



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

Efectos subletales de malatión sobre variables demográficas de tres especies de cladóceros (Cladocera): *Daphnia pulex* Leydig, *Diaphanosoma birgei* Korinek y *Moina macrocopa* Goulden

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
ESMERALDA BRAVO HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Singaraju Sri Subrahmanya Sarma
Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM

COMITÉ TUTOR
Dra. Cecilia Vanegas Pérez. Facultad de Ciencias. UNAM
Dr. Martín Frías-Espéricueta. Facultad de Ciencias del Mar. UAS
Dr. José Luis Gama Flores. Facultad de estudios superiores Iztacala. UNAM
Dr. Marcelo Silva Briano. Departamento de Biología. UAA

Ciudad de México,

Agosto 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Uno escribe para tratar de responder
a las preguntas que le zumban en la cabeza,
moscas tenaces que perturban el sueño”

E. Galeano

AGRADECIMIENTOS

A mi familia.

A mis padres, Armando Bravo y Gabriela Hernández, con todo mi amor. Infinitamente agradecida por lo que me han enseñado, por todo el apoyo a lo largo de mi vida, por su cariño y cuidado.

A mi hermano, Armando, por sus consejos, ayuda, complicidad, por todo.

A mis profesores.

Dr. S.S.S. Sarma por darme la oportunidad de realizar este trabajo con él, por todo su apoyo y confianza.

A la Dra. Cecilia Vanegas, Dra. Luz María García de la Parra[†], Dr. Marcelo Silva, al Dr. Martín Frías-Espericueta y el Dr. José Luis Gama Flores. Gracias a todos por sus puntuales y acertadas observaciones lo mismo que generosas, durante mi formación en el posgrado.

A la Dra. Nandini Sarma, por toda su incondicional atención, consejos y ayuda.

A mis amigos.

A Gerardo García, agradezco bastante toda su paciencia y ayuda para resolver mis dudas, que no eran pocas; a Diego, agradezco y admiro su disponibilidad para ayudar. A Meeztli, Romina, Rocío, Aurora, Brenda, Rosa, Cesar, Michael, Jesús agradezco los buenos momentos y las sonrisas compartidas.

Al Dr. Javier Aldeco y Dra. Martha Signoret[†], grandes influencias en mi vida. A Alfonso H. por su energía, cariño, risas y motivación, gracias por todo. A Flavia, mujer de fuego, siempre. A Alberto por ser ese cálido viento que me ha traído hasta aquí.

A las instituciones.

A la Universidad Nacional Autónoma de México con especial agradecimiento a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, por las valiosas herramientas de conocimiento que me otorgaron.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo durante mis estudios.

El método habitual para purificar el agua de los pozos: mantener una tortuga en su fondo, resultaba una forma eficaz de contaminación.

Ambrosio Ortega Paredes,
El agua, drama de México.

CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN

2. ANTECEDENTES

2.1 Malatión

2.1.1 Toxicidad

2.1.2 Modo de acción

2.2 Cladóceros

2.2.1 Importancia en cuerpos de agua

2.2.2 Utilidad en pruebas ecotoxicológicas

3. JUSTIFICACIÓN

4. OBJETIVOS

5. HIPÓTESIS

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo de cladóceros

6.2 Cultivo de *Chlorella vulgaris*

6.3 Determinación de la concentración real de "Malatión 500"

6.4 Experimentos de toxicidad

6.4.1 Prueba de toxicidad aguda

6.4.2 Pruebas de toxicidad crónica – efecto subletal Crecimiento poblacional Tablas de vida

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de la concentración real de "Malatión 500"

7.2 Experimentos de toxicidad

7.2.1 Prueba de toxicidad aguda

7.2.2 Pruebas de toxicidad crónica – efecto subletal

Crecimiento poblacional

Tablas de vida

8. DISCUSIÓN

8.1 Determinación de la concentración real de "Malatión 500"

8.2 Experimentos de toxicidad

8.2.1 Prueba de toxicidad aguda

8.2.2 Pruebas de toxicidad crónica – efecto subletal

Crecimiento poblacional

Tablas de vida

9. CONCLUSIÓN

10. RECOMENDACIONES

I. REFERENCIAS

II. ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura química del malatión.

Figura 2. Ruta metabólica de malatión en animales, microorganismos del suelo y plantas.

Figura 3. Acción normal de la enzima acetilcolinesterasa.

Figura 4. Formación del complejo acetilcolinesterasa-malatión.

Figura 5. Especies de cladóceros con las que se realizaron los experimentos.

Figura 6. Concentración letal media 50 (CL₅₀), para cada especie.

Figura 7. Curvas de crecimiento de *D. pulex* expuesta durante 21 días a cuatro diferentes concentraciones de malatión.

Figura 8. Curvas de crecimiento de *D. birgei* expuesta durante 21 días a cuatro diferentes concentraciones de malatión.

Figura 9. Curvas de crecimiento de *M. macrocopa* expuesta durante 16 días a cuatro diferentes concentraciones de malatión.

Figura 10. Abundancia máxima poblacional alcanzada por cada una de las especies, durante el experimento.

Figura 11. Tasa de crecimiento poblacional de las especies durante el experimento de crecimiento poblacional.

Figura 12. Curvas de supervivencia de *D. pulex* expuesta a cuatro concentraciones diferentes de malatión, alimentadas con 1×10^6 cel/mL de *Chlorella vulgaris*.

Figura 13. Curvas de supervivencia de *D. birgei* expuesta a cuatro concentraciones diferentes de malatión, alimentadas diariamente con 1×10^6 cel/mL de *Chlorella vulgaris*.

Figura 14. Curvas de supervivencia de *M. macrocopa* expuesta a cuatro concentraciones diferentes de malatión, alimentadas diariamente con 1×10^6 cel/mL de *Chlorella vulgaris*.

Figura 15. Proporción de neonatos por hembra por día de *D. pulex*. Resultados obtenidos en las cuatro concentraciones de malatión.

Figura 16. Proporción de neonatos por hembra por día de *D. birgei*. Resultados obtenidos en las cuatro concentraciones de malatión.

Figura 17. Proporción de neonatos por hembra por día de *M. macrocopa*. Resultados obtenidos en las cuatro concentraciones de malatión.

Figura 18. Esperanza de vida específica por edad a lo largo del ciclo de vida de *D. pulex* expuesta a cuatro concentraciones de malatión.

Figura 19. Esperanza de vida específica por edad a lo largo del ciclo de vida de *D. birgei* expuesta a cuatro concentraciones de malatión.

Figura 20. Esperanza de vida especificada por edad a lo largo del ciclo de vida de *M. macrocopa* expuesta a cuatro concentraciones de malatión.

Figura 21. Promedio de vida en días de los individuos de cada especie.

Figura 22. Esperanza de vida en días de los individuos de cada especie.

Figura 23. Tasa de reproducción bruta de cada especie.

Figura 24. Tasa de reproducción neta de cada especie.

Figura 25. Tiempo generacional de cada especie.

Figura 26. Tasa de crecimiento poblacional de cada especie.

Tabla 1. Concentraciones de malatión (μgL^{-1}) utilizadas en las pruebas de toxicidad crónica, para cada especie.

Tabla 2. Análisis de varianza de una vía de tasa de crecimiento poblacional y abundancia máxima.

Tabla 3. Análisis de varianza de una vía de las variables de tabla de vida.

Tabla 4. Estudios de toxicidad de malatión sobre distintos grupos de organismos.

Tabla 5. Comparación de los resultados obtenidos en los tratamientos control con los encontrados en la literatura.

RESUMEN

Efectos subletales de malatión sobre variables demográficas de tres especies de cladóceros (Cladocera): *Daphnia pulex* Leydig, *Diaphanosoma birgei* Korinek y *Moina macrocopa* Goulden

En México, donde grande parte del territorio es utilizado para agricultura, el empleo de plaguicidas para mantener o aumentar la producción es una práctica común. El malatión es uno de los insecticidas organofosforados más utilizados, debido a su bajo costo y amplia gama usos.

El uso excesivo de este plaguicida podría traer graves consecuencias para la flora y fauna que rodean el lugar de aplicación y así generar efectos adversos en especies para las que no fue intencionalmente diseñado. Los ecosistemas dulceacuícolas cercanos a los sitios de aplicación son ecosistemas que afectados por la descarga de pesticidas. En estos sistemas, los cladóceros son un grupo clave que cumple la función de transferir energía de un nivel trófico al siguiente. Algunas especies de cladóceros pueden ser muy sensibles a los contaminantes y una reducción en su población puede alterar la estructura de la red trófica y en el funcionamiento del sistema.

En el presente trabajo de manera inicial se realizaron pruebas de toxicidad aguda de malatión (ML), en las que se determinó la concentración letal media (CL₅₀-24h) en tres especies de cladóceros. La especie de mayor sensibilidad fue *D. birgei* (CL₅₀-24h = 1.12 ng ML L⁻¹) mientras que la especie menos sensible fue *M. macrocopa* (CL₅₀-24h= 0.81 µg ML L⁻¹). *D. pulex* presentó una CL₅₀-24h cien menor que *M. macrocopa*.

En base a estos resultados se seleccionaron concentraciones subletales del plaguicida (1/10, 1/20 y 1/40 de acuerdo con la CL₅₀-24h de cada especie) para valorar el efecto del malatión sobre variables demográficas de las especies. Variables como la abundancia máxima y tasa de crecimiento poblacional no fueron alteradas significativamente por la exposición a malatión, en el caso de *D. pulex*.

En el caso de *D. birgei*, la abundancia máxima y la tasa de crecimiento se redujeron significativamente por la exposición a malatión desde la exposición a la más baja concentración del plaguicida (0.000028 µg/L⁻¹). En contraste, en *M. macrocopa* los efectos

negativos del plaguicida sobre las variables se observaron sólo en la concentración más alta de malatión ($0.162 \mu\text{g ML L}^{-1}$).

De manera complementaria se evaluó en cada especie el efecto de la exposición crónica subletal al malatión sobre diversas variables que se integran en las tablas de vida (supervivencia, fecundidad, tiempo generacional y esperanza de vida específica por edad). En *M. macrocopa* y *D. birgei*, la supervivencia fue la variable más afectada por la exposición al malatión, mientras que en *D. pulex* esta variable no fue alterada.

La fecundidad, la tasa de reproducción bruta y neta, y la tasa de crecimiento poblacional fueron variables afectadas significativamente por la exposición al plaguicida en las tres especies. No obstante, el tiempo generacional, el promedio de vida y la esperanza de vida al nacer, en ninguna de las tres especies fueron variables sensibles al malatión.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las variables que involucran reproducción parecen ser las más sensibles para evaluar los efectos tóxicos del malatión lo cual tiene una implicación ecológica relevante.

Palabras clave: malatión, cladóceros, toxicidad, variables poblacionales, exposición crónica.

ABSTRACT

Sublethal effects of malathion on demographic variables of three species of cladocerans (Cladocera): *Daphnia pulex* Leydig, *Diaphanosoma birgei* Korinek and *Moina macrocopa* Goulden

Malathion is one of the most widely used organophosphate insecticides due to their low cost and wide range applications. Excessive use of this pesticide could have serious consequences for the flora and fauna surrounding the application site and generate adverse effects on species for which it was not intentionally designed. Freshwater ecosystems can be potentially damaged for this pesticide where cladocerans are a key group that transfers energy from one trophic level to the next. Some species of this group can be very sensitive to contaminants and the reduction of the population of these groups may thus alter the structure of the food web and the system operation.

In this work, we tested acute toxicity of malathion (ML), in which LC_{50-24h} was determined in three cladoceran species. The most sensitive species was *D. birgei* ($LC_{50-24h} = 1.12 \text{ ng ML L}^{-1}$) while the least sensitive species was *M. macrocopa* ($LC_{50-24h} = 0.81 \text{ mg ML L}^{-1}$). *D. pulex* LC_{50-24h} filed one hundred less than *M. macrocopa*.

