

# Evaluación de Riesgo Ecológico en el embalse El Nihuil, Mendoza, mediante biomarcadores de contaminación en perca criolla (*Percichthys trucha*).

## Resumen

Con el fin de conocer el estado ecosanitario de un ambiente acuático se desarrolló y aplicó un protocolo para la evaluación de riesgo ecológico, caracterizando el escenario geográfico, humano y ecológico. El sitio de estudio fue el embalse El Nihuil, Mendoza, donde se han registrado repetidos eventos de mortandad en peces.

Se estudiaron biomarcadores de exposición y de efecto producidos por contaminantes plaguicidas en percas criollas (*Percichthys trucha*), especie nativa y más abundante del embalse.

Se realizó la captura con redes de una muestra poblacional, toma de variables ambientales, morfométricas de cada ejemplar, evaluación macroscópica y muestreo de tejidos para estudios lepidológicos, toxicológicos, genéticos e histológicos.

Se determinó: la presencia/ ausencia de plaguicidas por espectrofotometría gaseosa en músculo de peces; la presencia y graduación de alteraciones histopatológicas en branquias, hígado y riñón (Bernet 1999); el nivel de daño genético en eritrocitos de acuerdo a los criterios de Fenech (2000) y Carrasco y col. (1990).

No se evidenciaron efectos de toxicidad acuática, determinando que el riesgo de salud pública sería mínimo, sin embargo al ser identificadas varias fuentes de contaminación, se recomienda la vigilancia ambiental.

La información generada amplía el conocimiento sobre *P. trucha* y posibilita un seguimiento en el tiempo de su salud general y genética, con proyección a salud del ambiente acuático en estudio. El protocolo propuesto permite ser aplicado sobre diferentes ecosistemas acuáticos.

## Introducción y Justificación

La evaluación de riesgo ecológico se basa en la caracterización y estimación de la probabilidad que hayan ocurrido, estén ocurriendo o vayan a ocurrir efectos adversos por efecto de actividades humanas. Con ello puede establecerse si el grado de contaminación presente en un sitio genera efectos nocivos.

Entre mayor sea el riesgo de que la contaminación afecte a los seres vivos, mayor será la necesidad de instrumentar programas de restauración. Para esto se plantea la necesidad de establecer una metodología integrada de evaluación de riesgo, caracterizando los diferentes escenarios reales. De esta forma mejorar la calidad y la eficiencia del proceso de evaluación, favorecer el intercambio de información entre la salud humana y los estudios ecotoxicológicos y proveer de mejores argumentos para el proceso de toma de decisiones ambientales. El esquema que propone este documento está basado en las metodologías ya descritas de la "Evaluación del Riesgo en Salud" de la OPS (Díaz Barriga, 1999) y de la "Evaluación del Riesgo Ecológico" (EPA, 1998; 1999, Sutter, 1995) que proponen el uso de biomarcadores de exposición (monitoreo de

sustancias tóxicas en individuos expuestos) y biomarcadores de efecto.

Los peces son particularmente blanco de contaminación y desarrollan alteraciones por bioacumulación de los contaminantes ambientales en sus órganos. (Mitchell 1992).

El uso de biomarcadores histológicos y genéticos en peces para vigilar la polución en ecosistemas es reconocido para metales pesados (Abdallah 2000), plaguicidas (Domitrovich 2000, Aiassa y Gorla 2009, Ramírez 2009), petróleo y derivados (Salamanca 2008), muestran el efecto de cambios bioquímicos, moleculares y celulares en el organismo como resultado de la exposición a contaminantes, son indicadores presentes de efectos biológicos a futuro (Marigómez 2006).

La exposición de los peces a los contaminantes químicos inducen diferentes lesiones en distintos órganos. Las branquias se consideran como marcador primario de contaminación acuática debido a que exhiben una gran superficie en permanente contacto con el contaminante potencial. También se han descrito alteraciones en riñón (Silva 2007) e hígado, asociadas principalmente a efectos más crónicos (Velisek 2009).

