tóxica; IP positiva, Se considera estimulación del crecimiento; IP = 0, No tóxica.

^b concentración de la muestra en agua dura reconstituida (% v/v).

Al comparar el crecimiento relativo, de las raicillas de *Lactuca sativa*, en las cuatro muestras, se observo solo en un caso, una leve inhibición del crecimiento radicular (I.P negativa) en aguas de RS4 del primer muestreo (Fig. 9), obteniéndose un valor de I.P.,-10 unidades. Las aguas del Río Salado del primer

muestreo arrojaron los valores fisicoquímicos más extremos de toda la campaña, la elevada conductividad (760 $\mu\text{S}/\text{cm}$), DQO (79,99 mg/l) y 1,5 mg/l de O.D, podrían estar relacionados con la leve inhibición registrada. En los demás casos estudiados, se produjo un incremento o estímulo en el crecimiento respecto al control, esto se atribuye a la presencia de nutrientes (fósforo y nitrógeno) en concentraciones elevadas propias de sistemas hídricos en proceso de eutrofización.

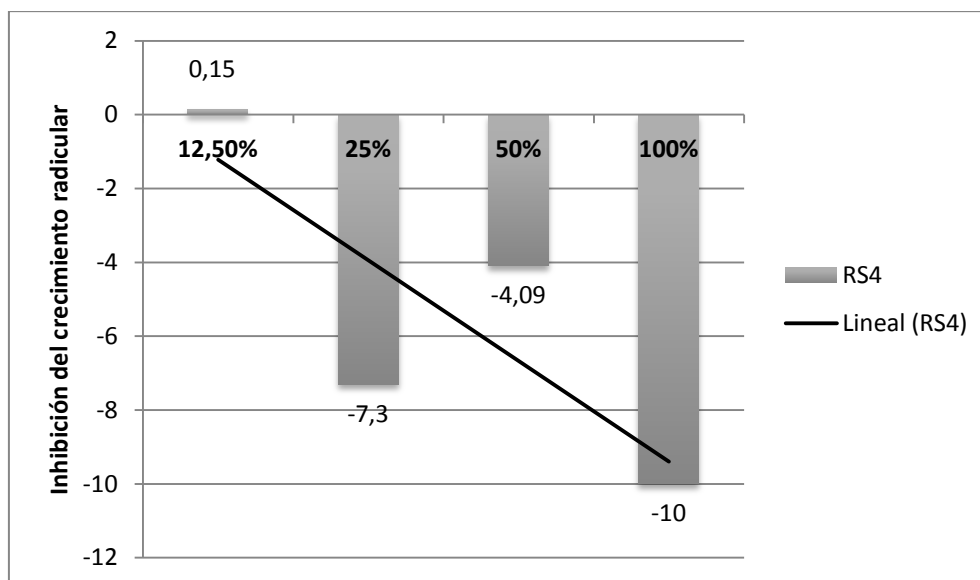


Figura 9. Variación de I.P para cada dilución (% v/v). de las muestras de agua de RS4 de la primera campaña

Ensayos genotóxicos

Allium test

Los ensayos bajo condiciones controladas a 24 Hs, mostraron diferencias significativas en los puntos AP2, LY3 y AY1 en cuanto al Índice Mitótico existe una disminución significativa con un nivel de significancia de 95% con respecto al control (Tabla 7). A las 48 Hs los puntos AP2, LY3 y AY1 mostraron una disminución en el índice mitótico con un nivel de significancia del 99%, sin embargo a las 72 horas, solo el punto AY1 mostró una disminución en el índice mitótico en contraste con el control negativo.

Con respecto a la citotoxicidad, no se encontraron diferencias significativas de C-Metafases con el control negativo en ninguno de los tiempos de exposición.

Los índices de micronúcleos, indicador de presencia de agente(s) genotóxico(s) se mostraron un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos en los puntos AP2 y AY1 a las 24 y 72 horas de exposición (Fig. 2. D y E), siendo éstos los puntos de muestreo con mayores niveles de genotoxicidad.