Based on these results we selected sublethal concentrations of the pesticide (1/5, 1/10, 1/20 and 1/40 according to the lethal concentration for each species) to assess the effect of malathion on demographic variables of the species. The results of maximum abundance and population growth rate showed that the exposition to malathion did not affect significantly these variables of *D. pulex*.

In the case of *D. birgei*, abundance and maximum growth rate was significantly reduced since the lowest concentration of the pesticide. In contrast, *M. macrocopa*, negative effects on variables were observed only in the highest concentration of malathion ($0.162 \text{ mg ML L}^{-1}$).

Complementary, we evaluated the effect of chronic sublethal exposure to malathion on several variables that are integrated into a life table (survival, fecundity, generation time and life expectancy age-specific). In *M. macrocopa* and *D. birgei*, survival was the variable most affected by exposure to malathion, while in *D. pulex* this variable was not altered by the pesticide.

The fecundity, the rates of gross and net reproduction, and population growth rate variables were significantly affected by pesticide exposure in the three species. However, the generation time, average life expectancy at birth, in none of the three species were susceptible to malathion.

According to the obtained results, variables involving reproduction appear to be most sensitive to the toxic effects of malathion, which has important ecological implications.

Keywords: malathion, cladocerans, toxicity, population variables, chronic toxicity

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, en el mundo se emplean diariamente cantidades considerables de numerosos plaguicidas con el propósito de combatir diversas plagas y enfermedades, asegurando así la productividad del campo y la inversión económica ya que los daños causados por las plagas pueden originar una gran reducción de la producción agrícola (Albert, 2005).

En México, aunque esto varía según el cultivo, en términos generales los plaguicidas de mayor uso son los herbicidas, seguidos de insecticidas y fungicidas. Entre los insecticidas, los más usados son los organofosforados; por ejemplo, diazinón, malatión y clorpirifos, los cuales son con frecuencia altamente tóxicos para los humanos (Levine, 2007).

Estos plaguicidas y/o sus residuos pueden ser transportados por escorrentías provenientes de zonas urbanas y agrícolas donde se aplican (Odenkirchen y Wentz, 2007) y llegar a ecosistemas dulceacuícolas y marino costeros (Levine, 2007).

Los efectos de los plaguicidas en un ecosistema se pueden expresar de distintas maneras. Por ejemplo, puede incrementar la mortalidad de una población u ocasionar alteraciones en la reproducción o comportamiento de una especie o un grupo de especies, ocasionando efectos de cascada trófica (Relyea y Hoverman, 2006).

Un grupo clave dentro de los sistemas dulceacuícolas son los cladóceros, sensibles a los contaminantes, por lo que los plaguicidas podrían tener graves efectos en sus poblaciones (Sarma y Nandini, 2006).

Estos microcrustáceos cumplen la función de transferir la energía de un nivel trófico al siguiente. Son uno de los principales consumidores de microalgas debido a sus altas tasas de filtración, en *Daphnia pulex* se ha reportado una tasa de 176-330 ml/mg peso seco/ día (Richman 1958). Al mismo tiempo, los cladóceros forman parte importante de la dieta de peces, sobre todo en etapas larvarias. De tal manera que una reducción de la población de estos grupos podría traer como consecuencia un desequilibrio en la red trófica y en el funcionamiento del sistema (Groner y Relyea, 2011).

En México no se cuenta con un programa de monitoreo que registre los niveles actuales de plaguicidas en los cuerpos de agua, ni mucho menos datos que permitan determinar los volúmenes de plaguicidas que ingresan en los cuerpos de agua a través del tiempo para obtener un registro histórico de los niveles de este tipo de contaminantes.

En particular, el malatión es uno de los tres plaguicidas organofosforados más utilizados en México (Albert, 2005). Sin embargo, no se cuentan con datos oficiales específicos sobre la proporción con la que utiliza en el país.

La única fuente de información al respecto se ha obtenido a través de una bitácora de aplicación de plaguicidas para el periodo 2005- 2010 de una zona agrícola en el Estado de Sinaloa, México, en la que se reporta la aplicación de malatión. Solamente en esa zona, la aplicación de este plaguicida puede ser de hasta 1, 364 Kg/año (2008). Los datos de aplicación muestran que el malatión es uno de mayormente aplicados en esta zona: el doble de metamidofos, 10 veces más que diazinón y 20 veces más que clorpirifos (Astorga-Rodríguez, 2011).

El malatión es un insecticida soluble en agua, lo que le confiere la capacidad de desplazarse desde el lugar de aplicación a cuerpos de agua cercanos, mediante las escorrentías. Con el objetivo de entender el efecto tóxico que puede tener el malatión si llegará a los cuerpos de agua dulce, en el presente estudio se evalúa el efecto de este plaguicida sobre la dinámica poblacional de tres especies de cladóceros que habitan cuerpos de agua dulce en México. Para ello, se efectuaron pruebas bajo condiciones controladas de laboratorio en las que se utilizaron concentraciones subletales de malatión para evaluar su efecto crónico; dichas concentraciones subletales fueron derivadas de estudios de toxicidad aguda.

Se espera que esta información pueda ser útil para profundizar en procesos y mecanismos de acción del malatión, con la finalidad de inferir probables efectos en algunas poblaciones zooplanctónicas y se puedan establecer estrategias de regulación ambiental.

2. ANTECEDENTES

En México, la agricultura es una actividad productiva sumamente importante, el territorio disponible para ello es del 12% de la superficie total de país. Mantener o aumentar la producción requiere de la utilización de grandes cantidades de plaguicidas, para evitar que se afecte la rentabilidad de los cultivos. Sin embargo, el uso excesivo de plaguicidas puede tener un impacto negativo sobre las exportaciones de alimentos hacia países con regulaciones estrictas y mecanismos de verificación eficientes (Albert, 2005). Además, hay evidencias de una grave contaminación del agua derivada de los plaguicidas (Zavala-Aguirre, 2007; Agrawal *et al.* 2010) cuya aplicación ha aumentado en un 150% en los últimos ocho años (FAOSTAT, 2012). De acuerdo con datos del INEGI, en el 2005 la aplicación de insecticidas agrícolas anualmente representaba 11, 058 toneladas, para el 2012 esta cantidad alcanzó las 21 723 toneladas (INEGI, 2012). Este uso desmedido ha traído consecuencias a la salud de jornaleros y consumidores, la Organización Mundial de la Salud (2004) registra cada año entre uno y cinco millones de casos de intoxicación por plaguicidas en países en desarrollo. Los síntomas que se presentan durante la intoxicación comprenden fatiga, mareos, náuseas, vómitos, efectos respiratorios y neurológicos que pueden poner en peligro la vida (Maroni *et al.*, 2000).

Los plaguicidas son sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o controlar una plaga, pueden ser clasificados de acuerdo a su estructura química, modo de acción, acción específica, grado de toxicidad y persistencia en el ambiente (USEPA 2008). De acuerdo a su estructura química, los plaguicidas se clasifican en diversas familias, que incluyen compuestos organoclorados, organofosforados, incluso compuestos inorgánicos. Los compuestos organofosforados (OF), son ésteres, amidas o tioles derivados de los ácidos fosfórico, fosfónico y fosforico (Ramírez y Lacasaña, 2001). La gran utilización de los insecticidas organofosforados está vinculada con su bajo costo y su amplia variedad de usos: en agricultura, jardinería, dentro del hogar e incluso en las cabezas de las personas (Groner y Relyea, 2011).

En algunos casos se cree que los OF tienen una persistencia menor frente a los organoclorados y se consideran levemente tóxicos. Sin embargo, se ha comprobado que algunos organofosforados no se degradan tan rápido y pueden llegar a bioacumularse a través de una red trófica (Martínez-Tabche *et al.*, 1993). Adicionalmente, hay ciertas especies que habitan cuerpos de agua dulce muy sensibles a estas sustancias.

Por ejemplo, fentión en forma granular a una concentración de 0.025 mgL^{-1} es considerado no tóxico para copépodos, ostrácodos, oligoquetos y gasterópodos. Sin embargo, cladóceros como *Daphnia* sp., rápidamente mueren a tal concentración debido a que su nivel de tolerancia es tan bajo como 0.00065 mgL^{-1} (Ramade, 1987). La reducción de las poblaciones de especies sensibles son un buen indicador de la salud de un ecosistema y la pérdida total de estas especies podría traer efectos graves en la estructura y funcionalidad del mismo.

2.1 Malatión

El malatión es un organofosforado (figura 1) con un amplio espectro de uso, en el sector agrícola, urbano, industrial, pecuario y jardinería. Se utiliza habitualmente para el control de mosquitos y diversos insectos en frutas, hortalizas, arbustos y plantas ornamentales.

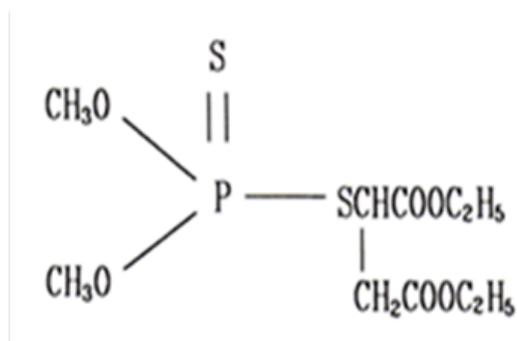


Figura 1. Estructura química de malatión (Karpouzias y Singh, 2006)

Incluso se puede encontrar en otros productos de uso en interiores para el control de garrapatas e insectos en animales de compañía, de piojos de cabeza y del cuerpo en las personas (EPA, 2006). En el mercado existen por lo menos dos productos de aplicación en la cabeza de los humanos para combatir piojos, uno es Para Plus® que contiene malatión, permetrina y butóxido de piperonilo y el otro es Filvit® que contiene 0.5% de malatión y 1% de permetrina.

Es considerado un plaguicida "seguro" y es el más utilizado por la Secretaría de Salud para tratar problemas de mosquitos, recomendado por el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades para ser utilizado en una concentración de 112-600 gr i.a./Ha (CENAPRECE, 2015).

2.1.1 Toxicidad

Existen varios factores bióticos y abióticos que determinan el potencial tóxico de un plaguicida en cuerpos de agua, como su habilidad para disolverse, factores ambientales como el suelo, el clima, la estacionalidad, la distancia del punto de aplicación al cuerpo de agua (Levine, 2007), así como los métodos y periodos de aplicación (Kerry y Vass, 1973).

En el caso del malatión, el pH es una variable abiótica importante que determina la rapidez de su degradación. Por ejemplo, en condiciones de pH 2 y contenido orgánico bajos, el malatión puede persistir en el agua por un periodo de 0.2 a una semana, pero en estanques con menos movimiento y con pH 6 se prolonga hasta por 21 semanas (Newhart, 2006).

Tanto en agua como en el suelo la degradación del malatión depende principalmente del pH y ocurre por una combinación de procesos biológicos (por ejemplo, metabolismo microbiano) y reacciones no biológicas (como la hidrólisis). En condiciones donde el pH es mayor a 7, el papel de los biodegradadores se vuelve más importante para la degradación del malatión, ya que la tasa de hidrólisis en estas condiciones es muy lenta (EPA, 2006).

El malatión, debido a su capacidad de disolverse en el agua, puede llegar a ecosistemas acuáticos cercanos al lugar de aplicación a través de escurrimientos o afluentes. Una vez en el sistema, el malatión puede ser incorporado por los organismos mediante mecanismos de adsorción dermal o ingestión (EPA, 2009).

