

Estudi de l'impacte ecotoxicològic de l'insecticida Imidacloprid en diferents compartiments ambientals.

Carla Ribalta Carrasco ^{a,b}, Jaume Bori Dols ^b, Xavier Domene Casadesus ^a, M. Carme Riva Juan ^b.

^a Centre de Recerca i Innovació en Toxicologia (CRIT-UPC)

^b Universitat Autònoma de Barcelona

Paraules clau

Imidacloprid, Confidor, Dosis aplicació, Ecotoxicologia, Lixiviació, *Eisenia fetida*, *Daphnia magna*, *Selenastrum capricornutum*.

Resum

En les darreres dècades la necessitat d'una major producció en l'agricultura ha implicat l'ús de productes químics per a millorar la producció. Entre aquests productes trobem els insecticides que, tot i ser específics per a determinades funcions, en molts casos acaben afectant també a altres organismes que no en són la diana. Els assajos d'ecotoxicitat són una eina clau per a determinar el grau d'afectació d'aquests insecticides. En aquest estudi es pretén determinar l'efecte de l'aplicació directa en el sòl de les dosis recomanades de l'insecticida Confidor 20SL (amb imidacloprid com a principi actiu) sobre *Eisenia fetida* i dels lixiviats d'aquests sòls sobre *Daphnia magna* i *Selenastrum capricornutum* simulant fenòmens d'escorrentia o lixiviació naturals. En el cas de *E.fetida* s'obté una LC50 de 24.71 mg/kg sòl i per la reproducció un valor de EC50 de 8.41 mg/kg sòl. S'observa allunyament en totes les dosis utilitzades i la EC50 és de 2.57 mg/kg sòl. No s'han pogut determinar efectes a nivell neurològic a partir de la determinació de l'activitat de l' AChE. A l'exposar *D.magna* als lixiviats del sòl contaminat no s'han observat efectes clars ni en la mortalitat ni en la reproducció. El mateix succeeix amb *S.capricornutum*. Les dosis d'aplicació del pesticida Confidor, representen una amenaça per a *E.fetida* pel que fa a efectes subletals però no podem dir el mateix per als organismes aquàtics.

Resumen

Durante las últimas décadas la necesidad de una mayor producción en la agricultura ha implicado el uso de productos químicos para mejorar la producción. Entre estos productos encontramos los insecticidas que, aun siendo específicos para determinadas acciones, en muchas ocasiones afectan también a organismos no diana. Los ensayos de ecotoxicidad constituyen una herramienta esencial para determinar el grado de afectación de estos insecticidas. En este estudio se pretende determinar el efecto de la aplicación directa en el suelo de las dosis recomendadas del insecticida Confidor 20SL

(con imidacloprid como principio activo) sobre *Eisenia fetida* i de los lixiviados de este suelo sobre *Daphnia magna* i *Selenastrum capricornutum* simulando efectos de escorrentía i lixiviación naturales. En el caso de *E.fetida* se obtiene una LC50 de 24.71 mg/kg suelo y para la reproducción un valor de EC50 de 8.41 mg/kg suelo. Se observa alejamiento en todas las dosis utilizadas con una EC50 de 2.57 mg/kg suelo. No se han podido determinar efectos a nivel neurológico a partir de la determinación de la actividad de la AChE. Al exponer *D.magna* a los lixiviados del suelo contaminado no se han observado efectos claros ni en la mortalidad ni en la reproducción. Lo mismo sucede con *S.capricornutum*. Las dosis de aplicación del pesticida Confidor, representan una amenaza para *E.fetida* a nivel de efectos subletales pero no podemos decir lo mismo para los organismos acuáticos.

Abstract

During the last decades, the need of increasing agricultural production in has triggered the use of many chemicals to improve production. Among these products we find insecticides that, despite their specificity for certain functions, can effect non- target organisms. Ecotoxicity tests have become a key tool to determine how these insecticides affect the enviroment. This study aims to determine the effects that the direct application of field doses of the insecticide Confidor (a.i imidacloprid) on soil cause to *Eisenia fetida*, and the effects that leachates from these soils have on *Daphnia magna* and *Selenastrum capricornutum*, simulating natural effects of run-off and leaching. In the case of 1.reproduction was 8.41 mg/kg soil. Avoidance response was observed in all concentrations and the EC50 was 2.57 mg/kg soil. Effects at neurological level by determination of acetylcholine esterase activity determinations could not been determined. Exposure of *D.magna* to leachates from contaminated soils showed no effects in mortality or in reproduction. The same occurred with *S.capricornutum*. The application of the pesticide Confidor in its file doses, represent a threat for *E.fetida* at sublethal levels but the same cannot be said for aquatic organisms.