El segundo muestreo no presenta niveles significativos en cuanto a Índice mitótico y aberraciones cromosómicas en ninguno de los puntos y tiempos de exposición (Tabla 8)

Tabla 7. Resultados de los conteos del primer muestreo y su nivel de significancia para el Índice Mitótico, C-Metafase para la determinación de citotoxicidad y Miconúcleos para la determinación de genotoxicidad.

	Puntos de Muestreo	Índice Mitótico	Significancia	Índice de C-Metafase	Significancia	Índice de Micronúcleos	Significancia
24 horas	AP2-24hs	4,00	0,005 (*)	0,83	0.7065	0,19	0.0108 (*)
	LY3-24hs	2,42	0,003(*)	0,63	10.000	0,10	10.000
	AY1.24hs	4,75	0,013(*)	0,21	0.8797	0,18	0.0250 (*)
	RS4-24hs	4,78	0,773	0,29	0.5402	0,11	0.9151
	Control Negativo	8,99		0,22		0,00	
48 horas	AP2-24hs	2,62	0.00208 **	0,33	0.999	0,21	0.350
	LY3-24hs	3,47	0.00113 **	0,53	0.981	0,11	0.828
	AY1.24hs	2,08	0.00577 **	0,33	0.920	0,24	0.845
	RS4-24hs	7,43	0.67761	0,53	0.981	0,00	1.000
	Control Negativo	8,99		0,22		0,00	
72 horas	AP2-24hs	5,89	0,627	0,32	0.619	0,21	0.0350 (*)
	LY3-24hs	1,60	0,971	0,83	0.941	0,73	0.8430
	AY1.24hs	7,66	0,04(*)	0,76	0.870	0,22	0.0277 (*)
	RS4-24hs	3,72	0,181	0,33	0.934	0,00	1.000
	Control Negativo	8,99		0,22		0,00	

Signif. codes: '***' 0.01 '**' 0.05.

El análisis de datos del IM es indispensable para la evaluación de la citotoxicidad ya que miden la cinética celular. Los controles negativos obtenidos en este trabajo presentaron un rango de IM 5 ± 8 , unidades, que se encuentran dentro de los parámetros reportados por FISKESJO, G. (1985). En los resultados obtenidos del primer muestreo en base a análisis estadísticos existe una significancia en cuanto a la disminución del Índice Mitótico (I.M.) en 3 de los 4 puntos; OLORUNFEMI et al (2011) en estudios realizados en agua residual, se encontraron disminución similares en el I.M. Alteraciones en ciclo celular, fueron reportados en efluentes de las curtiembres de la cuenca del Lago Ypacarai, estos efectos se asociaron desequilibrios sobre la síntesis de proteínas que condicionan el ciclo celular (FRANCO DE DIANA, 2000).

Tabla 8: Resultados de los conteos del segundo muestreo y su nivel de significancia para el Índice Mitótico, C-Metafase para la determinación de citotoxicidad y Miconúcleos para la determinación de genotoxicidad.

	Puntos de Muestreo	Índice Mitótico	Significancia	Índice de C-Metafase	Significancia	Índice de Micronúcleos	Significancia
24 horas	AP2	6,86	0,538	0,053	0,563	0,086	0,349
	LY3	6,70	0,494	0,053	0,828	0,029	0,953
	AY1	6,29	0,371	0,018	0,919	0,083	0,158
	RS4	6,00	0,326	0,09	0,737	0,024	0,919
	Control Negativo	8,58		0,015		0,034	
48 horas	AP2	7,15	0,620	0,056	0,254	0,05	0,471
	LY3	7,03	0,647	0,066	0,469	0,00	0,374
	AY1	5,48	0,239	0,032	0,442	0,00	0,374
	RS4	6,83	0,591	0,014	0,963	0,018	0,795
	Control Negativo	8,58		0,015		0,034	
72 horas	AP2	5,41	0,253	0,05	0,316	0,01	0,688
	LY3	5,90	0,306	0,013	0,337	0,00	0,374
	AY1	7,45	0,647	0,011	0,818	0,033	0,883
	RS4	5,01	0,333	0,00	0,374	0,073	0,374
	Control Negativo	8,58		0,015		0,034	

Signif. codes: *** 0.01 ** 0.05.