Los efectos en los seres vivos expuestos dependen del alcance que tenga dentro de organismo (Espina y Vanegas, 2005), de acuerdo a su capacidad de incorporar, degradar y/o eliminar el plaguicida.

Se ha probado que el Malatión es altamente tóxico para invertebrados acuáticos y moderadamente tóxico para anfibios (USEPA Ecotox database). Muchos de los trabajos escritos, describen la toxicidad de malatión en términos de mortalidad, encontrando valores para *Moina macrocopa* de CL₅₀ 6 h de 0.007 mgL⁻¹ de malatión, >4.91 mgL⁻¹ en *Oithona davisae*, >25.0 en *Brachionus plicatilis* y para *Artemia salina* >40 mgL⁻¹ (Kashiwada *et al.*, 1995).

Así, la mayoría de las pruebas se enfocan en una sola variable, la mortalidad. Aunque los valores de CL_{50} tienen mucho valor normativo, éstos proveen insuficiente información para vincular esos efectos con lo que pasa o podría pasar a nivel de un ecosistema, debido a que usualmente en los sistemas naturales, las concentraciones a las que se exponen los organismos son subletales. Se necesitan respuestas que tengan relevancia ecológica y ayuden en el desarrollo de modelos que puedan realizar generalizaciones sobre los efectos de los pesticidas en un ecosistema (Groner y Relyea, 2011).

Sólo algunos trabajos han estudiado los cambios en la composición de los ensamblajes de zooplancton que ocurren como respuesta a la exposición a insecticidas. Groner y Relyea (2011) llevaron a cabo experimentos de toxicidad de plaguicidas sobre ranas e invertebrados acuáticos en microcosmos; ellos reportaron una disminución en la cantidad de cladóceros con la presencia de los organofosforados, malatión y carbaril, concluyendo que los plaguicidas que tienen el mismo mecanismo de acción (en este caso, la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa), a las mismas concentraciones, generan los mismos efectos en invertebrados acuáticos. Sin embargo, en el caso de los anfibios no pudieron concluir lo mismo, debido a que el carbaril tuvo efectos distintos a los que tuvo el malatión a las mismas concentraciones, el carbaril retardó la metamorfosis de los renacuajos.

Junto a los trabajos de Groner y Relyea se encuentran otros que tratan de identificar los efectos ecológicos de plaguicidas en un sistema, Giddings *et al.* (1996) realizaron experimentos en microcosmos con diferentes intervalos de aplicación de diazinón y encontraron que los cladóceros e insectos fueron los grupos más sensibles al insecticida, tomando en cuenta su abundancia en los microcosmos; Rohr y Crumrine (2005) también encontraron que los cladóceros (*Daphnia*) eran el grupo más sensible al plaguicida endosulfan dentro de una comunidad en la que también había larvas de quironomidos, renacuajos y caracoles.

Hanazato y Yasuno (1989) evaluaron el efecto de carbaril sobre una comunidad de zooplancton encontrando que al estar disuelto este plaguicida en el agua, todas las especies de zooplancton murieron. Sin embargo, después del tratamiento las larvas de *Chaoborus* se recuperaron rápidamente, llegando a la misma densidad poblacional que había antes de la aplicación de plaguicida.

Los cladóceros no se recuperaron a sus niveles anteriores, Hanazato y Yasuno se lo atribuyen a la alta presión por depredación por parte de las larvas de *Chaoborus* que se recuperaron del plaguicida. En la tabla 1 se muestran estudios en los que se ha evaluado el efecto de malatión en diferentes organismos.

Tabla 1. Estudios de toxicidad de malatión sobre distintos grupos de organismos.

| Autor y año | Organismos | Concentración (μgL^{-1}) | Efectos | Observaciones |
|--------------|--|---|--|--|
| Wong, 1995 | <i>Moina macrocopa</i> | 24 h CL ₅₀ : entre 5 y 10. Efectos crónicos: 0.01, 0.10, 1 y 1.0 | - Disminución de sobrevivencia a partir de 0.01. - No sobrevivieron más de 8 días. - La reproducción disminuyó en un 40%. | No hay efectos en el primer día de reproducción. Se utilizó un producto comercial, con concentraciones nominales. |
| Relyea, 2004 | Renacuajos de <i>Rana sylvatica</i> , <i>R. pipiens</i> , <i>R. clamitans</i> , <i>R. catesbeiana</i> , <i>Rinella americanus</i> e <i>Hyla versicolor</i> . | 1250 – 5900 Supervivencia, durante 16 días. | -La toxicidad se duplicó al ser expuestos también a estrés por depredación. | |
| Relyea, 2009 | Microcosmos que incluyen <i>Daphnia pulex</i> , <i>Ceriodaphnia sp.</i> , copépodos, fitoplancton, perifiton y larvas de anfibios (ranas). | 2- 16 | - <i>D.pulex</i> menos abundante con clorpirifos, diazinón y mezcla de insecticidas. - Con malatión, la densidad de <i>D. pulex</i> estuvo por encima del control. - <i>Ceriodpahnna sp.</i> ausente con cualquier insecticida. - Copépodos sensibles sólo a endosulfan, a la mezcla de insecticidas/ herbicidas. - Retraso de metamorfosis en anfibios. | Experimentos realizados con malatión como único plaguicida; y mezclado con otros 4 insecticidas* y 5 herbicidas**. |

*carbaril, clorpirifos, diazinón y endosulfan. **glifosato, atrazina, acetoclor, metolaclor y 2,4-D

Continúa tabla 1.

| Autor y año | Organismos | Concentración ($\mu\text{g/L}^{-1}$) | Efectos | Observaciones |
|-------------------------------------|--|---|---|--|
| Robles-Mendoza <i>et al.</i> , 2009 | Embriones y larvas de <i>Ambystoma mexicanum</i> | 10 000 - 30 000 | -Los embriones fueron menos sensibles que las larvas. - Lesiones en embriones: notocorda delgada, pliegues neurales no fusionados y edema localizado. - La toxicidad de carbaril en la etapa de larva fue mayor que malatión. | Se expusieron durante 96 h a carbaril y malatión, seguido de 9 días sin plaguicida para identificar posible recuperación. |
| Groner y Relyea, 2011 | Mesocosmos conteniendo zooplancton (identificado hasta nivel de cladóceros y copépodos), fitoplancton, perifiton y larvas de anfibios. | 25, semanalmente 250, una sola aplicación 2500, una sola aplicación | -La concentración semanal no tuvo efectos significativos en la densidad de cladóceros. - Las concentraciones 250 y 2500 $\mu\text{g/L}^{-1}$ aplicadas en una sola ocasión, redujeron los cladóceros en un 93 y 97%. | |
| Zhang <i>et al.</i> , 2011 | <i>D. magna</i> | 10 – 18 | 24 h -CL ₅₀ | En este estudio se hace una comparación entre los estereoisómeros y los metabolitos de malatión. Siendo malatión menos tóxico que malaoxón e isomalatión. |

2.1.2 Modo de acción del malati6n

Las neuronas se comunican entre s3 a trav3 de sitios especializados conocidos como sinapsis. El impulso nervioso, de naturaleza el3ctrica, no puede transmitirse directamente entre las membranas de las neuronas debido a que existe un espacio entre ellas. Se requiere la liberaci6n de una sustancia llamada neurotransmisor que llega de una membrana a la otra y se une a un receptor espec3fico. Existen una gran variedad de neurotransmisores, entre ellos la acetilcolina (ACh). La neurotransmisi6n mediada por ACh es fundamental en la funci6n del sistemas nervioso central, su interrupci6n abrupta es letal y su p3rdida gradual est3 asociada al deterioro auton6mico y de la funci6n neuromuscular.

De manera normal, despu3 de la transmisi6n de un impulso nervioso c3lula-c3lula, el neurotransmisor debe ser degradado, en el caso de la ACh por la acetilcolinesterasa (AChE), un milisegundo despu3 de su liberaci6n (figura 2), la acetilcolina es hidrolizada en acetato y colina. As3 se regula la concentraci6n de este neurotransmisor en la sinapsis (S3nchez-Ch3vez y Salceda, 2008). Las colinesterasas se han encontrado desde organismos unicelulares, plantas, invertebrados y vertebrados.

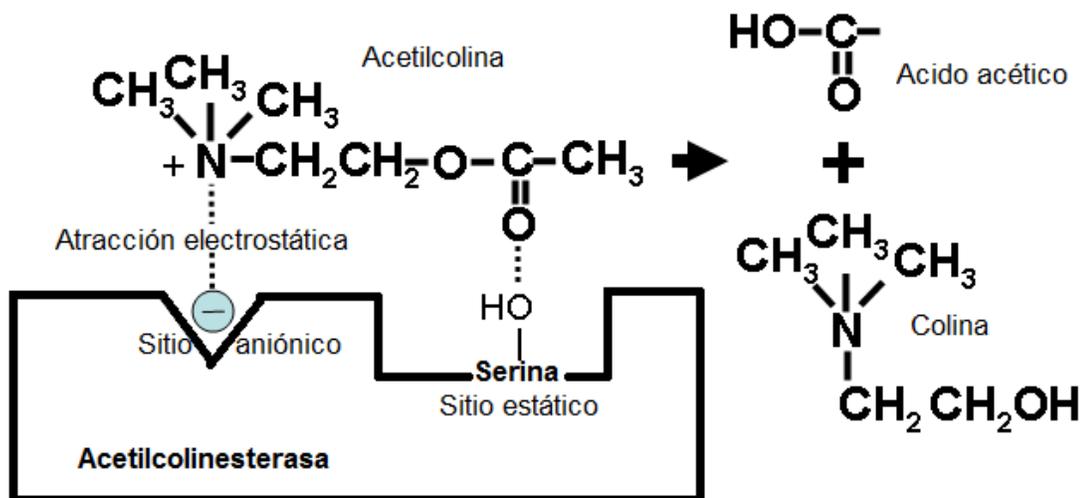


Figura 2. Acción normal de la enzima acetilcolinesterasa (Wiener y Hoffman, 2004)

El sitio activo, presenta dos subsitios: un subsitio aniónico que atrae por fuerzas electrostáticas al grupo amonio de la acetilcolina e interacciones hidrofóbicas con los grupos metilo del nitrógeno cuaternario de la colina y coloca al sustrato en una orientación adecuada y el subsitio del éster, responsable de la acción catalítica, que rompe el enlace éster (Sánchez-Chávez y Salceda, 2008).

El principal mecanismo de acción del malatión, como otros organofosforados, es inhibir la actividad de la enzima AChE (Manahan, 2003).

Lo que hace el malatión es formar una ligadura con el grupo hidroxil de la serina, provocando la inactivación de la enzima. Se forma un complejo formado de acetilcolinesterasa-malatión (figura 3), en donde el plaguicida es hidrolizado muy lentamente, lo que resulta en la falta de acetilcolinesterasas activas viables y libres para hidrolizar la acetilcolina; por lo tanto, se produce una acumulación de acetilcolina en las conjunciones neurona-neurona y neurona-músculo y esto daña severamente la transmisión sináptica de impulsos nerviosos. Como los organofosforados requieren activación y ejercen sus efectos primeramente en el sistema nervioso central, actúan más lentamente que insecticidas como los piretroides que actúan primeramente en el sistema nervioso periférico y sus efectos son un poco más inmediatos (Carlile, 2006).

