



## Índices de calidad ambiental de aguas del Arroyo Caañabe mediante tests microbiológicos y ecotoxicológico

doi:10.4136/ambi-agua.1703

Received: 14 Jul. 2015; Accepted: 07 May 2016

Tomás López Arias<sup>1\*</sup>; Virginia Fernández Peralta<sup>1</sup>;  
Deidamia Mercedes Franco de Diana<sup>1</sup>; Edgar Galeano Delgado<sup>1</sup>;  
Fernando Salvador Alonso Márquez<sup>2</sup>; Mónica Diana Benítez Martínez<sup>1</sup>;  
María Eva López Vera<sup>1</sup>; Helton Ímas Ayala<sup>1</sup>; Nathalia Bobadilla Giménez<sup>1</sup>;  
Liz Mariela Benitez Resquín<sup>1</sup>; Carlos Gustavo Mazó Bareiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción (UNA)

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN), San Lorenzo, Paraguay  
Departamento de Biología

<sup>2</sup>Universidad de Córdoba (UCO), Córdoba, España  
Departamento de Ciencias Ambientales

\*Autor correspondiente: tlopez@facen.una.py,  
virginiafernandezperalta@gmail.com, profedeidy@gmail.com,  
galeanoedgar\_@hotmail.com, fernapi@live.com,  
monicadianabenitez@gmail.com, mariaeva193@gmail.com,  
heltonimas@hotmail.com, ns.bobadilla@gmail.com,  
marie.benitez@yahoo.com, cagumazo@gmail.com

### RESUMEN

El Arroyo Caañabe, es un curso de agua que corre a través de los Departamentos Central y Paraguarí (República del Paraguay). Las descargas de origen agropecuario, urbano e industrial contaminan sus aguas. En este trabajo se evalúa la calidad del arroyo mediante sus características físicoquímicas, ecotoxicológicas, microbiológicas y se la comparan con la legislación vigente. Se colectaron muestras en los meses de Julio y Setiembre del año 2014. Se estudiaron tres sitios denominados S1, ubicado en aguas arriba de la Ciudad de Carapegua; S2 en la intersección del arroyo con la Ruta 1, y S3, en la zona límite de las ciudades de Carapegua y Nueva Italia. Se realizaron ensayos de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, *Lactuca sativa*, y alevines de *Danio rerio*; además de ensayos crónicos en *Tetrademus wisconsinensis*, *D. rerio* y *Allium cepa*. Se evaluaron los grupos y especies microbianos siguientes: aerobios mesófilos, enterobacterias, coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, mohos y levaduras; además se determinaron índices de calidad y de contaminación. Los resultados indican que las aguas del arroyo presentaron características de clase II y de clase III según el padrón establecido por la Secretaría del Ambiente del Paraguay. El índice de calidad de agua (ICA) arrojó valores comprendidos entre 52 y 62 lo que otorga la clasificación de “regular”; mientras que el índice de contaminación trófica (ICOTRO) presentó valores entre 0,12 y 0,26, indicando “eutrofización”. Los recuentos de coliformes fueron superiores en el segundo muestreo, aunque dentro lo establecido por la norma. La presencia de *P. aeruginosa* en los tres puntos constituye un riesgo para la salud. Ensayos ecotoxicológicos agudos mostraron que las aguas presentan escasos efectos letales, no obstante los ensayos crónicos en *A. cepa* y el test de micronúcleos en *D. rerio* indican

potenciales efectos citotóxicos y genotóxicos de las aguas del Arroyo Caañabe.

**Palabras clave:** actividad antrópica, calidad del agua, toxicidad.

## Índices de qualidade ambiental das águas do riacho Caañabe mediante testes microbiológicos e ecotoxicológicos

### RESUMO

O “Arroyo de Caañabe” é um riacho que atravessa os departamentos Central e Paraguari (Paraguai) e sofre contaminação proveniente do desague de restos de origem agropecuária, urbana e industrial. A qualidade de suas águas com base nas características físico-químicas, ecotoxicológicas, microbiológicas foi avaliada levando-se em consideração a legislação vigente. Foram coletadas amostras nos meses de julho e setembro de 2014 de três pontos ao redor da cidade de Carapeguá. Foram realizados ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna*, *Lactuca sativa* e alevinos de *Danio rerio*, assim como ensaios crônicos com *Tetrademus wisconsinensis*, *D. rerio* y *Allium cepa*. Foram analisados os seguintes microrganismos: aeróbios mesófilos, enterobacterias, coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa*, fungos leveduriformes e filamentosos; além da determinação dos índices de qualidade e de contaminação. Os resultados obtidos indicam que as águas apresentam características de classe II e classe III segundo o padrão estabelecido pela Secretaria do Ambiente do Paraguai. O índice de qualidade de água (ICA) ficou entre 52 e 62, classificado, portanto como “regular”, enquanto o índice de contaminação trófica (ICOTRO) ficou entre 0,12 e 0,26, indicando eutrofização. A quantificação de coliformes foi superior na segunda coleta, porém ainda dentro da norma. A presença de *P. aeruginosa* nos três pontos de amostragem representa risco à saúde. Os ensaios ecotoxicológicos agudos demonstraram que as águas do riacho Caañabe apresentam efeitos letais escassos, entretanto, os ensaios crônicos com *A. cepa* e o teste de micronúcleos em *D. rerio* indicaram que essas águas apresentam potencialmente efeitos citotóxicos e genotóxicos.

**Palavras-chave:** atividade antrópica, qualidade de água, toxicidade.

## Environmental quality assessment of Caañabe Stream by microbiological and ecotoxicological tests

### ABSTRACT

The Caañabe stream is a watercourse that runs between the Departments Central and Paraguari (Republic of Paraguay). Discharges of agricultural origin, urban and industrial pollute its waters. In this work the quality of the stream was assessed by its physicochemical characteristics, ecotoxicological, microbiological and compared with the current legislation. Samples were collected in July and September of 2014 from three study sites: S1, situated upstream from the city of Carapegua; S2, situated at the intersection of the stream and Route 1; and S3, situated at the border area between the cities of Carapegua and Nueva Italia. Assays were performed for acute toxicity in *Daphnia magna*, *Lactuca sativa* and fingerlings of *Danio rerio*, as well as assays for chronic toxicity in *Tetrademus wisconsinensis*, *D. rerio* and *Allium cepa*. The following microbial groups and species were determined: aerobic mesophilic bacteria, enterobacteria, total coliforms, fecal coliforms, *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa*, molds and yeasts; and the quality and contamination indices were determined. The results indicate that the waters of the stream presented Class II and Class III features

according to the standards set by the Secretariat of the Environment in Paraguay. The water quality index (ICA by its Spanish acronym) gave values between 52 and 62, which allows the classification of “regular”; while the trophic contamination index (ICOTRO by its Spanish acronym) presented values between 0.12 and 0.26, indicating “eutrophication”. The coliform recount was higher in the second sampling, although within the limits established by the standards. The presence of *P. aeruginosa* at the three points represents a health risk. Ecotoxicological assays showed that the waters produced few lethal effects; however, the chronic assays in *A. cepa* and the micronucleus test in *D. rerio* indicate potential cytotoxic and genotoxic effects.