Bernet (1999) propone un protocolo para evaluar la contaminación ambiental mediante el uso de índices histopatológicos estandarizados para generar análisis estadísticos.

En la Argentina, dentro de los agroquímicos, los herbicidas son los que poseen mayor volumen de venta, ocupando el segundo lugar los insecticidas. En estos últimos, en primer lugar estarían los organofosforados (OF), luego los piretroides, organoclorados (OC), carbamatos y otros (Rodríguez 1991).

El potencial genotóxico de los plaguicidas ha sido bastante estudiado y hay considerables evidencias que muestran la capacidad de estos para inducir daño cromosómico, intercambio de cromátidas hermanas y mutación puntual (Peitl 1996).

La prueba de detección de micronúcleos y alteraciones nucleares es una de las técnicas más confiables para determinar cambios genéticos en los organismos y con resultados sensibles para el monitoreo de contaminación acuática (Arslan 2010).

En el siguiente trabajo se expone un protocolo de diagnóstico para la evaluación de sistemas acuáticos donde se caracteriza el escenario geográfico, ecológico y humano, se estima el riesgo de contaminación, se desarrolla un plan de muestreo y un programa analítico basado en el estudio de biomarcadores toxicológicos, histológicos y genéticos en una muestra poblacional de *Percichthys trucha* del Embalse El Nihuil.



# SUBSIDIOS INVESTIGADORES MENDOCINOS

## FACUNDO "TATA" QUIROGA

### Hipótesis

Los biomarcadores histológicos y genéticos en peces son una herramienta útil para determinar contaminación de ambientes acuáticos y pueden aplicarse como modelo preventivo de problemas más severos e irreversibles.

### Objetivos

- Describir la histología de branquias, hígado y riñón de *Percichthys trucha*.
- Medir la extensión de los cambios histopatológicos y la importancia de las alteraciones, con el objetivo de obtener índices que puedan ser analizados estadísticamente (según el protocolo de evaluación de contaminación ambiental propuesto por Bernet y col, 1999).
- Evaluar el nivel de daño genético en los mismos peces mediante las técnicas propuestas por Schmid (1975), Fenech (2000) y Carrasco y col. (1990) para la determinación de micronúcleos y alteraciones nucleares en sangre.
- Determinar la presencia de tóxicos comunes (plaguicidas) en tejido de los mismos peces.
- Analizar estadísticamente si existe una correlación entre los niveles y el tipo de compuestos detectados en carne de peces y los efectos histológicos y genéticos en los peces.
- Determinar la validez de los biomarcadores estudiados para la evaluación del riesgo ecológico en sitios potencialmente contaminados.

### Materiales y Métodos

Estudio: descriptivo, observacional y transversal.

Se diseñó un protocolo metodológico para la evaluación de sistemas acuáticos que permita un enfoque holístico de los escenarios geográficos, ecológicos y humanos del ambiente en cuestión. Se utilizaron referencias bibliográficas, análisis de imágenes satelitales y entrevistas a pobladores y entes municipales.

Se determinaron los criterios de selección de especie para biomonitorio: *Percichthys trucha*,

Área de muestreo: Embalse El Nihuil, Provincia de Mendoza, Argentina. 35°04'S, 68°45'O; 1325 msnm, el ingreso al embalse se realizó con embarcación tipo lancha de 4,65 metros de eslora, con motores de 4 tiempos (no contaminantes) de 50 Hp y 2 Hp.

Se capturó la muestra con redes agalleras de 4 x 4 cm. Una vez capturado el pez vivo se realizó una rápida eutanasia por desmedulación cervical (corte con tijera en caudal de los opérculos) y se procedió inmediatamente a la toma de muestra de sangre de la vena dorsal para estudios citogenéticos, realización de mediciones corporales; longitud (centímetros) pesaje (con balanza electrónica Acculab GS 2001) y muestreo lepidológico de escamas, para determinar la edad.

Se aplicó una técnica de necropsia rigurosa, realizando el sexado y determinación de estado de maduración gonadal, toma de muestras de músculo para estudios toxicológicos y la evaluación macroscópica de alteraciones orgánicas con muestreo para estudios histopatológicos de los órganos (branquias, hígado y riñón).