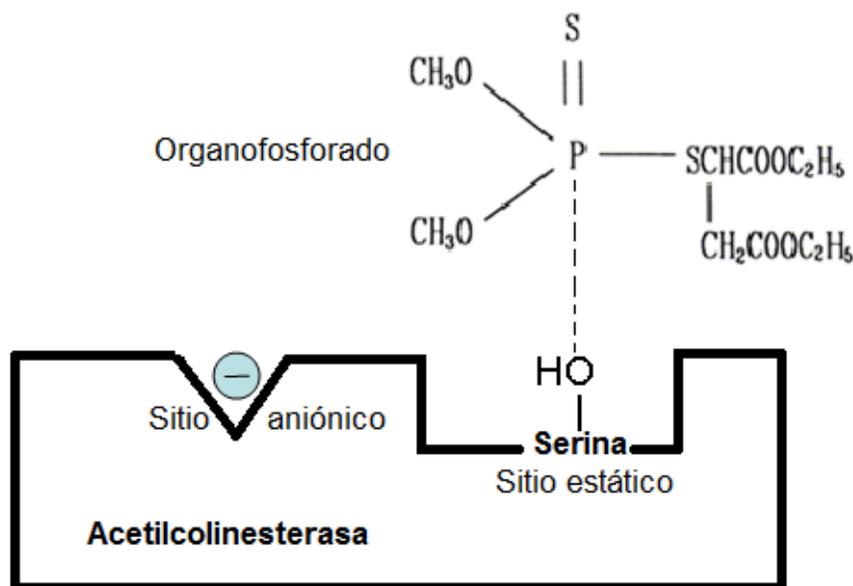


Figura 3. Formación del complejo acetilcolinesterasa-malatión (Wiener y Hoffman, 2004)

Con el fin de protegerse así mismos contra sustancias naturales, los organismos desarrollan varios mecanismos de desintoxicación. Estos mecanismos permiten en algunas ocasiones que organismos expuestos a plaguicidas sobrevivan. El tipo y nivel de protección difiere enormemente dependiendo de la especie que se trate, el estadio, la población, etc. Normalmente, un proceso de desintoxicación puede ser dividido en dos fases. La fase I consiste en reacciones de oxidación, hidrólisis y reducción. Algunas veces, los metabolitos surgidos de esta fase, son lo suficientemente polares como para ser excretados, de no ser así, en la fase II estos productos polares son conjugados con una gran variedad de componentes endógenos como azúcares, sulfatos, fosfatos, aminoácidos y subsecuentemente excretados (Yu, 2008).

En el caso del malatión, que contiene dos grupos carboxiesteres y un grupo P=S, puede ser contrarrestado por al menos dos tipos de enzimas, las carboxilesterasas y las monooxigenasas del citocromo P450. El malatión es metabolizado a fosfato inorgánico y entonces excretado (Manahan, 2003). En la figura 4, se puede ver el proceso de degradación del malatión llevada a cabo por animales, microorganismos del suelo y plantas, el cual involucra una serie de procesos oxidativos (Karpouzias y Singh, 2006).

De entre los pesticidas organofosforados el malatión es relativamente seguro para su uso en mamíferos. Sin embargo, algunas sustancias presentes en las formulas comerciales son inhibidores de carboxilesterasa, permitiendo incrementos dramáticos en la formación de malaoxón, metabolito tóxico (Buratti *et al.*, 2005).

Los cambios cualitativos en las estererasas por ejemplo, mutaciones en los alelos, pueden resultar en una enzima mutada que metaboliza el insecticida más rápido que la forma "normal" de esta enzima. Este fenómeno ocurre en poblaciones de mosquitos resistentes al malatión (*Anopheles stephensi*) en Pakistán y (*Anopheles culicifacies*) en India en donde las carboxilesterasas presentan una alta afinidad por el malatión y lo metabolizan rápidamente (Campbell *et al.*, 1998).

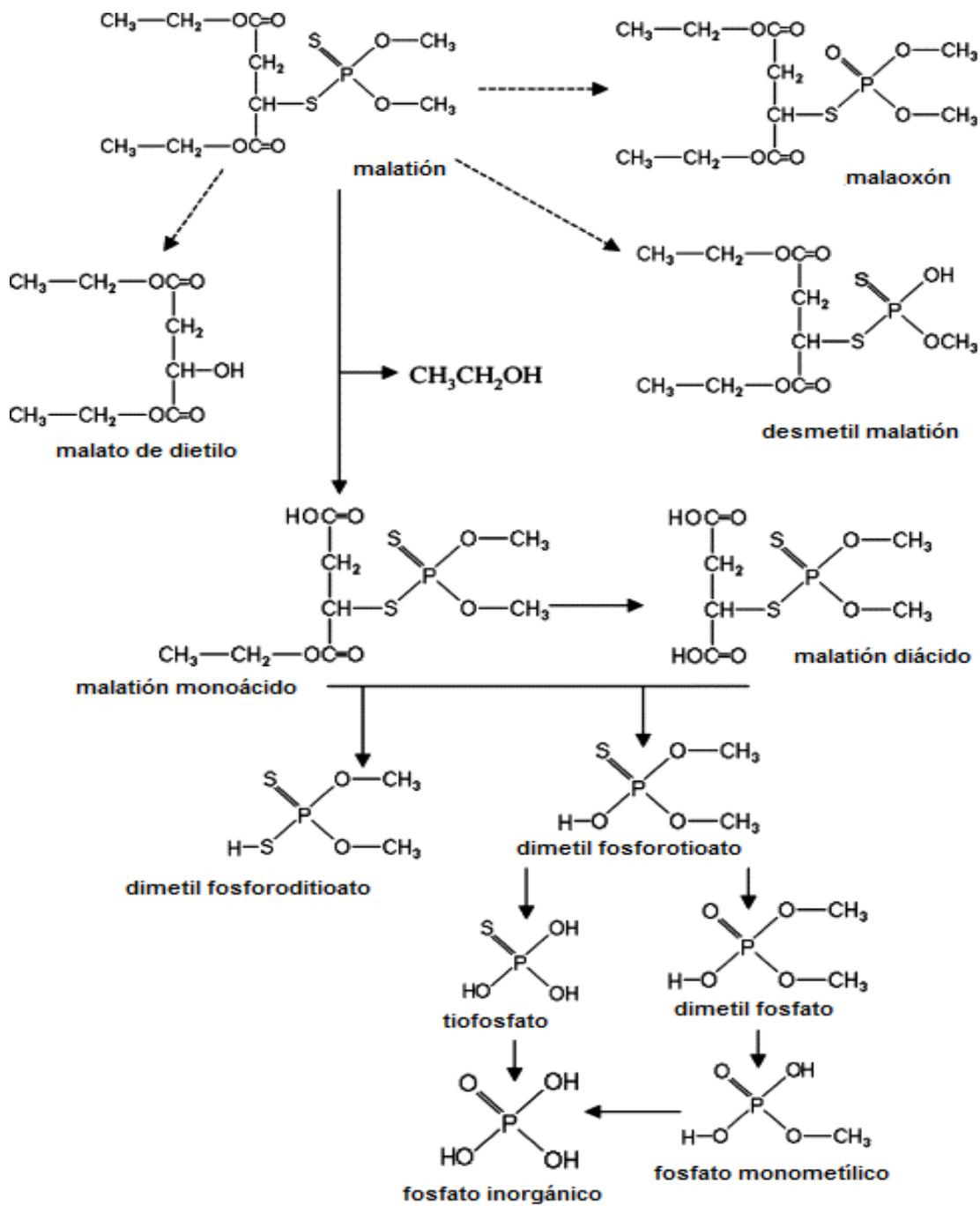


Figura 4. Proceso de degradación de malatión que involucra reacciones de oxidación y reducción en animales, microorganismos del suelo y plantas (Karpouzas y Singh, 2006).

2.2 Cladóceros

En las comunidades naturales de los cuerpos de agua dulce, el zooplancton está dominado por protozoarios, rotíferos y crustáceos, éstos últimos con dos grandes grupos representativos, la clase copépoda y el sub-orden Cladocera (clase Braquiopoda).

Los cladóceros son un grupo de crustáceos de tamaño pequeño que habitan principalmente cuerpos de agua dulce, aunque existen unas cuantas especies en ambientes salinos, incluso hipersalinos (Dumont y Negrea, 2002).

Su ciclo de vida se caracteriza por estar dominado por hembras que se reproducen de manera asexual a través de partenogénesis, produciendo más hembras. En ciertos momentos y generalmente como resultado de un estímulo ambiental, que puede ser, un cambio en la temperatura o reducción de alimento, las hembras producen un tipo de huevo diferente, que si no es fecundado dará origen a machos (haploides generalmente). En el caso de ser fecundados, estos huevos originan una estructura de resistencia denominada efipio, la cual permanecerá en el sedimento mientras las condiciones ambientales no sean óptimas. Nuevamente, un estímulo ambiental estimulará la eclosión de los efipios, dando lugar a hembras partenogénéticas (Elías-Gutiérrez *et al*, 2008).

Las especies de cladóceros utilizadas en esta investigación taxonómicamente pertenecen a tres familias diferentes de la clase Brachiopoda: Siddidae, a la cual pertenece la especie *Diaphanosoma birgei*, una especie con distribución tropical (Korinek, 2002). Moinidae, representada por la especie *Moina macrocopa* considerada un cladóceros de amplia distribución, muy común en ambientes eutróficos, es la especie más utilizada como alimento vivo en acuarios (Elías-Gutiérrez *et al*, 2008). La tercera familia es Daphniidae a la que pertenece la especie *Daphnia pulex*, distribuida en zonas templadas (Korinek, 2002).

2.2.1 Importancia de los cladóceros en los cuerpos de agua

Los cladóceros se encuentran en todos los sistemas epicontinentales, en todas las latitudes cumpliendo un rol importante en la red alimenticia de estos sistemas (Hanazato, 2001).

Los cladóceros, junto con otras especies de zooplancton representan una biomasa alta en los cuerpos de agua dulce y juegan un rol central en las redes alimenticias de los sistemas acuáticos ya que a menudo cumplen un papel clave en hacer la producción primaria viable para otros niveles tróficos superiores, incluyendo vertebrados e invertebrados. Debido a que estas especies de zooplancton tienen altas tasas de reproducción en combinación con su relativamente gran tamaño, son capaces de controlar la densidad de fitoplancton (Scholten *et al*, 2005).

2.2.2 Utilización de cladóceros en pruebas ecotoxicológicas

También destaca su valor como indicadores biológicos y, en consecuencia su utilización en estudios de toxicidad. De hecho, existe la Norma Oficial Mexicana (NMX-AA-087-1995-SCFI) para estudios en toxicología basada en el cladóceros *Daphnia magna*, la cual es una innecesaria copia de la norma desarrollada por la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos, pues este cladóceros es exótico en nuestro país, sin registros en ambientes naturales (Elías-Gutiérrez *et al*, 2008), esto podría generar que los análisis de toxicidad estén basados en una especie que no representa la sensibilidad de las especies nativas y, en consecuencia las normas generadas podrían no brindar los resultados esperados. Por tal motivo, es necesario incorporar a las especies locales en este tipo de normatividades.

Los plaguicidas ejercen sus efectos a múltiples niveles, desde niveles moleculares, individuales en la que los pesticidas pueden alterar la reproducción, morfología y/o comportamiento, hasta niveles de población, comunidad y ecosistema (Relyea y Hoverman, 2006). Una gran variedad de pruebas han sido diseñadas para evaluar estos efectos (Hoffman *et al*, 2003). Las pruebas ecotoxicológicas en las especies de zooplancton son ecológicamente relevantes debido a que son uno de los grupos más sensibles a tóxicos y ocupan una posición central en la red alimenticia de cuerpos de agua. Las respuestas de estas especies en las pruebas de toxicidad brindan información acerca de los impactos relativos sobre el ecosistema (Hanazato, 2001).