1. Introducció

Un dels molts problemes ambientals és l'ús massiu de pesticides, el qual ha crescut enormement des del s.XIX i especialment a partir dels anys 1950 degut als canvis en el model de producció necessaris per abastir una població humana creixent (McNeill, 2001). Els plaguicides van suposar una gran solució a la fam i a les malalties i s'estima que un 30% de l'augment de la productivitat dels conreus es deguda exclusivament al seu ús (Olivera i Rodriguez,1999)

Tot i l'evidència d'aquests efectes positius no s'ha d'oblidar que són substàncies químiques que tot i estar dissenyades per afectar específicament les plagues, tenen potencials efectes per a organismes no diana, podent afectar tant els ecosistemes adjacents a les zones agrícoles com als humans.

L'aplicació de pesticides al sòl pot comportar una contaminació irreversible d'aquest medi eliminant així formes de vida essencials i produint-ne la seva degradació, ja que els cicles naturals del nitrogen, la matèria orgànica... es veuen afectats (Olivera i Rodriguez, 1999).

A més, la mobilitat d'alguns d'ells entre els diferents compartiments ambientals (aigua-aire-sòl) i la seva persistència en el medi així com l'acumulació deguda a males practiques agrícoles poden agreujar aquests problemes. Finalment, per a molts pesticides, i malgrat els requeriments legals de descartar els seus riscos directes per l'ambient i l'home, es desconeixen els seus efectes additius amb altres substàncies o a llarg termini .

La contaminació dels cursos hídrics es produeix de forma directa per l'aplicació de pesticides en les aigües (arrossars), pel rentat d'envasos o equips i per descàrrega de residus. És també molt important la contribució indirecta produïda per la lixiviació (infiltració) i escorrentia superficial de productes que contaminen aigües subterrànies, zones humides, rius, llacs i fins i tot oceans (Olivera i Rodriguez, 1999).

Tradicionalment, per a la determinació de la qualitat dels diferents compartiments ambientals s'han utilitzat mètodes d'anàlisi químics que permeten determinar el tipus de compostos i la concentració en que es troben. Tot i això, aquests mètodes presenten importants limitacions com ara la necessitat d'equips i mètodes sofisticats, la necessitat de sobrepassar un llindar mínim per a la seva detecció o la gran dificultat en detectar tots els contaminants presents en una mescla. Degut als inconvenients dels mètodes químics citats anteriorment s'han desenvolupat mètodes alternatius basats en l'estudi dels efectes d'aquestes substàncies com és el cas dels assaigs biològics emprats en ecotoxicologia, una branca de la toxicologia que estudia els efectes tòxics de les substàncies químiques sobre els organismes vius a través de la realització d'assajos d'ecotoxicitat. L'avaluació del risc ecològic es fa en base al grup biològic que es pretén protegir, com són els organismes del sòl, els organismes aquàtics o els vertebrats terrestres.

2. Objectius

L'objectiu d'aquest projecte és determinar l'impacte que l'insecticida Imidacloprid (IMI), en la seva formulació comercial Confidor 20SL, pot representar sobre el medi tenint en compte els potencials efectes sobre el sòl, on s'aplica de forma directe, i el medi aquàtic, on hi va a parar de forma indirecte a partir de la lixiviació o l'escorrentia superficial. Per a poder complir l'objectiu s'utilitzaran assajos d'ecotoxicitat sobre un organisme terrestre (*E.fetida*) i sobre dos aquàtics (*D.magna* i *S. capricornutum*) i l'avaluació de biomarcadors (activitat de l'enzim AChE).

3. Materials i mètodes

3.1. Substància test, sòl test i preparació lixiviats.

El pesticida utilitzat per a fer aquest estudi ha estat Confidor 20LS (Bayer).