Estas muestras fueron remitidas al laboratorio en formaldehído 4 % para su procesamiento mediante técnicas histológicas estándares, inclusión en parafina y tinción con Hematoxilina Eosina, PAS y Alsián Blue. Se utilizó un microscopio óptico Nikon Eclipse trinocular con cámara de 3,2 megapíxeles.

Se describió la anatomía microscópica de los tejidos, se tomaron algunas medidas estructurales y se analizaron matemáticamente las alteraciones histopatológicas, según el protocolo de evaluación de contaminación ambiental propuesto por Bernet y col, 1999. Las muestras de músculo fueron enviadas congeladas para la detección de plaguicidas dentro de las 24 hs (vía encomienda aérea a Buenos Aires). Mediante cromatografía gaseosa se utilizó un detector de captura de electrones (ECD) para detección de piretroides, OC y endosulfán, y detector fotométrico de llama (FPD) para plaguicidas OF. Para los análisis estadísticos se aplicó el software Statistix 7.0.

Se extrajeron 43 muestras de sangre de la vena dorsal de cada ejemplar de *Percichthys trucha*, obtenidas mediante punción con jeringas de 1ml y aguja fina, se realizó un extendido sanguíneo en portaobjetos previamente limpiados con alcohol y codificados.

Los extendidos fueron secados in situ a temperatura ambiente y mantenidos refrigerados a 8°C. Luego fueron trasladados al laboratorio donde fueron fijados con metanol absoluto durante 10 minutos y se colorearon con Giemsa al 10% en agua destilada durante 10-14 minutos. Se realizó la observación microscópica en microscopio óptico Nikon con objetivo de 100X en aceite de inmersión, y se observaron 2000 células por animal.

Se identificaron micronúcleos en eritrocitos según los criterios definidos por Fenech, 2000 y las siguientes anomalías nucleares según Carrasco y col., 1990; células binucleadas, blebbed, notched, lobed y puente. Se capturaron imágenes con cámara digital Samsung 5.0. Se utilizó el software GraphPadPrism 5.0 y realizó análisis estadístico para obtención de medias y desvíos estándares aplicando el test de Kolmogorov-Sminov

### Resultados

Se generó un Protocolo de diagnóstico para la Evaluación de Contaminación de Sistemas Acuáticos reuniendo la mayor cantidad de información posible que permita un amplio enfoque descriptivo de la siguiente manera:

1- Caracterización general y geográfica del sitio. Descripción geomorfológica. Hidrología. Descripción del proceso contaminante o de las fuentes de contaminación. Caracterización de Asentamientos urbanos.

2- Caracterización del escenario ecológico.

a)-Criterios para la selección de especies para biomonitorio



- b. Antecedentes de efectos en especies seleccionadas.
- c. Disturbios antropogénicos.
- 3- Estimación del Riesgo:
  - a- Caracterización de las rutas de exposición
  - b- Análisis de la contaminación ambiental:
    - Plan de muestreo
    - Programas analíticos.
- 4- Caracterización del Riesgo (plan de análisis de resultados)
- 5- Conclusiones y Recomendaciones.

En noviembre 2012 se realizó el muestreo en el Embalse El Nihuil, San Rafael, Mendoza. Se capturaron 60 percas criollas (*Percichthys trucha*), mediante el calado de redes (de 4x4cm) durante 12 horas a una profundidad de 2,1 m. Se ubicaron territorialmente los cardúmenes de percas (por ecosondas y testimonios de pescadores). En el momento del muestreo se registró: temperatura ambiente 12°C, temperatura acuática 13°C, oxígeno disuelto 89,2%, pH 8,8. Los peces muestreados presentaban una edad de 3 años (el 56%) y 4 años (29%).