Los cladóceros han emergido como un grupo clave para este tipo de pruebas estandarizadas, las razones tanto prácticas como científicas pueden resumirse en las siguientes (Koivisto, 1995):

- ❖ Los cladóceros están presentes en una gran variedad de sistemas acuáticos;
- ❖ Cumplen un papel importante en las redes alimenticias de estos sistemas;
- ❖ Son considerados sensibles a una amplia variedad de contaminantes;
- ❖ Cultivarlos en laboratorio es relativamente fácil;
- ❖ Su reproducción es normalmente partenogénica;
- ❖ Tienen un ciclo de vida corto;
- ❖ Las pruebas pueden realizarse en sistemas con volúmenes pequeños.

Daphnia magna y *D. pulex* son las especies mayormente utilizadas en pruebas de toxicidad aguda; en este tipo de pruebas la variable que se evalúa respecto a la concentración de plaguicida es la mortalidad.

Otro tipo de pruebas ecotoxicológicas son las de carácter crónico en las que la sobrevivencia, reproducción, entre otras, son las variables evaluadas durante un periodo que puede durar varios días (Cooney, 1995).

El objetivo de las pruebas ecotoxicológicas es evaluar el grado de sensibilidad (o resistencia) de diferentes especies a una sustancia toxica en particular (Ramade, 1987).

El principio fundamental sobre el cual todas pruebas toxicológicas están basadas es el hecho de reconocer que las respuestas de organismos vivos a la presencia o exposición de agentes tóxicos son dependientes del nivel de exposición al agente tóxico. Usando este principio, las pruebas de ecotoxicología acuática están diseñadas para describir una relación de concentración-respuesta (Manahan, 2003).

Las pruebas de toxicidad aguda toman como parámetro la mortalidad de los individuos. Con la prueba de CL_{50} se puede determinar la concentración de un contaminante a la que la mitad de una población se espera que muera. Existen varias maneras de determinar CL_{50} , en cladóceros, el tiempo varía de 24 horas hasta 96, dependiendo de la especie y las condiciones seleccionadas en cada trabajo. De acuerdo a la literatura, para los cladóceros la CL_{50} es obtenida, en promedio, en un periodo de 24 horas (Sarma y Nandini, 2006).

De la misma manera, se reportan de manera variable en la literatura el número de organismos que se utilizan, la edad de mismos y las réplicas utilizadas. Sin embargo, reportan que los neonatos son más sensibles que los adultos y por lo tanto son mayormente utilizadas en este tipo de pruebas. Sarma *et al.*, (2007) evaluaron la toxicidad aguda de metil paratión y mercurio sobre 7 distintas especies de cladóceros, utilizando neonatos y adultos; ellos concluyeron que los neonatos son generalmente el doble de sensibles que los adultos.

Las pruebas de toxicidad subletales están usualmente planeadas para evaluar la relación concentración-respuesta expresada en el crecimiento, reproducción, comportamiento o efectos bioquímicos una vez que el contaminante fue incorporado por el organismo (Hoffman *et al*, 2003).

Las descargas constantes de contaminantes en los sistemas acuáticos naturales, hacen que los organismos estén expuestos de forma crónica a sustancias tóxicas. Por lo tanto, es importante conocer los efectos de ésta exposición crónica, a niveles donde no causan la muerte inmediata de los individuos, pero sí pueden causar reducción o cambios en sus funciones ecológicas y biológicas (Espina y Vanegas, 2005).

El problema fundamental en la ecotoxicología a nivel poblacional es cómo inferir las consecuencias de la exposición a un tóxico para una población a partir de los efectos sobre los individuos que la componen. Hacer estas inferencias no es fácil debido a que los efectos de los contaminantes son diversos; afectan procesos bioquímicos, fisiológicos y de comportamiento que determinan la tasa de crecimiento, supervivencia, desarrollo y reproducción, conjuntamente llamadas tasas vitales y los efectos sobre estas tasas vitales podrían no tener la misma dirección. Además de que la sensibilidad de los individuos podría variar de un estadio del ciclo de vida a otro (Caswell, 2000).

La respuesta de los organismos también depende de la biología misma de la especie, algunos trabajos ya han documentado las diferencias que existen entre las estrategias de vida de las especies con distribución tropical y templada (Sarma *et al*, 2005). Por ejemplo, la edad a la que comienzan a reproducirse es claramente diferente entre especies templadas como *Daphnia* que comienzan a reproducirse después de una semana de eclosionar (De Meester, 1994), mientras que especies tropicales del genero *Moina* en menos de una semana después de haber eclosionado tienen su primera reproducción (Nandini y Sarma, 2002).

Por lo tanto, se necesita de una maquinaria analítica que pueda tomar datos a nivel individuo y realizar cálculos a nivel poblacional, tal como los modelos demográficos estructurados. Estos modelos se basan en la construcción de una tabla de vida, que incluye datos de supervivencia y fecundidad de individuos en una población.

Para expresar, por ejemplo, los efectos de un tóxico a nivel poblacional, las tasas vitales individuales son incorporadas en un modelo demográfico, el cual es usado para calcular algunas estadísticas poblacionales, como la tasa intrínseca de crecimiento, tiempo generacional, tasa reproductiva bruta y neta (Caswell, 2000).

Evaluar los efectos de un contaminante a través de una tabla de vida es un método ampliamente utilizado ya que es fácil de construir, analizar e interpretar. Una de las formas de construir una tabla de vida es seguir a la misma cohorte durante todo su ciclo vital y hacerlo con cladóceros resulta relativamente fácil debido a su ciclo corto de vida.

Wong ha utilizado estas tablas de vida para medir el efecto de malatión (1995) y diazinón (1996) sobre *M. macrocopa*, usando variables como fecundidad, edad de primera reproducción y supervivencia.

Al evaluar los efectos de metales pesados sobre cladóceros también se han utilizado de tablas de vida, en 2009 Gama-Flores *et al.*, utilizaron tablas de vida para medir la toxicidad del cobre, sobre *M. macrocopa*, a diferentes tiempos de exposición.

Las características demográficas del zooplancton son usadas como una herramienta importante para evaluar los efectos tóxicos de plaguicidas, ya que muestran una respuesta ecológica de la población fácil de interpretar (Kiorboe, 2008). Estos experimentos se realizan siguiendo una curva de crecimiento poblacional durante cierto tiempo y conservando a todos los individuos juntos durante todo el experimento (Ghazy *et al.*, 2011).

Un curva de crecimiento normal, en la que una especie no se encuentra expuesta a ningún tipo de estrés externo tiene cuatro fases (Krohne, 1998), la primera es un periodo corto en el que el crecimiento de la población es lento debido a la falta o poca reproducción de los

organismos, a esta fase sigue la fase de crecimiento exponencial en la que la población crece rápidamente debido a que la tasa de natalidad es mayor a la de mortalidad. La tercera fase es la de transición, al haber crecido tanto la población, los recursos se vuelven escasos y los individuos compiten entre ellos en esta fase, la tasa de mortalidad incrementa y la de natalidad disminuye. La última de la fase es la estacionaria donde el crecimiento poblacional es igual a cero porque la población ha alcanzado la capacidad de carga del sistema, que es la población máxima que el ambiente puede soportar. Este tipo de curva donde existe un factor que limita el crecimiento poblacional es llamada curva logística o sigmoidea (Krebs, 2001). La capacidad de una población para reproducirse es un parámetro muy utilizado en las evaluaciones de toxicidad y una de las variables ecológicas más importantes, es por eso que en varios experimentos sólo se mide la tasa de crecimiento poblacional de las especies durante cierto tiempo (generalmente 21 días), según la duración de su ciclo de vida o los objetivos de la investigación (Kilham, *et al.*, 1997; Terra *et al.*, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

En México, el consumo de plaguicidas es cada vez más elevado, según datos de la FAO entre los años 2004 y 2007 su uso aumentó de 15 mil toneladas a 38 mil ton, un aumento de casi 150% (FAOSTAT, 2012). El malatión se encuentra entre los tres insecticidas organofosforados más utilizados en el país (Albert, 2005). En comparación, la Unión Europea (UE, 2008) y Argentina (MSA, 2012) han prohibido este insecticida desde el 2007 y 2008, respectivamente. La causa por la que estos países han modificado su normatividad respecto al malatión es el potencial como disruptor endocrino y cancerígeno de éste plaguicida (PAN, 2008). Mientras que en México es el más utilizado por el sector salud para tratar problemas públicos de mosquitos (CENAPRECE, 2015).

Desde las zonas donde se aplica, el malatión puede llegar a los sistemas acuáticos y generar cambios en los sistemas y organismos que los habitan.

Los cladóceros son un de los principales grupos de zooplancton que habitan los cuerpos de agua dulce, vulnerables a ser contaminados por insecticidas. Realizar pruebas de toxicidad con cladóceros puede ayudar a cuantificar y/o prevenir los daños causados en un ecosistema.

Al llegar el malatión al cuerpo de agua, éste podría ser incorporado por los organismos mediante el alimento y, principalmente, por filtración de agua contaminada. La evaluación de los efectos de esta intoxicación en los cladóceros, a través de sus variables demográficas es una herramienta ecológicamente útil y práctica; una reducción en el tiempo de vida o en la producción de descendencia puede ser fácilmente cuantificada usando tablas de vida (Kiorboe, 2008). Debido a que los cladóceros presentan predominantemente un modo de reproducción partenogénica, la sobrevivencia por edad específica y reproducción pueden ser simultáneamente estimadas a partir de una cohorte de edad inicial conocida (Kareiva *et al.*, 1996).

Las especies de cladóceros con la que se trabajó pueden ser encontradas de forma natural en cuerpos de agua mexicanos, *Diaphanosoma birgei* que tiene una distribución tropical, *Daphnia pulex* distribuida principalmente en zonas templadas (Cooney, 1995) y *Moina macrocopa* con una amplia distribución tanto en zonas templadas como tropicales y eutrofizadas (Wong, 1997).

4. OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto subletal del malatión en poblaciones de tres diferentes especies de cladóceros, *Daphnia pulex*, *Diaphanosoma birgei* y *Moina macrocopa*.

PARTICULARES

- 1.- Determinar la concentración de malatión, que genera la mortandad de la mitad de la población para cada especie (Concentración letal 50).
- 2.- Determinar el efecto de diferentes concentraciones subletales de malatión sobre las variables demográficas: abundancia máxima, el tiempo al que se alcanza la abundancia máxima y la tasa de crecimiento de la población de las tres especies de cladóceros.
- 3.- Determinar el efecto de diferentes concentraciones subletales de malatión sobre variables demográficas en tablas de vida: promedio de vida, esperanza de vida al nacer, tasa reproductiva bruta y neta, tiempo generacional y tasa de crecimiento poblacional, de las tres especies de cladóceros, utilizando tablas de vida.

5. HIPÓTESIS

- ❖ Cada una de las especies con la que se realizan los experimentos tiene hábitats diferentes, *D. birgei*, es una especie pelágica, mientras que *D. pulex* y *M. macrocopa* prefieren zonas litorales; adicionalmente *M. macrocopa* es común en sistemas alterados por contaminantes. Las zonas litorales son más susceptibles de ser afectadas continuamente por el aporte de xenobióticos, comparadas con la zona pelágica. Por esta razón, se sugiere que las especies que habitan las zonas pelágicas son más sensibles a los contaminantes que las especies que habitan zonas litorales. Esto quiere decir que la sensibilidad de las variables demográficas de *D. birgei* al malatión es mayor a la de *M. macrocopa*. Esta hipótesis se puede representar de la siguiente manera:

Sensibilidad *D. birgei* > Sensibilidad *D. pulex* > Sensibilidad *M. macrocopa*

- ❖ Además de las propiedades intrínsecas que pueda tener el malatión, entre los factores que influyen su toxicidad destaca la magnitud de su exposición. Esto quiere decir que mientras más alta sea la concentración a la que se encuentra un plaguicida y mayor sea su frecuencia de aplicación, su potencial tóxico aumenta. Por lo tanto, si se utilizan 4 concentraciones diferentes de malatión, sus efectos adversos se verán intensificados en el tratamiento que mayor concentración de malatión contenga, afectando de manera negativa todas las variables demográficas de cada una de las especies.

