

UNIVERSIDAD NACIONAL COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR
ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTALES

Comparación de la sensibilidad de dos especies de hidras (*Hydra attenuata* e *Hydra viridis*) a dos plaguicidas aplicados en los cultivos de piña para la selección del organismo más sensible en la batería de pruebas de ECOTOX, Costa Rica, 2020-2022

Trabajo final de graduación para optar por el grado académico de Licenciatura en Ingeniería en
Gestión Ambiental

Modalidad: Artículo científico

Por:
Caroline Jones Peñaranda

Heredia, Costa Rica

2022

Trabajo de graduación aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Ambientales de la Universidad Nacional Costa Rica, para optar al grado de Licenciatura en **Ingeniería en Gestión Ambiental.**

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

.....

M.Sc. Lilliam Quirós Arias

Decana de la Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar

.....

M.Sc. Clemens Ruepert Ruepert

Dirección de EDECA

.....

M.Sc. Ma. del Rocío Ugalde Salazar

Tutora

.....

M.Sc. Freylan Mena Torres

Lector

.....

M.Sc. Seiling Vargas Villalobos

Lectora



.....

Caroline Jones Peñaranda

Postulante del trabajo

Sensibilidad de *Hydra attenuata* e *Hydra viridis* a dos plaguicidas (diuron y etoprofos) aplicados en los cultivos de piña, Costa Rica

Caroline Jones¹, Rocío Ugalde², Katherine Jiménez³, Freylan Mena⁴, Seiling Vargas⁵

¹Licenciatura en Ingeniería en Gestión Ambiental. Universidad Nacional, Campus Omar Dengo, Heredia, Costa Rica. caroline.jones.penaranda@est.una.ac.cr

²Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET), Universidad Nacional, Heredia 86-3000, Costa Rica.

³Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET), Universidad Nacional, Heredia 86-3000, Costa Rica.

⁴Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET), Universidad Nacional, Heredia 86-3000, Costa Rica.

⁵Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET), Universidad Nacional, Heredia 86-3000, Costa Rica.

Resumen: En diversos estudios de la calidad de aguas superficiales cercanas a plantaciones de piña de la Región Huetar Atlántica de Costa Rica, se han encontrado residuos de numerosos plaguicidas usados en estos cultivos. Para muchas de estas sustancias se desconoce el efecto sobre los organismos acuáticos, pues entre más sensibles sean estos, mayor será el impacto para la comunidad que los habita. Las hidras han sido usadas en bioensayos de toxicidad debido a su sensibilidad a contaminantes, sirviendo como herramienta para determinar efectos de los plaguicidas sobre ecosistemas acuáticos. En este estudio se comparó la respuesta de la *Hydra attenuata* e *Hydra viridis* a dos de los plaguicidas más comúnmente usados en el cultivo de piña y detectados en muestras de agua: el herbicida diuron y el insecticida etoprofos. Para esto se realizaron bioensayos de toxicidad con cada una de estas sustancias y posteriormente, con una mezcla de estas, con el fin de determinar cuál de las dos especies resultaba más sensible a estas sustancias, para luego usarla como parte de la batería de organismos de prueba del Laboratorio de Estudios Ecotoxicológicos (ECOTOX). La *H. attenuata* fue la especie más sensible a ambos plaguicidas, con LC₅₀s de 16,84 mg/L y 103,01 mg/L; y EC₅₀s de 4,24 mg/L y 23,74 mg/L para diuron y etoprofos, respectivamente. Mientras tanto la *H. viridis* tuvo LC₅₀s de 36,94 mg/L y 103,01 mg/L, con EC₅₀s de 13,64 mg/L y 53,12 mg/L, también para diuron y etoprofos, respectivamente. La exposición a la mezcla de plaguicidas solo causó mortalidad a la *H. viridis* y tuvo efecto sinérgico en ambas especies. Estos resultados sugieren que la *H. attenuata* es la especie más apropiada para la evaluación de efectos de plaguicidas, pero se deben realizar más estudios sobre las interacciones de los contaminantes en mezclas, porque estas pueden modificar su toxicidad para diferentes especies.

Palabras clave: hidra, diuron, etoprofos, toxicidad, piña.

1. INTRODUCCIÓN

En la década de los ochenta, Costa Rica inició la exportación de piña. Debido a la gran demanda de este producto, la producción avanzó rápidamente (Obando, 2017). Según un estudio realizado por el

Laboratorio PRIAS del Centro Nacional de Alta Tecnología en el año 2018, un total de 65 670 hectáreas de tierras costarricenses están destinadas al cultivo de piña, lo cual equivale a una cobertura del 1,29 % del territorio nacional (Vargas et al., 2020).

Diferentes estudios realizados en sitios asociados con la producción de piña en Costa Rica, han evidenciado la contaminación de cuerpos de agua superficial con residuos de plaguicidas utilizados en dicha actividad (Echeverría-Sáenz et al., 2012; Fournier et al., 2019). En algunos casos, las concentraciones de algunas sustancias superan límites relacionados con la protección de fauna acuática y se ha estimado que representan un riesgo para esos ecosistemas.

En el presente se observa un escenario, cuya búsqueda de la eliminación de plagas en los cultivos ha provocado el uso de sustancias como fungicidas, herbicidas, insecticidas, nematocidas y otros agroquímicos, lo cual ha desencadenado el desplazamiento de esas sustancias hacia los cuerpos de agua. Los tóxicos con los que son constituidos los plaguicidas inducen a un desbalance a nivel biológico y químico de los ecosistemas (Castro et al., 2015). Por consiguiente, muchas especies que no perjudican el cultivo de la piña sufren los efectos de los plaguicidas aplicados, muchos de estos altamente persistentes, que se mantienen en los ecosistemas por varias décadas (Tribunal Latinoamericano del Agua, 2013).

Según Ramírez (2017) las principales sustancias responsables de causar ecotoxicidad de invertebrados acuáticos, aplicadas en mayor cantidad anualmente en cultivos de piña en el Caribe y zona norte de Costa Rica, regiones donde se realiza la mayor actividad piñera del país, son ametrina, bromacil, diuron, glifosato, benfuracarb, carbaril, diazinon y etoprofos (ver Anexo A). Según Argüello et al. (2015) el diuron es utilizado como control pre y postemergente temprano selectivo de malezas de zonas de cultivo. De acuerdo con Caseley (s.f.) esta sustancia se adhiere a los coloides presentes en el suelo, donde soporta la lixiviación, por lo tanto, es usada en cultivos con raíces extensas y profundas, tal como las de la piña. Mientras que Gómez (2017) indica que el etoprofos es un insecticida organofosforado altamente tóxico que tiene la característica de permanecer detenido en la superficie, de modo que ejerce acción por contacto en la región de la raíz de la planta controlando los organismos. Además, esta sustancia ingresa a los tejidos radiculares para controlar los insectos que ya se encuentran establecidos en ella.

Montiel (2015) menciona que tanto diuron como etoprofos son aplicados a las plantaciones de piña por medio de Spray Boom. Según Ríos et al. (2019) este método consiste en un tractor en movimiento que lleva un sistema de inyección, constituido por un tanque donde se almacena el plaguicida y una bomba hidráulica que dirige la sustancia a microaspersores que permiten que cada una de las plantas sea rociada con un volumen específico. De manera que, Castro et al. (2015) indican que en el contexto ambiental la búsqueda de la eliminación de plagas en los cultivos de piña ha provocado la utilización de sustancias que se desplazan hacia los cuerpos de agua, de forma directa debido a las precipitaciones mediante escorrentía; y también por lixiviación. Por lo tanto, se evidencia la importancia de la evaluación toxicológica con bioindicadores para estimar el riesgo que representan estos contaminantes y poder actuar frente a la problemática ambiental.

Según Escobar-Chávez et al. (2019) los efectos que los plaguicidas ocasionan en las aguas superficiales y en los organismos que viven en esos ecosistemas pueden variar si las sustancias se presentan de manera individual o en una mezcla. Por lo tanto, dado que en las muestras de agua analizadas cercanas a plantaciones regularmente aparecen mezclas de plaguicidas, con herbicidas e insecticidas dentro de los más comunes, es de gran relevancia realizar análisis que incluyan la mezcla entre estos dos tipos de sustancias, ya que esto permitiría evaluar si hay interacciones de tipo antagónicas, aditivas o sinérgicas entre ellas.

Las hidras son organismos bioindicadores de niveles de toxicidad de agua. Los bioensayos determinan efectos letales y subletales de los organismos ante la presencia de contaminantes. Estos son apreciables en las hidras por medio de cambios en el estado de sus tentáculos y/o mortalidad de los organismos (Barrera et al., 2019). Entre las ventajas de las hidras se puede mencionar su alta tasa de crecimiento poblacional, lo cual posibilita la obtención de abundantes organismos en corto tiempo. Generalmente se reproducen asexualmente por gemación, proceso que se lleva a cabo debido al crecimiento continuo de células epiteliales e intersticiales en su columna. Lo anterior genera organismos muy semejantes genéticamente que conduce a resultados experimentales con coeficientes de variación muy reducidos. También, se reproducen sexualmente en condiciones de estrés ambiental, tal como cambios drásticos en la temperatura del agua. Otra ventaja corresponde a la facilidad tanto de ser cultivadas en laboratorios como de percibir cambios en su morfología provocados por la acción de tóxicos (Quinn et al., 2012).

La *Hydra attenuata* es un organismo de uso estándar a nivel internacional en estudios ecotoxicológicos para medir el efecto letal y subletal en la evaluación de calidad del agua; mientras que la *Hydra viridis* es una especie presente naturalmente en ecosistemas de Costa Rica y que según Hamada et al. (2020) también es utilizada en ensayos de toxicidad y posee una relación mutualista con microalgas.

En las bases de datos internacionales sobre sustancias plaguicidas, existen vacíos de información referente a los efectos ecotoxicológicos que muchas de estas sustancias tienen sobre las hidras. Considerando el escenario de contaminación que ocurre en ecosistemas acuáticos afectados por contaminación agrícola y en particular, por el cultivo de piña, el objetivo de este trabajo fue determinar la toxicidad de dos plaguicidas utilizados en ese cultivo, individualmente y en mezcla, sobre dos especies de hidras. Por esta razón, se desea conocer la sensibilidad de la *H. attenuata* a dos plaguicidas individuales, de mucho uso en piña y alta residualidad en aguas, así como a la mezcla de estos. Complementariamente, existe la necesidad de conocer más sobre la sensibilidad a plaguicidas de la *Hydra viridis*, para compararla con el organismo modelo que es la *H. attenuata*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1 Fase 1: Selección de plaguicidas

Para la selección de los dos plaguicidas se tomaron en consideración las ocho sustancias principalmente responsables de causar ecotoxicidad de invertebrados acuáticos, aplicadas en mayor cantidad anualmente en cultivos de piña en el país. Se utilizó la matriz adjunta en los Anexos B y C que puntuó distintos aspectos ambientales importantes para seleccionar un herbicida y un insecticida. Las sustancias elegidas fueron: diuron y etoprofos.

2.1.2 Fase 2: Ensayos de toxicidad

Las pruebas se basaron en el protocolo “Bioensayo Agudo con *Hydra attenuata*”, establecido por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) (Trottier et al., 1997). A cada especie de hidra se le realizaron tres tratamientos: uno con el herbicida diuron, otro con el insecticida etoprofos y el tercero con una mezcla de estos dos plaguicidas. Las soluciones madre de plaguicidas para las pruebas se prepararon en el Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas (LAREP) a partir de soluciones patrón, disueltas en acetona.

Para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones y en cada repetición se utilizaron cinco diluciones de la sustancia de prueba, un control negativo, un control positivo y un blanco de acetona, con tres réplicas cada uno. Como control negativo y agua de dilución se utilizó medio de hidras (ver Anexo D); como control positivo se usó para la *H. attenuata* 0,06 µg/L Cr⁺⁶ y para la *H. viridis* 1,30 µg/L Cr⁺⁶; y el blanco de acetona varió en cada ensayo de acuerdo con la concentración de acetona que contenía cada solución madre de plaguicidas (ver Anexos E y F).

Las hidras utilizadas no se alimentaron durante las 24 horas previas al inicio del ensayo. El día del ensayo se apartaron del cultivo, se enjuagaron y se colocaron en un recipiente con medio limpio. Luego, se colocaron 4 mL de cada una de las cinco diluciones de cada sustancia ensayada y de los controles en placas Petri de 35 mm de diámetro y se pasaron a cada placa 15 hidras para prelavado.

Seguidamente, utilizando una placa multicelda de doce pozos, se colocaron en cada pozo (por triplicado) 4 mL de cada una de las cinco diluciones de cada tratamiento y de los controles. En cada pozo se introdujeron tres hidras prelavadas en la concentración respectiva, iniciando por el control negativo, seguida del blanco, las diluciones de prueba (de la más baja a la más alta) y el control positivo. Posteriormente, se cubrió cada multicelda con papel parafilm® y se colocó su tapa (Figura 1).



Figura 1. Montaje de bioensayo agudo con hidras.

Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente. Pasadas 24 h y 48 h se registró el estado morfológico de las hidras expuestas según la Figura 2. Se consideró válida la prueba cuando al menos el 90 % de los organismos en el control negativo sobrevivieron y presentaron morfología normal. Además, se corroboró que el control positivo afectara aproximadamente a un 50 % de los organismos expuestos.




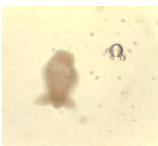
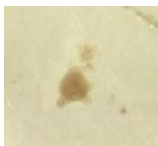





| Especie | Cuerpo normal | Tentáculos abastionados | Tentáculos acortados | Estado de tulipán | Cuerpo desintegrado |
|------------------------|---|---|--|---|---|
| <i>Hydra attenuata</i> |  |  |  |  |  |
| <i>Hydra viridis</i> |  |  |  |  |  |

Figura 2. Estados morfológicos de la *Hydra attenuata* e *Hydra viridis*.

Para evaluar la toxicidad aguda de los plaguicidas sobre las hidras se examinaron los cambios en la longitud y forma de su cuerpo. La concentración de efecto medio (EC_{50}) y la concentración letal media (LC_{50}); se estimaron por medio de una regresión de la respuesta observada sobre la concentración de exposición, utilizando el modelo Probit. Los cálculos fueron hechos en R (R Core Team) con el paquete Ecotox (Hlina et al., 2021).

Las interacciones de toxicidad se analizaron según DeLorenzo y Serrano (2003), calculando primeramente la suma de actividad biológica (S) para el valor de EC_{50} y LC_{50} ; y los límites inferiores (LCL) y límites superiores (UCL) de ambos valores. La fórmula corresponde a: $S = (A_m/A_i) + (B_m/B_i)$, donde A_m es el valor del compuesto A en mezcla, A_i es el valor del compuesto A individualmente, B_m es el valor del compuesto B en mezcla y B_i es el valor del compuesto B individualmente. Luego, se utilizaron los valores de S para calcular los índices aditivos: Si $S < 1$, el índice aditivo = $(1/S) - 1$; y si $S >$

1, el índice aditivo = S(-1) +1. Por último, se clasificaron las interacciones según tres posibilidades: antagonica, si el índice aditivo es menor a cero; aditiva, si es igual a cero; o sinérgica, si es mayor a cero.

3. RESULTADOS

En todos los ensayos la totalidad de los organismos del control negativo a las 48 horas estaban en estado normal. Además, los controles positivos se mantuvieron dentro de los rangos aceptables para la validación del ensayo. Así mismo, en todos los casos, las tres réplicas de cada ensayo arrojaron resultados muy similares, lo cual sustenta la reproducibilidad de los resultados. Los hallazgos de los bioensayos se muestran de forma resumida en los Cuadros 1 y 2, sin embargo, los resultados completos se encuentran en los Anexos E y F. Referente al efecto causado por los plaguicidas, la *H. attenuata* resultó ser la especie más sensible tanto para diuron como etoprofos, la cual mostró efecto subletal desde la concentración más baja de ambas sustancias. En contraste, la *H. viridis* mostró mayor tolerancia ante la exposición a los plaguicidas de forma individual, pero fue la más sensible ante la mezcla, ya que se observó letalidad en la concentración mayor de la mezcla.

Cuadro 1. Resultados obtenidos a las 48 horas en los ensayos de toxicidad de la *Hydra attenuata* con los plaguicidas diuron, etoprofos y la mezcla (diuron-etoprofos). Se muestran concentraciones promedio. D = diuron, E = etoprofos.

| Diuron | | | Etoprofos | | | | Mezcla (diuron-etoprofos) | | | | |
|---|-----------|-----------------|--------------|--|-----------|-----------------|---------------------------|--|-----------|-----------------|--------------|
| Concentración | No efecto | Efecto subletal | Efecto letal | Concentración | No efecto | Efecto subletal | Efecto letal | Concentración | No efecto | Efecto subletal | Efecto letal |
| Control (-) 100,00 % medio de hidra | x | | | Control (-) 100,00 % medio de hidra | x | | | Control (-) 100,00 % medio de hidra | x | | |
| Control solvente 1,15 mg/mL (32,00 % acetona) | x | x | | Control solvente 1,06 mg/mL (0,80 % acetona) | x | x | | Control solvente D: 1,15 mg/mL E: 1,06 mg/mL | x | x | |
| Control (+) 0,06 µg/L Cr ⁺⁶ | x | x | | Control (+) 0,06 µg/L Cr ⁺⁶ | x | x | | Control (+) 0,06 µg/L Cr ⁺⁶ | x | x | |
| 3,11 mg/L | x | x | | 9,11 mg/L | x | x | | D: 0,53 mg/L E: 3,22 mg/L | x | x | |
| 6,23 mg/L | x | x | x | 18,21 mg/L | x | x | | D: 1,05 mg/L E: 6,44 mg/L | x | x | |
| 12,45 mg/L | | x | x | 36,42 mg/L | x | x | | D: 2,11 mg/L E: 12,88 mg/L | x | x | |
| 24,91 mg/L | | x | x | 72,84 mg/L | | x | | D: 4,21 mg/L E: 25,75 mg/L | x | x | |
| 49,82 mg/L | | | x | 145,68 mg/L | | | x | D: 8,42 mg/L E: 51,51 mg/L | | | x |

Cuadro 2. Resultados obtenidos a las 48 horas en los ensayos de toxicidad de la *Hydra viridis* con los plaguicidas diuron, etoprofos y la mezcla (diuron-etoprofos). Se muestran concentraciones promedio. D = diuron, E = etoprofos.

| Diuron | | | | Etoprofos | | | | Mezcla (diuron-etoprofos) | | | |
|---|-----------|-----------------|--------------|--|-----------|-----------------|--------------|--|-----------|-----------------|--------------|
| Concentración | No efecto | Efecto subletal | Efecto letal | Concentración | No efecto | Efecto subletal | Efecto letal | Concentración | No efecto | Efecto subletal | Efecto letal |
| Control (-) 100,00 % medio de hidra | x | | | Control (-) 100,00 % medio de hidra | x | | | Control (-) 100,00 % medio de hidra | x | | |
| Control solvente 1,15 mg/mL (32,00 % acetona) | x | | | Control solvente 1,06 mg/mL (0,80 % acetona) | x | | | Control solvente D: 1,15 mg/mL E: 1,06 mg/mL | x | | |
| Control (+) 1,30 µg/L Cr ⁺⁶ | | x | x | Control (+) 1,30 µg/L Cr ⁺⁶ | | x | x | Control (+) 1,30 µg/L Cr ⁺⁶ | | x | x |
| 6,25 mg/L | x | | | 9,11 mg/L | x | | | D: 1,15 mg/L E: 3,22 mg/L | x | | |
| 12,50 mg/L | x | x | | 18,21 mg/L | x | | | D: 2,31 mg/L E: 6,44 mg/L | x | x | |
| 25,00 mg/L | | x | | 36,42 mg/L | x | x | | D: 4,62 mg/L E: 12,88 mg/L | x | x | |
| 50,01 mg/L | | x | x | 72,84 mg/L | x | x | | D: 9,24 mg/L E: 25,75 mg/L | | x | |
| 100,01 mg/L | | | x | 145,68 mg/L | | | x | D: 18,47 mg/L E: 51,51 mg/L | | x | x |

Los parámetros físicoquímicos de los controles y concentraciones de plaguicidas, en las tres réplicas de cada sustancia, arrojaron valores muy similares, lo cual muestra que las hidras estuvieron bajo condiciones semejantes durante los ensayos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Promedio de parámetros físicoquímicos de los controles y concentraciones de plaguicidas utilizados en los ensayos. D = diuron, E = etoprofos.

| Plaguicida | <i>Hydra attenuata</i> | | | | | <i>Hydra viridis</i> | | | | |
|-------------|---|-----|-----------------------|------------------|-------------------------|---|-----|-----------------------|------------------|-------------------------|
| | Concentración | pH | Conductividad (µS/cm) | Temperatura (°C) | Oxígeno disuelto (mg/L) | Concentración | pH | Conductividad (µS/cm) | Temperatura (°C) | Oxígeno disuelto (mg/L) |
| Diuron | Control (-) 100,00 % medio hidra | 7,2 | 285 | 24 | 7,4 | Control (-) 100,00 % medio hidra | 6,9 | 214 | 24 | 7,1 |
| | Control solvente 1,15 mg/mL (32,00 % acetona) | 7,1 | 243 | 24 | 7,5 | Control solvente 1,15 mg/mL (32,00 % acetona) | 6,8 | 202 | 24 | 7,3 |
| | Control (+) 0,06 µg/L Cr ⁺⁶ | 7,0 | 250 | 24 | 7,3 | Control (+) 1,30 µg/L Cr ⁺⁶ | 6,8 | 202 | 24 | 7,0 |
| | 3,11 mg/L | 6,9 | 258 | 24 | 7,4 | 6,25 mg/L | 6,8 | 225 | 24 | 7,0 |
| | 12,45 mg/L | 6,8 | 246 | 24 | 7,3 | 25,00 mg/L | 6,7 | 214 | 24 | 7,0 |
| Etoprofos | 49,82 mg/L | 6,8 | 246 | 24 | 7,2 | 100,01 mg/L | 6,7 | 204 | 24 | 6,9 |
| | Control (-) 100,00 % medio hidra | 8,1 | 293 | 22 | 7,8 | Control (-) 100,00 % medio hidra | 7,0 | 218 | 22 | 7,6 |
| | Control solvente 1,06 mg/mL (0,80 % acetona) | 7,8 | 212 | 22 | 7,6 | Control solvente 1,06 mg/mL (0,80 % acetona) | 6,8 | 176 | 22 | 7,5 |
| | Control (+) 0,06 µg/L Cr ⁺⁶ | 7,6 | 244 | 22 | 7,6 | Control (+) 1,30 µg/L Cr ⁺⁶ | 6,6 | 190 | 22 | 7,4 |
| | 9,11 mg/L | 7,4 | 259 | 22 | 7,7 | 9,11 mg/L | 6,5 | 215 | 22 | 7,5 |
| 36,42 mg/L | 7,1 | 238 | 22 | 7,5 | 36,42 mg/L | 6,4 | 197 | 22 | 7,4 | |
| 145,68 mg/L | 7,1 | 216 | 22 | 7,5 | 145,68 mg/L | 6,4 | 179 | 22 | 7,3 | |

| Plaguicida | <i>Hydra attenuata</i> | | | | | <i>Hydra viridis</i> | | | | |
|-----------------------------|--|-----|-----------------------|------------------|-------------------------|--|-----|-----------------------|------------------|-------------------------|
| | Concentración | pH | Conductividad (μS/cm) | Temperatura (°C) | Oxígeno disuelto (mg/L) | Concentración | pH | Conductividad (μS/cm) | Temperatura (°C) | Oxígeno disuelto (mg/L) |
| Mezcla (diuron - etoprofos) | Control (-) 100,00 % medio hidra | 7,6 | 278 | 24 | 7,5 | Control (-) 100,00 % medio hidra | 7,0 | 232 | 24 | 7,3 |
| | Control solvente D: 1,15 mg/mL E: 1,06 mg/mL | 7,6 | 241 | 24 | 7,3 | Control solvente D: 1,15 mg/mL E: 1,06 mg/mL | 6,7 | 213 | 24 | 7,2 |
| | Control (+) 0,06 μg/L Cr ⁺⁶ | 7,3 | 254 | 24 | 7,2 | Control (+) 1,30 μg/L Cr ⁺⁶ | 6,7 | 205 | 24 | 7,1 |
| | D: 0,53 mg/L E: 3,22 mg/L | 7,1 | 258 | 24 | 7,3 | D: 1,15 mg/L E: 3,22 mg/L | 6,7 | 231 | 24 | 7,3 |
| | D: 2,11 mg/L E: 12,88 mg/L | 6,8 | 250 | 24 | 7,0 | D: 4,62 mg/L E: 12,88 mg/L | 6,4 | 220 | 23 | 7,2 |
| | D: 8,42 mg/L E: 51,51 mg/L | 6,6 | 239 | 24 | 6,9 | D: 18,47 mg/L E: 51,51 mg/L | 6,6 | 218 | 24 | 7,0 |

Las primeras manifestaciones de afectación a las hidras en los tratamientos con diuron y etoprofos a las 48 horas se evidenciaron con los estados abastonado y acortado, lo cual indica un efecto subletal de estas sustancias. La *H. attenuata* mostró estos cambios morfológicos en el 33 % de los organismos expuestos a diuron a partir de la concentración más baja (3,11 mg/L) (Figura 3). En la siguiente concentración (6,23 mg/L), la afectación fue del 74 % de individuos y para las concentraciones superiores (12,45; 24,91 y 49,82 mg/L) la afectación alcanzó 100 % de la población. Por su parte, la *H. viridis* presentó sus primeras afectaciones ante el diuron a la concentración 12,50 mg/L con una respuesta del 41 % de los individuos y al igual que la *H. attenuata*, en las siguientes concentraciones (25,00; 50,01 y 100,01 mg/L), la afectación fue del 100 % de individuos expuestos.