Se determinó macroscópicamente el sexo en 43 individuos dando 30 hembras (51,7%) y 13 machos (22,4%). El peso medio fue de 444,96 gramos con una desviación estándar de 216,37 gramos (mín 200 - max 1100). La longitud media de 35,13 cm (sd8,21 cm). La evaluación macroscópica de los ejemplares detectó un alto valor (73%) de presencia de alteraciones, encontrándose principalmente involucrados las branquias y el hígado.

Se determina el análisis de plaguicidas como contaminantes críticos, por las amplias zonas cultivadas que por las características del suelo drenan hacia el embalse. No se detectó la presencia de ninguno de los plaguicidas monitoreados y sus metabolitos (OF, OC, Piretroides y Endosulfán) en carne fresca de percas.

En la tabla se realiza una comparación de la frecuencia media, desvío estándar y número de individuos entre el presente trabajo realizado en *Percichthys trucha* y de 3 especies ictícolas argentinas de la bibliografía (Pollo, 2012).

Para la caracterización de los biomarcadores histopatológicos de tejidos de branquias, hígado y riñón de *P. trucha* se realiza primero una descripción de la anatomía microscópica de los mismos a continuación.

Tabla 1

Comparación de la frecuencia media, desvío estándar y número de individuos, entre el presente trabajo

| ESPECIE EN ESTUDIO                           | N  | MICRONUCLEOS EN<br>1000 ERITROCITOS ± SD | ALTERACIONES NUCLEARES EN<br>1000 ERITROCITOS ± SD |
|--|----|--|--|
| <i>Percichthys trucha</i> (Actual trabajo)   | 43 | 0,51 ± 0,46                              | 2,68 ± 4,50  |
| <i>Cyprinus carpio</i> (Pollo, 2012)         | 26 | 0,05 ± 0,12                              | 2,12 ± 1,88  |
| <i>Astyanax eigenmanniorum</i> (Pollo, 2012) | 26 | 0,07 ± 0,22                              | 8,77 ± 7,46  |
| <i>Cheirodon interruptus</i> (Pollo, 2012)   | 21 | 0,04 ± 0,09                              | 5,62 ± 6,32  |

\*Se comparan las frecuencias con el desvío estándar (SD) de distintas especies de peces a través del análisis de varianza ANOVA, el cual no dio una diferencia estadísticamente significativa entre ellas (P>0,05). A su vez, se confirmó dicho resultado con el test de comparaciones múltiples de Tukey.

## Discusión y Conclusiones

La importancia de evaluar biomarcadores es la detección temprana de la presencia de contaminantes y dependiendo de las alteraciones observadas se puede analizar retrospectivamente y/o prospectivamente las modificaciones y el impacto de los contaminantes sobre el ambiente acuático.

Muchos autores y organismos referenciales de control recomiendan el uso de varios biomarcadores para integrar los programas de monitoreo ambiental de una forma más completa (ICES 1997, EPA 1998, 1999, Toro Restrepo 2011, Au 2004).

En este caso y según el Protocolo propuesto, observamos que todas las rutas de exposición de posibles contaminantes concluyen en el agua del embalse y los recursos alimentarios que de él se obtienen, por lo tanto el plan de biomonitoreo se plantea en *Percichthys trucha* que es la especie de peces nativa más abundante del sitio e integra una amplia cadena trófica (fitoplancton - zooplancton - moluscos gasterópodos - macrófitas) por lo que puede presentar efectos por bioacumulación de contaminantes (Espina y Banegas 2005), además se el principal recurso alimentario del embalse.

La metodología de muestreo propuesta fue exitosa debido a que se capturó el N planteado con el calado de una sola red en el tiempo estipulado y se logró la selección de especie ya que el 97% de los especímenes recolectados fueron *P. Trucha*. La muestra obtenida fue homogénea en relación al peso, longitud y edades de los individuos examinados como lo demuestran los valores de desvío estándar calculados. La asistencia de personal idóneo, equipamiento y medio de navegación adecuados resultó vital en el éxito de este muestreo.

Se determinó el rastreo de plaguicidas por la presencia de cultivos y las características geológicas que posibilitan su llegada al embalse. Además, sus usos están muy difundidos en la población, sumados a las altas características toxicológicas y su efecto conocido en peces, principalmente alteraciones genotóxicas e histopatológicas.