Esto es:

E.C. 4 > E.C 3 > E. C. 2 > E.C. 1 > E.C.0

donde la concentración 4 es la más elevada y genera mayores efectos (E.C. 4) en las variables demográficas, hasta llegar a concentración cero o grupo sin exposición al malatión.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo de cladóceros

Las diferentes especies de cladóceros fueron obtenidas de los cultivos con los que cuenta el laboratorio de Zoología acuática de la Facultad de Estudios Superiores-Izcatlala (FES-I). Cada cultivo comenzó con un sólo individuo. Las especies fueron cultivadas por separado en medio EPA, que se preparó disolviendo 96mg de NaHCO_3 , 60mg de CaSO_4 , 60mg de MgSO_4 y 4mg de KCL por cada litro de agua destilada (EPA, 1985).

6.2 Cultivo de *Chlorella vulgaris*

Las tres especies de cladóceros fueron alimentadas antes y durante los experimentos con *Chlorella vulgaris*, cultivada en botellas transparentes usando medio basal de Bold (Borowitzka y Borowitzka, 1988) (ver Anexos). Cuando este cultivo de fitoplancton alcanzó su etapa de máximo crecimiento se "cosechó" y se decantó. El precipitado se utilizó para contar las células en una cámara de Neubauer (hematocitómetro) con el fin de determinar el número de células/ml que se suministraron como alimento a los organismos (Umebayashi, 1973).

6.3 Determinación de la concentración real de "Malatión 500"

Para las pruebas ecotoxicológicas se utilizó un plaguicida comercial, llamado Malatión 500, el cuál según la etiqueta contiene 500 g/L de sustancia activa (0,0-Dimetil fosforoditioato de dietil mercapto succinato), correspondiente al 50% de pureza, los demás componentes incluyen sustancias inertes como disolventes y emulsificantes.

Este producto comercial se analizó en el Laboratorio de Instrumental de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMEX), utilizando un Cromatógrafo Varian 3900 acoplado a un detector de masas Saturno 2100T, una columna RTX 5 ms de 30m x 0.25 mm DI x 0.25 μm film. El límite de detección es: 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La extracción se realizó empleando la técnica de extracción en fase sólida con cartucho de C_{18} de 1cc. Se utilizaron estándares marca Aldrich.

Por otro lado, se prepararon otras dos muestras más para ser analizadas por cromatografía de gases acoplado a masas. Las muestras contenían 1000mg/L de malatión (preparado con agua destilada), una de ellas contenía únicamente medio EPA, mientras que la otra contenía 1×10^6 cels/mL de *Chlorella vulgaris*, con el fin de saber si el alga modificaba la concentración de malatión en el medio durante los experimentos.

Con base en el resultado de la concentración real de malatión en el producto comercial, se prepararon las concentraciones que se utilizaron en los experimentos de toxicidad.

6.4 Experimentos de toxicidad

Se elaboró una solución madre de 1000 mg/L de malatión a partir de la cual se preparó una solución de 10 µg/L; con la cual se hicieron diluciones para realizar los experimentos, letales y subletales.

Las condiciones de los experimentos se mantuvieron siguiendo las indicaciones de EPA (1985): un pH de 7.4-7.8, con una temperatura de $20 \pm 3^\circ\text{C}$ y una concentración de oxígeno disuelto no menor a 4.0 mgO₂/L.

6.4.1 Prueba de toxicidad aguda - Estimación de concentraciones subletales de malatión

Las concentraciones subletales utilizadas fueron derivadas de pruebas de toxicidad aguda. Por lo tanto, fue necesario obtener la concentración letal media (CL_{50-24h}) de malatión para cada especie. Se efectuaron bioensayos estáticos sin recambio y sin adición de alimento. Los organismos fueron expuestos a cinco concentraciones diferentes de malatión (ML) en un intervalo inicial de 6 – 50 µg ML L⁻¹, que de acuerdo a los resultados, fue modificado para cada especie. Para cada condición experimental se utilizaron recipientes de plástico de 50 ml, cada uno con 10 neonatos (menos de 24 hr de nacidos) (Scholten *et al.*, 2005). Se efectuaron 4 réplicas de cada bioensayo.

Los resultados de mortalidad obtenidos para cada especie se introdujeron al software Sigma Plot 11.0, para obtener el valor de la concentración letal media, mediante la derivación del valor probit (Finney, 1971).

Las concentraciones subletales de malatión se obtuvieron al hacer cuatro diluciones de la CL₅₀; por lo tanto, las concentraciones subletales de cada especie dependieron de su sensibilidad en la prueba de toxicidad aguda.

6.4.2 Pruebas de toxicidad crónica – efecto subletal

Una vez obtenida la CL₅₀-24h de malatión para cada especie, se derivaron cuatro concentraciones consideradas subletales (1/5; 1/10; 1/20 y 1/40 de la concentración letal media de cada especie). Para cada especie se analizaron cuatro concentraciones subletales de malatión y un grupo testigo (sin adición del plaguicida).

Crecimiento poblacional

Cada experimento se realizó con cada especie de cladóceros por separado. Por cada condición experimental se analizaron 10 individuos (60% juveniles, 40% neonatos/adultos), los cuales fueron colocados en recipientes de plástico de 50 ml. Durante las pruebas los organismos fueron alimentados diariamente (1x10⁶ cel/ml *Chlorella vulgaris*) y el medio en el que se realizaron los experimentos fue renovado diariamente (Scholten *et al.*, 2005). El grupo testigo consistió en 40 ml de medio EPA, alimentados con la misma concentración de alimento que los tratamientos que contenían malatión.

Se realizaron conteos diarios de la población en cada tratamiento. La duración del experimento dependió del tiempo en el que las curvas de crecimiento poblacional comenzaron a declinar en la mayoría de las réplicas. Para las especies *D. pulex* y *D. birgei* el experimento tuvo una duración de 21 días y para *M. macrocopa* 16 días.

Para calcular la tasa de crecimiento poblacional, los datos obtenidos fueron tratados mediante la siguiente fórmula (Krebs, 1985):

$$r = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t}$$

donde N₀ es la población inicial y N_t es la población final, en un tiempo (t) determinado en días.

Con los datos obtenidos a través del tiempo, se pudo estimar la abundancia máxima que alcanzó cada especie expuesta a cierta concentración de malatión, el tiempo en el cual consiguió dicha abundancia y la tasa de crecimiento poblacional.

Tablas de vida

Se colocaron 10 neonatos (menos de 24 horas de edad) en recipientes de plástico de 50 ml, con las mismas concentraciones subletales que se utilizaron en el experimento de crecimiento poblacional, la misma cantidad de alimento (1×10^6 cel/ml *Chlorella vulgaris*) y del mismo modo, se renovaba diariamente el medio de exposición.

Se realizaron conteos diarios de los individuos sobrevivientes y de su descendencia la cual era contada y descartada de modo que se efectuó el seguimiento durante todo el experimento a los mismos individuos de una cohorte (Kiorboe, 2008); los adultos vivos eran trasladados diariamente a recipientes en las mismas condiciones previas. Se utilizó un tratamiento control en el que los neonatos no fueron expuestos al plaguicida. Se realizaron 4 replicas por cada tratamiento.

Los datos obtenidos a través de estos conteos fueron sustituidos en las siguientes fórmulas, para calcular las diversas variables demográficas, de las tablas de vida de las tres especies:

| | |
|---|--|
| Tasa de crecimiento poblacional $\sum_{x=w}^n e^{-rx} \cdot l_x m_x = 1$ | Esperanza de vida $e_x = \frac{T_x}{n_x}$ |
| Tasa de reproducción bruta $R = \sum_0^{\infty} m_x$ | Tasa de reproducción neta $R_0 = \sum_0^{\infty} l_x \cdot m_x$ |
| Tiempo generacional $T = \frac{\sum l_x \cdot m_x \cdot x}{R_0}$ | Promedio de vida $L_x = \frac{n_x 1 + n_x 2}{2}$ |

donde m_x se refiere a la proporción de descendencia producida por hembra por día y l_x es la proporción de supervivencia por día (Kiorboe, 2008). T_x es el número de individuos por día y n_x es el número de individuos vivos, con edad determinada al inicio de las pruebas (Krebs, 1985).

Los resultados obtenidos de cada especie fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía con el fin de detectar diferencias significativas entre los distintos tratamientos y entre las diferentes respuestas de cada especie. Se utilizó la prueba de Tukey (Sokal y Rohlf, 1995) para determinar entre qué tratamientos específicamente se encontraban dichas diferencias. Estas pruebas fueron realizadas utilizando el programa estadístico Sigma Plot 11.0.

7. RESULTADOS

Las especies se obtuvieron de cultivos monoclonales. Se tomaron algunos individuos y con ayuda de claves taxonómicas se comprobó que se trataba de las especies *Daphnia pulex*, *Diaphanosoma birgei* y *Moina cf macrocopa* (figura 5).



Figura 5. Especies de cladóceros con las que se realizaron los experimentos (A) *D. pulex*; (B) *D. birgei* y (C) *M. macrocopa*

7.1 Determinación de la concentración real de “Malatión 500”

En la etiqueta del producto comercial utilizado (Malatión 500) se menciona que tiene una concentración de 500g/L de ingrediente activo. Sin embargo, la concentración real encontrada por la UAEMEX fue de 470 g/L (ver anexo 2).

Este resultado fue utilizado para preparar dos soluciones patrón que contenían 1000mg/L de malatión (concentración real). Una de estas soluciones contenía *C. vulgaris* mientras que la otra no. Los cromatogramas de estas soluciones se encuentran en los anexos 3 y 4. De acuerdo a los análisis efectuados en la Facultad de Química de la UAEMEX, la solución que no contenía *C. vulgaris* tuvo una concentración final de 30 mg/L de malatión después de 24 horas de haberse preparado; mientras que la solución que sí contenía microalga tuvo una concentración final de malatión de 21 mg/L malatión después 24 horas.

Las concentraciones experimentales se prepararon partiendo de la concentración real del producto comercial de 470 g/L de malatión. Sin embargo, los resultados de las pruebas para determinar la concentración real de las soluciones después de 24 horas de preparación sugieren que después de este tiempo la solución contiene apenas entre el 3 y 2% de la concentración original. Esto supone una rápida degradación de malatión en el medio.

7.2 Experimentos de toxicidad

7.2.1 Prueba de toxicidad aguda – Estimación de concentraciones subletales de malatión

Las concentraciones subletales en las pruebas de toxicidad crónica se estimaron a partir de los resultados obtenidos en las pruebas de toxicidad aguda.

La concentración letal media (CL_{50} -24h) para *Daphnia pulex* fue de $0.0088 \mu\text{gL}^{-1}$ con un intervalo de confianza (IC) de 0.0085 a 0.009 ($p < 0.05$), para la especie de *Diaphanosoma birgei* $0.0011 \mu\text{gL}^{-1}$ con IC 0.00107 a 0.00115 ($p < 0.05$), y $0.906 \mu\text{gL}^{-1}$ de malatión con IC 0.492 a 1.319 ($p < 0.05$) para *Moina macrocopa* (figura 6).