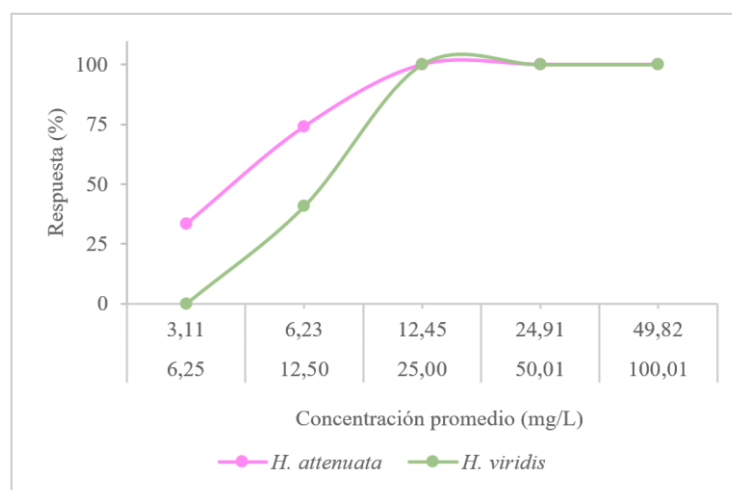


Figura 3. Efecto subletal en la *Hydra attenuata* e *Hydra viridis* ante la exposición a diuron durante 48 horas. En el eje horizontal, las concentraciones promedio superiores corresponden a las utilizadas con la *H. attenuata* y las inferiores con la *H. viridis*.

Para la sustancia etoprofos la *H. attenuata* mostró cambios morfológicos a partir de la concentración 9,11 mg/L, afectando el 15 % de los individuos expuestos. En las concentraciones siguientes correspondientes a 18,21; 36,42; 72,84 y 145,68 mg/L de esta sustancia, la afectación fue de 26; 81; 100 y 100 % de individuos respectivamente. Por su parte la *H. viridis* presentó sus primeras afectaciones ante el etoprofos

a la concentración de 36,42 mg/L, con una respuesta de 22 % de los individuos expuestos, mientras que en las concentraciones de 72,84 y 145,68 mg/L, la afectación fue de 74 y 100 % respectivamente (Figura 4).

Para la *H. attenuata*, en la concentración más alta de diuron (49,82 mg/L) y de etoprofos (145,68 mg/L) se registraron 24 y 22 individuos desintegrados respectivamente (efecto letal más importante), mientras que para la *H. viridis* en la concentración más alta de diuron (100,01 mg/L) y de etoprofos (145,68 mg/L) se registraron 20 y 3. En el tratamiento mezcla diuron-etoprofos no se obtuvieron individuos desintegrados de ninguna de las dos especies de ensayo (ver Anexos E y F). Estos resultados muestran que conforme aumentó la concentración de los plaguicidas diuron y etoprofos, incrementó la afectación de individuos expuestos y que ambas especies de hidras resultaron ser más sensibles al herbicida diuron que al insecticida etoprofos.

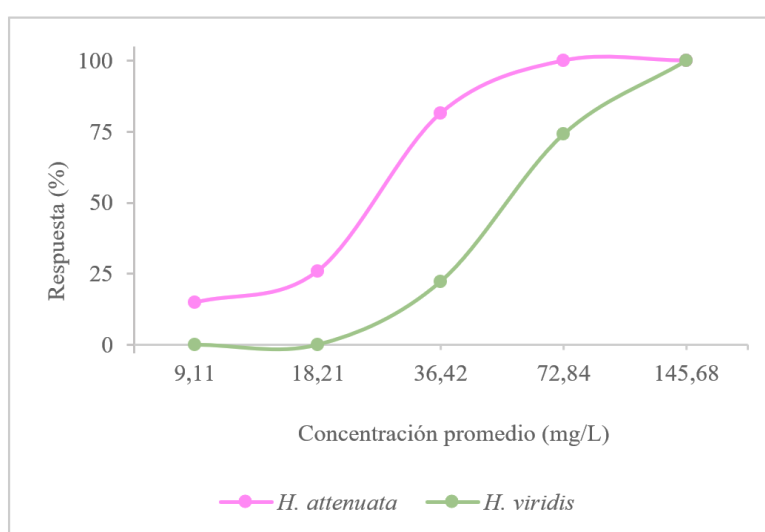


Figura 4. Efecto subletal en la *Hydra attenuata* e *Hydra viridis* ante la exposición a etoprofos durante 48 horas.

En cuanto los parámetros de toxicidad evaluados, en el ensayo con diuron, la EC_{50} de la *H. viridis* fue 3,22 veces mayor respecto a la otra especie de hidra y la LC_{50} fue 2,19 veces. Asimismo, en el ensayo con etoprofos la EC_{50} de la *H. viridis* fue 2,24 veces mayor respecto a la *H. attenuata*, mientras que la LC_{50} de las dos especies mostró el mismo resultado. Lo anterior muestra una menor tolerancia de la *Hydra attenuata* ante la exposición a los plaguicidas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Promedio de parámetros de toxicidad de la *Hydra attenuata* e *Hydra viridis* en los bioensayos con diuron y etoprofos.

| Plaguicida | <i>Hydra attenuata</i> | | <i>Hydra viridis</i> | |
|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | EC ₅₀ (mg/L) | LC ₅₀ (mg/L) | EC ₅₀ (mg/L) | LC ₅₀ (mg/L) |
| Diuron | 4,24 | 16,84 | 13,64 | 36,96 |
| Etoprofos | 23,74 | 103,01 | 53,12 | 103,01 |

En el bioensayo de la interacción entre diuron y etoprofos según EC₅₀ para la *H. attenuata* el resultado del índice aditivo fue de 0,19; 1,72 y 4,13 para UCL, EC₅₀ y LCL respectivamente, por lo tanto, al ser valores mayores a cero indica una toxicidad sinérgica (ver Anexo G). En el caso de la interacción según LC₅₀, en el ensayo con la mezcla de ambos plaguicidas no hubo mortalidad, por lo consiguiente, no fue posible determinar el LC₅₀ de la mezcla ni su interacción.

Respecto a la interacción de los plaguicidas con la *H. viridis*, según EC₅₀ el resultado del índice aditivo fue de 0,93; 0,96 y 0,99 para UCL, EC₅₀ y LCL respectivamente, al ser valores mayores a cero corresponde a una toxicidad sinérgica. Asimismo, en la interacción según LC₅₀, el índice aditivo fue de 0,36; 0,37 y 0,38; lo cual expresa una toxicidad sinérgica (ver Anexo H).

4. DISCUSIÓN

Al ser la hidra un organismo diploblástico, sus células se ubican de manera muy próxima al entorno, por consiguiente, responde rápidamente a los cambios que ocurren en el medio, de tal forma que los tóxicos presentes contribuyen a alteraciones en su morfología y capacidad de regeneración de fracciones de su cuerpo (Murugadas et al., 2016). En los ensayos realizados tanto la *H. attenuata* como la *H. viridis* fueron más sensibles al herbicida diuron que al insecticida etoprofos. Según Demetrio (2012), las concentraciones necesarias de herbicida para afectar la vía metabólica de las plantas generan toxicidad también para los cnidarios. Además, Barrera et al. (2019) mencionan que las hidras presentan alta sensibilidad a los herbicidas ya que al realizar un estudio con el herbicida glifosato y los insecticidas clorpirifos y cipermetrina, la *H. attenuata* mostró mayor sensibilidad al glifosato.

El diuron actúa de manera sistémica en las plantas, ya que es absorbido en mayor medida por las raíces, inhabilitando el transporte de electrones dentro del fotosistema II (IRET-UNA, 2020). A pesar de que no se registran en la literatura datos sobre la exposición de hidras a diuron, Dal (2020) menciona que al exponer la *H. viridis* a 400 µg/L de atrazina (cuyo modo de acción es similar al del diuron) por 35 días, se detectó una disminución de células del alga *Chlorella* presentes en las células de la hidra. Lo anterior resulta realmente negativo para esta especie de hidra, debido a que la relación de simbiosis con el alga le favorece la obtención de carbohidratos para su supervivencia.

Howe et al. (2017) también, mencionan que al exponer a diuron al cnidario *Exaiptasia pallida* (anémona de mar que vive en simbiosis con el alga *Symbiodinium spp.*) por un periodo de doce días, a

concentraciones de 10 µg/L y 200 µg/L, presentó un fuerte blanqueamiento; una EC₅₀ de 100 µg/L y 132 µg/L; y la inhibición del 50 % de la reproducción asexual. Asimismo, Mansano et al. (2018) citan hallazgos de otros cnidarios sensibles al diuron, tales como *Acropora tumida* y *Aiptasia sp.*

Las especies de hidras estudiadas en este artículo, tanto la *H. attenuata* como la *H. viridis*, mostraron menor sensibilidad ante el insecticida etoprofos. Según Demetrio (2012), los insecticidas organofosforados actúan afectando el sistema nervioso por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Klimovich y Bosch (2018) mencionan que el sistema nervioso de la hidra es muy sencillo y carece de células migratorias mesodérmicas especializadas. Asimismo, Demetrio (2012) indica que solo un 3 % del total de sus células corresponden a neuronas, por lo tanto, sufren un menor efecto ante este tipo de sustancias. “La baja sensibilidad de *Hydra attenuata* respecto a estos insecticidas podría deberse a que son organismos más sencillos con un sistema neuronal difuso y no centralizado, con la mayoría de las neuronas sin una polaridad definida” (p. 61).

El modo de acción de etoprofos es de contacto y actúa como inhibidor de la enzima colinesterasa (IRET-UNA, 2020). Los estudios de toxicidad con etoprofos son realmente escasos y no se registra en la literatura resultados sobre la exposición de los cnidarios a este plaguicida; sin embargo, se indica un análisis con un insecticida organofosforado que posee su mismo modo de acción, el cual corresponde a clorpirifos. Olguín (2021) menciona que al exponer al cnidario *Aurelia coerulea* a 0,04 µg/L de clorpirifos por un periodo de nueve semanas, la tasa de reproducción por medio de brotación no se vio afectada, además, no hubo cambios en los perfiles de metabolitos, por lo tanto, este organismo resultó ser resistente al plaguicida.

La *H. viridis* fue la hidra que se vio menos afectada al estar expuesta a diuron y etoprofos. Según Hamada et al. (2018) y Ye (2017) la simbiosis de la *H. viridis* con el alga *Chlorella sp.* le proporciona una menor sensibilidad ante varios contaminantes. El alga se alberga en las células epiteliales de la región gástrica de la hidra. Como beneficio el alga obtiene nitrógeno derivado del metabolismo de la hidra, mientras esta última obtiene carbohidratos del alga. Se reporta adición de la actividad antioxidante en cnidarios que tienen relación simbiótica con el alga, esto por medio de la presencia del gen encargado de codificar la enzima glutatión S-transferasa. Además, Guinou (2010) menciona que en épocas de extrema debilidad, las algas proveen a la hidra de alimento endógeno, lo cual representa una ventaja competitiva.

Este trabajo es de gran importancia para la comunidad científica porque ha generado información que se desconocía sobre la sensibilidad de las hidras (como organismo de ensayo) a plaguicidas. La *H. attenuata* resultó ser la especie más sensible ante los plaguicidas de forma individual, mientras que la *H. viridis* fue la más sensible ante la mezcla. Este dato es sumamente relevante ya que en la ejecución de bioensayos de laboratorio permitiría otorgarle diferentes usos a cada especie de hidra, según la composición de la muestra de agua a estudiar. Por ejemplo, la *H. attenuata* podría ser una excelente herramienta para evaluar efectos de plaguicidas ante sustancias individuales; mientras que la *H. viridis* sería mucho más útil en la evaluación de muestras de agua que contengan mezclas de plaguicidas. Por esta razón, los

resultados obtenidos son un primer indicio para la realización de más investigaciones con otras sustancias individuales y mezclas, que permitan verificar si efectivamente es conveniente darle el uso mencionado a cada especie de hidra.

Los valores de los parámetros de toxicidad (EC_{50} y LC_{50}) obtenidos indican la afectación a nivel subletal y letal, respectivamente, en hidras, por permanecer expuestas a diuron y etoprofos. Estos datos son un gran aporte para la comunidad científica debido a que existen estudios muy escasos realizados con hidras como organismos bioindicadores. Además, proporciona información de gran importancia al ECOTOX, que le permitirá optimizar su base de datos de bioindicadores y la realización de futuros ensayos que contribuyan al estudio de la sensibilidad de hidras ante otros contaminantes. Por lo consiguiente, el trabajo realizado sustenta efectos de lo que la contaminación por plaguicidas en ecosistemas acuáticos podría generar, representando una amenaza a la calidad de vida de gran cantidad de especies.

