

INVESTIGACIÓN

EMPLEO DEL CARACOL DE AGUA DULCE *Physa venustula* Gould COMO HERRAMIENTA ECOTOXICOLÓGICA PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGOS AMBIENTALES POR PLAGUICIDAS¹

Employing the freshwater snail *Physa venustula* Gould as an ecotoxicological tool for environmental risk assessments by pesticides

José Iannacone O.², Cecilia Caballero R.² y Lorena Alvariano F.²

ABSTRACT

A standardized ecotoxicological evaluation of soil pesticides such as lindane, chlorpyrifos and metamidofos was realized at Federico Villarreal University, Lima, Peru, employing the freshwater snail *Physa venustula* as a tool for environmental risk assessment. The values determined for mean lethal concentration (LC_{50}) for the lethal effect of the pesticides evaluated were at 24, 48 and 96 h of exposure respectively: lindane 811.89; 715.30; and 415 $\mu\text{g L}^{-1}$; chlorpyrifos 379.13; 154; and 66.01 $\mu\text{g L}^{-1}$ and metamidofos 1 791; 391.33; and 194 $\mu\text{g L}^{-1}$. Sublethal effects were observed with chlorpyrifos and metamidofos. The CE_{50} values determined for disadherence at 24, 48 and 96 h respectively were chlorpyrifos 197.14; 89.14; and 36.23 $\mu\text{g L}^{-1}$, and metamidofos 600.81; 361.69; and 150.75 $\mu\text{g L}^{-1}$. The values for cephalic detachment at 24, 48 and 96 h of exposure respectively were chlorpyrifos 323.69; 109.02; and 60.01 $\mu\text{g L}^{-1}$, and metamidofos 738.4; 314.4; and 155.93 $\mu\text{g L}^{-1}$. Of the three evaluated pesticides, the decreasing order of ecotoxicity for the lethal effects, at 24 h of exposure was chlorpyrifos > lindane > metamidofos; and at 48 h and 96 h was chlorpyrifos > metamidofos > lindane. For sub-lethal effects the decreasing order of ecotoxicity at 24, 48 and 96 h was chlorpyrifos > metamidofos. This protocol of ecotoxicological assays using *P. venustula* is proposed as a tool for the evaluation of environmental risks of soil pesticides.

Key words: agrochemical, *Physa*, soil, chlorpyrifos, lindane, metamidophos.

RESUMEN

Se realizó una evaluación ecotoxicológica estandarizada de los plaguicidas del suelo lindano, clorpirifos y metamidofos, en la Universidad Federico Villarreal, Lima, Perú, empleando al caracol dulceacuícola *Physa venustula* como herramienta para la evaluación de riesgos ambientales. Los valores determinados de la concentración letal media (CL_{50}) para el efecto letal de los plaguicidas evaluados fueron a 24, 48 y 96 h de exposición respectivamente: lindano 811,89; 715,30 y 415 $\mu\text{g L}^{-1}$; clorpirifos 379,13; 154,18 y 66,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ y metamidofos 1.791; 391,33 y 194 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se observaron efectos subletales con clorpirifos y metamidofos. Los valores determinados de concentración efectiva media (CE_{50}) para la desadherencia a 24, 48 y 96 h fueron respectivamente: clorpirifos 197,14; 89,14 y 36,23 $\mu\text{g L}^{-1}$, y metamidofos 600,81; 361,69 y 150,75 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los valores de CE_{50} para el desprendimiento cefálico a 24, 48 y 96 h de exposición respectivamente fueron: clorpirifos 323,69; 109,02 y 60,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ y metamidofos 738,4; 314,4 y 155,93 $\mu\text{g L}^{-1}$. De los tres plaguicidas evaluados el orden de ecotoxicidad decreciente a 24 h de exposición fue: clorpirifos >

¹Recepción de originales: 18 de diciembre de 2000 (reenviado).

²Universidad Nacional Federico Villarreal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Laboratorio de Ecofisiología, Calle San Marcos 383, Pueblo Libre, Lima-Perú. E-mail: joselorena@terra.com

lindano > metamidofos y a 48 y 96 h fue: clorpirifos > metamidofos > lindano para el efecto letal. En efectos subletales el orden de ecotoxicidad decreciente a 24, 48 y 96 h fue clorpirifos > metamidofos. Se propone este protocolo de ensayo ecotoxicológico empleando a *P. venustula* como una herramienta para la evaluación de riesgos ambientales por plaguicidas de suelo.

Palabras clave: agroquímico, *Physa*, suelo, clorpirifos, lindano, metamidofos.

INTRODUCCIÓN

Los agroquímicos, y en particular los plaguicidas, han llegado a ser una parte integral de los sistemas modernos de agricultura, contribuyendo significativamente a mejorar el rendimiento de las cosechas. A pesar de su significativa contribución, producen residuos indeseables en el medio ambiente (Pimentel, 1998). Además, han traído consigo un conjunto de efectos económicos y ambientales como la destrucción del 40% del potencial de la producción agrícola a escala mundial, así como la disminución de los enemigos naturales de las plagas, provocando el resurgimiento y aparición de nuevas plagas, y contaminación de suelos y aguas (Pimentel, 1998).

La evaluación del riesgo ambiental es un proceso de asignación de magnitudes, rangos y probabilidades a los efectos adversos que pueden derivar del uso de un plaguicida. Los riesgos ecológicos, por lo general, son juzgados basándose en el efecto sobre los organismos o la comunidad de poblaciones y en los valores finales, como la concentración letal media (CL_{50}), calculados a partir de ensayos ecotoxicológicos (Witters, 1998). Los ensayos de toxicidad son modificados por variables como factores físicos y químicos, tiempo de exposición, agente químico y disponibilidad (Lam, 1996). Iannacone *et al.* (1998) demostraron que muchas especies son útiles para evaluar la ecotoxicidad del agua, suelo, afluentes y sedimentos; entre ellos las bacterias, algas, plantas acuáticas, crustáceos, insectos, peces, etc.

Los organismos acuáticos como los pelecípodos y los gasterópodos tienen una función trófica de importancia en la dinámica de los ecosistemas

marinos y epicontinentales, además son herramientas biológicas esenciales para evaluar la respuesta a contaminantes (Pynnonen, 1995). Entre los moluscos ideales como organismos bioindicadores tenemos a los caracoles de agua dulce no operculados del género *Physa*, como las especies *P. fontinalis*, *P. integra*, *P. gyrina* y *P. acuta* (Takimoto *et al.*, 1987; Nebeker y Schuytema, 1998).

En el Perú se encuentra *Physa venustula* Gould, la cual se escogió como organismo prueba por ser una especie indicadora de la calidad del agua y por su amplia distribución (Iannacone y Alvaríño, 1999). *P. venustula* es un gasterópodo propio de la región Neotropical (Perú, Ecuador y Colombia), muy bien representado en lagos, estanques y aguas tranquilas de ríos. En Perú se encuentra especialmente en diferentes ambientes costeros, principalmente en el ambiente natural de los Pantanos de Villa, Lima, y además se ha encontrado en ambientes artificiales como las lagunas de oxidación (Iannacone y Alvaríño, 1999). Se les puede encontrar principalmente asociados a las raíces de *Hydrocotyle*, *Myriophyllum*, *Azolla*, algas filamentosas y en las paredes de acequias. Habita en agua limpia con abundante vegetación, puede desplazarse en suelo limoso y vivir en ambientes con un pH entre 6,4 y 7,2. Sin embargo, los datos de la alimentación y condiciones físico-químicas del hábitat de *P. venustula* son escasos (Iannacone y Alvaríño, 1999).