**Keywords:** human activity, toxicity, water quality.

## 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de los recursos hídricos se ha convertido en un creciente problema en la actualidad. Los ríos y arroyos son una importante fuente de agua dulce en todo el mundo, y por desgracia a menudo están contaminadas por el vertido de aguas residuales urbanas, desechos industriales, y por las actividades humanas en general. Según se menciona en el Manual de Política Ambiental del Paraguay, el deterioro de las aguas superficiales y subterráneas en el territorio nacional, está asociado principalmente con el uso inadecuado de la tierra, la contaminación de las áreas de recarga de los acuíferos, el monocultivo, el mal uso de agroquímicos, los desechos domésticos, industriales y hospitalarios de naturaleza tóxica o peligrosa (Paraguay, 2005).

Según la Dirección General de Estadísticas Encuestas y Censo, el Arroyo Caañabe es un cauce hídrico que surca por los departamentos de Paraguarí y Central, con un curso de unos 100 kilómetros de extensión desde su nacimiento (Cordillera de Ybycui) hasta su desembocadura (Lago Ypoa) (DGEEC, 2002). Pese a que la población no consume directamente sus aguas, a esta se le dan varios usos que van desde el recreacional, paisajístico, caza y pesca, hasta servir de fuente de agua para el sector ganadero de la zona.

Actualmente el Arroyo Caañabe se encuentra sometido a un proceso de polución creciente, causada por los contaminantes proveniente de la actividad industrial de la zona (frigoríficos, curtiembres, mataderías y aceiteras), comercial (lavaderos y talleres) sumado a la falta de un alcantarillado sanitario y planta de tratamiento de aguas residuales para la Ciudad de Carapeguá (Escobar, 2012); municipio que según la DGEEC cuenta con 30.758 habitantes, constituyéndose en la ciudad más importante de la cuenca (DGEEC, 2002). En la ciudad de Carapeguá actualmente existen en funcionamiento cerca de 30 industrias de curtido de cuero, de estas el 80% no disponen de plantas de tratamientos, siendo las condiciones financieras y técnicas las principales limitantes para su implementación (Marcello et al., 2010).

Es de público conocimiento que constantemente se divulgan a través de la prensa, sucesos resultantes de la mala calidad de las aguas del arroyo, como ser la mortandad de peces, problemas de salud de los pobladores de la Ciudad de Carapeguá (náuseas y cefaleas) asociados principalmente con derrames de desechos de industrias de la zona. En este contexto, considerando la presión antropogénica que recibe el cauce se hace necesario establecer las características reales que presentan sus aguas, puesto que no se disponen de informaciones apropiadas al respecto.

Tradicionalmente la determinación de los parámetros fisicoquímicos era utilizada como la única herramienta para el diagnóstico de la calidad del agua de un ecosistema, sin embargo más recientemente han mostrado su utilidad la detección de bioindicadores de contaminación, y la realización de bioensayos de laboratorio. Castillo (2004), mencionan que existen varios

organismos que pueden ser utilizados para la determinación de las características ecotoxicológicas de los ecosistemas acuáticos lóticos, siendo *Daphnia magna*, *Lactuca sativa*, *Allium cepa* y varias especies de microalgas, organismos caracterizados por su alta sensibilidad a la presencia de contaminantes.

Muchos de los contaminantes ambientales, producen daños subletales no detectados en los ensayos de toxicidad aguda realizados con los organismos anteriormente mencionados, en este contexto la genética toxicológica aporta herramientas para estimar el riesgo genético que pueden producir los contaminantes ambientales (Klaassen y Watkins, 2005). En el presente estudio se utilizaron dos test genotóxicos, el análisis de micronúcleos en sangre periférica de *Danio rerio*, y la determinación de efectos citogenéticos en *Allium cepa*. Ambos bioensayos estandarizados como biomarcadores de diferentes contaminantes ambientales, a dosis sub tóxicas y a exposiciones crónicas (Bolognesi et al., 2006).

Los índices son herramientas que permiten diagnosticar la calidad del agua, se pueden generar utilizando elementos básicos en función de los usos del recurso hídrico. El Índice de Calidad de Agua (ICA), define la aptitud del cuerpo del agua respecto a los usos prioritarios que este pueda tener, es un número adimensional que va de de 0 a 1 o 1 al 100, donde a mayor cantidad, indica mejor calidad. Esta metodología fue desarrollado por primera vez por Brown (1970), cuya versión modificada y adoptada por La Fundación Nacional de la Ciencia de E.E.U.U (NSF) es ampliamente utilizada actualmente. El propósito del ICA es identificar de forma ágil y fácil los problemas de contaminación (Bhadra et al., 2014; Noorbakhsh et al., 2014).

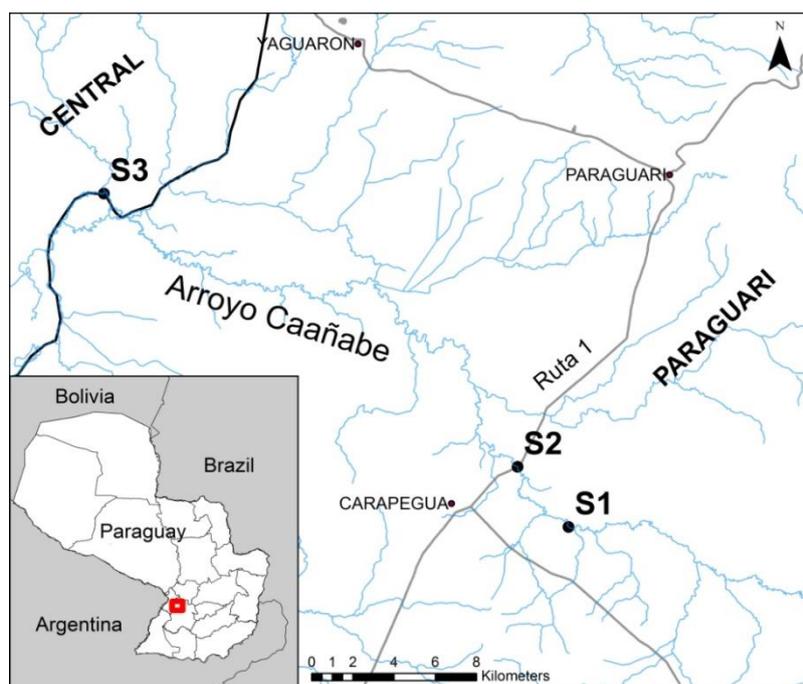
Otro aspecto importante al evaluar un curso hídrico, es su calidad microbiológica. Criterio que se utiliza para establecer el grado de contaminación con residuos de diversas fuentes, valiéndose de pruebas para la detección y recuento de microorganismos indicadores, antes que patógenos específicos. Los principales indicadores son las bacterias coliformes, mohos y levaduras, *E. coli*, *Enterobacter* entre otros. Estos dan con certeza informaciones relevantes de la adecuación del agua para usos domésticos, industriales o de otro tipo (APHA et al., 2008).

