

EFFECTOS LETALES Y SUBLETALES DEL CLOROTALONIL SOBRE *Daphnia pulex*

LETHAL AND SUBLETHAL EFFECTS OF CHLOROTHALONIL ON *Daphnia pulex*

Elizabeth Gómez¹, Jaime A. Palacio² y Néstor Jaime Aguirre³

Resumen

Neonatos de *Daphnia pulex* de una cepa producida a partir de hembras capturadas en el embalse La Fe (El Retiro, Antioquia), fueron sometidos a tratamientos con concentraciones agudas (90.0, 108.0, 129.0, 155.0 y 186.0 µg/l), durante 48 horas, y crónicas de Clorotalonil (0.93, 1.87, 3.75, 7.50 y 15.00 µg/l), durante trece días con el objeto de establecer los efectos letales y subletales.

Para las pruebas subletales se adoptó un sistema estático con renovación cada 48 horas y diez réplicas individuales. El pH, la temperatura del agua, el oxígeno disuelto, la dureza, la conductividad y la alcalinidad variaron en rangos estrechos y se mantuvieron en niveles aceptables para los ensayos agudos y crónicos. Para las 48 horas de exposición se calculó una CL₅₀ de 136.8 µg/l y un intervalo de confianza de 95% entre 127.22 y 148.09 µg/l. Para las pruebas crónicas, la mortalidad no excedió en ningún tratamiento el 20%. Exceptuando un ejemplar, la totalidad de los neonatos tratados se reprodujeron más de una vez. En el rango de concentraciones empleadas en el estudio, no se encontró efecto significativo del Clorotalonil sobre la edad de la primera reproducción de *D. pulex*.

Sólo en dos niveles de exposición se redujo el número promedio de camadas por hembra con relación al control. No obstante, fue evidente que la natalidad se redujo paralelamente con el incremento de la concentración de Clorotalonil.

Palabras clave: *Daphnia pulex*, concentraciones subletales, fungicida, Clorotalonil, supervivencia, reproducción.

Abstract

Newborn of *Daphnia pulex* from a colony produced by females captured from the reservoir La Fe (El Retiro, Antioquia), were exposed to acute (90.0, 108.0, 129.0, 155.0 and 186.0 µg/l) during a period of 48 hour, and to chronic concentrations of Chlorotalonil (0.93, 1.87, 3.75, 7.50 and 15.00 µg/l), during 13 days, in order to establish lethal and sublethal effects. The experimental desing for the acute treatment applied a static system with ten individuals per replica. For the chronic treatment, the experimental desing used a static system with water renovation, every 48 hours and ten replicas. Water conditions, such as pH, dissolved oxygen, temperature, hardness, conductivity and alcalinity, showed small variation and remained appropriate for the acute and chronic evaluations.

The LC₅₀ after the acute treatment was 136.8 µg/l, with a confidence interval of 95% (range 127.22 to 148.09 µg/l). For the chronic treatment mortality rate was less than 20% and animals reached reproductive stage. Chlorothalonil has no deleterious effects on age of the first reproduction, but a reduction of number of eggs per hatching was observed in two exposition levels. Nevertheless, it was evident that natality was reduced with an increase in Chlorothalonil concentrations.

Key words: *Daphnia pulex*, sublethal concentrations, Chlorothalonil, survival, reproduction.

INTRODUCCIÓN

El Clorotalonil (C₈Cl₄N₂) es un fungicida de amplio espectro que se usa intensivamente en culti-

vos de árboles frutales, en floricultivos, en plantaciones de banano y para la protección de la

Recibido: mayo de 2000; aprobado para publicación: noviembre de 2000.

¹Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín, apartado 1226. E-mail: felisa@epm.net.co.

²Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín, apartado 1226. E-mail: japalaci@jaibana.udea.edu.co.

³Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín, apartado 1226. E-mail: naguirre@udea.edu.co.

madera. La producción comercial de Clorotalonil se inició en Colombia en 1969, como resultado de la cloración del isoftalonitrilo a través del tratamiento de tetracloro-isoftalolil-amida con el oxiclورو de fósforo. Entre 1980 y 1982 se importaron 49.2 toneladas de Clorotalonil (WHO, 1996).