El objetivo principal del trabajo fue determinar la concentración letal media (CL_{50}) y la concentración efectiva media (CE_{50}) de tres plaguicidas –lindano, clorpirifos y metamidofos– a 24, 48, y 96 h de exposición, usando el caracol de agua

dulce *P. venustula*. Los objetivos específicos fueron determinar la sensibilidad de *P. venustula* a los tres plaguicidas mencionados, y determinar la eficacia de *P. venustula* como una herramienta para ensayos de ecotoxicidad para la evaluación de riesgos ambientales por plaguicidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen del organismo en estudio

La especie seleccionada para este estudio fue *Physa venustula*. Se depositaron 50 conchillas adultas de *P. venustula* en el Departamento de Malacología y Carcinología del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (MHN-UNMSM), Lima, Perú, debidamente etiquetadas y rotuladas. Los adultos de *P. venustula* se colectaron con ayuda de una espátula desde las paredes de la laguna secundaria de estabilización de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Carapongo, del Servicio de Agua Potable y Alcantarillado de Lima (SEDAPAL), en la cuenca baja del valle del Rímac, Perú (12°30' lat. Sur, 76° 50' long. Oeste), en octubre y noviembre de 1998. Posteriormente los caracoles fueron trasladados al laboratorio en recipientes de plástico de 500 mL. En noviembre de 1998 se determinó la concentración de trece elementos químicos presentes en las aguas del lugar de colecta, empleando espectrofotometría de absorción atómica (APHA, 1989), estando en todos los casos los valores muy por debajo de los límites máximos permisibles, de acuerdo con la Ley General de Aguas vigente para el Perú. Los valores encontrados fueron: Fe = 0,010 mg L⁻¹; Mn = 0,012 mg L⁻¹; Pb = 0,009 mg L⁻¹; Cd = 0,0012 mg L⁻¹; Cu = 0,021 mg L⁻¹; Zn = 0,114 mg L⁻¹; Al = 0,092 mg L⁻¹; Na = 16,178 mg L⁻¹; K = 2,223 mg L⁻¹; As = 0,007 mg L⁻¹; B = 0,261 mg L⁻¹; Cianuro < 0,0025 mg L⁻¹; F = 0,170 mg L⁻¹.

Plaguicidas evaluados

Los plaguicidas escogidos para realizar el presente trabajo son ampliamente usados en las prác-

ticas agrícolas peruanas (Racke, 1992; Van Wijk y Hutchinson, 1995). Los tres plaguicidas presentan límites máximos permisibles para el humano y el ambiente, pero en los países del tercer mundo no son usados apropiadamente (SENASA, 1998).

Los plaguicidas evaluados fueron el órgano-clorado lindano (Kuro wañuchiq®, Polvo Seco, Serfi) y los plaguicidas órganofosforados clorpirifos (Lorsban® Polvo Seco, Bayer) y metamidofos (Monitor® 600, Concentrado Soluble, Rodval). Se preparó una solución madre al 0,01% con 0,5 g del producto comercial del plaguicida en 500 mL de agua destilada para el lindano (15 mg L⁻¹ de ingrediente activo (I.A.)) y clorpirifos (25 mg L⁻¹ de I.A.), para el caso del metamidofos se preparó una solución madre con 1 mL del plaguicida (1200 mg L⁻¹ de I.A.) y 500 mL de agua destilada. Previamente, los plaguicidas fueron disueltos en 1 mL de acetona. A partir de estas soluciones se prepararon las diferentes concentraciones para los ensayos ecotoxicológicos. En todos los casos se realizó un tratamiento adicional con la máxima concentración de acetona empleada.

Parámetros físico-químicos del agua

El pH y la conductividad del agua fueron medidos mediante un potenciómetro Hanna 8417® (Exxon Chemical, Alemania). La determinación de dureza y alcalinidad se realizó empleando los protocolos estandarizados propuestos por la APHA (1989). El oxígeno disuelto se obtuvo por saturación del agua empleada en las crianzas individuales y en los ensayos ecotoxicológicos.

Pruebas ecotoxicológicas

Una vez obtenidas las formas juveniles de *P. venustula* de una cohorte entre 0 a 72 h de eclosión, se procedió a realizar los ensayos de ecotoxicidad (Iannacone y Alvarino, 1999). Las pruebas estuvieron compuestas de un control y cinco concentraciones nominales de los plaguicidas; para cada prueba se necesitó un total de

240 juveniles; en cada envase se colocaron 10 formas inmaduras que se distribuyeron al azar en cada una de las cuatro repeticiones. Las lecturas de mortalidad y de respuestas subletales se realizaron a las 24, 48 y 96 h de exposición. Al inicio de cada ensayo se ajustó a un pH de 7,0 con una solución amortiguadora de fosfato, preparado a partir de las sales fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) y fosfato de sodio monobásico hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) a 0,1 M.

Las cinco concentraciones nominales definitivas preparadas a partir de la solución madre para lindaño y clorpirifos fueron 15, 75, 150, 750, y 1.500 mg L⁻¹, y para metamidofos las concentraciones fueron 100, 300, 500, 800, y 1.000 mg L⁻¹. Las cinco concentraciones para lindaño y clorpirifos siguieron un incremento alternado x 5 y x 2; para el metamidofos mayormente la separación entre concentraciones fue de 200 mg L⁻¹. Para la discriminación de mortalidad se usó el criterio propuesto por Iannacone y Alvaríño (1999). Se consideró muerto el individuo incapaz de realizar algún tipo de movimiento en la placa de recuento, como mover el pie, la concha o los tentáculos cefálicos durante 15 s de observación al estereoscopio. Para el caso de los efectos subletales, se consideró desadherencia cuando el organismo ya no se desliza sobre las paredes del frasco perdiendo la capacidad de fijar el pie y el individuo se encuentra suspendido en el medio; se consideró desprendimiento cefálico cuando una porción del área cefálica se desprende e incrementa su tamaño al triple del normal. Para ambos casos se realizó el cálculo del porcentaje a partir del total de individuos expuestos.