Considerando que no se disponen de informaciones certeras sobre el Arroyo Caañabe en cuanto a su calidad. El objetivo del presente estudio es realizar un diagnóstico de las condiciones ambientales de las aguas de este cause, mediante el análisis de parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y ecotoxicológicos, en zonas de influencia con la Ciudad de Carapeguá, y comparar estos parámetros con normativas de regulación nacional e internacionales.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Localización del Área de Estudio y toma de muestras

Se seleccionaron tres sitios para la colecta de las muestras de agua (Figura 1). El primer sitio (S1), ubicado aguas arriba de la Ciudad de Carapeguá (coordenadas 25°46'32.28"S, 57°11'40.52"O); el segundo (S2) en el puente de la intersección del Arroyo Caañabé y la Ruta 1 (25°44'56.62"S, 57°13'0.93"O); y el tercero (S3), ubicado en el puente sobre el Arroyo Caañabe, zona limítrofe entre las ciudades de Carapeguá y Nueva Italia (25°37'43.62"S, 57°23'51.02"O). Se realizaron dos muestreos, la primera colecta fue el 2 de julio (sitios S2 y S3), y la segunda el 25 de setiembre de 2014 (Sitios S1, S2 y S3), totalizando cinco muestras. Se tomaron muestras puntuales, en forma manual con muestreador tipo Van Dorn y fueron almacenadas en envases de polipropileno de 5 L para los ensayos toxicológicos, en frascos de vidrio color ámbar de 200 ml para la determinación de fósforo, y en frascos de vidrio estériles para las determinaciones microbiológicas. Las muestras fueron conservadas a 4° C hasta su estudio en el laboratorio.



**Figura 1.** Sitios de colecta de muestras en el Arroyo Caañabe. S1, aguas arriba de la Ciudad de Carapeguá. S2, en la intersección con la Ruta N°1 Mariscal Francisco Solano López. S3, aguas abajo de la Ciudad de Carapeguá, límite con la Ciudad de Nueva Italia.

## 2.2. Análisis fisicoquímicos

Se realizaron determinaciones *in situ* con un equipo multiparamétrico HANNA serie HI9828 para los siguientes parámetros: temperatura, pH, conductividad, oxígeno disuelto (OD) y sólidos totales disueltos (STD). Otros parámetros como la turbidez, la Demanda Bioquímica de Oxígeno a los cinco días (DBO<sub>5</sub>), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Nitrógeno Total (NTK), ortofosfato, fósforo total (P-total), sulfato, dureza total, y metales (Cadmio, cromo total y plomo) se determinaron en el Laboratorio de Calidad de Agua, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales siguiendo las metodologías de la “American Public Health Association/American Water Works Association Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (APHA et al., 2008). Los resultados se presentan en la Tabla 3.

## 2.3. Ensayos microbiológicos

Se determinaron 7 grupos microbianos (Tabla 4). Para el recuento de aerobios mesófilos (RAM), mohos y levaduras (ML), se siguió las indicaciones del método Petrifilm (3M Placas Petrifilm<sup>TM</sup>). Se inoculó 1 ml de diluciones sucesivas de la muestra en placas apropiadas para cada caso; para RAM se llevó a incubación a 36°C ±1°C por 24-48 h; y para ML a 22°C-25°C por 3-5 días. Los resultados se reportan como UFC/ml.

La determinación de las enterobacterias se realizó en placas de VRBG (violeta rojo y bilis glucosa) (Método APHA). Para el efecto se vertió 10 ml de agar VRBG en las placas con 1 ml de las diluciones de la muestra. Luego se adicionó 8 ml del agar VRBG y se dejó solidificar, e incubar a 35°C por 24 h.

El recuento de coliformes fecales (CF), coliformes totales (CT), y *E. coli* se realizó por el método de filtración por membrana (SM 9222 D). Se filtraron al vacío varios volúmenes de muestras de 100 ml, posteriormente se colocaron los filtros preparados en los medios apropiados; para CF se ubicaron en placas con M-FC agar, y se incubaron a 44,5°C por 24 h. Se contaron las placas con colonias de color azul. Por su parte para los CT se colocaron los

filtros preparados con la muestra en placas con caldo M-Endo en almohadillas absorbentes, y se incubaron a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Se contaron las placas con colonias de color rojo y brillo metálico para CT, y las de color verde con brillo metálico para *E. coli*. Los resultados se reportaron como UFC/100ml.

Método APHA de Presencia/Ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*: se tomaron 50 ml de la muestra y se mezcló con 50 ml de caldo nutritivo, se llevó a incubación a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24-48 h, pasado ese tiempo, se realizó la siembra de la muestra por el método de repique por estrías cruzadas en placas con Cetrimide agar, y se llevó a incubación a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Se revelaron las colonias de *P. aeruginosa* de color amarillo-verdoso fosforescente, bajo la luz UV. Se reportaron los resultados como Presencia / Ausencia (P/A).

#### 2.4. Bioensayos ecotoxicológicos

El ensayo de toxicidad aguda en *D. magna* Straus 1820, fue utilizado en este estudio. Se trabajó con organismos provenientes de lotes de cultivos a base de agua dura reconstituida (APHA et al., 2008) alimentadas con la microalga *Chlorella* sp; mantenidas a fotoperiodo de luz/oscuridad de 16/8 horas, temperatura de  $22^{\circ}\text{C}$ , pH 7-8, y dureza entre 160-180 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ . El mantenimiento y las pruebas se realizaron siguiendo las recomendaciones de la OECD (2004) y Castillo (2004), con un diseño DBCA  $7 \times 3$ , 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. Los ensayos se realizaron por triplicado, con volúmenes de 30 ml de la muestra y 10 neonatos menores a 24 h de nacidas. Los individuos fueron expuestos a las aguas por un periodo de 48 horas y las mismas condiciones ambientales utilizadas para mantener los lotes en el laboratorio. Como control positivo se utilizó una solución de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de dicromato de potasio; y como control negativo, agua dura reconstituida. El criterio de aceptabilidad fue la supervivencia en el control negativo  $>90\%$  y la inmovilidad del 100% frente al control positivo (CONAGUA, 2010). El recuento de individuos inmóviles se realizó a las 48 h del inicio de los ensayos, se seleccionó como medida de punto final la concentración efectiva 50 ( $\text{CE}_{50}$ ).

Se determinó la toxicidad crónica de las muestras mediante la inhibición del crecimiento de la microalga *Tetrademus wisconsinensis*, tras 72 h de exposición, según el método estándar publicado por la Agencia de Protección Ambiental de Canadá (Canadá, 1992). Se ensayaron a concentraciones de 100%, 50%, 25%, 12,5% y 6,25% en tubos de 20 ml, por triplicado, el recuento celular se realizó mediante la cámara de Neubauer. Los resultados se compararon con el control negativo y se determinó porcentaje de inhibición del crecimiento 50 (%I50).

El ensayo de fitotoxicidad se realizó con *Lactuca sativa*, siguiendo la metodología propuesta por Castillo (2004). Se trabajó con un control negativo (agua dura reconstituida) y concentraciones de 100%, 50%, 25% y 12,5% (v/v) de la muestra del arroyo. 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 sembraron 20 semillas por placa y cada preparado fue embebido con 4 ml del tratamiento. Se incubaron a oscuridad en una estufa LAB-LINE, modelo AMBI-HI-LO, a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por un periodo de 120 h, al final del cual se midieron las longitudes de cada raíz. Como criterio de fitotoxicidad se utilizó el porcentaje de inhibición de la prolongación de la raíz 50 (%IP50). El criterio de aceptación de los resultados fue la germinación en los controles negativos  $\geq 90\%$ .

La toxicidad aguda en peces, se realizó con alevines recién eclosionadas de *D. rerio*, con edad menor a 48 h y que aún presentaban reserva de vitelo. Se prepararon tres concentraciones de 100%, 50% y 25% para cada una de las muestras. Tanto las diluciones como el grupo control negativo se realizó con agua semidura reconstituida. La exposición se ensayó por triplicado, colocando 10 alevines en cada concentración, en vasos de 200 ml, a una

temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y fotoperiodo 16h luz/8h oscuridad, por de 96 h (Ramirez y Mendoza, 1998).