El sòl utilitzat de classe textural franca (pH= 7.2, 10.74% matèria orgànica, 37.4% llim, 24.1% argila, 38.5% arena, 6.24% C, 0.37% N, CIC= 22.8 meq/100g s.m.s) procedia d'una zona boscosa de Terrassa. En el mostreig es va agafar mostra dels 20 primers cm. Abans de ser utilitzat per als assajos va ser tamisat a 2mm, i se'n va determinar la humitat i WHC per tal de poder-la ajustar al 60% en els assajos realitzats.

Els assaigs de toxicitat aquàtica es van fer utilitzant lixiviats obtinguts de sòl contaminat amb el mateix rang de concentracions utilitzades en els assaigs de toxicitat terrestre. Per a l'obtenció dels lixiviats es va seguir la norma UNE-EN 12457-2 (2003). Es va posar una relació líquid- sòlid de 10 l – 1kg. Com a lixiviant es va utilitzar el medi corresponent segons l'assaig. Es va agitar durant 24hores en fosc, es va deixar decantar entre 30 min i 2 hores, es va centrifugar a 4000rpm durant 10min, i es va filtrar per separar restes vegetals flotants. Van se congelats fins al moment del seu ús.

3.2. Organismes test

3.2.1. *Eisenia fetida*

Els cucs utilitzats procedien de cultius sincronitzats, van estar mantinguts en una mescla de torba i fems 1:1, a una temperatura de 20 ± 2 °C i amb un fotoperíode de 12 hores de llum i 12 hores de fosc. Van estar alimentats amb una pasta de pà i aigua un cop a la setmana. Per als assajos es van utilitzar cucs adults de com a mínim dos mesos d'edat. Per als assajos de supervivència i reproducció es van seleccionar individus amb un pes d'entre 300 i 600 mg i clitel·lats, mentre que per a l'assaig d'evitament no era necessari que els cucs presentessin clitel·li. Abans de l'inici dels assajos els cucs van ser aclimatats com a mínim durant 24 hores en 3 kg de sòl control ajustat al 60% de la seva WHC.

3.2.2. *Daphnia magna*

Les dàfnies utilitzades en els experiments d'aquest estudi procedien de cultius sincronitzats. Tres cops per setmana es renovava el medi, enriquit amb un extracte de matèria orgànica, i s'afegia com a aliment un concentrat de *Chlorella vulgaris*. El medi utilitzat correspon a l'ASTM E729-96 (2007) de pH 7.8-8.0. Els cultius es mantenien a una temperatura de 20 ± 2 °C i amb un fotoperíode de 16 hores de llum i 8 de fosc. Per als experiments no es van utilitzar dàfnies de més de 24 hores d'edat ni procedents de la primera posta.

3.2.3. *Selenastrum capricornutum*

Els cultius eren mantinguts en condicions d'esterilitat a una temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ i amb il·luminació permanent d'aproximadament 4000-5000 lux. El medi de cultiu utilitzat correspon a la norma AFNOR T 90-304 (1982), amb un pH entre 6.9-7.2. Per a la realització dels assajos es va utilitzar algues en fase de creixement exponencial.

3.3. Assajos de toxicitat

Es van seleccionar la concentració mínima i màxima d'aplicació del producte i es varen relacionar entre si utilitzant un factor de 2 per a representar concentracions probables de trobar en el medi. Per a l'assaig de toxicitat aguda no es van utilitzar aquestes concentracions ja que es va utilitzar com a eina de cribratge.

3.3.1. Assaig de toxicitat aguda amb *E.fetida*

Es va realitzar l'assaig basant-nos en la norma OECD 207 (1984) i la UNE-77304-1 (1999) per determinar la LC50 a 7 i 14 dies. Primer es va realitzar un assaig preliminar i a continuació es va realitzar un definitiu utilitzant un factor geomètric de 1.3. Es van realitzar 4 rèpliques per concentració (10 cucs per rèplica) de 750g cada una més 4 per al control. Amb una solució aquosa amb una concentració coneguda es va contaminar el sòl i es va ajustar la humitat al 60% de la WHC. Finalment els recipients es van cobrir amb una tapa que permetia l'intercanvi gasós i es van mantenir a una temperatura i llum constants ($20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, 400-800 lux). Els cucs no van ser alimentats durant l'assaig.