Análisis de datos

Las pruebas de ecotoxicidad aguda para los tres plaguicidas se realizaron en cuatro repeticiones con cinco concentraciones nominales y un control en un diseño en bloque completamente aleatorizado: 6 x 4. Los porcentajes de mortalidad se transformaron a arcoseno \sqrt{x} , con el fin de ajustar los datos a una distribución normal (Zar, 1996). El ensayo con 24, 48 y 96 h se realizó tres

veces con lindaño, dos veces con clorpirifos y una vez con metamidofos. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía con el propósito de analizar las diferencias entre las concentraciones del plaguicida aplicado, entre las repeticiones, y finalmente entre los tiempos de exposición. Se determinó el grado de significancia, para que en los casos necesarios, fuera contrastado con la prueba *a posteriori* de Tukey HSD. El nivel de significancia fue de $\alpha = 0,05$ (Zar, 1996). Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el paquete SPSS, versión, 1996 para Windows 95. La CL_{50} , la concentración efectiva media (CE_{50}), y sus respectivos límites de confianza al 95% se calcularon usando el programa computarizado de la EPA (1986) Probit 1,5-1983. Además se determinaron dos valores de efectos subletales: concentración de efectos no observables (NOEC) y concentración más baja de efectos observables (LOEC) para cada uno de los ensayos evaluados.

RESULTADOS Y DISCUSION

Toxicidad de los plaguicidas evaluados

Efectos letales

Lindaño

Los valores de la CL_{50} a 24, 48 y 96 h de exposición para el plaguicida organoclorado lindaño correspondieron a un promedio aritmético de tres ensayos. El Cuadro 1 muestra los valores de la CL_{50} y sus límites de confianza al 95% a 24, 48 y 96 h de exposición. El valor de NOEC fue menor que la CL_{50} a los tres períodos de exposición. El lindaño es un plaguicida con numerosa información en ensayos ecotoxicológicos. *P. venustula* es más sensible que los microcrustáceos y que los ensayos ecotoxicológicos "Kits"; esto pudiera ser debido al empleo de "quistes" en los "kits" para la obtención de los estados de desarrollo empleados en los bioensayos, evidenciando la ventaja de trabajar con especies aclimatadas y cultivadas en el laboratorio por su mayor sensibilidad a los tóxicos evaluados (WHO, 1991; Crisinel *et al.*, 1994). El ANDEVA para los tratamientos mostró que

Cuadro 1. Concentraciones letales medias (CL₅₀) de juveniles de *Physa venustula* expuestas al lindano, clorpirifos y metamidofos por 24, 48 y 96 h

Table 1. Mean lethal concentrations (CL₅₀) of *Physa venustula* exposed to lindane, chlorpyrifos and metamidophos for 24, 48 and 96 h

	Lindano			Clorpirifos			Metamidofos		
	24 h	48 h	96 h	24 h	48 h	96 h	24 h	48 h	96 h
CL ₅₀ (µg L ⁻¹)	811,89	715,30	415,16	379,13	154,18	66,01	1.791	391,33	194,78
L.C. inferior (µg L ⁻¹)	306,51	262,3	101,23	346,98	88,68	23,43	1.150	95,01	117,51
L.C. superior (µg L ⁻¹)	951,42	1.006	615,40	696,59	242,84	101,46	2.000	471,61	240,40
F	10,52	12,68	24,05	29,39	63,67	22,18	7,58	18,40	46,28
P	0,014	0,012	0,006	0,005	0,002	0,006	0,02	0,008	0,001
NOEC (µg L ⁻¹)	150	150	150	75	75	15	300	100	100
LOEC (µg L ⁻¹)	750	750	750	150	150	75	500	300	300

L.C.: límite de confianza; F: estadístico de Fisher; P: probabilidad; NOEC: concentración de efectos no observables; LOEC: concentración más baja de efectos observables.

existieron diferencias significativas entre ellos. El caracol dulceacuícola *P. venustula* a 48 h de exposición ocupó el puesto nueve entre 14 organismos de la biocenosis acuática, y el cuarto lugar entre nueve invertebrados de la biota acuática. Organismos como peces y algunos insectos resultaron ser más sensibles que *P. venustula* (WHO, 1991; Crisinel *et al.*, 1994).

En el ensayo a 96 h de exposición *P. venustula* ocupó el lugar 13 de 20 organismos de la biocenosis acuática, sin embargo, ocupó el primer lugar entre cuatro moluscos de la biota acuática. A 96 h de exposición *P. venustula* fue menos sensible que peces, crustáceos e insectos (WHO, 1991). La CL₅₀ para *P. venustula* y *P. fontinalis* presentaron valores muy cercanos, mostrando la misma sensibilidad frente a lindano. Comparando el ensayo ecotoxicológico estandarizado con el crustáceo *D. magna* y el ensayo con el caracol dulceacuícola *P. venustula*, la variación de la CL₅₀ a las 96 h de exposición mostró que *D. magna* fue menos sensible a lindano. *P. venustula* ocupó el octavo lugar entre 12 organismos, sólo considerando los ensayos estáticos y el décimo lugar entre 16 organismos dulceacuícolas (WHO, 1991). El orden decreciente de toxicidad para

P. venustula frente a lindano fue: 96 h > 48 h > 24 h.

La Figura 1 muestra el porcentaje de mortalidad para cada una de las concentraciones del plaguicida lindano con *P. venustula* a 24, 48 y 96 h de exposición. Los porcentajes de mortalidad son directamente proporcionales al tiempo de exposición.

Los ANDEVA revelaron que existieron diferencias significativas para las repeticiones de los tres plaguicidas para efectos letales y subletales.

Clorpirifos

La Figura 2 muestra los porcentajes de mortalidad para el plaguicida organofosforado clorpirifos a 24, 48 y 96 h de exposición para el caracol dulceacuícola *P. venustula*. Los valores de la CL₅₀ son promedios aritméticos de dos ensayos. El valor de la CL₅₀ a 24, 48 y 96 h y sus límites de confianza y el ANDEVA para los tratamientos se muestran en el Cuadro 1. El ensayo con *P. venustula* a las 24 h de exposición ocupó el segundo lugar con dos organismos de la biocenosis acuática y resultó ser 8,6 veces más sensible que el

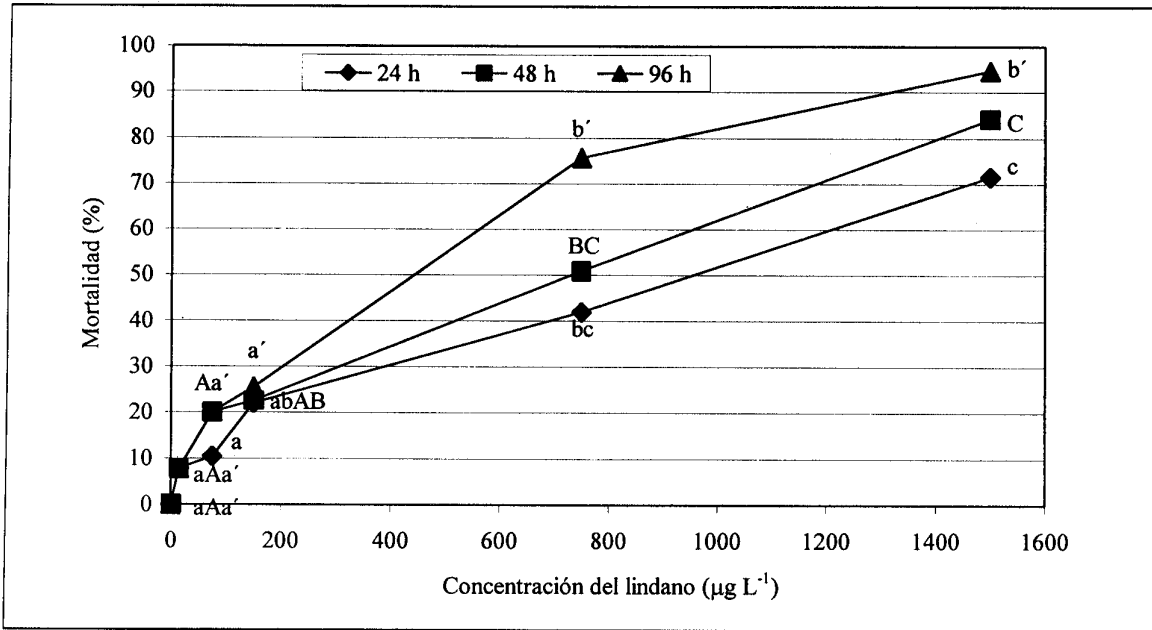


Figura 1. Porcentaje de mortalidad del caracol dulceacuícola *Physa venustula* con el lindano a 24, 48 y 96 h de exposición.