El Allium test es un sistema efectivo para un screening de genotoxicidad en aguas residuales, permite clasificar el potencial genotoxicidad de diferentes muestras (NIELSEN, M. 1994).

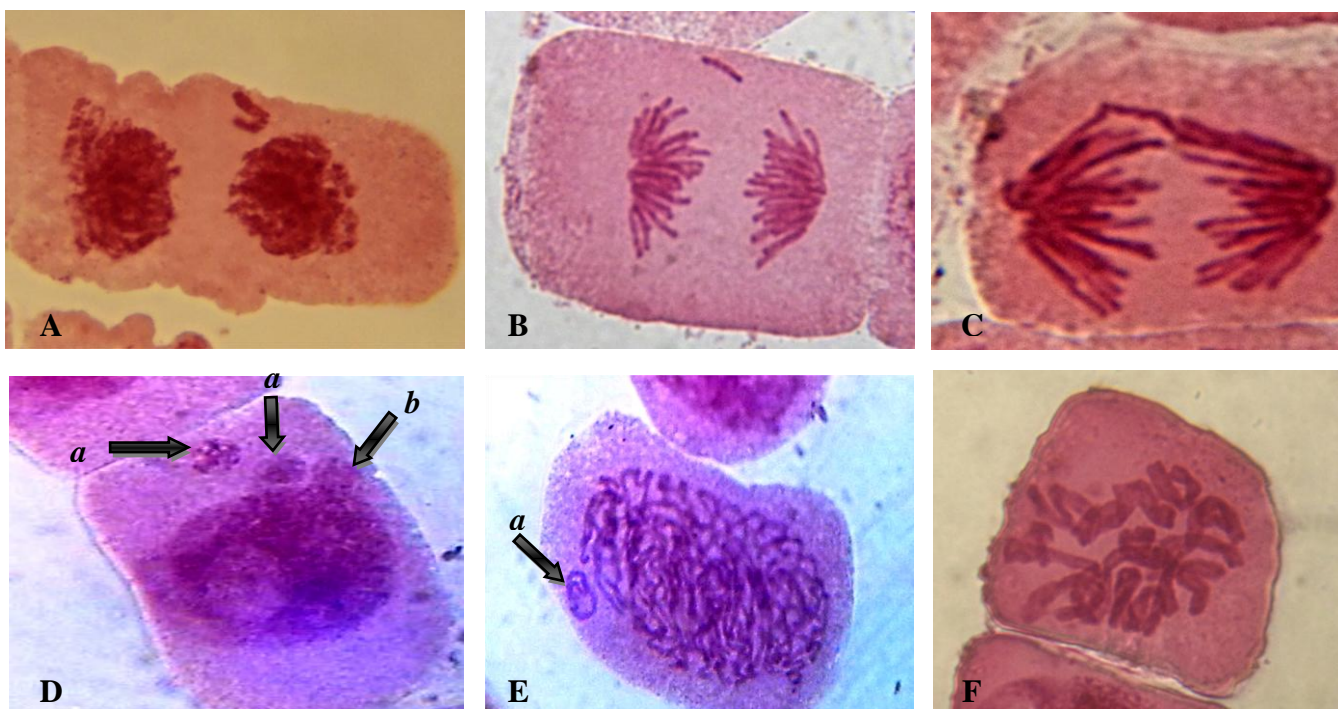


Figura 2. Aberraciones cromosómicas obtenidas con Allium test, en AP2, del primer muestreo. A. Formación de micronucleo. B. pérdida de cromosoma. C. Puente en anafase. D. Micronucleos en interfase (*a*, micronúcleos; *b*, brote). E. Micronúcleo en profase (*a*, micronúcleo) F. C-metafase (Coloración de Orceina, 400x)