La interacción entre diuron y etoprofos, tanto para la *H. attenuata* como la *H. viridis*, resultó en una toxicidad sinérgica. Una mezcla es aditiva si la toxicidad corresponde a la suma de los efectos de cada sustancia, mientras que el sinergismo ocurre cuando la toxicidad es más elevada que la aditiva y el antagonismo sucede cuando es inferior a la aditiva. Además, los efectos de las mezclas son producto de alteraciones de la actividad biológica que una sustancia provoca a la otra, estas pueden ser cambios en la eliminación, en las tasas de absorción o en el metabolismo (Aronzon, 2013). Los efectos de los contaminantes pueden variar entre organismos y niveles de organización biológica (Andrade, 2021). Adicionalmente, realizar estudios con las sustancias por separado subestima el efecto que ocasionan los tóxicos en panoramas reales, cuyos ecosistemas acuáticos pueden estar contaminados por diversas sustancias, las cuales afectan de manera distinta a los organismos presentes. En este trabajo se evidenció que la mezcla de diuron y etoprofos es sinérgica, de forma que ocasionó a nivel subletal una afectación mayor en las hidras estudiadas en comparación con el efecto de las sustancias de manera individual. Por lo consiguiente, se rescata la gran utilidad de estos cnidarios como bioindicadores en el monitoreo de la calidad de agua y, de igual modo, la importancia de realizar más estudios con hidras, utilizando diferentes mezclas de sustancias para comprender la afectación de los tóxicos en los seres vivos.

5. CONCLUSIONES

La *H. attenuata* y la *H. viridis* resultaron ser más sensibles al herbicida diuron, debido al modo de acción de los herbicidas, que representan mayor toxicidad para estos organismos. Mientras que la sensibilidad de ambas especies al insecticida etoprofos fue menor, debido a que los insecticidas organofosforados están diseñados para afectar el sistema nervioso de los organismos y al tener las hidras un sistema nervioso relativamente simple, sufren un menor efecto ante este tipo de sustancias.

La simbiosis de la *H. viridis* con el alga *Chlorella sp.* la hace más resistente ante diversas sustancias individuales del medio, debido a que el alga le proporciona adición de la acción antioxidante y carbohidratos como alimento, ventaja que no posee la *H. attenuata*.

La interacción entre diuron y etoprofos, tanto para la *H. attenuata* como para la *H. viridis*, resultó en una toxicidad sinérgica, de modo que, la mezcla ocasiona a nivel subletal una afectación mayor en las hidras en comparación con el efecto de las sustancias de manera individual.

La *H. attenuata* resultó ser la especie más sensible tanto para diuron como etoprofos, mientras que la *H. viridis* fue la más sensible ante la mezcla de los dos plaguicidas. La *H. attenuata* al verse más afectada por dos de las tres sustancias es la hidra que mostró mayor sensibilidad, por lo que se recomienda mantenerla dentro de los organismos de la batería de pruebas de ECOTOX para la ejecución de bioensayos de toxicidad. Sin embargo, se recomienda realizar más investigaciones para verificar si es más conveniente otorgarle diferentes usos a cada especie de hidra, de manera que la *H. attenuata* se utilice en ensayos toxicológicos con sustancias individuales y la *H. viridis* con mezclas de sustancias.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, V. (2021). *Efectos de la contaminación directa y difusa por plaguicidas sobre el zooplancton a distintas escalas de análisis* (tesis para optar al posgrado de Doctorado en Ciencias Biológicas). Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Argüello, E., Chaves, A., Chinchilla, A. y Navarrete, M. (2015). *Posibles efectos en la salud asociados a la exposición al agua para consumo humano contaminada por plaguicidas, en las poblaciones de Milano, Luisiana y El Cairo, Siquirres, estudiados en el periodo de setiembre 2013 a enero de 2014* (Seminario para optar al grado de Licenciatura en Salud Ambiental). Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Aronzon, C. (2013). *Evaluación de la toxicidad de los contaminantes Cobre, Nonilfenol y Diazinón sobre embriones y larvas de Rhinella (Bufo) arenarum* (tesis para optar al posgrado en Ciencias Biológicas). Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Barrera, J., Espinosa, A. y Álvarez, J. (2019). Contaminación en el Lago de Tota, Colombia: toxicidad aguda en *Daphnia magna* (Cladocera: Daphniidae) e *Hydra attenuata* (Hydroida: Hydridae). *Revista de Biología Tropical*, 67(1), 11-23. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v67i1.33573>
- Bucheli, M. (2015). *Evaluación del impacto ambiental causado por el cultivo intensivo de fresa (Fragaria vesca) en la parroquia huachi grande, cantón Ambato* (tesis para optar al posgrado de Magíster en Agroecología y Ambiente). Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Caseley, J.C. (s.f.). *Capítulo 10. Herbicidas*. <http://www.fao.org/3/t1147s0e.htm>
- Castro, S., Picado, H. y Vega, W. (2015). Comunidades fumigadas en Costa Rica acusan al Estado y transnacionales ante la Comisión Interamericana de Derechos Humanos. *Revista Biodiversidad*, 85, 23-26. <https://www.grain.org/media/w1siziisijiwmtuvmduvmdvmtbfnddfntnfmjq3xza2q29tdw5pzgfkzxfzntawdhzgfzx2vux0nvc3rhx1jpy2ffiywn1c2fux2fsx0vzdgfkb195x3ryyw5zbfmfjaw>

9uywxc19hbnrlx2xhx0nvbw1zav9ux0ludgvyyw1lcm1jyw5hx2rlx0rlcmvjag9zx0h1bwfub3mucgr
mild

- Costa Rica, El Presidente de la República, El Ministro de Ambiente y Energía y la Ministra de Salud. (2007). Diario Oficial la Gaceta N° 178. Decreto 33903-MINAE-S-Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales. San José, C.R.: Imprenta Nacional.
- Dal, J. (2020). *Effects of the herbicide atrazine on members of the freshwater genus hydra*. Pensilvania, Estados Unidos: Elizabethtown College.
- DeLorenzo, M. y Serrano, L. (2003). Individual and Mixture Toxicity of Three Pesticides; Atrazine, Chlorpyrifos, and Chlorothalonil to the Marine Phytoplankton Species *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Environmental Science and Health*, 38 (5), 529–538. <https://doi.org/10.1081/PFC-120023511>
- Demetrio, P. (2012). *Estudio de efectos biológicos de plaguicidas utilizados en cultivos de soja RR y evaluación de impactos adversos en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampeana* (tesis para optar al posgrado de Doctorado en Ciencias Exactas). Universidad Nacional de la Plata, Buenos Aires, Argentina. <https://doi.org/10.35537/10915/18139>
- Echeverría-Sáenz, S., Mena, F., Pinnock, M., Ruepert, C., Solano, K., de la Cruz, E., Campos, B., Sánchez-Avila, J., Lacorte, S. y Barata, C. (2012). Environmental hazards of pesticides from pineapple crop production in the Río Jiménez watershed (Caribbean Coast, Costa Rica). *Science of the Total Environment*. 440, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.092>
- Escobar-Chávez, C., Alvaríño, L. y Iannacone, I. (2019). Evaluación del riesgo ambiental acuático de la mezcla de los plaguicidas imidacloprid (insecticida) y propineb (fungicida) en *Daphnia magna* straus, 1820. *Paideia XXI*. 9 (2), 301-332. [doi:10.31381/paideia.v9i2.2759](https://doi.org/10.31381/paideia.v9i2.2759)
- Fournier, L., Castillo, L., Ramírez, F., Moraga, G. y Ruepert, C. (2019). Preliminary Assessment of Agricultural Area and its Influence to the Quality of Water in Golfo Dulce, Costa Rica. *Revista de Ciencias Ambientales Tropical Journal Of Environmental Sciences*, 53 (1). <http://dx.doi.org/10.15359/rca.53-1.5>
- Gómez, J. (2017). *Eficacia de control de diferentes sustancias sobre caracoles *Opeas pumilum* y *Cecillioides aperta* EN PIÑA (*Ananas comosus*. var. *comosus*) híbrido MD-2 en finca El Tremedal S.A., San Carlos, Costa Rica* (tesis para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía). Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Costa Rica.
- Guinou, C. (2010). *The Toxicity of Harmony Landfill Leachate to Green Hydra (*Hydra viridissima*)* (tesis para optar al posgrado de Maestría en Biociencia Aplicada). University of Ontario Institute of Technology, Oshawa, Canadá.

- Hamada, M., Satoh, N. y Khalturin, K. (2020). A Reference Genome from the Symbiotic Hydrozoan, *Hydra viridissima*. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 10 (11), 3883–3895. <https://doi.org/10.1534/g3.120.401411>
- Hamada, M., Schröder, K., Bathia, J., Ulrich, K., Fraune, S., Khalturina, M., Khalturin, K., Shinzato, Satoh., N. y Bosch., T. (2018). *Metabolic co-dependence drives the evolutionarily ancient Hydra-Chlorella symbiosis*. Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University, Tancha, Japón.
- Hlina, B.L., Birceanu, O., Robinson, C.S., Dhiyebi, H. y Wilkie, M.P. (2021). *In Press. The relationship between thermal physiology and lampricide sensitivity in larval sea lamprey (Petromyzon marinus)*. *Journal of Great Lakes Research*. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2021.10.002>
- Howe, P., Reichelt-Brushett, A., Clark, M. y Seery, C. (2017). Toxicity estimates for diuron and atrazine for the tropical marine cnidarian *Exaiptasia pallida* and in-hospite *Symbiodinium* spp. using PAM chlorophyll-a fluorometry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 171, 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.05.006>
- IRET-UNA. (2020). *Manual de Plaguicidas de Centroamérica*. <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu>
- Klimovich, A y Bosch, T. (2018). Rethinking the Role of the Nervous System: Lessons From the Hydra Holobiont. *BioEssays*, 40, (1800060), 1-9. <https://doi.org/10.1002/bies.201800060>
- Lewis, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D. y Green, A. (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(4), 1050-1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>
- Mansano, A.S., Moreira, R.A., Dornfeld, H.C., Diniz, L., Daam. M., Rocha, O. y Selegim, M. (2018). Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 13335 - 13346. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8274-9>
- Ministerio de Ambiente y Energía (MINAE). (2013). *Plan Nacional de Monitoreo de la Calidad de los Cuerpos de Agua Superficiales*. San José, Costa Rica.
- Montiel, M. (2015). Uso de agroquímicos en la producción intensiva de piña en Costa Rica. *Revista Pensamiento Actual*, 15(25), 183 - 195. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/pensamiento-actual/article/view/22604/24028>
- Murugadas, A., Zeeshan, M., Thamaraiselvi, K., Ghaskadbi, S. & Abdulkader, M. (2016). Hydra as a model organism to decipher the toxic effects of copper oxide nanorod: Eco-toxicogenomics approach. *Scientific Reports*, 6 (29663), 1-14. <https://doi.org/10.1038/srep29663>

- Obando, A. (2017). *El Estado detrás de la piña: el desarrollo de los monocultivos de exportación en la Región Huetar Norte de Costa Rica*. Universidad de Costa Rica. <http://www.congresoalacip2017.org/archivo/downloadpublic2?q=ytoyontzojy6inbhcmtcyi7czozntoiytoxontzojewoiijrf9bulfvsvzpijtzojq6ijiznkio30io3m6mtoiaci7czozmjoinjdhyjnhnzc3zdgxmdi2m2rjmjqzmzbiytextotrkzguio30%3d>
- Olguín, C. (2021). *Responses of jellyfish to pesticides across different life history stages* (tesis para optar al posgrado de Maestría en Ciencias en Biología Marina). Griffith University, Queensland, Australia. <https://doi.org/10.25904/1912/4080>
- Pesticide Action Network (PAN). (2020). *Pesticide info*. <https://www.pesticideinfo.org/>
- Quinn, B., Gagné, F. y Blaise, C. (2012). Hydra, a model system for environmental studies. *The International Journal of Developmental Biology*, 56(6-8), 613-625. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113469bq>
- Ramírez, F. (2017). *Diagnóstico de plaguicidas en Caribe y zona norte*. IRET-UNA, Heredia, Costa Rica.
- Ríos, L., Puentes, C., Trejos, A., Ramos, Y., Carabalí, A., Gómez, Y. y Saavedra, S. (2019). *Manual técnico para la producción de semilla de piña (Ananas comosus L. Merrill) variedad MD2*. AGROSAVIA Editorial, Mosquera, Colombia. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.investigation.7403190>
- Tribunal Latinoamericano del Agua. (2013). *Memoria del foro: “El Monocultivo de piña en Costa Rica y la repercusión en los sistemas hídricos”*. <http://tragua.com/wp-content/uploads/2013/10/parte-i-memoria-el-monocultivo-de-pi%C3%B1a-y-su-posible-repercusi%C3%B3n-en-los-sistemas-h%C3%ADricos-.pdf>
- Trottier, S., Blaise, C., Kusui, T. y Johnson, E. (1997). Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based Hydra attenuata assay. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 12, 265-271. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2256\(1997\)12:3<265::aid-tox10>3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2256(1997)12:3<265::aid-tox10>3.0.co;2-9)
- Vargas, C. , Miller, C., y Arguedas, C. (2020). *Informe: Monitoreo del estado de la piña en Costa Rica para el año 2018*. San José, Costa Rica: CONARE – CENAT.
- Ye, S. (2017). *The Roles of Endosymbionts and Hosts in Adaptive Response to Stress*. Rice University, Texas, Estados Unidos. <https://hdl.handle.net/1911/94004>

7. ANEXOS

Anexo A . Plaguicidas utilizados en el cultivo de piña del Caribe y zona norte de Costa Rica.

| Plaguicidas | Cantidad aplicada en cultivos de piña por año (kg ia/ha/año) | Ecotoxicidad en invertebrados acuáticos |
|-------------|--|---|
| Ametrina | 2 a 3 | Relevante |
| Bromacil | 2 a 3 | Medianamente relevante |
| Diuron | 2 a 3 | Relevante |
| Glifosato | 0 a 1 | Relevante |
| Benfuracarb | 7 a 8 | Altamente relevante |
| Carbaril | 3 a 4 | Altamente relevante |
| Diazinon | 4 a 5 | Altamente relevante |
| Etoprofos | 8 a 10 | Relevante |

Fuente: Elaboración propia (2020) con datos de Ramírez (2017) y Lewis et al. (2016).