3.3.2. Assaig d'evitament amb *E.fetida*

L'assaig es va dur a terme basant-se en la norma ISO 17512-1 (2008). Es van preparar 5 rèpliques per cada concentració i cada rèplica era constituïda per dues seccions de 350 g de sòl cadascuna (pes sec), una amb sòl control i l'altra amb sòl test (sòl tractat amb el producte d'assaig). Addicionalment, es van preparar 5 recipients control que contenien sòl control en ambdues parts per tal d'excloure comportaments anòmals no atribuïbles a l'insecticida. Finalment els recipients van ser coberts amb una tapa que permetés l'intercanvi gasós i es van mantenir a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i llum contínua de 400-800 lux. Durant l'assaig els cucs no van ser alimentats. Es va determinar el percentatge d'evitament a les 48h.

3.3.3. Assaig de toxicitat crònica amb *E.fetida*

L'assaig es va dur a terme segons la norma OECD 222 (2004). Per cada concentració es van preparar 4 rèpliques (10 cucs cada una) juntament amb 4 controls. A cada rèplica es van afegir 500 g de sòl (pes sec). Finalment, els recipients es van cobrir amb una tapa que permetés l'intercanvi gasós, i es van

mantenir a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i entre 400-800 lux constants. L'assaig va tenir una durada total de 56 dies, els cucs eren alimentats dos cops per setmana amb 2 g de pà fins al dia 28. En aquest dia els cucs adults es van retirar (se'n va mirar mortalitat i deferències en el pes) i es va continuar incubant el sòl fins al dia 56 per tal de permetre l'emergència i creixement de la descendència. Del dia 28 al 56 els juvenils es van alimentar un cop per setmana amb 2 g de pà.

3.3.4. Biomarcadors (activitat AChE) *E.fetida*

Es van exposar els cucs a les diferents concentracions ja definides més un control. Es van preparar 3 rèpliques per concentració, cadascuna amb deu individus, en recipients, condicions ambientals i amb característiques dels cucs idèntiques a les descrites per a l'assaig de toxicitat crònica. També es va fer un seguiment de la humitat, i es va afegir aliment a partir del dia 14 dos cops per setmana en forma de 2 g de pà. Es van triar a l'atzar 3 cucs de cada rèplica al cap de 48 hores, 14 i 28 dies, coincidint amb els temps d'exposició de l'assaig d'allunyament, toxicitat aguda i toxicitat crònica respectivament. La detreminació de l'activitat es va fer segons el procediment descrit per Ellman et al. (1961).

3.3.5. Assaig de toxicitat aguda amb *Daphnia magna*

L'assaig es va realitzar en base a la norma OECD 202 (2004). Les dàfnies eren directament exposades als diferents lixiviats obtinguts dels sòls. Per a cadascun dels 5 lixiviats es van preparar 4 rèpliques amb 5 dàfnies cadascuna, fent un total de 20 dàfnies per concentració d'assaig. Cada rèplica consistia en un tub de vidre amb 10 ml del lixiviat corresponent. Es van mantenir en un incubador a 21°C i en fosc total. La supervivència es va determinar visualment a les 24 i 48 hores d'assaig.

3.3.6. Assaig de reproducció amb *Daphnia magna*

L'assaig es va realitzar en base a la norma OCDE 211 (2008). Es van exposar les dàfnies directament als 5 lixiviats del sòl contaminat més el lixiviat del sòl control sense contaminar. Per cada concentració es van preparar 10 rèpliques de 100ml de lixiviat amb una sola dàfnia per cadascuna. El lixiviat es renovava 3 cops per setmana durant l'assaig. Es van alimentar de la manera descrita en el punt 3.2.2. Les rèpliques es van mantenir durant els 21 dies d'assaig en una cambra a una temperatura controlada de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ i amb un fotoperíode de 16 hores de llum i 8 de fosc.

3.3.7. Assajos de toxicitat amb *Selenastrum capricornutum*

L'assaig es va realitzar en base a la norma OECD 201 (2011). Per cada una de les concentracions es van preparar 3 rèpliques consistents en un tub, a cadascuna de les quals es van afegir 9 ml del lixiviat i a continuació es va afegir

1 ml d'inòcul d'algues de concentració coneguda per saber quina era la concentració d'algues inicial en els tubs. Els tubs es tapaven amb cotó i duïen a la cambra de cultius, on eren col·locats en un agitador orbital a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ amb il·luminació continuada d'intensitat entre 4000-5000 lux. Tant el material com les condicions de treball eren d'esterilitat (excepte els lixiviats) fins al moment de dur els tubs a la zona d'assaig.