Figure 1. Percentage of mortality of the freshwater snail *Physa venustula* with lindane at 24, 48 and 96 h exposure. *Letras iguales mayúsculas o minúsculas en una recta indican que no existen diferencias significativas del efecto letal entre concentraciones.

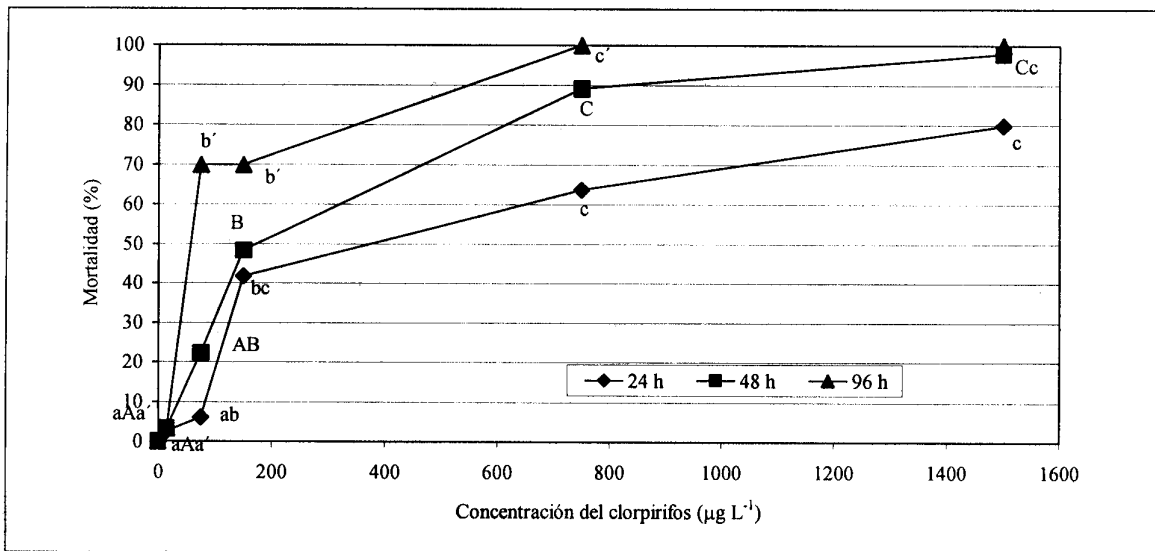


Figura 2. Porcentaje de mortalidad del caracol dulceacuícola *Physa venustula* con el clorpirifos a 24, 48 y 96 h de exposición.

Figure 2. Percentage of mortality of the freshwater snail *Physa venustula* with chlorpyrifos at 24, 48 and 96 h exposure.

*Letras iguales mayúsculas o minúsculas en una recta indican que no existen diferencias significativas del efecto letal entre concentraciones.

oligoqueto *Limnodrilus hoffmeisteri* (Iannacone et al., 2000). El ensayo con *P. venustula* a las 48 h de exposición ocupó el puesto nueve de nueve organismos de la biocenosis acuática (EPA, 1986; Leight y Van Dolah, 1999). El ensayo con *P. venustula* a 96 h de exposición ocupó el puesto 10 de 14 organismos. *P. venustula* fue menos sensible que los crustáceos y algunos peces, pero más sensible que algunos peces como *C. auratus* (EPA, 1986; Leight y Van Dolah, 1999). Los valores de NOEC y de LOEC a 24, 48 y 96 h se muestran en el Cuadro 1. La toxicidad en orden decreciente para *P. venustula* frente a clorpirifos fue 96 h > 48 h > 24 h.

Metamidofos

La Figura 3 muestra que los porcentajes de mortalidad para el plaguicida metamidofos a 24, 48 y 96 h de exposición, presentan un patrón ascendente muy marcado. La CL_{50} a 24, 48 y 96 h de exposición y el ANDEVA para los tratamientos

son indicados en el Cuadro 1. Los valores del NOEC y LOEC para 24 h fueron diferentes en comparación con 48 y 96 h.

La falta de ensayos ecotoxicológicos realizados con este plaguicida y su limitada información no permitieron realizar comparaciones a 24, 48 y 96 h de exposición. A 48 h de exposición el crustáceo *Daphnia* fue más sensible que el caracol dulceacuícola *P. venustula*. La toxicidad en orden decreciente para *P. venustula* frente a metamidofos fue 96 h > 48 h > 24 h.

La mortalidad fue baja sólo a las 24 h de exposición, a 48 y 96 h de exposición la mortalidad aumentó notoriamente a partir de la concentración 300 $\mu\text{g L}^{-1}$.

La toxicidad aguda (letalidad) de los tres plaguicidas evaluados en relación con el tiempo de exposición muestra que no hay diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad entre