Anexo B. Determinación del herbicida con mayor puntaje para ser utilizado en los bioensayos. La fuente de cada dato se indica con una letra como se especifica seguidamente: (A) Lewis et al., 2016; (B) Pesticide Action Network, 2020; (C) Ramírez, 2017; (D) IRET, 2020.

| Indicadores | Rangos de clasificación | Ametrina | | | | Bromacil | | | | Diuron | | | | Glifosato | | | |
|--|--|----------|------------------------|---------|--------|----------|------------------------|---------|--------|-------------|--------------------------|---------|--------|-----------|--------------------------|---------|--------|
| | | Dato | Clasificación | Puntaje | Fuente | Dato | Clasificación | Puntaje | Fuente | Dato | Clasificación | Puntaje | Fuente | Dato | Clasificación | Puntaje | Fuente |
| Cantidad importada por año (ton ia) | < 50 = Ligeramente relevante 30 - 150 = Relevante 150 - 400 = Altamente relevante > 400 = Extremadamente relevante | 198,7 | Altamente relevante | 4 | C | 198,7 | Altamente relevante | 4 | C | 418,6 | Extremadamente relevante | 5 | C | 1371,9 | Extremadamente relevante | 5 | C |
| Cantidad aplicada en cultivos de piña por año (kg ia/ha/año) | 0 -1 = Ligeramente relevante 2-3 = Medianamente relevante 3-4 = Relevante 4-5 = Altamente relevante > 5 = Extremadamente relevante | 2 a 3 | Medianamente relevante | 2 | C | 2 a 3 | Medianamente relevante | 2 | C | 2 a 3 | Medianamente relevante | 2 | C | 0 a 1 | Ligeramente relevante | 1 | C |
| Solubilidad en agua (20°C) (mg/L) | <= 50 = Medianamente relevante 50 - 500 = Relevante 500 -1000 = Altamente relevante > 1000 = Extremadamente relevante | 200 | Relevante | 3 | A | 815 | Altamente relevante | 4 | A | 35,6 | Medianamente relevante | 2 | A | 10500 | Extremadamente relevante | 5 | A |
| Coefficiente de reparto octanol-agua (en pH 7, 20°C) (LogP) | < 2,7 = Medianamente relevante 2,7 - 3,0 = Relevante > 3,0 = Altamente relevante | 2,63 | Medianamente relevante | 2 | A | 1,88 | Medianamente relevante | 2 | A | 2,87 | Relevante | 3 | A | -3,2 | Medianamente relevante | 2 | A |
| Volatilidad 20°C (mPa) | < 5,0 = Medianamente relevante 5,0 - 10,0 = Relevante > 10,0 = Altamente relevante | 0,365 | Medianamente relevante | 2 | A | 0,041 | Medianamente relevante | 2 | A | 0,001 15 | Medianamente relevante | 2 | A | 0,0131 | Medianamente relevante | 2 | A |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|----|-----------|----|---|-----|------------------------|----|---|-------|------------------------|----|---|-----|------------------------|----|---|
| Persistencia en suelo (días) | < 30 = Ligeramente relevante 30 - 100 = Relevante 100 - 365 = Altamente relevante > 365 = Extremadamente relevante | 37 | Relevante | 3 | A | 60 | Relevante | 3 | A | 146,6 | Altamente relevante | 4 | A | 15 | Ligeramente relevante | 1 | A |
| Persistencia en agua (días) | < 1 = Ligeramente relevante 1 - 14 = Medianamente relevante 14 - 30 = Relevante > 30 = Altamente relevante | 28 | Relevante | 3 | B | 30 | Relevante | 3 | B | 8,8 | Medianamente relevante | 2 | A | 9,9 | Medianamente relevante | 2 | A |
| Ecotoxicidad en invertebrados acuáticos (Agudos 48 h LC ₅₀ (mg/L)) | > 100 = Medianamente relevante 0,1 - 100 = Relevante < 0,1 = Altamente relevante | 28 | Relevante | 3 | A | 119 | Medianamente relevante | 2 | A | 5,7 | Relevante | 3 | A | 40 | Relevante | 3 | A |
| Sumatoria | | | | 22 | | | | 22 | | | | 23 | | | | 21 | |

Anexo C. Determinación del insecticida con mayor puntaje para ser utilizado en los bioensayos. La fuente de cada dato se indica con una letra como se especifica seguidamente: (A) Lewis et al., 2016; (B) Pesticide Action Network, 2020; (C) Ramírez, 2017; (D) IRET, 2020.

| Indicadores | Rangos de clasificación | Benfuracarb | | | | Carbaril | | | | Diazinon | | | | Etoprofos | | | |
|--|---|-------------|--------------------------|---------|--------|----------|------------------------|---------|--------|----------|--------------------------|---------|--------|-----------|--------------------------|---------|--------|
| | | Dato | Clasificación | Puntaje | Fuente | Dato | Clasificación | Puntaje | Fuente | Dato | Clasificación | Puntaje | Fuente | Dato | Clasificación | Puntaje | Fuente |
| Cantidad importada por año (ton ia) | < 50 = Ligeramente relevante 30 - 150 = Relevante 150 - 400 = Altamente relevante > 400 = Extremadamente relevante | 59,3 | Relevante | 3 | C | 71 | Relevante | 3 | C | 718,6 | Extremadamente relevante | 5 | C | 217,2 | Altamente relevante | 4 | C |
| Cantidad aplicada en cultivos de piña por año (kg ia/ha/año) | 0 - 1 = Ligeramente relevante 2-3 = Medianamente relevante 3-4 = Relevante 4-5 = Altamente relevante > 5 = Extremadamente relevante | 7 a 8 | Extremadamente relevante | 5 | C | 3 a 4 | Relevante | 3 | C | 4 a 5 | Altamente relevante | 4 | C | 8 a 10 | Extremadamente relevante | 5 | C |
| Solubilidad en agua (20°C) (mg/L) | <= 50 = Medianamente relevante 50 - 500 = Relevante 500 -1000 = Altamente relevante > 1000 = Extremadamente relevante | 8,4 | Medianamente relevante | 2 | A | 9,1 | Medianamente relevante | 2 | A | 60 | Relevante | 3 | A | 1300 | Extremadamente relevante | 5 | A |
| Coefficiente de reparto octanol-agua (en pH 7, 20°C) (LogP) | < 2,7 = Medianamente relevante 2,7 - 3,0 = Relevante > 3,0 = Altamente relevante | 4,22 | Altamente relevante | 4 | A | 2,36 | Medianamente relevante | 2 | A | 3,69 | Altamente relevante | 4 | A | 2,99 | Relevante | 3 | A |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|------------|---------------------------|----|---|--------|---------------------------|----|---|-------|---------------------------|----|---|------|--------------------------|----|---|
| Volatilidad 20°C (mPa) | < 5,0 = Medianamente relevante 5,0 - 10,0 = Relevante > 10,0 = Altamente relevante | 0,00 42 | Medianamente relevante | 2 | A | 0,0416 | Medianamente relevante | 2 | A | 11,97 | Altamente relevante | 4 | A | 78 | Altamente relevante | 4 | A |
| Persistencia en suelo (días) | < 30 = Ligeramente relevante 30 - 100 = Relevante 100 - 365 = Altamente relevante > 365 = Extremadamente relevante | 0,5 | Ligeramente relevante | 1 | A | 16 | Ligeramente relevante | 1 | A | 9,1 | Ligeramente relevante | 1 | A | 13,6 | Ligeramente relevante | 1 | A |
| Persistencia en agua (días) | < 1 = Ligeramente relevante 1 - 14 = Medianamente relevante 14 - 30 = Relevante > 30 = Altamente relevante | - | Ligeramente relevante | 1 | D | 3,1 | Medianamente relevante | 2 | A | 4,3 | Medianamente relevante | 2 | A | 20 | Relevante | 3 | A |
| Ecotoxicidad en invertebrados acuáticos (Agudos 48 h LC ₅₀ (mg/L)) | > 100 = Medianamente relevante 0,1 - 100 = Relevante < 0,1 = Altamente relevante | 0,01 | Altamente relevante | 4 | A | 0,0064 | Altamente relevante | 4 | A | 0,001 | Altamente relevante | 4 | A | 0,2 | Relevante | 3 | A |
| Sumatoria | | | | 22 | | | | 19 | | | | 27 | | | | 28 | |

Anexo D. Composición del medio de cultivo para hidras, utilizado como control negativo y agua de dilución.

| Reactivos | En 20,00 litros |
|--|--|
| Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 2,94 g |
| Ácido N-tris [hidroximetil] metil 1-2- aminoetanosulfónico (TES) | 2,20 g |
| Ácido etilendiamintetraacético (EDTA) | 0,08 g |
| Hidróxido de sodio (NaOH 1N) | Agregar por gotas hasta alcanzar pH 7,00 |
| Agua Milli-Q | Hasta aforar en botellón de 20,00 L |

Fuente: Adaptado de Trottier et al. (1997).

Anexo E. Cambios morfológicos ocurridos a la *Hydra attenuata* en ensayos de toxicidad aguda con dos plaguicidas y la mezcla de estos. N = hidra normal; B = hidra con tentáculos abastados; S = hidra con tentáculos acortados; T = hidra en estado de tulipán; D = hidra desintegrada.

| Ensayo | Diuron | | | Etoprofos | | | Mezcla (diuron - etoprofos) | | |
|------------|---|-------------------|-----------------------|--|--------|--|---|--------|------------|
| | Concentración | 24 h | 48 h | Concentración | 24 h | 48 h | Concentración | 24 h | 48 h |
| 1 | Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N | Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N | Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N |
| | Control solvente 1,15 mg/mL (32,00 % acetona) | 5N, 4S | 7N, 1B, 1S | Control solvente 1,06 mg/mL (0,80 % acetona) | 7N, 2B | 7N, 2B | Control solvente Diuron: 1,15 mg/mL Etoprofos: 1,06 mg/mL | 7N, 2B | 5N, 4B |
| | Control (+) 0,06 µg/L Cr ⁺⁶ | 9N | 2N, 2B, 5S | Control (+) 0,06 µg/L Cr ⁺⁶ | 6N, 3B | 2N, 5B, 2S | Control (+) 0,06 µg/L Cr ⁺⁶ | 8N, 1B | 9B |
| | 3,13 mg/L | 8N, 1S | 4N, 3B, 2S | 9,09 mg/L | 9N | 8N, 1B | Diuron: 0,53 mg/L Etoprofos: 3,22 mg/L | 7N, 2B | 5N, 4B |
| | 6,25 mg/L | 4N, 4B, 1S | 2N, 3B, 2S, 1T, 1D | 18,18 mg/L | 9N | 7N, 2B | Diuron: 1,05 mg/L Etoprofos: 6,44 mg/L | 5N, 4B | 4N, 5B |
| | 12,50 mg/L | 1N, 3B, 4S, 1T | 1B, 7S, 1T | 36,37 mg/L | 9N | 1N, 8B | Diuron: 2,11 mg/L Etoprofos: 12,88 mg/L | 5N, 4B | 4N, 5B |
| | 25,00 mg/L | 1S, 5T, 3D | 1S, 1T, 7D | 72,73 mg/L | 9B | 4B, 5S | Diuron: 4,21 mg/L Etoprofos: 25,75 mg/L | 1N, 8B | 1N, 7B, 1S |
| 50,00 mg/L | 7T, 2D | 2T, 7D | 145,46 mg/L | 6S, 1T, 2D | 2T, 7D | Diuron: 8,42 mg/L Etoprofos: 51,51 mg/L | 8B, 1S | 1B, 8S | |
| 2 | Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N | Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N | Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N |
| | Control solvente 1,15 mg/mL (32,00 % acetona) | 6N, 2B, 1S | 7N, 1B, 1S | Control solvente 1,06 mg/mL (0,80 % acetona) | 7N, 2B | 3N, 6B | Control solvente Diuron: 1,15 mg/mL Etoprofos: 1,06 mg/mL | 4N, 5B | 5N, 4B |
| | Control (+) 0,06 µg/L Cr ⁺⁶ | 9N | 2N, 7S | Control (+) 0,06 µg/L Cr ⁺⁶ | 7N, 2B | 4N, 5B | Control (+) 0,06 µg/L Cr ⁺⁶ | 7N, 2B | 2N, 5B, 2S |