3.3.8. Anàlisi estadístic

L'anàlisi de les dades es va realitzar amb els paquets estadístics SPSS, Minitab i Statistica. Les concentracions letals per al 50% dels individus (LC50) es van determinar per probit analysis (Statistica). Les concentracions efectives corresponents a la inhibició del 50% (EC50) es van calcular per regressió no-lineal (Statistica) mentre que els corresponents a l'evitament es va determinar per probit analysis (Minitab).

Les diferències en els paràmetres biològics letals i subletals de tots els organismes entre el controls i cadascuna de les concentracions de substància test, per tal d'estimar la LOEC i la NOEC es van realitzar amb el test post-hoc de Dunnet, mentre que l'evitament es va avaluar amb el test de Fisher.

4. Resultats i Discussió

4.1. Assaig de toxicitat aguda amb *Eisenia fetida*

Es va calcular la EC50 mitjançant l'anàlisi probit ajustat a un model logístic, els resultats obtinguts es presenten en la següent taula .

Concentració	LC50	Mínim (confiança 95%)	Màxim (confiança 95%)	R del model
mgConfidor/kg ss	24.71	23.30	26.20	0.997
mgIMI/kg ss	4.23	3.99	4.48	0.997

Taula 1. Toxicitat aguda (LC50) per a *E. fetida* de la substància testada, expressada com a LC50 del producte comercial i del principi actiu (imidacloprid).

Amb la realització del test de Dunnet es van poder calcular els valors de NOEC i LOEC que són 15.21 i 19.77 mg Confidor/kg sòl respectivament.

Veiem que no hi ha efectes letals en les dosis d'aplicació. Tot i així cal destacar que la EC_{50} i els valors de NOEC i LOEC són molt propers al doble de la dosi màxima d'aplicació del producte. Podem dir que la seva aplicació podria arribar a ser perillosa per a la supervivència dels organismes estudiats si no se'n fa un ús correcte. Els resultats obtinguts concorden molt bé amb els de Luo et al. (1999), on obtenen una LC_{50} als 14 dies de 2.30 mg IMI/kg sòl, valor molt pròxim a l'obtingut tenint en compte les diferències que hi pugui haver en la realització de l'experiment. No succeeix el mateix amb els resultats obtingut per Alves (2012), en que s'obté una LC_{50} als 14 dies de 25.53 mg IMI/kg sòl.

4.2. Assaig d'evitament amb *E.fetida*

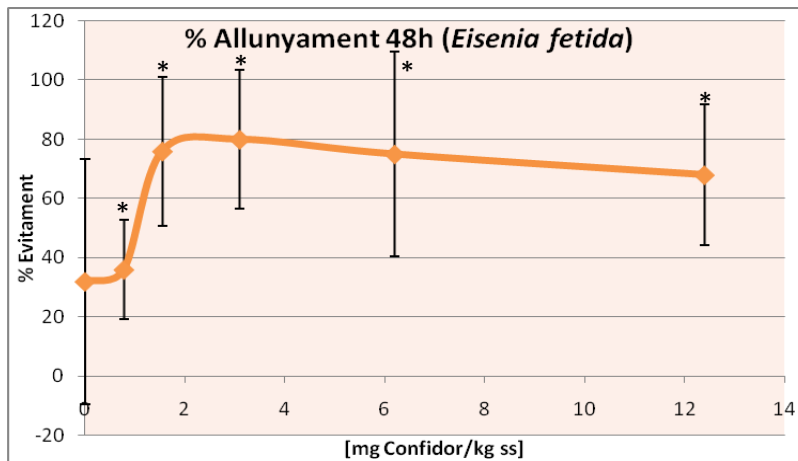


Figura 1. Comportament d'evitament de *E. fetida* a concentracions creixents de l'insecticida. Les concentracions marcades amb * presenten allunyament estadísticament significatiu segons el test de Fisher (veure resultats del test Taula 2 annex) acceptant H_0 (no hi ha allunyament/ n° organismes que es queden al sòl contaminat) si $P \geq 0.005$.

Els resultats mostren un evitament estadísticament significatiu des de la primera de les concentracions utilitzades.