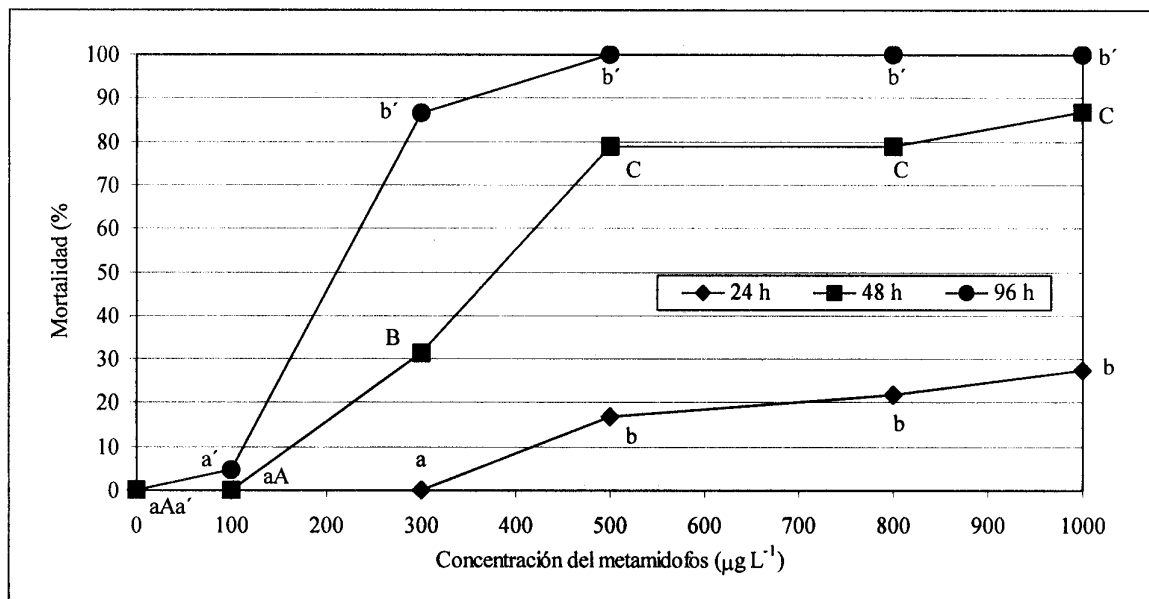


Figura 3. Porcentaje de mortalidad del caracol dulceacuícola *Physa venustula* con el metamidofos a 24, 48 y 96 h de exposición.

Figure 3. Percentage of mortality of the freshwater snail *Physa venustula* with metamidofos at 24, 48 and 96 h exposure.

*Letras iguales mayúsculas o minúsculas en una recta indican que no existen diferencias significativas del efecto letal entre concentraciones.

24, 48 y 96 h ($p > 0,05$). Sólo el plaguicida metamidofos mostró una pequeña diferencia en relación al tiempo de exposición entre 24 y 96 h ($F = 2,906$, $P = 0,04$).

Efectos subletales

Lindano

En los bioensayos ecotoxicológicos realizados con el plaguicida órganoclorado lindano no se observó ninguno de los dos efectos subletales evaluados (desadherencia y desprendimiento cefálico) en comparación a los ensayos realizados con los organofosforados metamidofos y clorpirifos. Sin embargo, lindano ha registrado en otras especies efectos subletales diferentes no detectados en el presente estudio, como interferencia en el desarrollo y potencial reproductivo de *Chironomus riparius*, alteraciones en el crecimiento de los peces *Pimephales promelas* y *Lepomis macrochirus*, y por último, inhibición

en la actividad alimentaria del anfípodo *Gammarus pulex* (Blockwell *et al.*, 1998).

Clorpirifos

Los efectos subletales observados con clorpirifos fueron la pérdida de la capacidad de adherencia al sustrato y desprendimiento del área cefálica observado con mayor claridad a medida que aumentó la concentración del plaguicida (Figuras 4 y 5). La CE_{50} para la desadherencia a 24, 48 y 96 h de exposición y sus límites de confianza se indican en el Cuadro 2. El ensayo con *P. venustula* a las 24 h de exposición ocupó el primer lugar con dos organismos de la biocenosis acuática, resultó ser 5,25 veces más sensible que *L. hoffmeisteri* (EPA, 1986; Leight y Van Dolah, 1999). Los valores de NOEC y LOEC fueron más bajos comparados con las 24 h de exposición. A las 48 h de exposición *P. venustula* ocupó el puesto nueve de nueve organismos de la bio-

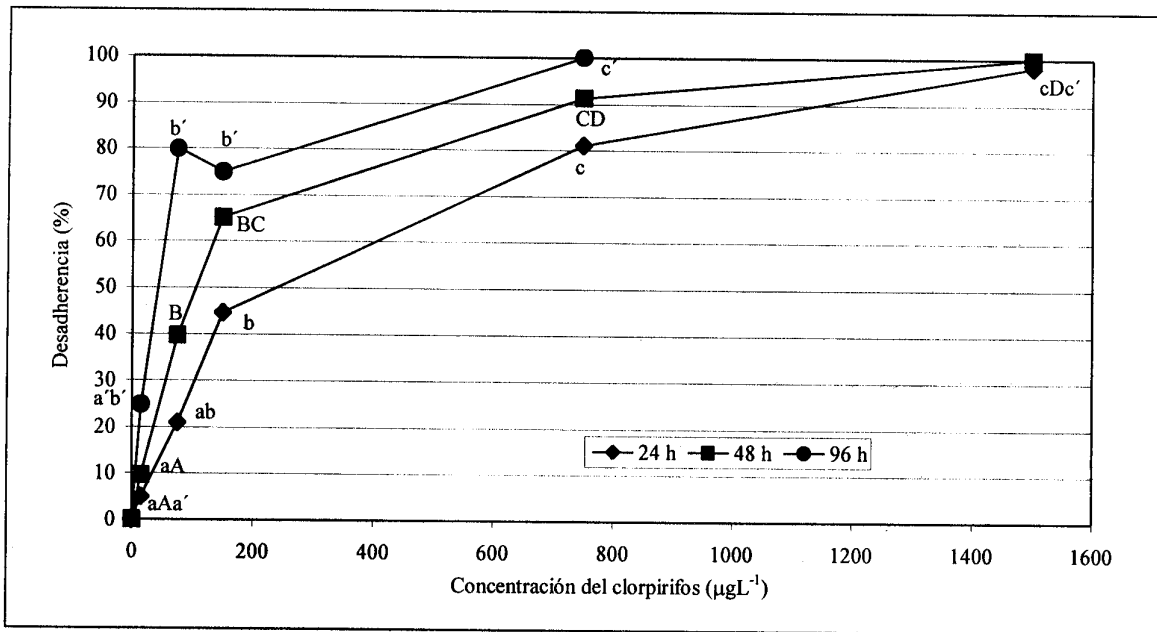


Figura 4. Porcentaje de desadherencia del caracol dulceacuicola *Physa venustula* con el clorpirifos a 24, 48 y 96 h de exposición.

Figure 4. Percentage of disadherence of the freshwater snail *Physa venustula* with chlorpyrifos at 24, 48 and 96 h exposure.

*Letras iguales mayúsculas o minúsculas en una recta indican que no existen diferencias significativas del efecto subletal entre concentraciones.