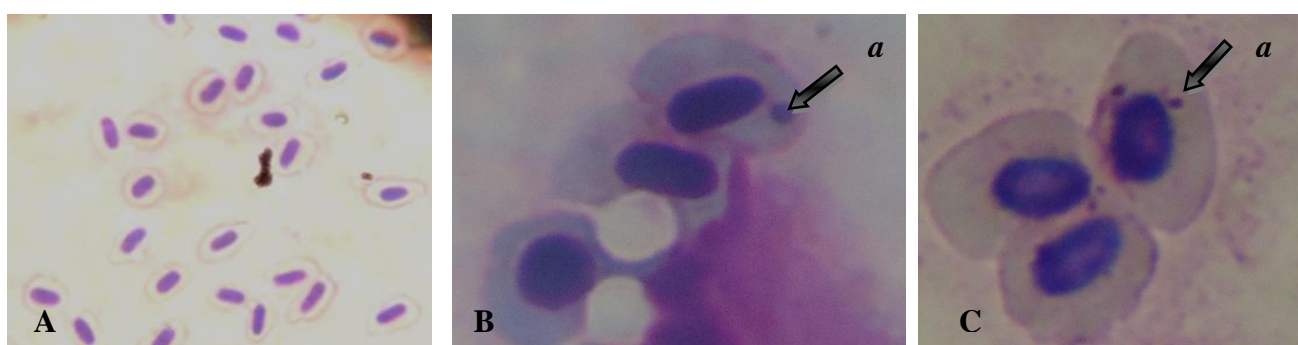


Figura 3. Células sanguíneas en pez cebra. A Células normales (100x). B-C. Células con microcnúcleos. *a*, micronúcleo.(Coloración Giemsa, 400x)

Test crónico en *Danio rerio*

En la tabla 9 se detalla la frecuencia de micronúcleos (MN) (Fig. 3. B-C) observados, sobre un total de 2000 células por campo, en los puntos de muestreo Arroyo Yukyry (AY1), Arroyo Pirayú (AP2), Lago Ypacaraí (LY3) , Río Salado (RS4), para el primer, y segundo muestreo. Se apreciar que la frecuencia de

MN en la zona de muestreo del Arroyo Yukyry, no muestra diferencias significativas con las frecuencias de MN del control, sin embargo se observaron diferencias significativas con respecto al control, en las frecuencias de MN de los puntos de muestreo ($X^2(1)=11,75$, $p < 0,05$), correspondientes al Arroyo Pirayú (%M.N=0,38) y del río Salado (%M.N=0,46) La Figura 10 muestra la relación de frecuencias de micronúcleos (MN) en cada punto de muestreo y periodo de estudio.

Tabla 9: Frecuencia de MN/ 2000 células según zonas de muestreo y tiempo de muestreo

puntos de muestreo	Primer muestreo			Segundo muestreo		
	Total de células	MN	% MN	Total de células	MN	% MN
AY1	6121	6	0,07	6178	4	0,06
AP2	6057	23	0,38*	6070	4	0,06
LY3	6007	10	0,16	6335	3	0,14
RS4	6110	28	0,46*	6035	1	0,02
control	6074	5	0,08	6003	4	0,07

*Las diferencias son significativas para $p < 0,05$ (Prueba de Kruskal-Wallis)