El percentatge d'evitament, mitjançant anàlisi probit, ajustant amb una distribució logística i utilitzant el programa Minitab, ens va permetre calcular la EC_{50} així com la $NOEC$ i $LOEC$ per aquest paràmetre: $EC_{50} = 2.57$ (1.86, 3.21) mg Confidor/kg sòl, $EC_{50} = 0.43$ (0.31, 0.54) mg IMI/kg sòl, $LOEC = 0.78$ mg Confidor/kg i $NOEC =$ entre 0 i 0.78 mg Confidor/kg. Els resultats obtinguts comparats amb els obtinguts per Alves (2012) concorden força bé, ells obtenen una EC_{50} de 0.11 mg IMI/kg mentre que en el nostre cas és de 0.43 mg IMI/kg. Creiem que l'efecte de disminució de l'allunyament a les dosis més altes pot ser degut a l'efecte en el sistema nerviós que produeix l'insecticida i que limita la capacitat de resposta dels organismes.

4.3. Assaig de toxicitat crònica amb *E. fetida*

Amb els resultats de número de juvenils a 56 dies es va realitzar un anàlisi probit utilitzant un model hormètic i es van obtenir uns valor de $EC_{50} = 8.41$ (12.87, 5.38) mg Confidor/kg sòl o 1.40 (2.145, 0.897) mg IMI/kg sòl ($R^2 = 0.989$). Els resultats poden observar-se en la següent figura.

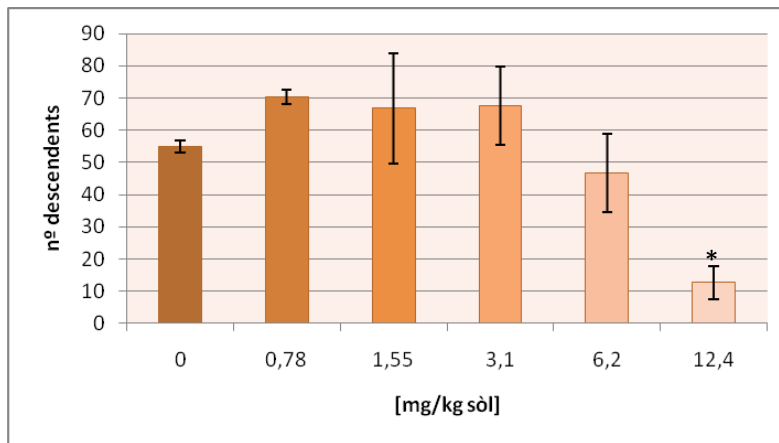


Figura 2. Nombre de juvenils d'*E. fetida* en les diferents concentracions test. L'asterisc indica diferències significatives respecte el control utilitzant el test estadístic de Dunnet

S'observa en les tres primeres concentracions un lleuger augment respecte el control en el número de descendents, i després comença a disminuir arribant a la concentració màxima on la disminució respecte el control és de gairebé el 80%.

El nostre valor de EC₅₀ és lleugerament inferior a l'obtingut per Alves et al. (2012) en que obtenen una EC₅₀ de 4.07 mg IMI/kg, i Gomez-Eyles et al. (2009) amb una EC₅₀ de 3.23 mg IMI/kg

Amb els càlculs realitzats amb la diferencia de pes entre l'inici i el final es va realitzar el següent gràfic.

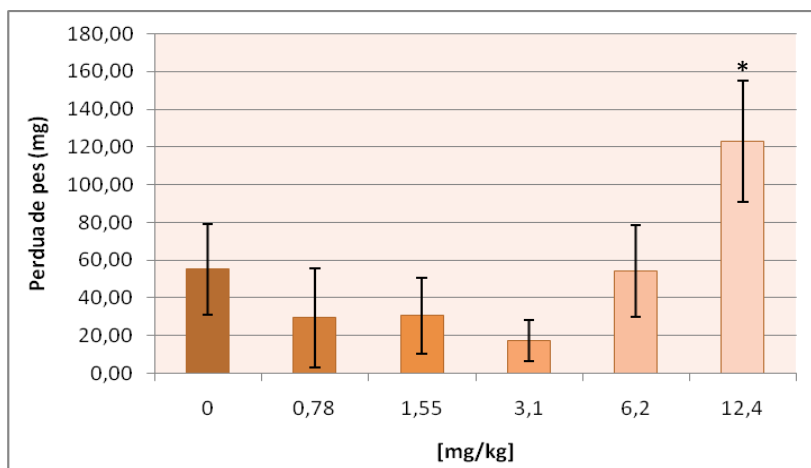


Figura 3. Pèrdua de pes d'*E.fetida* per les diferents concentracions testades. L'asterisc representa diferències estadísticament significatives respecte el control utilitzant el test de Dunnet.