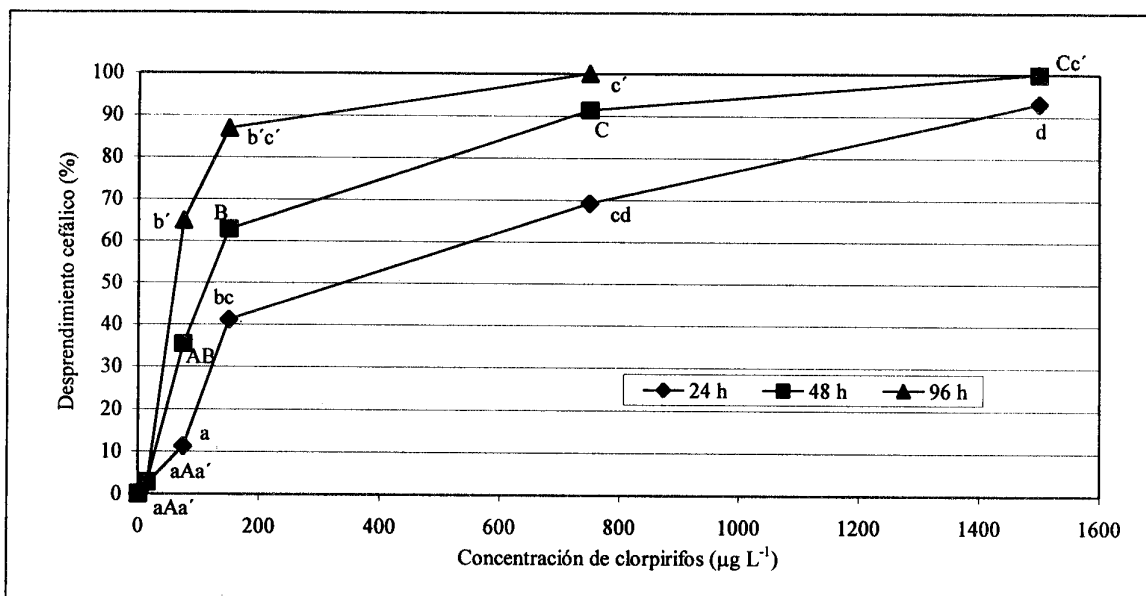


Figura 5. Porcentaje de desprendimiento cefálico del caracol dulceacuicola *Physa venustula* con el clorpirifos a 24, 48 y 96 h de exposición.

Figure 5. Percentage of cephalic detachment of the freshwater snail *Physa venustula* with chlorpyrifos at 24, 48 and 96 h exposure.

*Letras iguales mayúsculas o minúsculas en una recta indican que no existen diferencias significativas del efecto subletal entre concentraciones.

Cuadro 2. Concentraciones efectivas (desadherencia) medias (CE_{50}) de juveniles de *Physa venustula* expuestas a clorpirifos y metamidofos 24, 48 y 96 h

Table 2. Mean effective concentrations (disadherence) (CE_{50}) for juveniles of *Physa venustula* exposed to chlorpyrifos and metamidophos for 24, 48 and 96 h

	Clorpirifos			Metamidofos		
	24 h	48 h	96 h	24 h	48 h	96 h
CE_{50} (µg L ⁻¹)	197,14	89,14	36,23	600,81	361,69	150,75
L.C. inferior (µg L ⁻¹)	82,44	55,56	9,10	533,01	292,52	115,67
L.C. superior (µg L ⁻¹)	465,92	143,91	69,89	663,76	489,85	184,95
F	61,61	36,95	14,87	40,78	30,74	41,38
P	0,002	0,004	0,01	0,003	0,004	0,003
NOEC (µg L ⁻¹)	75	15	15	300	100	100
LOEC (µg L ⁻¹)	150	75	75	500	300	300

L.C.: límite de confianza; F: estadístico de Fisher; P: probabilidad; NOEC: concentración de efectos no observables; LOEC: concentración más baja de efectos observables.

cenosis acuática. A las 96 h de exposición ocupó el puesto 10 de 14 organismos de la biota acuática (EPA, 1986; Leight y Van Dolah, 1999).

Para el desprendimiento cefálico, el valor de la CE_{50} a 24, 48 y 96 h de exposición, sus límites de confianza y el ANDEVA para los tratamientos se muestran en el Cuadro 3. A las 24 h de exposición *P. venustula* ocupó el primer lugar con dos organismos de la biota acuática, resultó ser 5,25 veces más sensible que *L. hoffmeisteri* (Iannacone *et al.*, 2000). Los valores de NOEC y LOEC a las 96 h fueron diferentes en comparación a las 24 y 48 h. A las 48 h de exposición *P. venustula* ocupó el puesto nueve con nueve organismos, y a las 96 h de exposición *P. venustula* ocupó el puesto 10 de 14 organismos de la biocenosis acuática.

Clorpirifos deforma el área cefálica de *P. venustula* a partir de una concentración de 75 $\mu\text{g L}^{-1}$, también incrementa el nivel de deformaciones en el pez *P. promelas* a una concentración de 2,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Jarvinen *et al.*, 1998), además, Geyer *et al.* (1996) encontraron que clorpirifos disminuye la fecundidad y la supervivencia del copépodo *Amphiascus tenuiremis*.

El orden de toxicidad decreciente para desprendimiento cefálico y para desadherencia fue de 96 h > 48 h > 24 h. En ambos casos se observa que a mayor tiempo de exposición mayor toxicidad subletal, pero la toxicidad de clorpirifos fue mayor para desadherencia (Figuras 4 y 5).

Metamidofos

Los efectos subletales observados con metamidofos fueron los mismos que para clorpirifos, éstos son desadherencia y desprendimiento cefálico; para ambos casos se observó que a mayor concentración del plaguicida mas individuos presentaron efectos subletales (Figuras 6 y 7). Los valores de la CE_{50} para desadherencia y desprendimiento cefálico con metamidofos muestran el mismo patrón observado con clorpirifos, es decir, siguen un patrón ascendente a 24, 48 y 96 h de exposición (Cuadro 2 y 3).

La CE_{50} para desadherencia a 24, 48 y 96 h de exposición, sus límites de confianza y el ANDEVA de los tratamientos se muestran en el Cuadro 3. No se pudieron realizar mayores comparaciones con otros ensayos con metamidofos a 24 h de exposición debido a la escasa infor-

Cuadro 3. Concentraciones efectivas (desprendimiento cefálico) media (CE_{50}) de juveniles de *Physa venustula* expuestas al clorpirifos y metamidofos a 24, 48 y 96 h

Table 3. Mean effective concentrations (cephalic detachment) (CE_{50}) for juveniles of *Physa venustula* exposed to chlorpyrifos and metamidophos at 24, 48 and 96 h

	Clorpirifos			Metamidofos		
	24 h	48 h	96 h	24 h	48 h	96 h
CE_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	323,69	109,02	60,01	738,40	314,4	155,93
L.C. inferior ($\mu\text{g L}^{-1}$)	174,62	52,08	7,72	-	-	122,65
L.C. superior ($\mu\text{g L}^{-1}$)	517,99	170,12	87,35	-	-	189,75
F	26,89	47,58	31,38	30,30	32,26	45,65
P	0,005	0,003	0,004	0,005	0,004	0,003
NOEC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	75	75	15	300	100	100
LOEC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	150	150	75	500	300	300

L.C.: límite de confianza; F: estadístico de Fisher; P: probabilidad; NOEC: concentración de efectos no observables; LOEC: concentración más baja de efectos observables.