Los cálculos de las medidas de punto final  $\text{CE}_{50}$  para *D. magna* y *D. rerio*, así como el %I50 en *T. wisconsinensis* y el %IP50 para *L. sativa* se determinaron por el método Probit, utilizando el software SPSS 11.0.

## 2.5. Tests citogenéticos

Se realizó el test de micronúcleos en *D. rerio* para evaluar los efectos genotóxicos. Los ejemplares del pez fueron adquiridos comercialmente de un acuario y aclimatados en el laboratorio a una temperatura controlada  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y fotoperiodo 16h luz/8h oscuridad durante 5 semanas antes de los experimentos. Se establecieron grupos experimentales de 6 peces por pecera con 6L de muestra de líquido. Para el grupo control negativo, se utilizó agua corriente declorada con dureza total  $71,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  y pH 7,5. Los grupos de las muestras fueron expuestos al agua del arroyo por un periodo de 14 días (OECD, 2004). Para la obtención de la muestra de sangre, los peces fueron adormecidos en agua helada, se procedió a cortar con una tijera una de las branquias, posteriormente con una micropipeta con punta heparinizada se extrajo la muestra, y se realizó el extendido (Bolognesi et al., 2006). Las preparaciones se dejaron secar por 20 minutos, luego fueron fijados en etanol absoluto por 10 minutos y se secaron a temperatura ambiente. La tinción se realizó por el método de reacción nuclear para tinción específica de DNA según Feulgen (Feulgen y Rossnbeck, 1924) con modificaciones. Se prepararon tres láminas por pez, que fueron analizadas en un microscopio óptico Boeco BM – 180 con aumento de 1000x. Para determinar la presencia de micronúcleos, se realizaron recuentos de 1.000 células sanguíneas por lámina, totalizando 15.000 células por tratamiento. Los resultados obtenidos en los ensayos fueron comparados con el control negativo mediante un test estadístico no paramétrico Kruskal Wallis (Tabla 5).

La metodología de *Allium* test fue utilizada para evaluar los daños citogenéticos de las aguas según las indicaciones de Roldán et al. (2007) y Fernández et al. (2009). Los bulbos fueron mantenidos en condiciones estándares de  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , oscuridad total y burbujeo constante. Una vez obtenido un crecimiento óptimo de las raíces, se seleccionaron 4 bulbos para cada muestra de agua al 100%, utilizando como control negativo agua de red. A las 24 h y 48 h de exposición, se seleccionaron raíces con crecimiento de dos a tres centímetros (Fernández et al., 2000), posteriormente fueron cortadas y fijadas en solución Carnoy. Las raíces fijadas fueron hidrolizadas con ácidos clorhídrico 1 N por 5 minutos a  $60^{\circ}\text{C}$  y posteriormente coloreadas con orceina acetoclorhídrica (Fernández et al., 2009). Los preparados se observaron 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 por triplicado. Fueron calculados el índice mitótico (IM), índice de fases (IF) y el índice de aberraciones (IA) aplicando las Ecuaciones (1), (2) y (3).

$$IM = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células en mitosis}}{\text{Total de células}} \times 100 \quad (1)$$

$$IF = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células en cada fase la mitosis}}{\text{Total de células en mitosis}} \times 100 \quad (2)$$

$$IA = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células con aberración}}{\text{Total de células}} \times 100 \quad (3)$$

Para el procesamiento estadístico se utilizó el software SPSS 11.0, se realizó el análisis de varianza ANOVA, seguido de comparaciones múltiples de Scheffé para el IM y la prueba Dunnett para el IA. Se aceptó la prueba de significancia con un p-valor  $< 0.05$ .

## 2.6. Índice de Calidad de Agua (ICA) e Índices de Contaminación (ICO)

Para la determinación del índice ICA, se adoptaron los parámetros propuestos por Brown et al. (1970), con la fórmula de función ponderada multiplicativa obtenida mediante la Ecuación 4:

$$ICA = \prod_{i=1}^9 (Sub_i^{W_i}) \quad (4)$$

dónde:

$\Pi$ : representa la operación multiplicativa de las variables Q elevadas a la W;

$w_i$ : pesos relativos asignados a cada parámetro ( $Sub_i$ );

$Sub_i$ : subíndice del parámetro i (El Salvador, 2012);

ICA: los parámetros utilizados para la determinación del ICA fueron: coliformes fecales, pH, DBO<sub>5</sub>, nitratos, ortofostato, temperatura, turbidez, STD y OD (%).

La calificación fue establecida según la escala presentada en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Criterio de clasificación ICA (Brown et al., 1970).

Calidad de agua (ICA)	Escala
Excelente	91-100
Buena	71-90
Regular	51-70
Mala	26-50
Pésima	0-25

Los índices de contaminación (ICO) utilizados fueron calculados según la metodología propuesta por Ramírez et al. (1997). El primero de ellos, el índice de materia orgánica (ICOMO) se determina tomando el valor promedio de tres variables, la DBO<sub>5</sub>, los CF y el OD (%). El ICOMO, se obtiene a partir de la Ecuación 5:

$$ICOMO = 1/3(I_{DBO} + I_{CF} + I_{OD} \%) \quad (5)$$

El índice de contaminación por pH, se calculó aplicando la Ecuación 6:

$$ICO \text{ pH} = \frac{e^{-31,18} + 345 \text{ pH}}{1 + e^{-31,08} + 345 \text{ pH}} \quad (6)$$

La calificación para el ICOMO y el ICO pH fue establecida según la escala presentada en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Criterio de clasificación ICO (Ramírez et al., 1997).

Escala	ICO
0,0-0,2	Ninguno
0,2-0,4	Bajo
0,4-0,6	Medio
0,6-0,8	Alto
0,8-1,0	Muy alto

Índice de contaminación trófico (ICOTRO), se determinó correlacionando directamente la concentración de P-total con una categoría discreta propuesta por Ramírez et al. (1997). El valor del P-total se expresó en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Los resultados obtenidos tras aplicar los índices se presentan en la Tabla 6.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Parámetros fisicoquímicos

Los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados a las aguas del Arroyo Caañabe se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Parámetros fisicoquímicos de las aguas del Arroyo Caañabe en los tres sitios. Primer y segundo muestreo.

Determinaciones	Unidad	Método	S1		S2		S3		Ref. SEAM. <sup>a</sup>
			2°	1°	2°	1°	2°		
Temperatura aire	°C	-----		22,5			26		SR <sup>c</sup>
Temperatura agua	°C	SM <sup>b</sup> 2550 B	21	16,4	21	18,3	22		SR
pH	UpH	SM 4500-H B	7	7,11	6,87	7,07	6,51		6 a 9
Conductividad	$\mu\text{S}/\text{cm}$	SM 2510 B	98,3	42	93,9	41	98,8		SR
Turbiedad	UTN	SM 2130 B	90,6	35,1	99,9	42	97,4		$\leq 100$
Nitrato	$\text{mgN}\cdot\text{NO}_3/\text{L}$	Reduc. con Zn	0,11	<0,010	0,113	<0,010	0,09		10
NTK	$\text{mgN}/\text{L}$	SM 4500 B	0,918	1,636	0,949	1,238	0,524		0,6
P-total	$\text{mgP}/\text{L}$	SM 4500 -P E	0,266	0,265	0,223	0,124	0,17		0,05
Ortofosfato	$\text{mgP}/\text{L}$	SM 4500-P E	0,168	0,186	0,069	0,061	0,087		SR
Sulfato	$\text{mgSO}_4^{-2}/\text{L}$	Turbidimétrico	<0,30	0,39	0,73	<0,30	1,65		250
Dureza Total	$\text{mgCaCO}_3/\text{L}$	SM 2340 C	29,58	21	29,58	19	17,3		300
O.D	$\text{mgO}_2/\text{L}$	SM 4500-O G	6,1	5,7	5,7	7,3	6,1		$\geq 5$
D.B.O. <sub>5</sub>	$\text{mgO}_2/\text{L}$	SM 5210 B	3,0	16,2	2,4	15,2	2,4		$\leq 5$
D.Q.O.	$\text{mgO}_2/\text{L}$	SM 5220 B	48,78	54,46	52,85	45,55	48,78		SR
STD	$\text{mg}/\text{L}$	SM 2540 C	76,0	48	69,9	37	77		<500
Cadmio	$\text{mgCd}/\text{L}$	SM 3500-Cr B	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		0,001
Cromo Total	$\text{mgCr}/\text{L}$	SM 3500-Cr D	<0,001	0,024	<0,001	0,016	<0,001		0,05
Plomo	$\text{mgPb}/\text{L}$	SM 3500-Pb B	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		0,01