En los ecosistemas acuáticos, el Clorotalonil es removido de la fase soluble mediante la adsorción de sólidos en suspensión. La degradación de este fungicida por hidrólisis conduce principalmente a la producción de 4-hidroxi-2, 5, 6 tricloro-isoftalonitrilo y 3-cyano-2, 4, 5, 6-tetracloro-benzamida, con una vida media de 49 días (Szalkowski y Stallard, 1977, citados por WHO, 1996). De acuerdo con esta última fuente, en condiciones fotolíticas en ambientes acuáticos, el Clorotalonil se degrada lentamente a 4-hidroxi metabolitos, con una vida media de 65 días.

En peces, el Clorotalonil es metabolizado a través de la conjugación con glutatión para dar productos de excreción más polares en presencia de la enzima glutatión-transferasa. A pesar de que el Clorotalonil no se considera una sustancia bioacumulable, es muy tóxico para macroinvertebrados acuáticos y peces. La toxicidad del Clorotalonil sobre invertebrados acuáticos y peces ha sido investigada por Davis y White (1985), Mayer (1987), Ernst *et al.* (1991) y Gallager *et al.* (1992).

No se conocen estudios sobre los efectos crónicos del Clorotalonil sobre las especies del género *Daphnia*. Los microcrustáceos del género *Daphnia* se emplean rutinariamente como organismos estándares para estudios ecotoxicológicos. Las dafnias son formas muy representativas de las comunidades zooplánctónicas de los ecosistemas limnéticos con características lénticas. *Daphnia pulex* posee hábitos y estructuras filtradoras y presenta distribución cosmopolita.

En Colombia, Giraldo y Palacio (1999) establecieron los efectos subletales del insecticida clorpirifos sobre esta especie. No se dispone aún de

información sobre los efectos ecotoxicológicos de la exposición aguda o crónica de *D. pulex* al fungicida Clorotalonil. Mediante el presente estudio se busca establecer la concentración letal media y los efectos del Clorotalonil sobre la supervivencia y reproducción del cladóceros *D. pulex*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para esta investigación se empleó Clorotalonil con un grado de pureza de 98%. Este fungicida es conocido comercialmente como bravo, daconil 2787 y clortocaffaro.

El Clorotalonil es un sólido cristalino e incoloro, con un punto de fusión de 250 °C y una presión de vapor de 5.72×10^{-7} mm de Hg a 25 °C. El Clorotalonil posee baja solubilidad (0.6 a 1.2 mg/l a 25 °C), un coeficiente de partición octanol-agua de 2.882, se hidroliza lentamente en agua a pH 9 y es estable a un pH inferior a 7 (WHO, *Op. cit.*). Para el estudio se empleó una cepa de *D. pulex* procedente del embalse La Fe y aclimatada a condiciones de laboratorio (EPA, 1989, 1994a, 1994b, 1994c). Para el cultivo y los ensayos se empleó agua moderadamente dura, preparada a partir de agua destilada (APHA, AWWA y WPCF, 1995). Las características fisicoquímicas del agua de aclimatación y las condiciones ambientales del laboratorio durante el periodo de cultivo fueron las descritas previamente por Giraldo y Palacio (1999).

Para los cultivos en masa se utilizaron recipientes de tres litros y un máximo de veinte neonatos por litro. Los recipientes de cultivo se sifonearon desde el fondo tres veces por semana, reponiendo el agua descartada. Después de dos semanas, se renovó el cultivo con veinte neonatos de aproximadamente veinticuatro horas de edad y se descartaron los adultos.

En los cultivos individuales, fuente directa de neonatos para las pruebas de toxicidad crónica, se emplearon recipientes de 30 ml y un neonato por recipiente. Luego se descartaron los neonatos de las dos primeras camadas y se selecciona-

ron los de las siguientes camadas procedentes únicamente de adultos con una producción superior a ocho neonatos por camada.

En las pruebas de toxicidad aguda se utilizaron cinco niveles de exposición (90.0, 108.0, 129.0, 155.0 y 186.0 $\mu\text{g/l}$) y dos controles, uno con ace-

tona y otro únicamente con agua de dilución, en un sistema estático sin renovación. En cada nivel de exposición se emplearon cinco réplicas con diez neonatos. En la tabla 1 se sintetizan las condiciones experimentales durante la exposición aguda de *D. pulex* a Clorotalonil.