En les tres primeres concentracions els organismes perden inclús menys pes que en el control i en les dues últimes la pèrdua augmenta, especialment en la major de les concentracions en que la pèrdua de pes és més del doble que al control. Altres autors han descrit una pèrdua de pes en aquesta espècie en condicions i concentracions similars (Alves et al. 2012, Dittbrenner et al. 2011).

4.4. Biomarcadors (Activitat AChE)

Amb els resultats de les lectures d'absorbància realitzades en la determinació de la proteïna i l'activitat de l'enzim AChE es va calcular l'activitat en nmols/mg*min per cada rèplica de cada una de les concentracions. . Es varen realitzar els promitjos i les desviacions per a cada una de les concentracions i es realitzaren els següents gràfics que mostren els resultats obtinguts amb individus exposats durant 48 hores, 14 i 28 dies respectivament.

Els resultats obtinguts a les 48 hores mostren una lleugera disminució de l'activitat a mesura que augmenta la concentració sense ser estadísticament significatives (test de Dunnet). Contrastant amb aquests, els obtinguts a 14 dies mostren un lleuger augment amb l'increment de la concentració. Per últim els obtinguts als 28 dies no mostren cap tendència clara. Capoweiz et al. (2003) tampoc veu cap relació entre l'activitat de l'AChE i l'augment de la concentració, però si que destaca l'augment estadísticament significatiu de les proteïnes el que fa pensar que si que hi ha una resposta general a l'insecticida.

4.5. Assaig de toxicitat aguda *D. Magna*

Els resultats que mostren un 100% de supervivència de les dàfnies exposades a totes les concentracions utilitzades excepte en la més elevada en que la supervivència es redueix al 95%. Els resultats obtinguts són els esperats ja que les concentracions d'imidacloprid de tots els llixiviats assajats són molt menors a la EC_{50} estimada en l'estudi de Tisler et al. (2009) ($LC_{50(48hores)} = 56.6 \text{ mgIMI/L}$; $NOEC_{21d} = 1.25 \text{ mg/L}$).

4.6. Assaig de toxicitat crònica *D. magna*

El percentatge de supervivència observada en totes les concentració va ser del 100% a 21 dies.

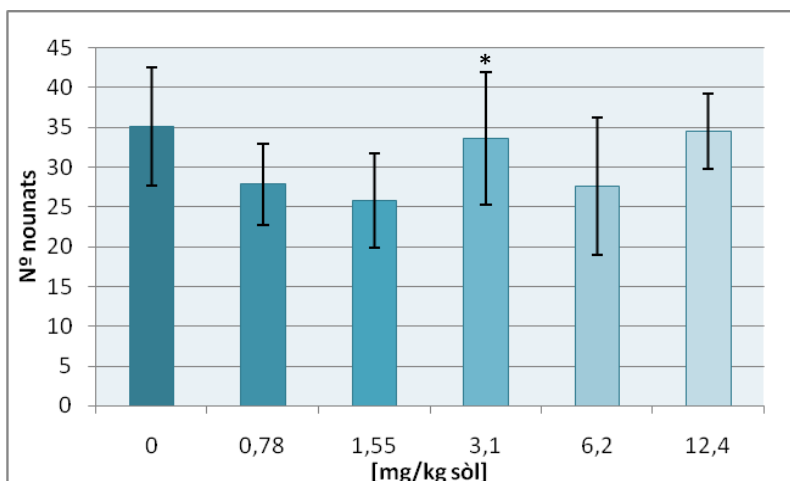


Figura 4. Número de nounats mitjà per dàfnia a 21 dies. L'asterisc representa diferències significatives utilitzant el test de Dunnet.

Pel que fa a possibles diferències en el numero de nounats per dàfnia no s'observa cap tendència clara que indiqui que aquest disminueixi a mesura que augmentem la concentració. En algunes concentracions intermitges s'observa un disminució del número de nounats totals.

Pel que fa al dia i la mida de la primera posta no s'observa cap tendència clara i no es veuen diferències respecte el control. El mateix succeeix amb el numero total de postes.