<sup>a</sup> Referencia: Resolución N° 222/02 Secretaría del Ambiente para aguas de Clase II.

<sup>b</sup> SM= Métodos Estándar (APHA et al., 2008). <sup>c</sup> SR= Sin referencia.

Al comparar los resultados obtenidos en los análisis con los valores máximos permisibles para cada parámetro según de la legislación vigente, se percibe que las aguas del arroyo no pueden encuadrarse exclusivamente dentro de la clase II, que es la categoría que deben cumplir todas las aguas superficiales del territorio paraguayo (Paraguay, 2006). Los parámetros que se encontraron en condiciones óptimas para esta categoría en los tres sitios son el pH, la turbidez, nitratos, los sulfatos, dureza, OD, STD y los metales (Cadmio, cromo y plomo). Entretanto los parámetros cuyos valores sobrepasaron los límites admisibles y tienen características propias de aguas de clase III por cada sitio son: en S1 (NTK, y P-total), para los puntos S2 y S3 (NTK, P-total y la DBO<sub>5</sub>). Según el padrón nacional de calidad de aguas, promulgada en la resolución 222/02 de la SEAM (Paraguay, 2002), se recomienda que las

aguas de clase III sean destinadas al abastecimiento doméstico después de un tratamiento especial, para irrigación de especies arbóreas, jardines y plantas forrajearas, así como para la recreación de contacto secundario.

Según Toniolo et al. (1996), los cuerpos de agua a una temperatura de 20°C deben proporcionar niveles de OD cercanos a 9,2 mg. L<sup>-1</sup>, así los valores más altos son indicadores de presencia de algas, y los más bajos de la presencia de materia orgánica; esta hipótesis es apoyada en el presente trabajo considerando que en dos ocasiones (primera colecta en S2 y S3) los niveles de DBO<sub>5</sub>, se encontraron a niveles relativamente elevados para aguas de este tipo (16,2 y 15,2 mg. L<sup>-1</sup> respectivamente), y presentaron concentración de OD menores a 7,3 mg. L<sup>-1</sup>.

La concentración de P-total y NTK, se presentaron en niveles superiores a los límites máximos. Para el P-total los valores fueron 1,5 a 2,7 veces superiores, mientras que para el NTK entre 2,5 y 5,3 veces superior a la norma. Estos parámetros generalmente son indicadores de contaminación causados por establecimientos agropecuarios e industriales. En este contexto, considerando que el Arroyo Caañabe es el principal afluente del Lago Ypoa, se hace imperativo el control y fiscalización ya que este cause está aportando continuamente compuestos que contribuyen a la eutrofización y deterioro progresivo de las aguas del ecosistema léntico receptor (Lago). En un estudio similar realizado a los principales arroyos altamente poluidos, que son afluentes del Lago Ypacarai, López Árias et al. (2013), encontraron elevados niveles de P-total, y los asociaron con el deterioro del Lago.

### 3.2. Examen microbiológico de las aguas

Los ensayos microbiológicos (Tabla 4) demostraron la presencia en valores normales de aerobios mesófilos (RAM) en los tres puntos del cauce, aunque en mayor cantidad durante el segundo muestreo. Estas bacterias crecen bien a temperatura corporal o próxima a ella, e indican condiciones favorables para la multiplicación de microorganismos patógenos de origen humano o animal. El grupo de las bacterias RAM sirve posteriormente para determinar la existencia del tipo y número de otros microorganismos (Ashbolt et al., 2001).

**Tabla 4.** Parámetros microbiológicos de las aguas de los tres sitios. Primer y segundo muestreo.

Determinaciones	Unidad	Resultados						Ref. SEAM. Clase II <sup>a</sup>
		S1		S2		S3		
		1°	2°	1°	2°	1°	2°	
RAM	UFC/ml	--	39.000	7.200	46.500	3.000	23.000	SR
Enterobacteriaceae	UFC/ml	--	6.600	4.300	5.300	1.600	6.000	SR
CT	UFC/100ml	--	5.000	400	5.400	700	4.000	SR
CF	UFC/100ml	--	310	20	410	26	230	<1.000
<i>E. coli</i>	UFC/100ml	--	5	ND	6	1	7	SR
ML	UFC/ml	--	120	100	220	55	85	SR
<i>P. aeruginosa</i>	P/A	--	P	P	P	P	P	SR

<sup>a</sup> Referencia: Resolución N° 222/02 de la Secretaría del Ambiente (Paraguay, 2002) para aguas de Clase II. SR.: sin referencia.

Las mayores concentraciones de enterobacterias se presentaron en S1 y S3, en la segunda campaña de colecta; estas bacterias son bacilos gramnegativos cuyo hábitat natural es el intestino del hombre y otros animales. La familia comprende varios géneros (*E. coli*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., *Proteus* sp. y otros más). *E. coli*, se encontró en los puntos S1 y S2 en cantidades que indicarían bajo riesgo, el mayor número se presentó en S3. Se considera que *E. coli* es el índice de contaminación más adecuado por ser parte de la microflora normal del intestino y en ocasiones puede ser patógeno, en tanto que otras enterobacterias, como las salmonellas y las shigelas, por lo regular son patógenos peligrosos para el ser humano. (Jawetz et al., 2010). La relación *E. coli*/coliformes termotolerantes fue baja, así como valor máximo se llegó a 0,03 en S-3 durante el segundo muestreo, esto indica que la contaminación fecal es relativamente baja en el ecosistema estudiado.

La concentración de coliformes fecales en los tres puntos (S1, S2, S3), estuvo por debajo al límite máximo establecido en la Resolución N° 222/02 SEAM, para aguas de Clase II, que sugiere un máximo hasta 1000 UFC/100ml (Tabla 4). Este grupo de bacterias es normalmente encontrado en las heces de animales homeotermos y no se consideran perjudiciales para el ser humano, no obstante altas concentraciones de CF suelen coincidir con otras bacterias peligrosas (Ashbolt et al., 2001). Por su parte los CT se encontraron en cantidades importantes, observándose mayores valores en el segundo muestreo en los tres sitios del arroyo (Tabla 4). El grupo de los coliformes totales incluye microorganismos que pueden sobrevivir y proliferar en el agua. Por consiguiente, no son útiles como índice de agentes patógenos fecales, pero pueden utilizarse como indicador de la eficacia de tratamientos y para evaluar la limpieza e integridad de sistemas de distribución y la posible presencia de biopelículas. (Ashbolt et al., 2001).