Los micronúcleos pueden originarse durante mitosis anormales, que inducen a la formación de cromosomas retrasados o adelantados (efecto citotóxico), o por segmentos de cromosomas producto de rupturas de las cromátidas, que hacen que los segmentos al carecer de centrómero no migren a los polos, evidenciándose como pequeños núcleos en el citoplasma.(efecto genotóxico) (MUDRY M. y CARBALLO, 2006). El valor de la frecuencia de MN encontrados en las muestras de individuos expuestos al control corresponde a una inducción natural, cuyo rango coincide con datos para frecuencias de MN basales para pez cebra, reportados por otros investigadores (PRIETO GARCÍA, F; BÁEZ RAMÍREZ, OA; SCOUT, W; GAYTÁN OYARZÚN, JC; ZÚÑIGA ESTRADA, A.,2007

El aumento de MN en los peces expuestos a muestras de agua de la zona del Arroyo Pirayú, coincide con datos reportados por FRANCO DE DIANA, D; FERNÁNDEZ, V; SEGOVIA,J. (2006), que indican un aumento de MN en larvas de anfibios expuestas a muestras de aguas correspondientes a la zona de muestreo de la desembocadura del Arroyo Pirayú. Por lo que los contaminantes que contienen estas aguas podrían tener un efecto genotóxico o citotóxico .

El aumento significativo de MN correspondiente a la zona de desembocadura del Río salado, también podría estar relacionado a la concentración subtóxica de los contaminantes que provienen del lago, que sin embargo

en la segunda campaña de muestreo no se ha encontrado efecto genotóxico debido a que en esa época de muestreo fueron abundantes las lluvias y podrían haber diluido la concentración de los contaminantes con potencial efecto genotóxico

Los resultados de este estudio y de otras investigaciones similares (PRIETO, Z. y col., 2008, OLIVERA BAEZ R., FRANCISCO PRIETO y CARLOS GALAN VIDAL, 2004), han demostrado que el ensayo de MN en eritrocitos de sangre periférica de peces, resulta ser un excelente indicador para la evaluación de efecto genotóxico de contaminantes de agua.