Podríem dir que cap dels paràmetres analitzats en cap de les concentracions presentava diferències significatives respecte el control. Els resultats concorden amb els obtinguts per Jamec et al. (2007) en que va obtenir una LOEC d'entre 2.5 i 10 mg IMI/L segons el paràmetre estudiat dins els efectes en la reproducció.

4.7. Assaig d'inhibició del creixement de *S.capricornutum*

Amb les taxes de creixement calculades es va realitzar el següent gràfic.

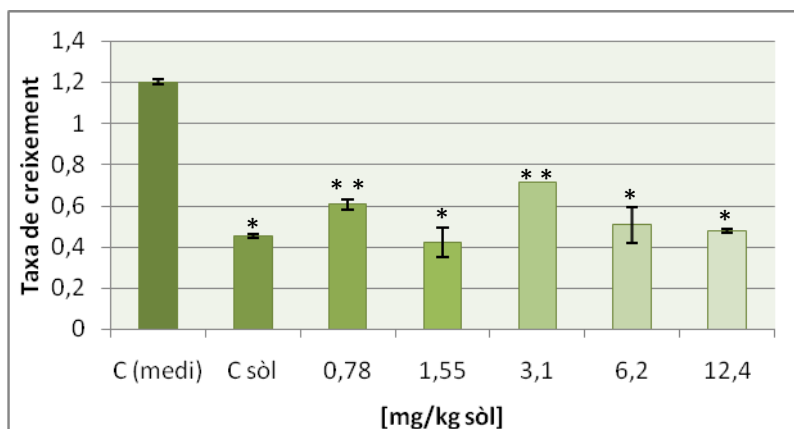


Figura 5. Taxa de creixement per a les diferents concentracions. Un asterisc representa diferències significatives respecte el control (medi), i dos asteriscs representen diferències (Dunnet) respecte el C (medi) i el C sòl.

S'observen diferències significatives quan comparem tot els lixiviat estudiats amb el control (medi). Les taxes de creixement es redueixen pràcticament en tots a menys de la meitat. Quan comparem amb el control (lixiviat del sòl sense contaminar) observem diferències significatives a les concentracions de 0.78 i 3.1, que tenen taxes de creixements majors. Tot i obtenir disminucions importants en la taxa de creixement, no podem dir que sigui deguda al pesticida. El que sí s'intueix és que el lixiviat del sòl té un efecte negatiu sobre el creixement de les algues.

5. Conclusions

L'ús de l'insecticida Confidor 20SL en les dosis recomanades pel fabricant presenta un perill potencial per a *Eisenia fetida* ja que tot i no observar-se

efectes letals s'observen efectes subletals greus, amb una EC50 per la reproducció molt propera a la dosi recomanada d'aplicació i respostes d'evitament de fins el 80% a dosis encara més baixes. Amb els resultats obtinguts podem dir que l'ús d'aquest insecticida pot influir en la presència d'espècies similars en els sòls, amb la conseqüent pèrdua de biodiversitat i la pèrdua de les funcions beneficioses realitzades per aquests organismes. Així doncs creiem que cal garantir-ne l'aplicació correcta i establir una regulació en el seu ús.

Pel que fa al risc de transferència de l'insecticida a ecosistemes aquàtics simulat amb la preparació de lixiviats a partir de sòl contaminat, la manca d'efectes nocius en els organismes aquàtics estudiats fa pensar que no hi hauria perill real en cap de les dosis estudiades.

El disseny de l'estudi realitzat ens ha permès aconseguir els objectius fixats inicialment. En base als resultats, tots els bioassajos seleccionats van ser adequats per a respondre les preguntes experimentals, excepte l'activitat de l'AChE, ja que no està directament afectada per l'insecticida.

Els resultats d'aquest treball suggereixen noves preguntes experimentals, com si és possible un efecte acumulatiu de les aplicacions reiterades de l'insecticida sobre el sòl, ja que tot i no ser tant persistent com altres pesticides, la seva durada en el sòl està estimada entre els 100 i 300 dies. També fer estudis d'ecotoxicitat amb altres organismes test amb protocols estàndard disponibles, com col·lèmbols i enquitreids o altres, per tal de valorar amb més rigor els riscos ambientals d'aquest insecticida i poder valorar la seva restricció o prohibició.