Las tres zonas estudiadas en el Arroyo Caañabe, arrojaron valores de presencia para *P. aeruginosa* (Tabla 4). Esta bacteria es de amplia distribución en el suelo, el agua, plantas y los animales. A menudo está presente en pequeñas cantidades en la microflora intestinal normal y en la piel del ser humano, es invasiva y toxígena produciendo infecciones en pacientes inmunodepresivos y es el principal microorganismo patógeno del grupo de las pseudomonas. (Jawetz et al., 2010). La importancia de este patógeno oportunista se vio acentuada cuando se comprobó su capacidad de inhibir el crecimiento de los coliformes (D'Aguila et al., 1996). La presencia de esta bacteria indica que el agua del arroyo posee inadecuada calidad microbiológica.

### 3.3. Ensayos ecotoxicológicos

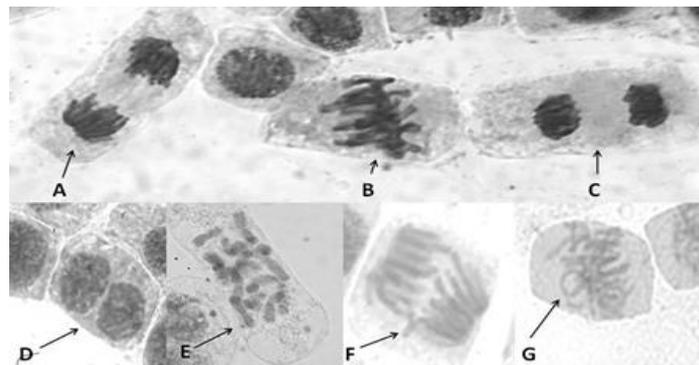
La toxicidad aguda investigada utilizando especies acuáticas de tres niveles tróficos, *T. wisconsinensis* (productor primario), *D. magna* (consumidor primario) y *D. rerio* (consumidor secundario), produjeron escasos efectos adversos detectables con el parámetro de punto final seleccionado (CE<sub>50</sub>). El test agudo con alevines con *D. rerio*, arrojó en una ocasión indicios de toxicidad en la muestra colectada en S1 (Segundo muestreo), donde se determinó una CE<sub>50</sub> de 86,5%, con intervalos de confianza al 95% (54,0-107,7), este resultado de igual manera indica que el agua presenta baja toxicidad. No se detectaron efectos fitotóxicos en el test con *L. sativa*, durante el estudio.

La ausencia de efectos tóxicos agudos importantes se puede asociar con la bajas concentraciones de sustancias inhibitorias, como los metales que fueron objetos de estudio en este trabajo (Tabla 3). Otros parámetros como el OD, DBO<sub>5</sub>, DQO y la dureza se presentaron en valores que de por sí, no resultan ser letales para los biosensores. A excepción del ensayo agudo en *D. rerio* en el sitio S1, en los demás casos los organismos expuestos a las muestras del Arroyo Caañabe mostraron mejores rendimientos en lo referente al crecimiento (*L. sativa* y *D. magna*). Este comportamiento es atribuible a la presencia material particulado en

suspensión (STD) y a las condiciones eutróficas del medio favorecidas por las concentraciones elevadas de nitrógeno y fósforo (Sánchez, 2008).

### 3.4. *Allium* test

El índice mitótico (IM) en el grupo control fue de  $5,08 \pm 1,8\%$  y  $7,38 \pm 0,97\%$  para el primer y segundo muestreo respectivamente. No se observaron resultados con variaciones significativas del IM respecto al control (efectos citotóxicos), ni en el índice de aberraciones (efectos genotóxicos) para las muestras obtenidas de los sitios S1 y S2; sin embargo, para el punto de muestreo S3 las células binucleadas presentaron frecuencias de 0,27 BN/2000 células y 0,13 BN/2000 células para el primer y segundo muestreo, con p-valor  $< 0,05$  ( $p = 0,016$  y  $0,044$  respectivamente), indicando efectos citotóxicos del agua en células meristemáticas de *A. cepa* (Figura 2.D). Además, fueron registradas otras alteraciones citogenéticas (micronucleos, C-metafase, puentes, cromosomas adelantados, cromosomas rezagados, fragmentos, anillos, brotes, cromosomas pegajosos, y bi-metafase) que no resultaron ser significativas, al igual que posibles disminuciones del IM, observándose siempre que el ciclo celular transcurría normalmente, a pesar de acumular células aberrantes (Figura 2). 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 que se encuentran dentro de valores normales reportados por Fiskesjö (1985).



**Figura 2:** Células en mitosis de *Allium cepa* expuestas a las aguas del Arroyo Caañabe. Fases normales: A) Anafase. B) Metafase. C) Telofase. Células con aberraciones: D) Célula binucleada E) C-Metafase F) Anafase con puente. G) Metafase con anillo.

Es difícil asociar la causa de la toxicidad con una sustancia o elemento cuando grupos de organismos son expuestos a muestras de aguas de ríos o arroyos. Sin embargo, la metodología del *Allium* test ha sido validada en otros estudios similares. Alteraciones en ciclo celular, fueron reportados en efluentes de las curtiembres de la cuenca del Lago Ypacaraí, estos efectos adversos son causados por desequilibrios en la síntesis de proteínas que condicionan el ciclo celular (Franco de Diana et al., 2000). En un estudio ecotoxicológico, López Árias et al. (2013), encontraron elevadas frecuencia de micronúcleos y variaciones en el índice mitótico en *Allium cepa* en aguas de dos arroyos poluidos, el Pirayú y el Yukyry, afluentes del Lago Ypacaraí.

### 3.5. Test de micronúcleos en *Danio rerio*

En la Tabla 5 se presentan las frecuencias de micronúcleos (MN) en los diferentes puntos de muestreo y las obtenidas en el control negativo. Los resultados arrojaron diferencias significativa al aplicar el test de Kruskal -Wallis con  $X^2=10,72$  para el primer muestreo,

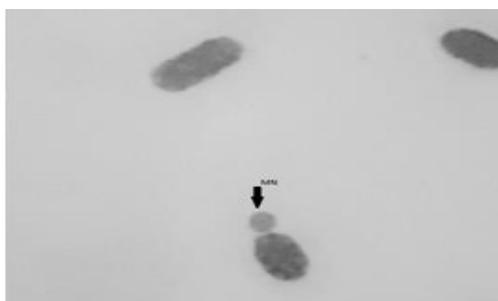
y  $X^2=9,53$  para el segundo muestreo, para una  $p < 0,05$  en ambos casos. Las frecuencias más elevadas se presentaron en S3, durante la primera campaña y en S1 durante la segunda.

**Tabla 5.** Frecuencia de MN en *D. rerio*, por sitio y tiempo de muestreo.

	1° Muestreo		2° Muestreo	
	$\mu$ (%MN)	SD	$\mu$ (%MN)	SD
Control negativo	0,020	0,046	0,007	0,026
S1	-----	-----	0,047	0,052
S2	0,013	0,035	0,007	0,026
S3	0,106	0,138	0,006	0,024

**Referencia:**  $\mu$  y SD representan el promedio y desviación estándar de la %MN/1000 células.

Los valores de %MN encontrados en los controles durante el primer y segundo muestreo (0,046 y 0,007 MNs/1000 células respectivamente) correspondería a una inducción espontánea natural, cuyo rango coincide con datos para frecuencias de MNs basales para *D. rerio*, reportados por otros investigadores (Prieto García et al., 2007). Los micronúcleos (Figura 3) 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 y Carballo, 2006). López Árias (2012), testearon los efectos genotóxicos aguas del Arroyo Pirayú, mediante el test de MN en *Danio rerio*; los autores reportaron efectos crónicos sobre el pez.