Tabla 1. Condiciones experimentales para las pruebas de toxicidad aguda

Tipo de prueba	Estática y sin renovación
Duración de la prueba	48 horas
Temperatura	22 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$
Calidad de luz	Iluminación del laboratorio
Fotoperiodo	16 horas luz, 8 horas de oscuridad
Tamaño de las cámaras de prueba	150 ml, 120 ml
Volumen de la solución de prueba	100 ml por réplica
Edad de los ejemplares prueba	24 a 48 horas de edad
Ejemplares por cámara	10
Ejemplares por concentración	50
Alimentación	Hasta dos horas antes de la prueba
Aireación	Sin aireación
Agua de dilución	Moderadamente dura
Concentraciones de prueba	Cinco y dos controles
Factor de dilución	1.2
Efecto observado	Muerte
Criterio de aceptabilidad	90% de supervivencia en los controles
Expresión de resultados	CL ₅₀ - 48 horas y límites de confianza

Antes de iniciar y al finalizar la prueba de toxicidad aguda se controlaron el pH, la temperatura, la dureza y el oxígeno disuelto. Luego de 48 horas de exposición se determinó el número de neonatos muertos en cada nivel de exposición y en los controles.

En las pruebas de toxicidad crónicas se utilizó un sistema estático con renovación de las soluciones cada 48 horas. A partir de los resultados de los ensayos agudos, se fijaron cuatro niveles de exposición (0.93, 1.87, 3.75, 7.50 y 15.00 $\mu\text{g/l}$) y un control con agua de dilución.

Para cada nivel de exposición se emplearon diez neonatos de veinticuatro horas de edad, distribuidas individualmente en cámaras con 25 ml de

solución. La exposición a Clorotalonil se prolongó durante trece días. Al final de éste se determinó el número de adultos sobrevivientes y el promedio de neonatos producidos por hembra. Las condiciones generales para el estudio de los efectos crónicos con *D. pulex* se presentan en Giraldo y Palacio (1999).

Para el cálculo de la concentración letal media (CL₅₀) se aplicó el modelo Probit (Finney, 1978). Esta es una técnica paramétrica que se basa en una distribución normal de los porcentajes de mortalidad. Además de la estimación de la CL₅₀, el análisis Probit permite estimar los intervalos de confianza. La descripción detallada de este procedimiento se encuentra en Henao (1992), Mejía (1995) y Palacio (1996).

Los resultados de supervivencia se analizaron mediante la prueba exacta de Fisher. Para establecer si los resultados de reproducción se distribuían normalmente, se aplicó un test de chi-cuadrado a los resultados estandarizados. La homogeneidad de varianza de la producción de neonatos se evaluó por medio de la prueba de Bartlett. Se aplicó además una ANOVA de una vía y se usó la prueba de Dunnet para determinar las posibles diferencias entre los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las variables control pH (7.71, -7.97), temperatura (22 ± 0.5 °C), oxígeno disuelto (6.5-6.9 mg/l), dureza (92-99 mg/l de CaCO_3), conductividad eléctrica (220-240 mS/cm²) y alcalinidad (68-76 mg/l) fluctuaron sólo ligeramente y se mantuvieron en niveles considerados normales en los ensayos agudos y crónicos.

En la tabla 2 se presenta la mortalidad de *D. pulex* a 48 horas de exposición. Es evidente un incremento de la tasa de mortalidad con el aumento del nivel de exposición al Clorotalonil. Adicionalmente, la exposición de *D. pulex* a acetona no evidenció un efecto negativo. A partir de la aplicación del método Probit se obtuvo una concentración letal media (CL_{50}) de 136.78 µg/l de Clorotalonil (I.C 95%, 127.22-148.09 µg/l) en *D. pulex* para 48 horas de exposición (tabla 3).

La CL_{50} (9.7 µg/l) de Clorotalonil reportada por Ernst et al. (1991) para *D. magna* (CL_{50}) en unas condiciones de dureza superiores (250 mg/l de

Tabla 3. CL_{50} e intervalos de confianza para 48 horas de exposición de *D. Pulex* a Clorotalonil

Punto final (ug/l)	Concentración	Intervalo de confianza (95%)	
		Límite inferior	Límite superior
CL_{50}	136.8	127.22	148.09

CaCO_3) y el mismo periodo de exposición, indica menor sensibilidad de *D. pulex* a esta sustancia. Dada la gran importancia de la dureza del agua de dilución sobre el efecto de las sustancias xenobióticas, estos resultados deben ser comparados con precaución. No obstante, la menor dureza del agua (90-92.0 mg/l) y la mayor CL_{50} en la prueba con *D. pulex* podría evidenciar mayor tolerancia de esta especie que la presentada por *D. magna*.