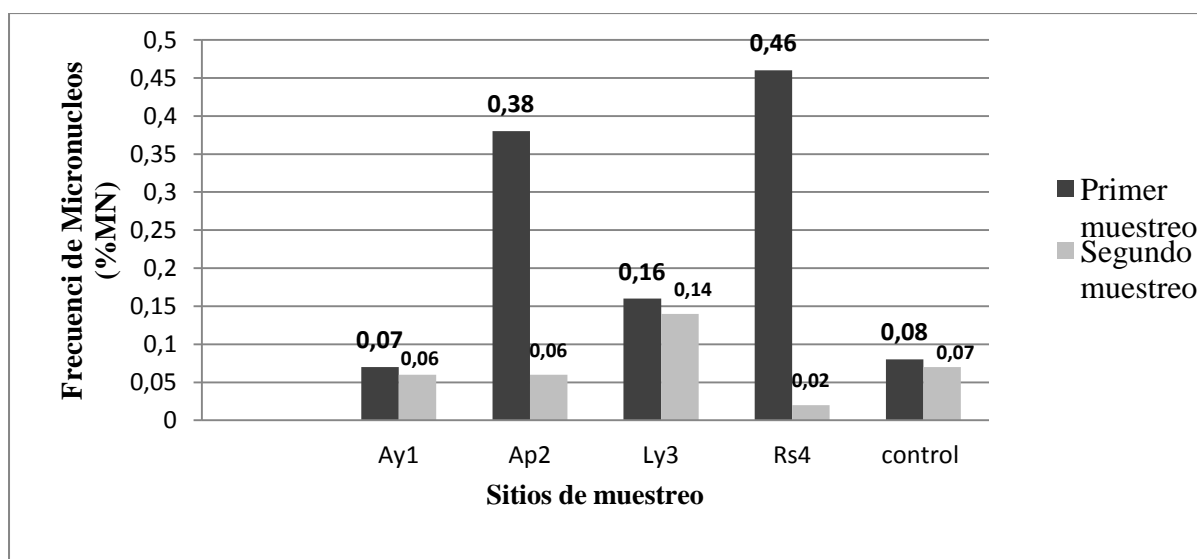


Figura 10: Frecuencia de MN en diferentes muestreos comparados

CONCLUSIONES

Los ensayos fisicoquímicos indican que las muestras analizadas presentan características de aguas de clase II; parámetros como la D.B.O₅, nitrógeno total, y fósforo total, durante la primera campaña presentaron valores de aguas de Clase III en algunos casos, esto se revirtió en el segundo muestreo. Los valores fisicoquímicos de la segunda campaña fueron menores a los registrados en el primer muestreo; también se observó una reducción de los efectos toxicológicos y genotóxicos en el segundo muestreo. Esto estaría relacionado con las precipitaciones que se desarrollaron en las semanas previas al muestreo, lo que produjo una gran dilución de los contaminantes. Los bioensayos realizados con las aguas de los afluentes (AY1 y AP2), con las del lago Ypacaraí (LY3), y con la del efluente del sistema (RS4) durante los dos muestreos, en todos los casos mostraron escasos efectos negativos para las pruebas de toxicidad aguda en *D. magna*, como en *L. sativa*. La inhibición del crecimiento radicular observado en una ocasión con *L. sativa* (RS4, del primer muestreo) se encuentran dentro de márgenes tolerables, y es clasificado como toxicidad leve.

Muy diferentes fueron los resultados obtenidos en los estudios crónicos. En el primer muestreo, se presentaron los mayores efectos. En *D. magna* se reportaron efectos crónicos significativos en muestras del primer muestreo en AP2, LY3 y de RS4; y en AP2 y LY3 en el segundo muestreo. Los efectos se presentaron en los parámetros reproductivos como la fecundidad, día de la primera camada, número de neonatos por día y por adulto; también se presentaron efectos significativos en la longevidad.

Según los resultados obtenidos en el primer muestreo con *Allium test*, se ha determinado que el ciclo replicativo celular sigue sin interrupción acumulando aberraciones cromosómicas, como micronúcleos, así como también puentes intercromosómicos, comosomas adelantados, células binucleadas y brotes nucleares, siendo los puntos Arroyo Pirayú (AP2) y Arroyo Yukyry (AY1) con mayor presencia de agentes genotóxicos, considerando los niveles significativos de micronúcleos encontrados. En el segundo muestreo, no se observan diferencias significativas en ninguno de los puntos estudiados, así como en los tiempos de exposición.

En *D. rerio*, se presentaron resultados similares a los demás estudios crónicos, con efectos significativos en AP2 y RS4 del primer muestreo. No se reportaron efectos crónicos en el segundo muestreo.

Las afirmaciones anteriores indican la necesidad de continuar el presente trabajo, y establecer el estudio como un monitoreo permanente de las condiciones tóxicas y genotóxicas de las aguas que desembocan en el lago, así como el propio espejo de agua. Esto permitiría evaluar los posibles riesgos por la exposición a este importante sistema hídrico, además serviría para evaluar la efectividad de las estrategias de manejo de la cuenca propuesta por las entidades nacionales.

AGRADECIMIENTOS

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por el apoyo brindado, así como a la Dirección de Investigación del Rectorado de la Universidad Nacional de Asunción, por el financiamiento del proyecto.

LITERATURA CITADA

- ANDRIOLI, N, WULFF, A., MUDRY, M. 2006. *Allium cepa* como biomonitor de Toxicidad y Genotoxicidad de Metrodinazol. THEORYA 15/002 : 9-16. Universidad del Bio Bio, Chillán. Chile.
- APHA (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th edition. American Public Health Association, Washington, D.C