| | | | | | | | | |
|---|------------|------------|--|---------------|--------|---|--------|------------|
| 3,13 mg/L | 9N | 7N, 1B, 1T | 9,11 mg/L | 9N | 8N, 1B | Diuron: 0,53 mg/L Etoprofos: 3,22 mg/L | 8N, 1B | 6N, 3B |
| 6,25 mg/L | 4N, 5B | 3N, 4B, 2S | 18,23 mg/L | 9N | 7N, 2B | Diuron: 1,05 mg/L Etoprofos: 6,44 mg/L | 5N, 4B | 3N, 5B, 1S |
| 12,50 mg/L | 3B, 6S | 9S | 36,46 mg/L | 9N | 2N, 7B | Diuron: 2,11 mg/L Etoprofos: 12,88 mg/L | 4N, 5B | 3N, 6B |
| 25,00 mg/L | 1S, 7T, 1D | 1S, 2T, 6D | 72,92 mg/L | 9B | 6B, 3S | Diuron: 4,21 mg/L Etoprofos: 25,75 mg/L | 2N, 7B | 1N, 7B, 1S |
| 50,00 mg/L | 1S, 5T, 3D | 1T, 8D | 145,84 mg/L | 8S, 1D | 3T, 6D | Diuron: 8,42 mg/L Etoprofos: 51,51 mg/L | 7B, 2S | 5B, 4S |
| Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N | Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N | Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N |
| Control solvente 1,15 mg/mL (32,00 % acetona) | 4N, 5B | 7N, 2B | Control solvente 1,06 mg/mL (0,80 % acetona) | 5N, 1B, 3S | 3N, 6B | Control solvente Diuron: 1,15 mg/mL Etoprofos: 1,06 mg/mL | 5N, 4B | 6N, 3B |
| Control (+) 0,06 µg/L Cr ⁺⁶ | 9N | 4N, 4B, 1S | Control (+) 0,06 µg/L Cr ⁺⁶ | 7N, 2B | 3B, 6S | Control (+) 0,06 µg/L Cr ⁺⁶ | 6N, 3B | 5B, 4S |
| 3,09 mg/L | 9N | 7N, 2B | 9,11 mg/L | 9N | 7N, 2B | Diuron: 0,53 mg/L Etoprofos: 3,22 mg/L | 6N, 3B | 5N, 4B |
| 6,18 mg/L | 5N, 4B | 2N, 2B, 5S | 18,22 mg/L | 9N | 6N, 3B | Diuron: 1,05 mg/L Etoprofos: 6,44 mg/L | 5N, 4B | 4N, 5B |
| 12,36 mg/L | 3N, 4B, 2S | 2B, 5S, 2T | 36,44 mg/L | 9N | 2N, 7B | Diuron: 2,11 mg/L Etoprofos: 12,88 mg/L | 5N, 4B | 2N, 7B |
| 24,73 mg/L | 1B, 1S, 7T | 1S, 8T | 72,88 mg/L | 9B | 5B, 4S | Diuron: 4,21 mg/L Etoprofos: 25,75 mg/L | 2N, 7B | 1N, 8B |
| 49,46 mg/L | 3T, 6D | 9D | 145,75 mg/L | 2T, 7D | 9D | Diuron: 8,42 mg/L Etoprofos: 51,51 mg/L | 7B, 2S | 4B, 5S |

3

Anexo F. Cambios morfológicos ocurridos a la *Hydra viridis* en ensayos de toxicidad aguda con dos plaguicidas y la mezcla de estos. N = hidra normal; B = hidra con tentáculos abastionados; S = hidra con tentáculos acortados; T = hidra en estado de tulipán; D = hidra desintegrada.

| Ensayo | Diuron | | | Etoprofos | | | Mezcla (diuron - etoprofos) | | |
|--------|---|------------|--------|--|------------|------------|---|------------|------------|
| | Concentración | 24 h | 48 h | Concentración | 24 h | 48 h | Concentración | 24 h | 48 h |
| 1 | Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N | Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N | Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N |
| | Control solvente 1,15 mg/mL (32,00 % acetona) | 9N | 9N | Control solvente 1,06 mg/mL (0,80 % acetona) | 9N | 9N | Control solvente Diuron: 1,15 mg/mL Etoprofos: 1,06 mg/mL | 9N | 9N |
| | Control (+) 1,30 µg/L Cr ⁺⁶ | 1N, 1B, 7S | 9S | Control (+) 1,30 µg/L Cr ⁺⁶ | 3N, 5B, 1S | 8S, 1D | Control (+) 1,30 µg/L Cr ⁺⁶ | 3N, 4B, 2S | 4S, 4T, 1D |
| | 6,25 mg/L | 9N | 9N | 9,09 mg/L | 9N | 9N | Diuron: 1,15 mg/L Etoprofos: 3,22 mg/L | 9N | 9N |
| | 12,50 mg/L | 5N, 2B, 2S | 6N, 3B | 18,18 mg/L | 9N | 9N | Diuron: 2,31 mg/L Etoprofos: 6,44 mg/L | 7N, 2B | 7N, 2B |
| | 25,00 mg/L | 1N, 8S | 1B, 8S | 36,37 mg/L | 9N | 7N, 2B | Diuron: 4,62 mg/L Etoprofos: 12,88 mg/L | 6N, 3B | 2N, 5B |
| 2 | 50,00 mg/L | 7S, 2T | 1S, 8T | 72,73 mg/L | 5N, 4B | 3N, 6B | Diuron: 9,24 mg/L Etoprofos: 25,75 mg/L | 9B | 2B, 7S |
| | 100,00 mg/L | 2S, 7T | 6T, 3D | 145,46 mg/L | 1B, 8S | 6T, 3D | Diuron: 18,47 mg/L Etoprofos: 51,51 mg/L | 4B, 5S | 9T |
| | Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N | Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N | Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N |
| | Control solvente 1,15 mg/mL (32,00 % acetona) | 9N | 9N | Control solvente 1,06 mg/mL (0,80 % acetona) | 9N | 9N | Control solvente Diuron: 1,15 mg/mL Etoprofos: 1,06 mg/mL | 9N | 9N |
| | Control (+) 1,30 µg/L Cr ⁺⁶ | 5N, 4B | 9S | Control (+) 1,30 µg/L Cr ⁺⁶ | 1N, 7B, 1S | 5S, 2T, 2D | Control (+) 1,30 µg/L Cr ⁺⁶ | 6B, 3S | 3S, 5T, 1D |

| | | | | | | | | |
|---|--------|------------|--|--------|------------|---|--------|------------|
| 6,25 mg/L | 9N | 9N | 9,11 mg/L | 9N | 9N | Diuron: 1,15 mg/L Etoprofos: 3,22 mg/L | 9N | 9N |
| 12,50 mg/L | 3N, 6B | 3N, 6B | 18,23 mg/L | 9N | 9N | Diuron: 2,31 mg/L Etoprofos: 6,44 mg/L | 8N, 1B | 8N, 1B |
| 25,00 mg/L | 9S | 1B, 8S | 36,46 mg/L | 9N | 7N, 2B | Diuron: 4,62 mg/L Etoprofos: 12,88 mg/L | 5N, 4B | 4N, 5B |
| 50,00 mg/L | 9S | 1S, 8T | 72,92 mg/L | 2N, 7B | 2N, 3B, 4S | Diuron: 9,24 mg/L Etoprofos: 25,75 mg/L | 9B | 8B, 1S |
| 100,00 mg/L | 8T, 1D | 1T, 8D | 145,84 mg/L | 9S | 9T | Diuron: 18,47 mg/L Etoprofos: 51,51 mg/L | 9S | 1S, 8T |
| Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N | Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N | Control (-) 100,00 % medio hidra | 9N | 9N |
| Control solvente 1,15 mg/mL (32,00 % acetona) | 9N | 9N | Control solvente 1,06 mg/mL (0,80 % acetona) | 9N | 9N | Control solvente Diuron: 1,15 mg/mL Etoprofos: 1,06 mg/mL | 9N | 9N |
| Control (+) 1,30 µg/L Cr ⁺⁶ | 1N, 8B | 4S, 2T, 3D | Control (+) 1,30 µg/L Cr ⁺⁶ | 2B, 7S | 2S, 5T, 2D | Control (+) 1,30 µg/L Cr ⁺⁶ | 8B, 1S | 5S, 3T, 1D |
| 3 6,25 mg/L | 9N | 9N | 9,11 mg/L | 9N | 9N | Diuron: 1,15 mg/L Etoprofos: 3,22 mg/L | 9N | 9N |
| 12,50 mg/L | 5N, 4B | 7N, 1B, 1S | 18,22 mg/L | 9N | 9N | Diuron: 2,31 mg/L Etoprofos: 6,44 mg/L | 7N, 2B | 9N |
| 25,01 mg/L | 2B, 7S | 1B, 8S | 36,44 mg/L | 9N | 7N, 2B | Diuron: 4,62 mg/L Etoprofos: 12,88 mg/L | 4N, 5B | 3N, 6B |
| 50,02 mg/L | 9S | 1S, 8T | 72,88 mg/L | 4N, 5B | 2N, 7B | Diuron: 9,24 mg/L Etoprofos: 25,75 mg/L | 8B, 1S | 4B, 5S |
| 100,04 mg/L | 1T, 8D | 9D | 145,85 mg/L | 1B, 8S | 9T | Diuron: 18,47 mg/L Etoprofos: 51,51 mg/L | 1B, 8S | 1S, 8T |

Anexo G. Toxicidad de la mezcla de diuron y etoprofos según EC₅₀ para la *Hydra attenuata*.

| Plaguicida | EC ₅₀ (mg/L) | LCL (mg/L) | UCL (mg/L) |
|------------------|----------------------------|---------------|---------------|
| Diuron | 4,24 | 2,95 | 6,20 |
| Etoprofos | 23,74 | 16,71 | 33,91 |
| Diuron mezcla | 0,74 | 0,28 | 2,47 |
| Etoprofos mezcla | 4,55 | 1,69 | 15,10 |
| S | 0,37 | 0,19 | 0,84 |
| Índice aditivo | 1,72 | 4,13 | 0,19 |
| Rango del índice | (0,19... 1,72... 4,13) | | |
| Interacción | Sinergismo | | |

Anexo H. Toxicidad de la mezcla de diuron y etoprofos para la *Hydra viridis*.

| Plaguicida | Según EC ₅₀ | | | Según LC ₅₀ | | |
|------------------|----------------------------|---------------|---------------|----------------------------|---------------|---------------|
| | EC ₅₀ (mg/L) | LCL (mg/L) | UCL (mg/L) | LC ₅₀ (mg/L) | LCL (mg/L) | UCL (mg/L) |
| Diuron | 13,64 | 10,48 | 17,76 | 36,94 | 33,19 | 41,11 |
| Etoprofos | 53,12 | 38,95 | 72,46 | 103,01 | 103,01 | 103,01 |
| Diuron mezcla | 4,06 | 3,01 | 5,48 | 13,45 | 12,66 | 14,30 |
| Etoprofos mezcla | 11,32 | 8,40 | 15,27 | 37,50 | 35,31 | 39,89 |
| S | 0,51 | 0,50 | 0,52 | 0,73 | 0,72 | 0,74 |
| Índice aditivo | 0,96 | 0,99 | 0,93 | 0,37 | 0,38 | 0,36 |
| Rango del índice | (0,93... 0,96... 0,99) | | | (0,36... 0,37... 0,38) | | |
| Interacción | Sinergismo | | | Sinergismo | | |

Anexo I. Plan de monitoreo

1. Alcance

El presente plan de monitoreo para cuerpos de agua superficiales se realizó utilizando como orientación el Plan Nacional de Monitoreo de la Calidad de los Cuerpos de Agua Superficiales del MINAE, el cual está estructurado siguiendo las instrucciones del Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales. Este documento establece una guía para llevar a cabo el monitoreo de aguas superficiales de zonas aledañas a cultivos de piña. Se trabajará a nivel de cuencas hidrográficas situadas en la región Huetar Atlántica, para determinar los daños presentes y proponer medidas de mitigación.

2. Objetivos

Objetivo general

Establecer un plan de monitoreo para la determinación de contaminantes en aguas superficiales que integre análisis de residuos de plaguicidas junto con pruebas de hidras, para la mitigación de los efectos derivados de la contaminación en aguas superficiales.

Objetivos Específicos

- Medir los parámetros físico-químicos de las aguas establecidos en el Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales, Decreto N° 33903-MINAE-S, para la determinación de la calidad de los cuerpos de agua.
- Evaluar cambios en la morfología de la *Hydra attenuata*, por medio de la realización de análisis de toxicidad, para la medición de impactos ocurridos en la biota acuática por la presencia de plaguicidas en las aguas superficiales.
- Determinar los impactos ambientales causados por procesos agrícolas mediante la aplicación de la matriz de Leopold para la propuesta de medidas de mitigación.