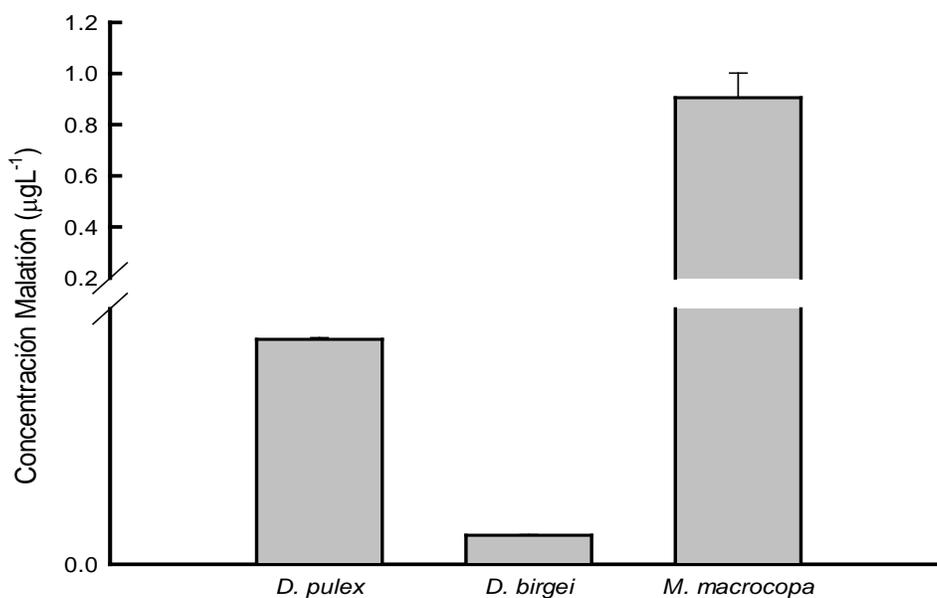


Figura 6. Concentración letal media (CL_{50}), para cada especie.

De acuerdo a los resultados, se puede observar la alta sensibilidad de *D. birgei* cuyo valor de CL_{50} es casi mil veces menor que el que se obtuvo para *M. macrocopa*. *D. pulex* presentó una sensibilidad 100 veces menor a *M. macrocopa*.

A partir de la concentración letal media de malatión en cada especie, se realizaron 4 diluciones (1/5; 1/10; 1/20 y 1/40) las cuales se consideran como concentraciones subletales (tabla 1) con las que se llevaron a cabo los experimentos para cuantificar el efecto de malatión sobre las variables poblaciones de cada especie.

En el caso de *M. macrocopa*, las concentraciones subletales se encuentran por encima del intervalo de malatión reportado para el Río Culiacán en Sinaloa ($0.015 - 0.0087 \mu\text{gL}^{-1}$); en contraste, las concentraciones subletales utilizadas para *D. pulex* y *D. birgei* se encuentran por debajo de la concentración reportada en Sinaloa, única concentración que se ha encontrado reportada en cuerpos de agua mexicanos (Leyva, 2009).

Tabla 1. Concentraciones de malatión (μgL^{-1}) utilizadas en las pruebas de toxicidad crónica, para cada especie.

| <i>Daphnia pulex</i> | <i>Diaphanosoma birgei</i> | <i>Moina macrocopa</i> |
|----------------------|----------------------------|------------------------|
| 0.0017 | 0.00022 | 0.181 |
| 0.00088 | 0.00011 | 0.090 |
| 0.00044 | 0.000055 | 0.045 |
| 0.00022 | 0.000028 | 0.022 |

Es importante mencionar que las concentraciones subletales estimadas para cada especie, se encuentran por debajo del límite de detección del equipo de cromatografía de gases que se utilizó. Por lo tanto, se debe tener en consideración que se trata de concentraciones nominales.

7.2.2 Pruebas de toxicidad crónica – efecto subletal

Crecimiento poblacional

La duración de este experimento fue especie-específica. En el caso de *D. pulex* y *D. birgei* fue de 21 días. Mientras que en el caso de *M. macrocopa*, después de 16 días de inicio del experimento, la curva de crecimiento poblacional comenzó a descender en todos los tratamientos y réplicas.

En el caso de *D. pulex*, la exposición al malatión no modificó el crecimiento poblacional significativamente (figura 7). Así mismo, no se encontraron diferencias significativas que demostraran modificaciones en los valores de densidad poblacional máxima. Sin embargo, cabe mencionar que la densidad poblacional máxima del tratamiento testigo y de la concentración más baja ($0.00022 \mu\text{gL}^{-1}$) fue menor a 1 indmL^{-1} alcanzadas dentro de los primeros 8 días del experimento, mientras que los organismos expuestos a mayores concentraciones de malatión alcanzaron densidades poblacionales mayores a 1 indmL^{-1} al día 10 del experimento (figura 10).

En el caso de *D. birgei* (figura 8), la exposición subletal al malatión modificó significativamente el crecimiento poblacional desde las concentraciones más bajas. En el tratamiento testigo la población comenzó a crecer desde los primeros días alcanzando una densidad máxima por encima de 1 indmL^{-1} a los 9 días, mientras que en los tratamientos con malatión la población ni siquiera comenzó su fase exponencial o fue muy pequeña, tuvieron una densidad poblacional que llegó a menos de la mitad de las muestras testigo (figura 10).

Los resultados obtenidos muestran que desde los primeros 3 días la especie *M. macrocopa* tiene un crecimiento poblacional mucho más grande que *D. pulex* y *D. birgei*, esto puede verse aún en los tratamiento que contenían malatión, excepto en la concentración más elevada. Los efectos negativos del malatión sobre el crecimiento poblacional de *M. macrocopa* sólo fueron observables en el tratamiento con la concentración más alta ($0.181 \mu\text{gL}^{-1}$).

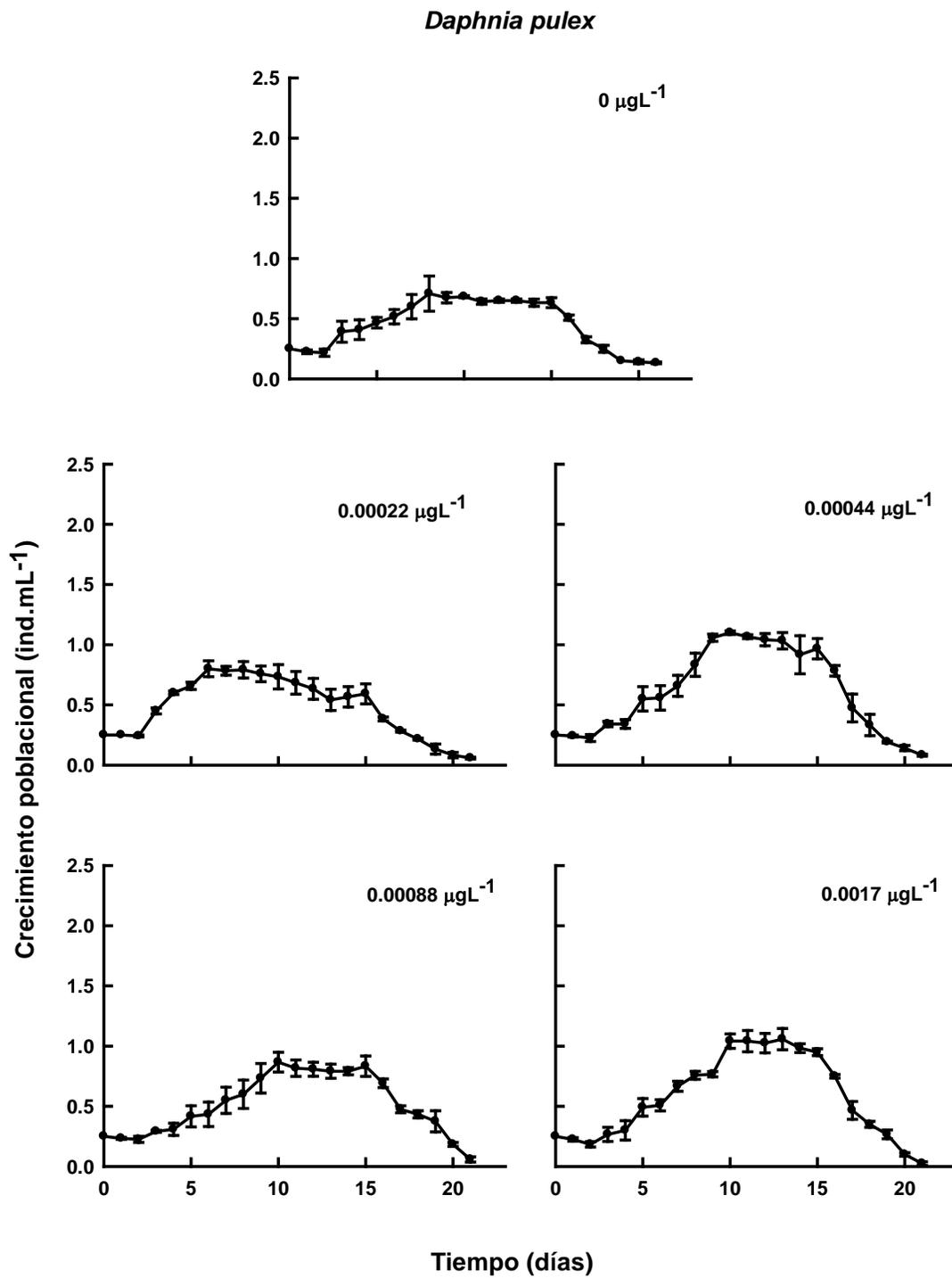


Figura 7. Curvas de crecimiento de *D. pulex* expuesta durante 21 días a cuatro diferentes concentraciones de malatión.

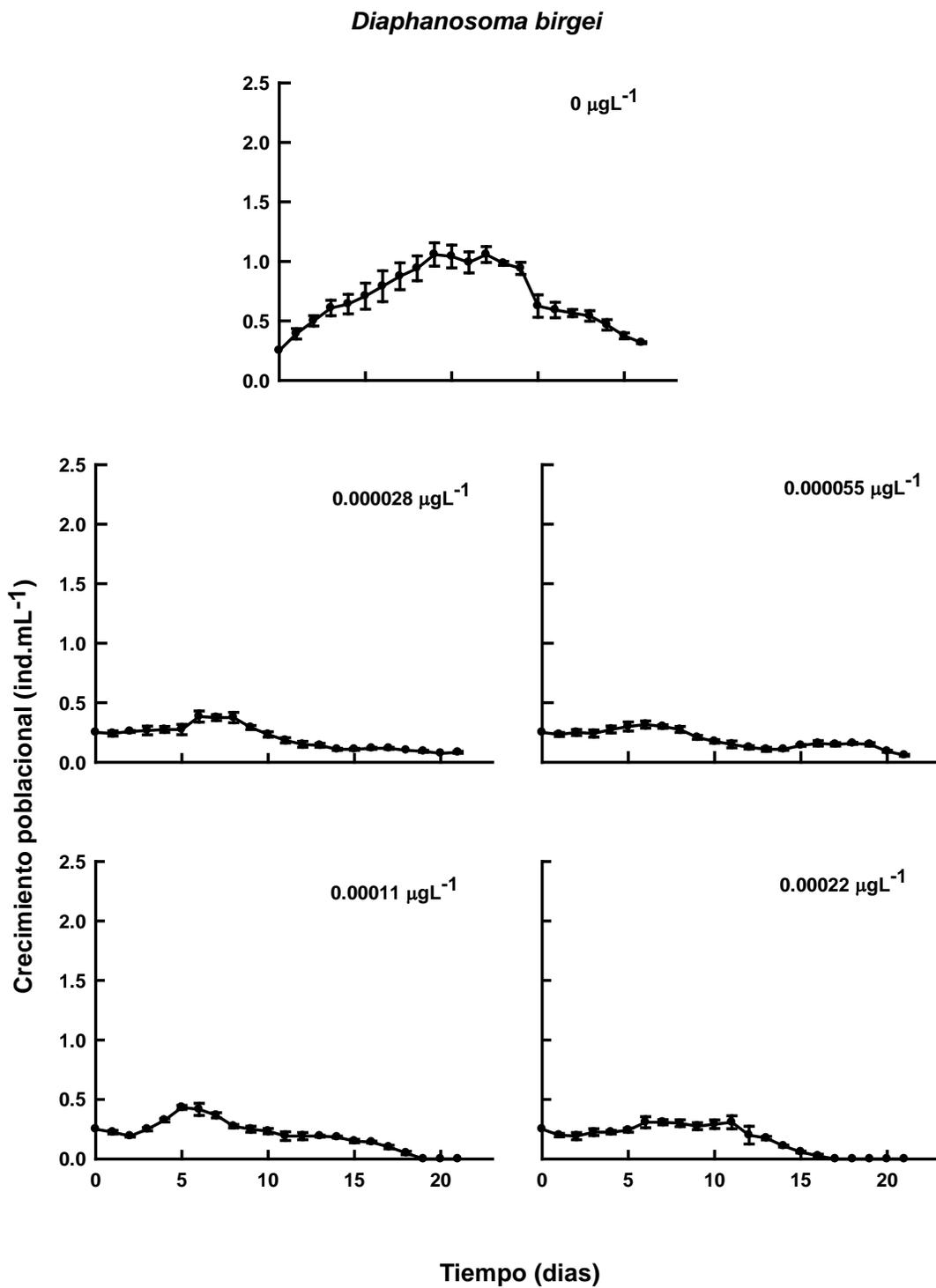


Figura 8. Curvas de crecimiento de *D. birgei* expuesta durante 21 días a cuatro diferentes concentraciones de malatión.