En ensayos de flujo continuo con la trucha *Oncorhynchus mykiss* a temperaturas significativamente más bajas (14 a 16 °C) y a un porcentaje de pureza comparable al del presente estudio, Davies y White (1985) encontraron una CL_{50} de 18.8-19.0 µg/l de Clorotalonil para un periodo de exposición de 48 horas. A pesar de las diferencias de las temperaturas, de estos resultados se infiere una sensibilidad notablemente más alta de *O. mykiss*. Los valores reportados por estos mismos autores para tres especies del género *Galaxias* muestran también valores de CL_{50} para 48 horas notablemente inferiores a los encontrados para *D. pulex* e incluso a los registrados para *D. magna*.

De acuerdo con los pocos resultados disponibles, el Clorotalonil es altamente tóxico para invertebrados y peces. Adicionalmente, los datos sintetizados por WHO (1996) indican que los peces podrían ser más sensibles que los invertebrados a la presencia de este fungicida en los ambientes acuáticos.

Como se infiere de la tabla 4, la máxima mortalidad de *D. pulex* en los cinco niveles de exposición crónica no excedió en ningún caso el 20%,

Tabla 2. Mortalidad de *D. pulex* expuesta al Clorotalonil durante 48 horas

Concentración (µg/l)	Número de ejemplares	Mortalidad	
		Número	Porcentajes
Control de agua	50	0	0
Control de acetona	50	0	0
90.0	50	0	0
108.0	50	13	26
129.6	50	15	30
155.5	50	40	80
186.6	50	43	86

Tabla 4. Supervivencia y algunas características reproductivas de *D. pulex* a Clorotalonil

Concentración (µg/l)	Ejemplares	Supervivencia de adultos		Hembras en reproducción	Edad promedio de la primera camada en días	Número de camadas	Total de neonatos	Total de neonatos por camada
		No	%					
Control	10	10	100	10	6.9	31	170	5.48
0.093	10	8	80	10	7.8	32	142	4.43
1.87	10	10	100	10	7.6	29	126	4.34
3.75	10	9	90	10	7.6	25	127	5.08
7.50	10	9	90	9	7.5	23	125	5.43
15.0	10	10	100	10	7.5	34	118	3.47

y esta variable no presentó tendencia clara asociada al incremento de las concentraciones de Clorotalonil. Con la prueba exacta de Fisher no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia entre los diferentes niveles de exposición y el control.

Exceptuando uno de los ejemplares expuestos a 7.50 µg/l, la totalidad de los neonatos tratados con Clorotalonil y los del control alcanzaron la madurez sexual y se reprodujeron más de una vez durante los trece días de exposición al fungicida.

Tampoco se registraron diferencias apreciables entre los tratamientos en la edad promedio de los adultos al producir la primera camada (tabla 4). No obstante, únicamente para el control el valor promedio de esta variable fue ligeramente inferior a siete. Estos resultados indican que para las concentraciones empleadas en el estudio y para el periodo de exposición el Clorotalonil no conduce a aumento significativo en la edad reproductiva.

Únicamente en las concentraciones intermedias (3.75 y 7.50 µg/l) se observó cierta diferencia en el número total de camadas con relación al control. En la concentración de 7.50 µg/l, una hembra no alcanzó la edad reproductiva y este hecho afectó negativamente el número total de camadas. Para los restantes niveles de exposición, no se detectó efecto sobre el número de camadas, e incluso en la concentración máxima 15.0 µg/l se registró mayor número de camadas que en el control.

Es indiscutible que la producción de neonatos se redujo significativamente en todos los tratamientos con Clorotalonil con respecto al control. No obstante, para las tres concentraciones intermedias (1.87, 3.75 y 7.50 µg/l), no se registró ningún efecto de la exposición creciente. A pesar del menor número de camadas en las concentraciones de 3.75 y 7.50 µg/l, el total de neonatos por camada fue mayor que en los restantes niveles de exposición y alcanzó un valor cercano al del control. Es evidente que para 15 µg/l, el total de neonatos y el promedio por camada se afectaron en forma significativa por la exposición al Clorotalonil (tabla 5).

Como criterio para definir la duración del periodo de exposición se asumió la presencia de al menos tres camadas por hembra en el control. Es indiscutible que el número de camadas y el total de neonatos por nivel de exposición, así como el número de neonatos por camada, podrían afectarse considerablemente por la duración del periodo de exposición. Sin embargo, más que los resultados absolutos, es conveniente establecer la importancia del periodo de exposición sobre las tendencias y el comportamiento de estas variables con respecto al control y frente a las concentraciones crecientes.