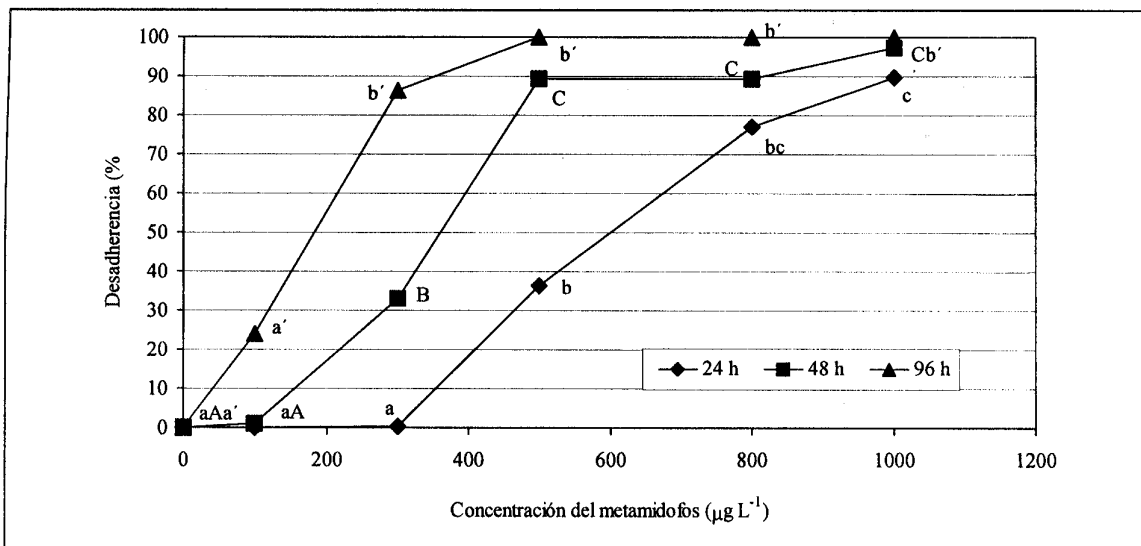


Figura 6. Porcentaje de desadherencia del caracol dulceacuícola *Physa venustula* con el metamidofos a 24, 48 y 96 h de exposición.

Figure 6. Percentage of disadherence of the freshwater snail *Physa venustula* with metamidofos at 24, 48 and 96 h exposure.

*Letras iguales mayúsculas o minúsculas en una recta indican que no existen diferencias significativas del efecto subletal entre concentraciones.

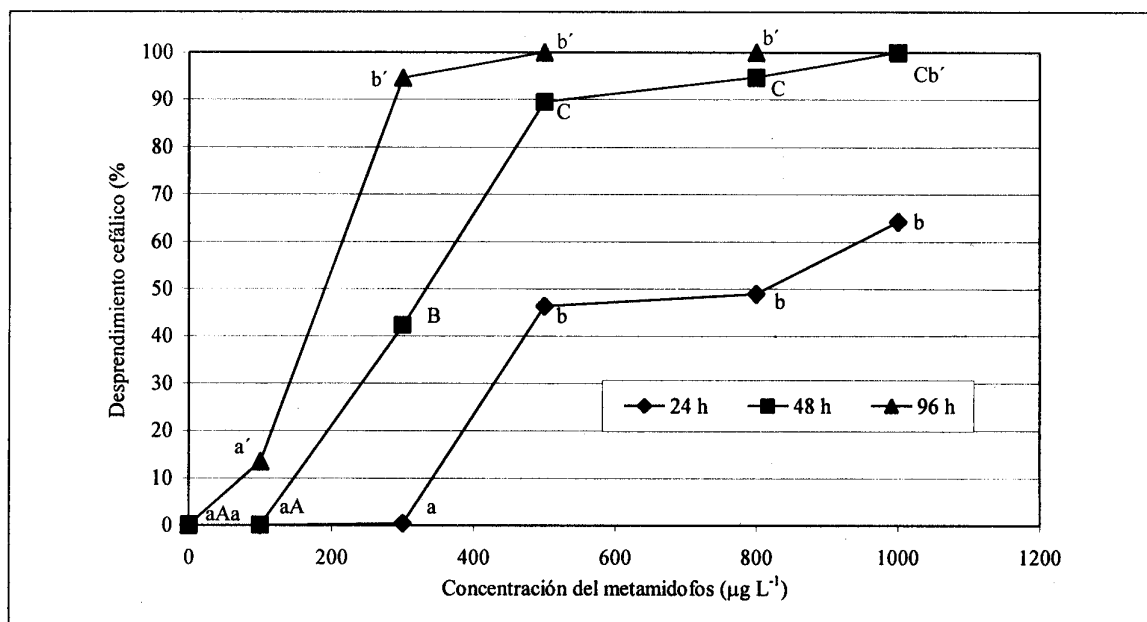


Figura 7. Porcentaje de desprendimiento cefálico del caracol dulceacuícola *Physa venustula* con el metamidofos a 24, 48 y 96 h de exposición.

Figure 7. Percentage of cephalic detachment of the freshwater snail *Physa venustula* with metamidofos at 24, 48 and 96 h exposure.

*Letras iguales mayúsculas o minúsculas en una recta indican que no existen diferencias significativas del efecto subletal entre concentraciones.

mación. Los valores de NOEC y LOEC fueron diferentes entre las 24 h, en comparación con las 48 y 96 h. A 48 h de exposición a metamidofos *P. venustula* resultó ser 0,75 veces menos sensible que *Daphnia* (SENASA, 1998). A las 96 h de exposición ocupó el primer lugar con 5 organismos de la biota acuática, expuesto a metamidofos resultó ser 327 veces más sensible que los peces *C. auratus* y *Cyprinus carpio*, 641 veces más sensible que *P. reticulata* y que *O. mykiss* (Kidd y James, 1991).

Los valores del efecto subletal desadherencia con metamidofos a 24, 48 y 96 h de exposición se observan en la Figura 6. Los valores de la CE_{50} para desprendimiento cefálico a 24, 48 y 96 h de exposición, sus límites de confianza y el ANDEVA para los tratamientos se indican en el Cuadro 3. Los valores de NOEC y LOEC a 24 h fueron diferentes en comparación con las 48 y 96 h.

El ensayo con *P. venustula* no se pudo comparar con otros ensayos ecotoxicológicos (Kidd y James, 1991). Al ser expuesto a metamidofos *P. venustula* resultó ser 0,86 veces menos sensible que el microcrustáceo *Daphnia*. Los porcentajes de desprendimiento cefálico a 24, 48 y 96 h de exposición con metamidofos se observan en la Figura 3. El orden de toxicidad decreciente para desprendimiento cefálico y desadherencia para *P. venustula* frente a metamidofos fue 96 h > 48 h > 24 h. Juárez y Sánchez (1989) señalaron que metamidofos a una concentración de 220.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ provoca letalidad en los crustáceos adultos *Macrobrachium rosenbergii* y *Penaeus stylirostris*.

Los efectos subletales observados para clorpirifos y metamidofos en este trabajo concuerdan con lo observado por Haji (1993) para el plaguicida organofosforado carbofuran, quien lo denomina "síndrome de estrés"; este síndrome empieza con la extensión de la masa cefalopodal de *P. acuta*, el cual permanece inmóvil en la parte inferior del recipiente, perdiendo la capacidad de fijar el pie en el recipiente que lo contiene,

debido a su acción sobre la acetilcolinesterasa. El resultado de Haji (1993) confirma la validez de nuestros resultados ya que carbofuran, al igual que clorpirifos y metamidofos, es plaguicida organofosforado, y en segundo lugar porque se utilizó un organismo del mismo género como organismo bioindicador en ambas evaluaciones.