3. Metas

- Brindar una herramienta con los pasos a seguir para el monitoreo de zonas que presenten vulnerabilidad ambiental tales como escorrentía, precipitación y pendiente, que propicien el desplazamiento de los tóxicos utilizados en los cultivos a las aguas superficiales.
- Ejecutar las acciones planteadas según el cronograma establecido.
- Evidenciar la importancia de la realización de constantes monitoreos en aguas superficiales en zonas afectadas por la utilización de plaguicidas.

4. Vulnerabilidad ambiental por el uso de plaguicidas en cultivos de piña

Se presentan los mapas de cuencas, pendientes, precipitación y escorrentía de la Región Huetar Atlántica (Figuras 1, 2, 3 y 4). Además, producto de la unión de los anteriores se obtuvo un quinto mapa que muestra los niveles de vulnerabilidad ambiental (Figura 5). Este último indica las zonas con mayor riesgo de sufrir afectación ante el uso de plaguicidas y las cuencas que las recorren, las cuales se tomarán en cuenta en la red de monitoreo de aguas superficiales del presente plan.

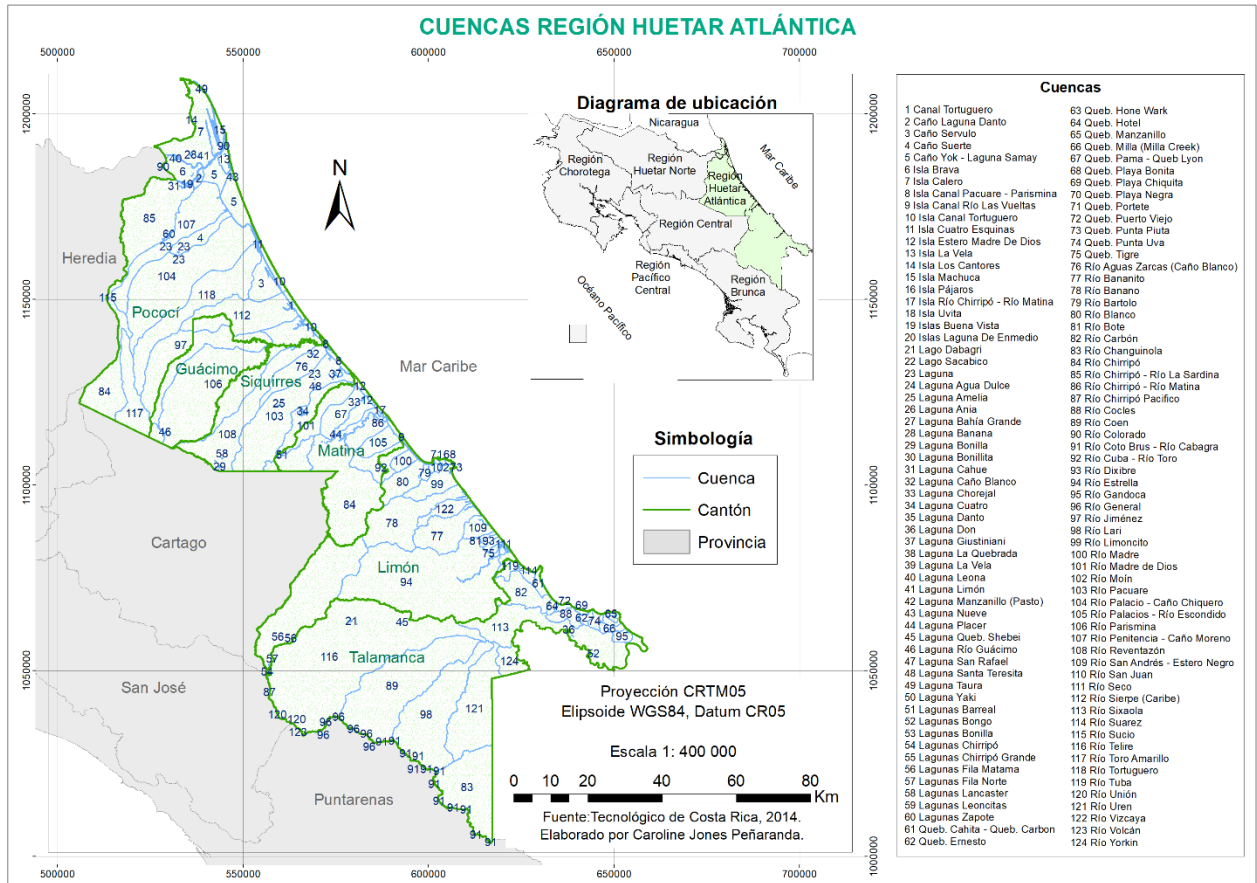


Figura 1. Mapa de cuencas en región Huetar Atlántica.

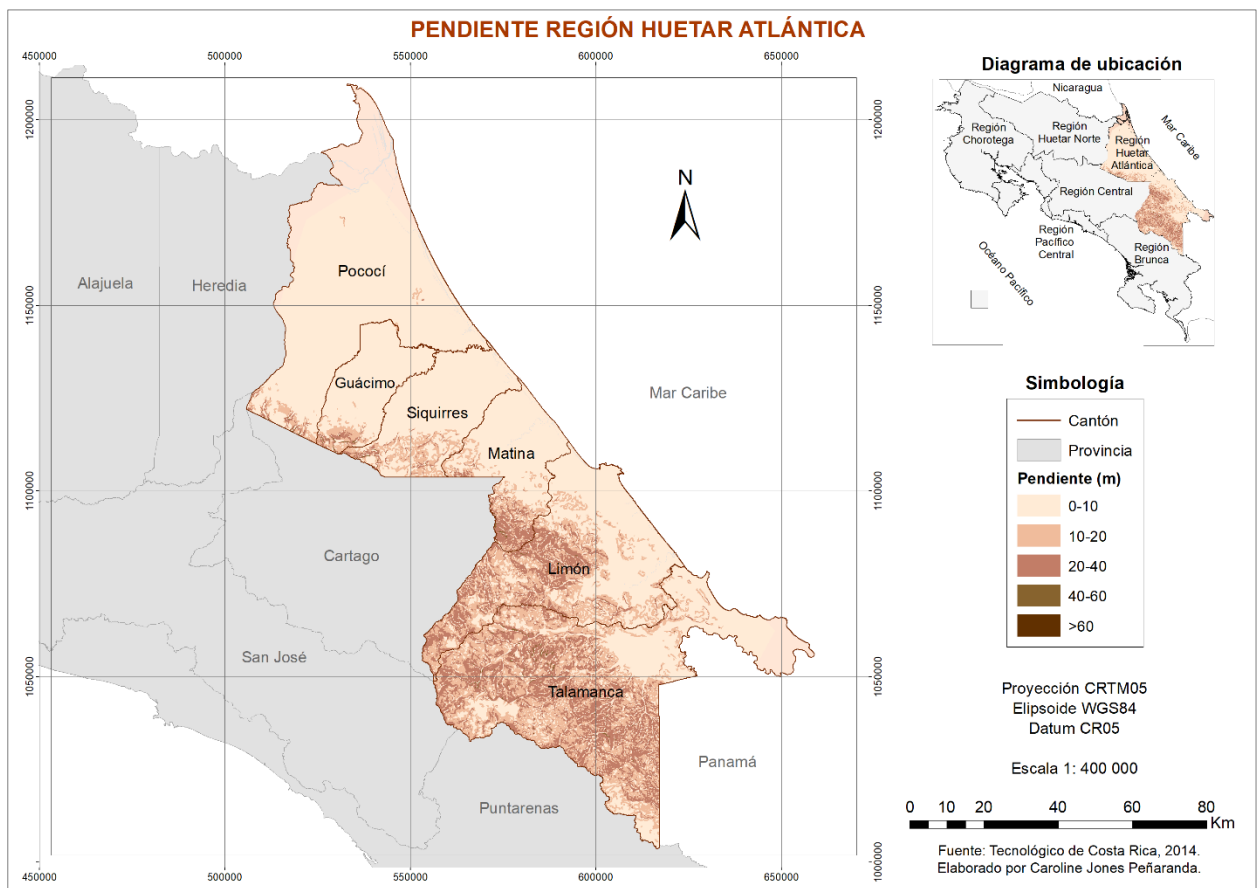


Figura 2. Mapa de pendientes en región Huetar Atlántica.

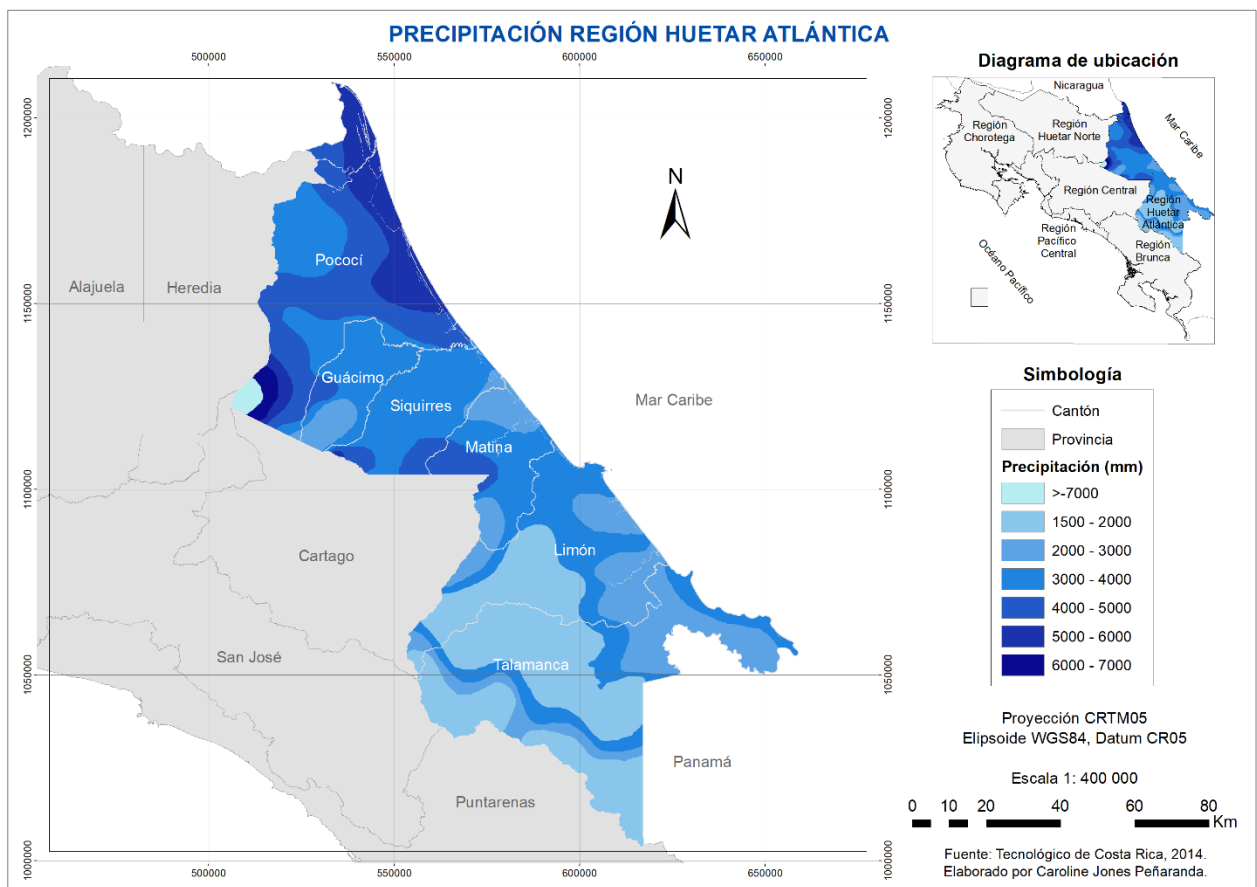


Figura 3. Mapa de precipitación en región Huetar Atlántica.