La aplicación de las pruebas de chi-cuadrado y Bartlett a los resultados de la tabla 5 demostró que los datos presentaron una distribución normal y homogénea. Por su parte, con la aplicación de la prueba Dunnett se estableció que en ningun-

Tabla 5. Neonatos producidos por hembra de *D. pulex* luego de trece días de exposición a Clorotalonil

Réplica	Control	Concentración ($\mu\text{g/l}$)				
		0.93	1.87	3.75	7.50	15.0
1	16	21	18	15	0	18
2	19	12	24	8	15	10
3	17	13	11	10	18	5
4	16	17	19	17	2	13
5	15	19	13	7	12	22
6	18	17	13	12	19	4
7	15	19	6	16	8	13
8	17	17	6	13	11	14
9	18	5	8	10	21	7
10	19	2	8	19	19	12
Total	170	142	126	127	125	118
Media	17	14.2	12.6	12.7	12.5	11.8
Desv. estándar	1.56	3.9	6.07	4.0	7.4	5.6
Varianza	2.44	15.7	36.93	16.01	55.5	31.5

na de las concentraciones de Clorotalonil se superó el valor crítico teórico de Dunnett (tabla 6).

Tabla 6. Valores "d" de Dunnett

Concentración ($\mu\text{g/l}$)	Valor d 0.93
0.93	1.033
1.87	1.623
3.75	1.586
7.50	1.660
15.00	1.918

A pesar de que la tabla 5 infiere una reducción del total de neonatos por hembra en los tratamientos con respecto al control, el análisis estadístico indicó que el número de juveniles por hembra no fue significativamente inferior al control en ninguno de los niveles de exposición. De acuerdo con los valores obtenidos con la prueba de Dunnett, la concentración de efecto no observado (CENO) para el Clorotalonil y para trece días de exposición es superior a 15 $\mu\text{g/l}$, concentración que equivale a un porcentaje muy cercano al 10% de la concentración letal media para 48 horas de exposición.

REFERENCIAS

- APHA, AWWA Y WPCF. 1995. *Standard methods for the examination of water and waste water*. American Public Health Association, Washington, DC.
- Davies PE, White RWG. 1985. The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish I. Lethal levels for *Salmo gairdneri*, *Galaxias maculatus*, *G. truttaceus* and *G. auratus* and the fate of ^{14}C -TCIN in *S. gairdneri*. *Aquat Toxicol* 7:93-105.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1989. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organism*. 2nd ed. Cincinnati, Ohio. 600/4-89/001.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1994a. 48-hours acute toxicity test using *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. Estados Unidos: 2024/10-94.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1994b. 24-hours range finding test using *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. Estados Unidos: 2021/10-94.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1994c. 10-day chronic toxicity test using *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. Estados Unidos: 2028/11-94.
- Ernst W, Doe K, Jonah P, Young J, Julien G, Hennicar P. 1991. The toxicity of chlorothalonil to aquatic fauna and the impact of its operational use on a pond ecosystem. *Arch Environ Toxicol* 21:1-9.
- Finney DJ. 1978. *Statistical methods in biological assay*. Charles Griffin and Company 3^a. ed., 508 p.

- Gallager EP, Cattley RC, Di Giuzio RT.** 1992. The acute toxicity and sublethal effects of chlorothalonil in channel cat fish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere* 24:3-10.
- Giraldo DL, Palacio JA.** 1999. Efectos del clorpirifos sobre la supervivencia y reproducción de *Daphnia pulex*. *Actual Biol* 21(71):123-130.
- Henao B.** 1992. Determinación de la toxicidad letal del clorpirifos sobre *Oreochromis niloticus*. Trabajo de grado, Departamento de Biología, Universidad de Antioquia.
- Mayer FL.** 1987. Acute toxicity handbook of chemicals to estuarine organisms, Gulf Breeze, Florida. US Environmental Protection Agency (EPA - 600/8 - 017; NTI PB 87 - 188 686).
- Mejía BL.** 1995. Efectos letales de la exposición de *Daphnia pulex* a siete sales de metales pesados. Tesis de grado, Departamento de Biología, Universidad de Antioquia.
- Palacio JA.** 1996. Algunos aspectos biológicos en la contaminación acuática. Universidad de Antioquia. *Rev Fac Ingen* 8(3):56-69.
- World Health Organization (WHO).** 1996. *Environmental health criteria*. 183: Chlorothalonil. 145 p.