- “AQUATOX”. Mayo 2003. “ Aquatox: juventud, ciencia, salud y medio ambiente”. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID/IDRC), de Canadá. Programa “ Enfoques Ecosistémicos para la Salud(Ecosalud).
- BARAL, A, ENGELKEN, R., STEPHENS, W., FARRIS, J., & HANNIGAN, R. (2006). Evaluation of aquatic toxicities of chromium and chromium-containing effluents in reference to chromium electroplating industries. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 50(4), 496–502. doi:10.1007/s00244-005-0068-x
- BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, D.; SCIUTTO, A. 2006 Assesment of Micronuclei induction in pheripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions . *Aquatic Toxicol.*, V:78, ps93 –s98
- CAPÓ MARTÍ, MIGUEL. 2002. Principios de Ecotoxicología. Diagnóstico, tratamiento y gestión del Medio Ambiente. McGRAW-HILL/INTERAMERICANA DE ESPAÑA S.A.U. España. 314 pp.
- CASTILLO MORALES, GABRIELA. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones - México: IMTA.
- DUTKA, B. In: *Methods for microbiological and toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments*. National Water Research Institute (NWRI), Canada: Burlington; 1989.
- ESPÍNOLA, JULIO, LORENZO, FERNANDO. Evaluación de la Toxicidad Aguda y Genotoxicidad de Efluentes industriales Vertidos en las principales Cuencas Hídricas del Municipio de Montevideo, Uruguay. Informe Final. Laboratorio de Calidad Ambiental. Sección Bioensayos.
- FERNÁNDEZ, V., DESVARS, N., FRANCO DE DIANA, D., BENÍTEZ, B., JOACHINI, J. & JOACHINI, L. 2000. Acción de plantas medicinales paraguayas sobre el ciclo replicativo celular. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 17.
- FISKESJÖ, G. 1985. The Allium Test as Standard in Environmental Monitoring. *Hereditas* 102: 99-112.
- ———. 1993. The Allium Test in Wastewater Monitoring. *Environmental Toxicology and Water Quality* 8: 291-298.
- ———. 1997. Allium Test for Screening Chemicals; Evaluation of Cytological Parameters. En: W. Wancheng, J. W. Gorsuch y J. S. Hughes (eds.). *Plants for Environmental Studies*. CRC Press, Florida, pp. 308-329.
- FRANCO DE DIANA, D. FERNANDEZ, V., TORRES, E. 2000. Evaluación de la actividad genotóxica de efluentes de curtiembres del Dpto. Central de la Región Oriental. Paraguay. *Revista de Ciencia y Tecnología Dirección de Investigaciones – UNA*, 2, 37 – 48
- FRANCO DE DIANA, D; FERNÁNDEZ, V; SEGOVIA, J 2006 Análisis de la actividad genotóxica y citotóxica en organismos expuestos a contaminantes del lago ypacarai *Investigaciones y estudios de la UNA Vol.1 :38 - 49*
- GUILHERMINO, L., DIAMANTINO, T., SILVA, M. C., & SOARES, A M. (2000). Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicology and environmental safety*, 46(3), 357–62. doi:10.1006/eesa.2000.1916.
- GRANT, WF. 1982. Chromosome aberration assays in Allium. A report of the US Environmental Agency Gene - Tox Program. *Mutation. Res.* 99, 273-291
- LALLANA, M., ET ALL. 2007. Bioensayo de germinación de *Lactuca sativa* (L.): determinación de calidad de agua en represas para riego. *Rev. FCA UNCuyo*. Tomo XL. N° 1. Año 2008. 29-38.
- LIU, Y., QI, S., ZHANG, W., LI, X., QIU, L., & WANG, C. (2012). Acute and chronic toxicity of buprofezin on *Daphnia magna* and the recovery evaluation. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 89(5), 966–9. doi:10.1007/s00128-012-0802-9
- MACGREGOR, H. C. (n.d.). *An introduction to animal cytogenetics*. Springer.