Los resultados marcan la ausencia de plaguicidas monitoreados en carne fresca de percas, eliminando el biomarcador de exposición probable y las posibilidades de correlación entre la presencia de tóxico y la presencia de alteraciones genéticas o histológicas. Igualmente es necesario remarcar que no se pudo evaluar la presencia de "Glifosato" que es el herbicida más usado en Argentina y que en esta zona en particular, por el tipo de cultivos aledaños, sería el plaguicida más probable de encontrar y que causa alteraciones genotóxicas e histológicas en peces. Se recomienda el muestreo en cerebro, riñón y grasa donde pueden acumularse plaguicidas por sus características liposolubles.

No se puede considerar que los valores hallados, tanto de micronúcleos como de alteraciones nucleares, indiquen alguna toxicidad.





En los resultados se compararon las frecuencias halladas con las de Pollo y col. (2012) en otras frecuencias de Micronúcleos y Anormalidades especies, observándose que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las Nucleares. Los valores obtenidos en todos los casos, son muchos menores que los registrados en bioensayos, en donde se exponen a los animales a distintos tóxicos. Debido a la distinta sensibilidad de las especies de peces a presentar aumento en las frecuencias de MN y AN, sería conveniente muestrear otros ejemplares que habiten en dicho embalse para comparar los resultados con la perca criolla. Realizando esto podríamos determinar si *Percichthys trucha* es un fiel centinela de calidad ambiental, o si bien podía considerarse una especie resistente adaptada a un ambiente de alto impacto antrópico.

La obtención de descripciones histológicas y recuento de alteraciones histopatológicas para branquias, hígado y riñón son de importancia en la investigación básica y comparativa de esta especie, al no encontrar en la bibliografía registros previos. También se plantea estudiar estas variables en *P.trucha* en un ambiente prístino para poder comparar y generar valores de referencia en esta especie, que además de ser autóctona en el amplio sur argentino, puede valorizarse como recurso alimentario versus las especies exóticas introducidas. En función de los resultados obtenidos podríamos decir que riesgo de salud pública sería mínimo para el momento en que se ha realizado el estudio, sin embargo al encontrarse identificadas variadas fuentes de contaminación, se recomendaría una vigilancia ambiental y epidemiológica en forma periódica.

### Referencias Bibliográficas

Abdallah, A.T. 2000. On the efficiency of some histological techniques as biomarker for heavy metal pollution. *Science, Technology and Education of Microscopy: An Overview*. 287-296

Aiassa D, Gorla N, Bosch B. (2011) Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *Journal of Toxicology & Environm. Sciences* Vol. 3(5), pp. 155-163

Alvarez M, Gimenez I, Saitua H, Enriz R, Giannini F. 2012 .Toxicidad en peces de herbicidas formulados con glifosato. *Acta Toxicol. Argent.* 20 (1):5-13

Muranli FDG, Güner U. 2011. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Mutation Research* 726, 104-108

Pollo F, Salas N, Mancini M, Martino A. 2012. Estudio comparativo de la frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares en eritrocitos de tres especies ícticas. *Acta Toxicol. Argent.* 20 (2):62-67.

RAMSDORF, W. Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax* sp B e A. *altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri - UFPR). 2007. 127 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética - Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.



**Título:** Evaluación de Riesgo Ecológico en el Embalse El Nihuil, Mendoza, mediante biomarcadores de contaminación en perca criolla (*Percichthys trucha*).

**Autores:** M. E. Palma Leotta, N. Gorla, M. N. Caliri; A. R. Cáceres; E. Saldeña; D. Ibaceta, .

**Instituciones:** Laboratorio de Biopatología, Fac. de Cs Veterinarias y Ambientales, Universidad Maza, Mendoza. GenAr (Laboratorio de Genética, Reproducción y Ambiente) Universidad Maza, Mendoza. Laboratorio de Anatomía Patológica. Hospital Central, Ministerio de Salud.