**Figura 3.** Micronúcleo en eritrocito de *D. rerio* obtenidas en S3 (A=1000 x).

### 3.6. Índice de Calidad de Agua (ICA) e Índices de Contaminación (ICO)

Los resultados del ICA se mantuvieron constantes en los tres sitios de estudio del Arroyo Caañabe, y caen en la categoría “regular” según la metodología utilizada (Tabla 6). Las aguas de la clase “regular” se caracterizan porque generalmente tienen menos diversidad de organismos acuáticos, y con frecuencia presentan condiciones propicias para la aparición de crecimiento de algas (El Salvador, 2012). El Departamento de Medio Ambiente de Malasia, utiliza el ICA para clasificar las aguas según el grado de contaminación; aguas muy poluidas (ICA: 0-59), ligeramente contaminadas (ICA: 60-80) y limpia (ICA:81-100). La misma entidad categoriza las aguas superficiales en cinco clases según el uso sobre la base del ICA, quedando en: clase I ( $> 92,7$ ), clase II (76,5-92,7), clase III (51,9-76,5), clase IV (31-51,9) y clase V ( $< 31$ ). Bajo este criterio las aguas de los sitios S2 (ambos muestreos), y la S3 (primer muestreo) son consideradas como “muy poluidas”, y las de S1 y la S3 (segundo muestreo) quedan como “ligeramente contaminadas”. Según los estándares de esta misma agencia las aguas del arroyo Caañabe, quedan como de “clase III”, y bajo este criterio se recomienda que

sean utilizados para el suministro de aguas, previo tratamiento intenso, para la pesca y también puede servir como agua para el ganado (Islam et al, 2010).

El ICOMO indica que las muestras analizadas presentan contaminación orgánica “media” en S2, y “baja” en S3 en el primer muestreo; sin embargo en el segundo muestreo se revirtió esta condición, pasando a la calificación de “ninguna” contaminación para este índice (Tabla 6). Este comportamiento fluctuante estaría relacionado con las mayores concentraciones de DBO<sub>5</sub> obtenidos para los sitios S2 y S3 en el primer muestreo (Tabla 3), siendo este el parámetro con mayor peso relativo para el ICO.

**Tabla 6.** Índices de contaminación (ICO) por sitio y muestreo.

Índices	S1		S2		S3	
	1°	2°	1°	2°	1°	2°
ICA	--	62,36 (Regular)	53,03 (Regular)	58,78 (Regular)	52,52 (Regular)	60,73 (Regular)
ICOMO	--	0,194 (ninguno)	0,438 (medio)	0,188 (ninguno)	0,333 (bajo)	0,167 (ninguno)
ICOpH	--	0,001 (ninguno)	0,001 (ninguno)	0,002 (ninguno)	0,001 (ninguno)	0,005 (ninguno)
ICOTRO	--	0,266 (eutrófico)	0,265 (eutrófico)	0,223 (eutrófico)	0,124 (eutrófico)	0,17 (eutrófico)

El segundo índice de contaminación (ICO pH), por su parte indica que las aguas están en buenas condiciones si se considera como indicador el pH de la misma (Tabla 6), valor que en todos los casos permaneció próximo a la neutralidad en los tres sitios muestreados.

En el presente estudio se reportan valores elevados de P-total, lo que otorga al Arroyo Caañabe, las características de un ecosistema ligeramente “eutrofizado” (0,021 mg. L<sup>-1</sup> para las aguas eutróficas). El índice ICOTRO depende de la concentración de fósforo, suele ser el nutriente limitante en los ecosistemas, y define de por sí el tipo de organismo fotosintético que va a prevalecer así como la tendencia a la eutrofización de los sistemas acuáticos. Ramírez et al. (1997), mencionan que la concentración de este nutriente también es importante en sistemas lóticos.

La eutrofización artificial envuelve actividades humanas. Este proceso resulta de la descarga de polutantes de varios orígenes. Los fertilizantes utilizados en la agricultura, pueden llegar hasta las aguas, mediados por la escorrentía superficial tras una lluvia, sumado a los procedentes de detergentes presentes en aguas residuales domésticas y otras sustancias químicas de las industrias, se produce el incremento en los valores de nitrógeno y fósforo, ocasionando la eutrofización, lo que finalmente promueve el crecimiento de varios organismos propios de estas condiciones (Rodrigues et al., 2015).

#### 4. CONCLUSIONES

Los parámetros fisicoquímicos indican que las aguas del arroyo Caañabe, presentan características de aguas de clase II, y en algunos casos de clase III, según estándares de la SEAM. El índice ICA determina que la calidad es “regular”, mientras que el índice ICOTRO, le otorga la calificación de “eutrofizada”.

Los coliformes no representan un riesgo considerable por tratarse de aguas de clase II, no obstante, la presencia de *P. aeruginosa* en todas las muestras, indican que estas aguas poseen inadecuada calidad microbiológica.

Ensayos ecotoxicológicos con *D. magna*, *L. sativa*, *T. wisconsinensis* demuestran que la aguas testeadas presentan escasos efectos agudos. Sin embargo, el análisis de los resultados del *Allium* test y el test de micronúcleos *D. rerio* detectó la existencia de potenciales efectos citotóxicos y genotóxicos. Bajo este criterio, el Arroyo Caañabe no cumple los estándares de calidad de aguas superficiales para las características toxicológicas.

De los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir que el Arroyo Caañabe no presenta índices alarmantes de contaminación, no obstante se puede inferir que sus aguas se encuentra en una fase de progresivo deterioro, fenómeno que está asociado con la actividad humana. Considerado que la calidad del agua requiere de una vigilancia eficaz, se recomienda realizar un monitoreo permanente del cauce hídrico utilizando criterios fisicoquímicos, microbiológicos y ecotoxicológicos a fin identificar los focos de contaminación y evaluar su evolución en el tiempo.

## 5. AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Investigaciones del Rectorado, y la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción, por el apoyo económico otorgado para la realización del estudio.

## 6. REFERENCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION – AWWA; WATER ENVIRONMENT FEDERATION - WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20th. Washington, DC, 2008.
- ASHBOLT, N. J.; GRABOW, W.; SNOZZI, M. Indicators of microbial water quality. In: FEWTRELL, L.; BARTRAM, J. (Eds.). **Water quality: Guidelines, standards and health – Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease**. Londres: IWA, 2001. p. 289–315.
- BHADRA, A. K.; SAHU, B.; ROUT, S. P. Evaluation of the water quality index in River Brahmani, Odisha in the Light of National Sanitation Foundation ( NSF ) Standards. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v. 7, n. 6, p 586–592, 2014.
- BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, D.; SCIUTTO, A. Assesment of Micronuclei induction in pheripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 93–98, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.015>
- BROWN, R.; MCCLELLAND, N.; DEININGER, R.; TOZER, R. A. Water Quality Index-Do we Dare? **Water and Sewage Works**, v. 11, p. 339–343, 1970.
- CANADÁ. Environment Canada. Science And Technology Branch. **Biological test method: growth inhibition test using a freshwater alga**. EPS1/RM/25. Gatineau, 1992.
- CASTILLO, G. (Ed.). **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. México: IMTA, 2004. 188 p.

- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA – CONAGUA (México). **Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010**: análisis de agua - evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia Magna Straus* (Crustacea - Cladocera ) - método de prueba (Cancela a la NMX-AA-087-SCFI -1995). México: Secretaría de Economía, 2010.
- D'AGUILA, P. S.; MIRANDA, C. A. S.; CRUZ, O. C. da. *Pseudomonas aeruginosa* como indicador em análises bacteriológicas de águas de abastecimento público. In: SIMPÓSIO ÍTALO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 3., 1996, Gramado. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 1996.
- EL SALVADOR. Servicio Nacional de Estudios Territoriales - SNET. **Índice de calidad de agua** - ICA. 2012. Disponible en: <http://www.snet.gob.sv/Hidrologia/Documentos/calculoICA.pdf>. Acceso el: 5 mar. 2015.
- ESCOBAR, L. **Propuesta plan de desarrollo sustentable y lineamientos para el ordenamiento territorial del municipio de Carapegua**. 2012. Disponible en: <http://pasealdesarrollo.org/wp-content/uploads/2012/11/propuesta-plan-carapegua-final.pdf>. Acceso el: 25 oct. 2014.
- FERNÁNDEZ, V.; DESVARS, N.; FRANCO DE DIANA, D.; BENÍTEZ, B.; JOACHINI, J.; JOACHINI, L. Acción de plantas medicinales paraguayas sobre el ciclo replicativo celular. **Revista de Ciencia y Tecnología**, n. 17, 2000
- FERNÁNDEZ, V.; SALES, L.; GOMEZ, A.; CABAÑAS, F.; ALFONSO, J. Evaluación citotóxica de *Psidium guajava* L. utilizando como bioensayo el *Allium* test. **Steviana**, v. 1, p. 51- 58. 2009.
- FEULGEN, R.; ROSSNBECK, H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure von Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende selektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie**, n. 135, p.203–248, 1924.
- FISKESJÖ, G. The Allium Test as standard in environmental monitoring. **Hereditas**, n. 102, p. 99-112. 1985. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>
- FRANCO DE DIANA, D.; FERNANDEZ, V.; TORRES, E. 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**, v. 2, p. 37–48, 2000.
- ISLAM, S.; RASUL, T.; ALAM, J. BIN; HAQUE, M. A. Evaluation of water quality of the Titas River using NSF Water Quality Index. **Journal of Scientific Research**,v. 3, n.1, 2010. <http://dx.doi.org/10.3329/jsr.v3i1.6170>
- JAWETZ, E.; MELNICK, J.; ADELBERG, E. **Microbiología médica**. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana, 2010. 820p.
- KLAASSEN, C.; WATKINS, J. **Fundamentos de toxicología**. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana, 2005. 560 p.
- LÓPEZ ÁRIAS, T. R.; FRANCO DE DIANA, D.; FERNÁNDEZ , V.; BENÍTEZ, C.; SÁNCHEZ, P. et al. 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*. **Investigaciones y Estudios - UNA**. 2013. Disponible en: <http://sdi.cnc.una.py/catbib/documentos/647.pdf>. Acceso el: 25 oct. 2014.

- MARCELLO, V.; YAMIL, F.; ORTIZ, P.; DA ROSA, S.; KAWAI, H. **Ordenamiento de descargas contaminantes industriales**. Propuesta para implementación de un centro de productores de pequeñas y medias curtiembres, en el parque industrial de Carapegua para alcanzar el pleno cumplimiento a las normas ambientales en vigor en el Paraguay. Municipalidad de Carapegua: [s.n.], 2010. 22 p.
- MUDRY, M.; CARBALLO, M. **Genética toxicológica**. Buenos Ayres: De los Cuatro Vientos, 2006
- NOORBAKSHI, J.; SEYEDMAHALLEH, E. S.; DARVISHI, G.; KOOTENAEI, F. G.; MEHRDADI, N. An evaluation of water quality from Siahrod River, Haraz River and Babolrood River by NSFQI index. **Current World Environment Journal**, v. 9, n.1, p. 59–64, 2014.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **Daphnia sp. Acute Immobilisation**. Test n° 202. México, 2004.
- PARAGUAY. Consejo Nacional del Ambiente - CONAM. **Política ambiental nacional**. Asunción: Secretaría del Ambiente, 2005.
- PARAGUAY. Dirección General de Estadísticas Encuestas y Censos - DGEEC. **Atlas censal del Paraguay**: resultados finales del censo nacional: Paraguarí. 2002. Disponible en: <http://www.dgeec.gov.py/Publicaciones/Biblioteca/Atlas%20Censal%20del%20Paraguay/12%20Atlas%20Paraguari%20censo.pdf>. Acceso el: 20 oct. 2015.
- PARAGUAY. Secretaria Del Ambiente. **Resolución N° 222/02**. Por la cual se establece el padrón de calidad de las aguas en el territorio Nacional. 22 abril 2002. Disponible en: [http://www.seam.gov.py/images/stories/seam/resoluciones/resolucion\\_222\\_02.pdf](http://www.seam.gov.py/images/stories/seam/resoluciones/resolucion_222_02.pdf). Acceso el: 18 Set. 2014.
- PARAGUAY. Secretaria Del Ambiente. **Resolución N° 255/06**. Por la cual se establece la clasificación de las aguas superficiales de la República del Paraguay. 17 Feb. 2006. Disponible en: [http://www.seam.gov.py/images/stories/seam/resoluciones/resolucion\\_255\\_06.pdf](http://www.seam.gov.py/images/stories/seam/resoluciones/resolucion_255_06.pdf). Acceso el: 20 Nov. 2014.
- PRIETO GARCIA, F.; BÁEZ RAMÍREZ, O. A.; SCOUT, W.; GAYTÁN OYARZÚN, J. C.; ZÚÑIGA ESTRADA, A. Toxicidad y teratogénesis por arsénico en aguas en el pez cebra (*Danio rerio*). **Revista de Toxicología**, v. 24, n. 1, p. 18-22, 2007
- RAMÍREZ, A.; RESTREPO, R.; VIÑA, G. Cuatro índices de contaminación para caracterización de aguas continentales: formulaciones y aplicación. **Ciencia, Tecnología y Futura**, v. 1, n. 3, p. 135-153, 1997.
- RAMÍREZ, P.; MENDOZA, A. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: la experiencia en México. México: SEMARNAT, 1998.
- RODRIGUES, L.; TORRES, N.; TORNISIELO, V.; FERREIRA, L.; MARANHO, L. Determination of toxicity assays, trophic state index, and physicochemical parameters on Piracicaba River and Itapeva Stream. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, n. 2, 2015. <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1387>
- ROLDÁN, R.; NORIEGA, M.; WAGNER, M.; GURNI, A.; BASSOLS, G. Estudio de genotoxicidad de *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. -Simaroubaceae-. **Acta toxicológica Argentina**, v. 15, n.2, p. 39–42, 2007.

- 
- SANCHEZ, A. **Evaluación de riesgos ambientales del uso de plaguicidas empleados en el cultivo del arroz en el Parque Natural de la Albufera de Valencia.** 2008. Disertación (Memoria de tesis Doctoral) - Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 2008
- TONIOLLO, V.; LOYOLA, R. G. N.; POZZOBON, M. **Curso de limnología básica.** Joinville: UNIVILLE, 1996.