- NMX-AA-087-SCFI-2010. Norma Mexicana de Análisis de Agua y Evaluación de Toxicidad Aguda con *Daphnia magna*. Straus (Cladocera, Crustacea). Secretaría de Economía.
- MUDRY, M. Y CARBALLO, M. 2006. Genética toxicológica. De los Cuatro Vientos. Bs.As.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (1998) *Daphnia magna* reproduction test. OECD guidelines for testing of chemicals, vol 211. Paris, France.
- "OECD 204 fish prolonged toxicity test 14 day study pdf free ebook ..." 2013. 12 Mar. 2013 <<http://ebookbrowse.com/oecd-204-fish-prolonged-toxicity-test-14-day-study-pdf-d390903666>>
- "OECD 203: FISH ACUTE TOXICITY TEST – limit test and LC50 - GLP." 2011. 12 Mar. 2013 <http://www.eurofins.it/media/3400954/EurofinsBiolab_mktg_50019_Fish%20Acute%20Toxicity%20test.pdf>
- PRIETO Z. et al. 2008. Efecto genotóxico de dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus*. Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública. V:25 (1) : 51-58
- PRIETO GARCÍA, F; BÁEZ RAMÍREZ, OA; SCOUT, W; GAYTÁN OYARZÚN, JC; ZÚÑIGA ESTRADA, A. (2007). Toxicidad y teratogénesis por arsénico en aguas en el pez cebra (*Danio rerio*). Revista de Toxicología, . 18-22.
- POSTALLI, F. et al. Genotoxic evaluation of an industrial effluent from an oil refinery using plant and animal bioassays. Genet Mol Biol. 2010 Jan-Mar; 33(1): 169–175
- PROTECTION AGENCY, Corvallis, OR, EPA 60072-83/054, NTIS Publ. No. PB83241737. Citado por: Burton, G.A. y Pitt E. R. 2002. Stormwater effect handbook: a toolbox for watershed managers, scientist, and engineers. Lewis Publishers. CRC Press Company. 911 p.
- RODRIGUEZ, P., MARTINEZ-MADRID, M., & CID, A. (2006). Ecotoxicological assessment of effluents in the Basque country (Northern Spain) by acute and chronic toxicity tests using *Daphnia magna* straus. *Ecotoxicology (London, England)*, 15(7), 559–72. doi:10.1007/s10646-006-0091-3
- RONCO, ALICIA; SOBRERO, CECILIA; GRASSI VALERIA; KAMINSKI, LETICIA; MASSOLO, LAURA; MIN LEONARDO. WaterTox bioassay intercalibration network: Results from Argentina. Environm Toxicol 2000;(15): 287-296.
- ROLDÁN, R.M., NORIEGA, M.F., WAGNER, M.L., GURNI, A.A. & BASSOLS, G.B. 2007. Estudio de genotoxicidad de *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. -Simaroubaceae-. Acta toxicológica argentina 15(2), 39–42.
- SEAM, Resolución N° 222/02 .POR LA CUAL SE ESTABLECE EL PADRON DE CALIDAD DE LAS AGUAS EN EL TERRITORIO NACIONAL. 18 de Set. 2013. http://www.seam.gov.py/images/stories/seam/resoluciones/resolucion_222_02.pdf
- TORRES RODRIGUEZ, MARINA TERESA. 2003. Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. Rev Cubana Higiene y Epidemiología. 2003;41(2-3)
- OLORUMFEMI, D; et al. 2011. Genotoxicity screening of industrial effluentns usining onion bulbs (*Allium cepa*).University of Technology, Ogbomosho. Vol 15(1) 211-216
- VILLARROEL MJ, SANCHO E, FERRANDO MD, ANDREU E (2003) Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. Chemosphere 53:857–864.
- WANG W 1987. Root Elongation Method for Toxicity Testing of Organic an Inorganic Pollutants. Environmental Toxicology & Chemistry 6, 409-414
- WERNERSSON, A., & DAVE, G. 1997. Environmental Contamination and Toxicology Phototoxicity Identification by Solid Phase Extraction and Photoinduced Toxicity to *Daphnia magna*, 273, 268–273.
- ZALIZNIAK L, NUGEGODA D (2006) Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of *Daphnia carinata*. Ecotoxicol Environ Saf 64:207–214