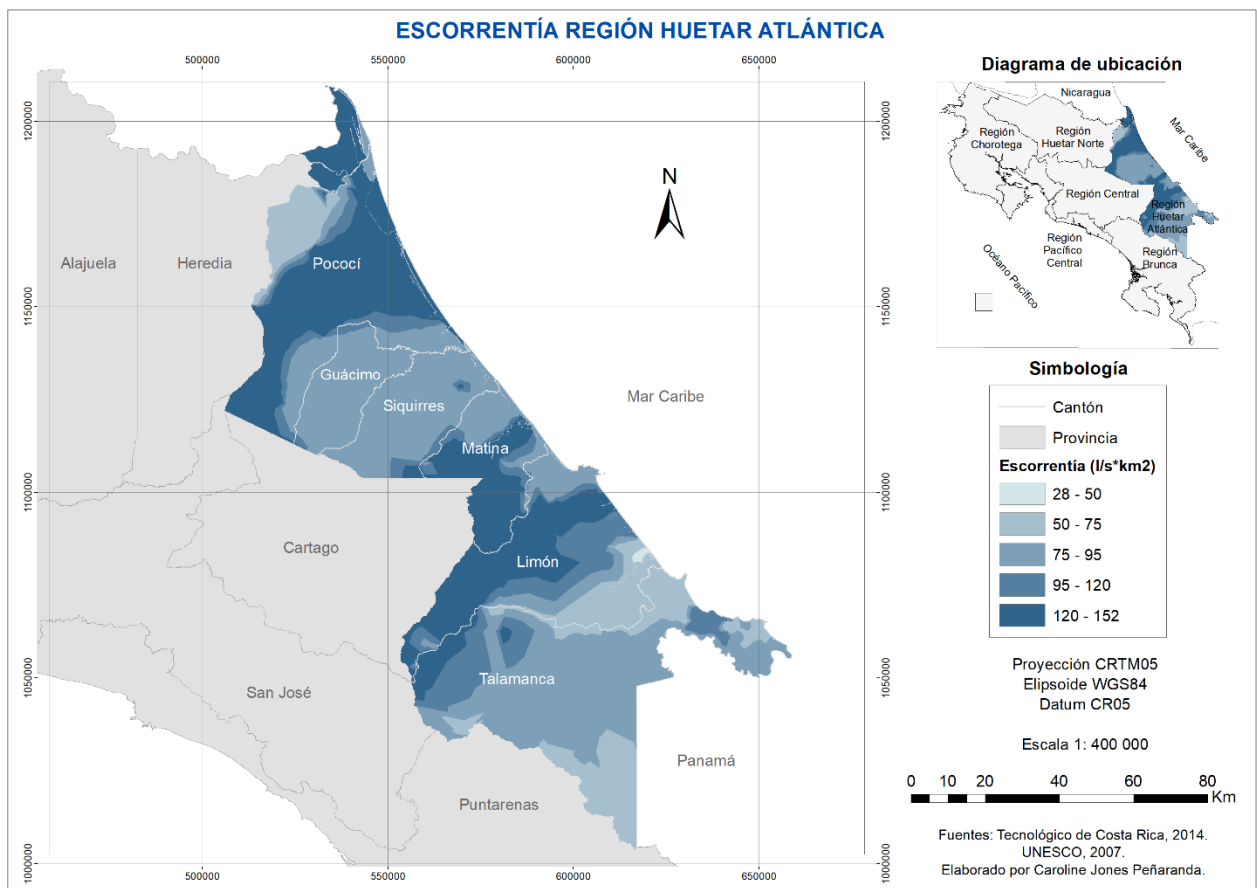


Figura 4. Mapa de escorrentía en región Huetar Atlántica.

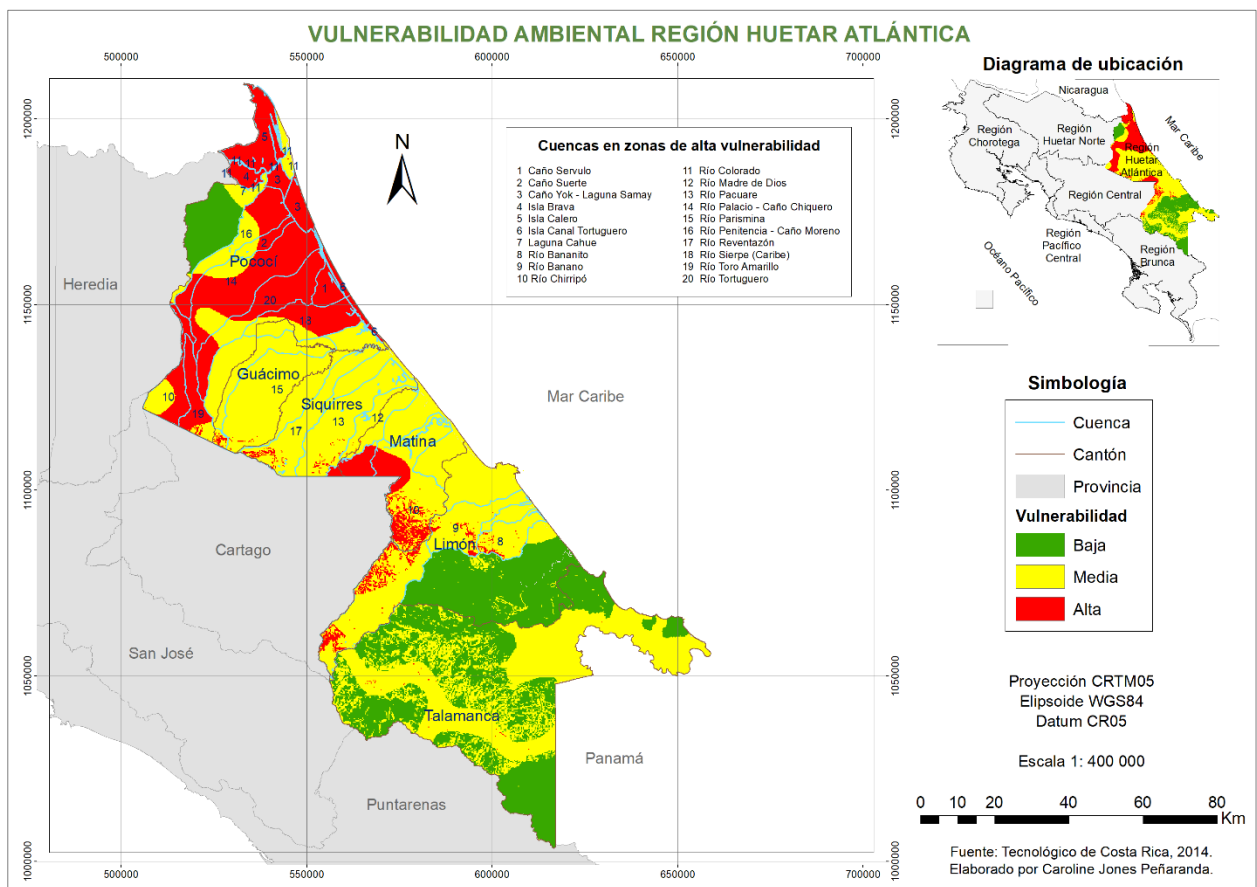


Figura 5. Mapa de vulnerabilidad en región Huetar Atlántica.

5. Metodología

Para establecer el plan de monitoreo, se indicará el procedimiento de análisis de calidad de aguas superficiales integrado por ensayos de toxicidad con hidras, la determinación de parámetros físico-químicos en aguas superficiales y la evaluación de impacto ambiental.

Sitios de muestreo: son seleccionados de acuerdo con el nivel de vulnerabilidad al cual están expuestas las cuencas por su cercanía a áreas de cultivo de piña. Se toman en cuenta los puntos donde se registra mayor escorrentía, precipitación y pendiente, que favorecen el desplazamiento de los plaguicidas a las aguas superficiales.

Toma de muestras: se debe realizar según lo establecido en el Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales, Decreto N° 33903-MINAE-S.

Frecuencia: el muestreo se repite para época seca, lluviosa y las dos de transición.

5.1. Análisis con hidras

Se debe seguir el protocolo: Bioensayo Agudo con *Hydra attenuata* según Trottier et al. (1997) establecido por la OECD. Este comprende los pasos a seguir en los ensayos en laboratorio para estudiar los cambios letales y subletales de las hidras ante muestras de agua. Estos análisis indican su sensibilidad ante contaminantes y, por lo tanto, posibles efectos en la fauna acuática.

5.2. Análisis físico-químico

Los parámetros por analizar según el Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales, Decreto N° 33903-MINAE-S; corresponden a Porcentaje de oxígeno disuelto, demanda bioquímica de oxígeno y nitrógeno amoniacal. Además, se incluirán los parámetros de temperatura, conductividad, pH y turbidez; y otros complementarios como concentraciones de nutrientes en agua y sustrato. Una vez realizado el primer ciclo de muestreo el comité evaluador debe analizar si es necesario, incorporar o excluir parámetros físico-químicos o puntos de monitoreo en cada cuenca.

5.3. Evaluación de impacto ambiental

Se debe aplicar la matriz de Leopold para realizar la evaluación de impacto ambiental de la región. La matriz está integrada en la parte superior por columnas que indican las acciones causantes de impactos y en la sección izquierda por filas con factores ambientales implicados en el cultivo de piña (Cuadro 1). En la parte central donde convergen los aspectos anteriores se encuentran cuadros con una línea diagonal (Cuadro 2). Estos cuadros deben ser rellenados de la siguiente manera: en el espacio superior se coloca la magnitud del impacto y en el espacio inferior se escribe la importancia. Se utiliza una escala de 1 a 10, donde 10 representa la mayor magnitud o importancia y 1 la mínima. Se deben sumar las calificaciones de las filas y las columnas, por lo tanto, los impactos significativos corresponden a los puntajes más altos. Estos deben ser evaluados para proponer medidas de mitigación (Bucheli, 2015).

Cuadro 1. Factores ambientales y acciones causantes de efectos ambientales implicados en los cultivos.

| Factores ambientales | | | | | Acciones causantes de efectos ambientales | |
|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------------|--|---|
| Componente físico | | | Componente biológico | | | |
| Suelo | Agua | Aire | Flora | Fauna | | |
| Recursos minerales. | Calidad. Temperatura. | Calidad (gases y partículas). | Árboles. Arbustos. Cultivos. | Aves. Animales terrestres. | Control biológico. Control de malezas. | Ruidos y vibraciones. Vertederos. |
| Geomorfología. Erosión. | Precipitación. Escorrentía. | | Plantas acuáticas. | Animales acuáticos. Microfauna. | Modificación del hábitat. Alteración de la cubierta terrestre. | Adecuaciones sobre el paisaje. Utilización de abonos. |
| Sedimentación. | Recarga. | | | | Control del río y modificación del caudal. Riego. | Reciclado de residuos. Fertilización. Estabilización química del suelo. |

Fuente: Elaboración propia (2020) con datos de Bucheli (2015).

Cuadro 2. Matriz de Leopold.

| FACTORES AMBIENTALES | | | ACCIONES QUE CAUSAN EFECTOS AMBIENTALES | | | | | | | | | | | | EVALUACIONES | | |
|----------------------|-------|-----------------------------|---|--------------------|--------------------------|-------------------------------------|---|-------|----------------------|------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|--------------|----------------------------------|---|
| | | | Control biológico | Control de malezas | Modificación del hábitat | Alteración de la cubierta terrestre | Control del río y modificación del caudal | Riego | Ruidos y vibraciones | Vertederos | Adecuaciones sobre el paisaje | Utilización de abonos | Reciclado de residuos | Fertilización | | Estabilización química del suelo | |
| COMPONENTE FÍSICO | SUELO | Recursos minerales | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | |
| | | Geomorfología | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| COMPONENTE FÍSICO | AGUA | Calidad | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | |
| | | Temperatura | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| COMPONENTE FÍSICO | AIRE | Calidad (gases, partículas) | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | |
| COMPONENTE BIOLÓGICO | FLORA | Árboles | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | |
| | | Arbustos | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| COMPONENTE BIOLÓGICO | FAUNA | Aves | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | |
| | | Animales terrestres | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| EVALUACIONES | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Fuente: Elaboración propia (2020) con datos de Bucheli (2015).

5.4. Red de monitoreo

En el Cuadro 3 se presenta la propuesta de monitoreo que incluye las cuencas a analizar.

Cuadro 3. Red de monitoreo de las cuencas en las zonas de alta vulnerabilidad ambiental de la Región Huetar Atlántica.

| Punto | Cuenca | Coordenadas | |
|-------|---|-------------|----------|
| | | Latitud | Longitud |
| 1 | Caño Servulo | 1154369 | 555336 |
| 2 | Caño Suerte | 1167011 | 537924 |
| 3 | Caño Yok – Laguna Samay – Caño la Palma | 1178947 | 545924 |
| 4 | Isla Brava | 1184982 | 533374 |
| 5 | Isla Calero | 1195235 | 537389 |
| 6 | Isla Canal Tortuguero | 1152956 | 561242 |
| 7 | Laguna Cahue | 1180553 | 533038 |
| 8 | Isla Bananito | 1087592 | 604259 |
| 9 | Río Banano | 1090978 | 593258 |
| 10 | Río Chirripó | 1093949 | 563967 |
| 11 | Río Colorado | 1188704 | 541320 |
| 12 | Río Madre de Dios | 1119259 | 569200 |
| 13 | Río Pacuare | 1118503 | 560345 |
| 14 | Río Palacio – Caño Chiquero | 1156239 | 533356 |
| 15 | Río Parismina | 1127218 | 543729 |
| 16 | Río Penitencia – Caño Moreno | 1167888 | 532051 |
| 17 | Río Reventazón | 1118690 | 549535 |
| 18 | Río Sierpe (Caribe) | 1145733 | 549598 |
| 19 | Río Toro Amarillo | 1123299 | 520620 |
| 20 | Río Tortuguero | 1148166 | 537611 |