Análisis comparativo entre los tres plaguicidas evaluados

En la toxicidad obtenida en términos de la CL_{50} (efecto letal) de los tres plaguicidas evaluados, clorpirifos fue el plaguicida más tóxico y lindano el menos tóxico, con la excepción de las 24 h de exposición donde metamidofos fue el menos tóxico. Concordando con los resultados de autores como Iannacone *et al.* (2000) y Leight y Van Dolah (1999) quienes encontraron que el plaguicida clorpirifos era más tóxico que el plaguicida lindano. La toxicidad a 24 h de exposición: metamidofos < lindano < clorpirifos, y para 48 y 96 h de exposición siguió el siguiente patrón: lindano < metamidofos < clorpirifos. La toxicidad obtenida en términos de la CE_{50} (efectos subletales) de los dos plaguicidas, mostró que el clorpirifos resultó más tóxico que el metamidofos. La toxicidad a 24, 48 y 96 h de exposición siguió la relación metamidofos < clorpirifos.

CONCLUSIONES

1. De los tres plaguicidas evaluados, el plaguicida organofosforado clorpirifos fue el de mayor toxicidad aguda y el plaguicida organoclorado lindano el de menor toxicidad para el caracol dulceacuícola *Physa venustula*. El orden decreciente de toxicidad aguda-letal en forma global fue: clorpirifos > metamidofos > lindano. La toxicidad de los tres plaguicidas evaluados aumentó con el tiempo de exposición. Metamidofos presentó muy baja toxicidad a las 24 h de exposición, pero aumentó considerablemente con el tiempo de exposición (96 h). Sin embargo, los resultados con los tres plaguicidas examinados a las 24, 48 y 96 h de exposición mostraron que en general

no existen diferencias significativas entre la toxicidad aguda y el tiempo de exposición evaluado.

2. *P. venustula* expuesto al lindano, no presentó los dos efectos subletales evaluados: pérdida de adherencia al sustrato y desprendimiento del área cefálica. El clorpirifos y el metamidofos presentaron estos efectos durante los ensayos toxicológicos subletales, siguiendo una relación directamente proporcional.
3. El ensayo ecotoxicológico empleando al caracol dulceacuícola *P. venustula*, como una he-

rramienta para la evaluación de riesgos ambientales por plaguicidas, principalmente de suelo, puede ser utilizado dentro de una batería multitrófica, debido a que el ensayo presenta confiabilidad, repetibilidad, alta sensibilidad y corta duración.

AGRADECIMIENTOS

A los Sres. Manuel Huamán y José Fuertes por su colaboración en el desarrollo de esta investigación.

LITERATURA CITADA

- APHA. 1989. Standard methods for examination of water and wastewater. 720 p. 17th ed. American Public Health Association (APHA), Washington D.C., USA.
- Blockwell, S., E. Taylor, I. Jones, and D. Pascoe. 1998. The influence of freshwater pollutants and interaction with *Asellus aquaticus* (L.) on the feeding activity of *Gammarus pulex* (L.). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34:41-47.
- Crisinel, A., L. Delaunay, D. Rossel, J. Tarradelas, H. Meyer, H. Saiah, P. Vogel, C. Delisie, and C. Blaise. 1994. Cyst-based ecotoxicological tests using anostracans: comparison of two species of *Streptocephalus*. Environ. Toxicol. Water Qual. 9:317-326.
- EPA. 1986. Ambient water quality criteria for chlorpyrifos. p. 5-51. Environmental Protection Agency (EPA), Washington D.C., USA.
- Green, A. and G. Chandler. 1996. Life-table evaluation of sediment-associated chlorpyrifos chronic toxicity to the benthic copepod, *Amphiascus tenuiremis*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31:77-83.
- Haji, J. 1993. The distribution of *Physa acuta* Draparnaud (Gastropoda: Physidae) in Malaysia and its suitability as test material for insecticide toxicity studies. J. Med. & Appl. Malacol. 5:129-134.
- Iannacone, J., y L. Alvarifio. 1999. Ecotoxicidad aguda de metales pesados empleando juveniles del caracol de agua dulce *Physa venustula* (Gould, 1847) (Mollusca). Gayana 63:101-110.
- Iannacone, J., L. Alvarifio, y W. Dale. 1998. Pruebas ecotoxicológicas como una herramienta para la evaluación del impacto ambiental. Boletín de Lima (Perú) 113:53-68.
- Iannacone, J., L. Alvarifio, C. Caballero, y J. Sánchez. 2000. Cuatro ensayos ecotoxicológicos para evaluar lindano y clorpirifos. Gayana 64: 139-146.
- Jarvinen, A., D. Tanner, and E. Kline. 1988. Toxicity of chlorpyrifos, endrin or fenvalerate to fathead minnows following episodic or continuous exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 15:78-95.
- Juárez, L., and J. Sánchez. 1989. Toxicity of the organophosphorus insecticide metamidofos (O, S-dimethyl phosphoramidothioate) to larvae of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De man) and the blue shrimp *Penaeus stylirostris* Stimpson. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 43:302-309.
- Kidd, H., and D. James, D. 1991. The agrochemicals handbook. p. 5-14. 3rd ed. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, United Kingdom.

- Lam, P. 1996. Sublethal effects of cadmium on the energetics of a tropical freshwater snail, *Brotia hainanensis* (Brot, 1872). *Environ. Toxicol. Water Qual.* 11:345-349.
- Leight, A., and R. Van Dolah. 1999. Acute toxicity of the insecticides endosulfan, chlorpyrifos and malathion to the epibenthic estuarine amphipod *Gammarus palustris* (Bousfield). *Environ. Toxicol. Chem.* 18:958-964.
- Nebeker, A., and G. Schuytema 1998. Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms and snails. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35:441-446.
- Pimentel, D. 1998. Environmental and economic issues associated with pesticide use. p. 8-11. *International Conference on Pesticide Use in Developing Countries: Impact on Health and Environment*, Febrero 23-28. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Pynnonen, K. 1995. Effect of pH, hardness and maternal pre-exposure on the toxicity of Cd, Cu and Zn to the glochidial larvae of a freshwater clam *Anodonta cygnea*. *Water Res.* 29:247-254.
- Racke, K. 1992. The environmental fate of chlorpyrifos. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 131: 5-52.
- SENASA. 1998. Documentos de orientación para la toma de decisiones: metamidofos, paration-metilo, monocrotofos, paration, fosfamidon. p. 1-9. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), Lima, Perú.
- Takimoto, Y., M. Ohshima, and J. Miyamoto. 1987. Comparative metabolism of fenitrothion in aquatic organisms. II. Metabolism in the freshwater snails, *Cipangopaludina japonica* and *Physa acuta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 13: 118-125.
- Van Wijk, D., and T. Hutchinson. 1995. The ecotoxicity of chlorate to aquatic organisms: A critical review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 32: 244-253.
- Witters, H. 1998. Chemical speciation dynamics and toxicity assessment in aquatic systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41:90-95.
- WHO. 1991. Lindane. *Environmental Health Criteria* 124. 144 p. World Health Organization (WHO), Geneva, Italy.
- Zar, J. H. 1996. *Biostatistical analysis*. 718 p. 3rd ed. Prentice-Hall, New York, USA.