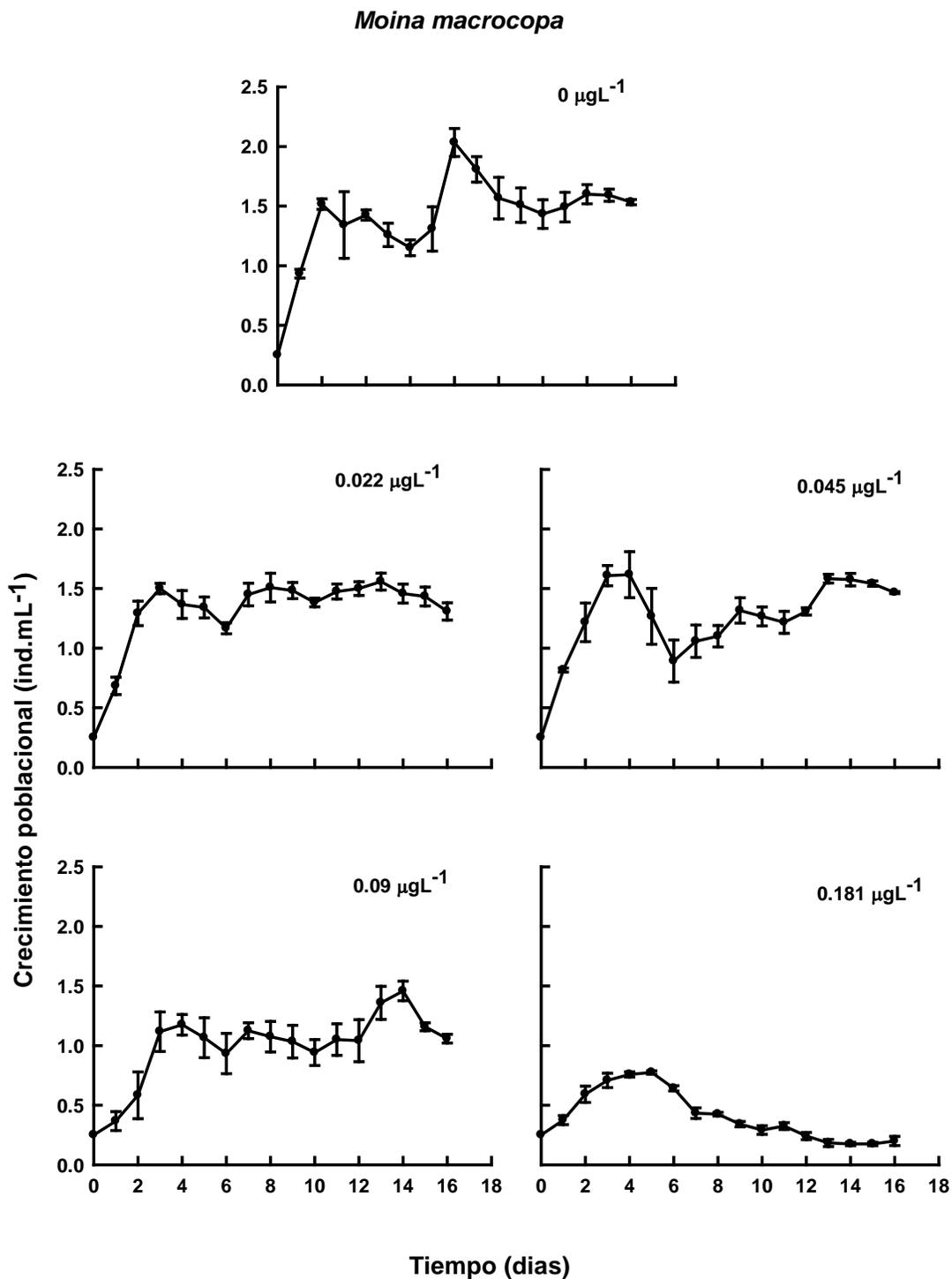


Figura 9. Curva de crecimiento de *M. macrocopa* expuesta durante 16 días a cuatro diferentes concentraciones de malatión.

En cuanto a la abundancia máxima, si bien en el caso de *D. pulex* (figura 10), se observa un ligero aumento en los tratamientos con las más altas concentraciones de malatión, 0.00088 y 0.0017 $\mu\text{g/L}$, estadísticamente no son diferentes del tratamiento testigo ($p > 0.05$).

La abundancia máxima de *D. birgei* es de 1.13 indmL^{-1} en el tratamiento testigo. Desde la concentración más baja del plaguicida, la abundancia máxima de esta especie disminuye significativamente ($p < 0.001$) con valores que no sobrepasan los 0.46 indmL^{-1} en todos los tratamientos con malatión, sin haber diferencias significativas entre ellos (tabla 2).

En el caso de *M. macrocopa*, los efectos significativos del malatión ($p < 0.05$) en la disminución de la abundancia poblacional máxima sólo se observaron en el tratamiento con la mayor concentración de malatión. La densidad poblacional máxima del tratamiento testigo fue 1.8 indmL^{-1} , mientras que en el tratamiento con la concentración más elevada (0.181 μgL^{-1}) se obtuvo un valor 2.5 veces menor, de 0.7 indmL^{-1} (figura 9).

Otra variable obtenida en este experimento fue la tasa de crecimiento poblacional (figura 11 y tabla 2). En el caso de *D. pulex*, los resultados obtenidos denotan que el plaguicida no ejerce un efecto significativo sobre la tasa de crecimiento de los organismos ($p > 0.05$).

En el caso de *D. birgei*, los organismos expuestos al malatión muestran tasas decrecimiento menores que los organismos dentro del tratamiento testigo. Sin embargo, no se observa una relación lineal significativa entre la concentración de malatión y la tasa de crecimiento poblacional. Los resultados de los tratamientos con plaguicida son significativamente diferentes a los del tratamiento control ($p < 0.05$) pero las tasas de crecimiento en los tratamientos con plaguicida no son diferentes entre ellos.

Del mismo modo, los valores de las tasas de crecimiento poblacional para la especie *M. macrocopa* no muestran una relación lineal con la concentración de malatión. Las diferencias significativas (tabla 2) sólo se encuentran entre el tratamiento testigo y el tratamiento con la concentración más elevada ($p < 0.05$).

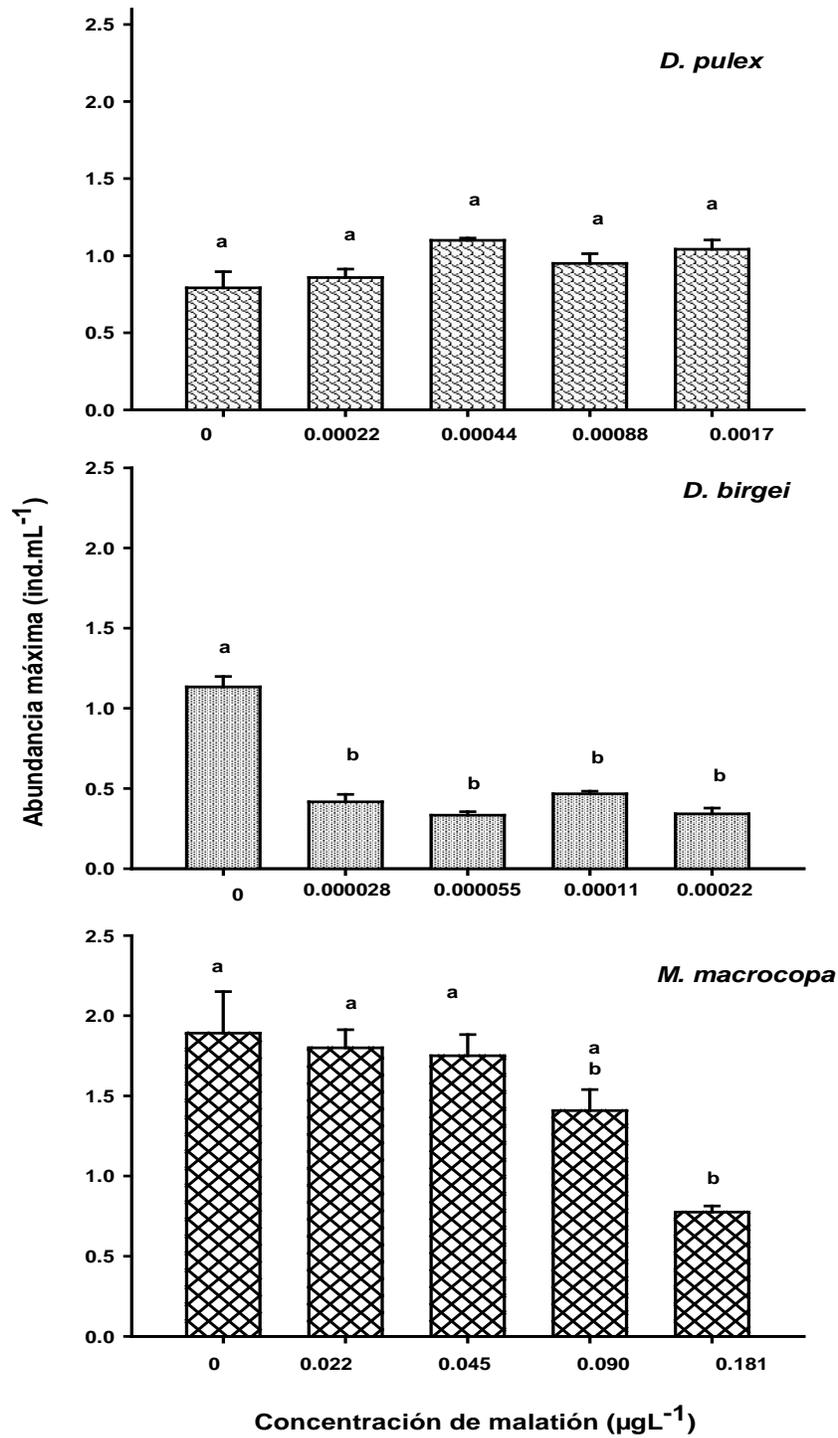


Figura 10. Abundancia máxima poblacional alcanzada por cada una de las especies, durante el experimento. Para cada especie, barras con letras diferentes denotan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$)

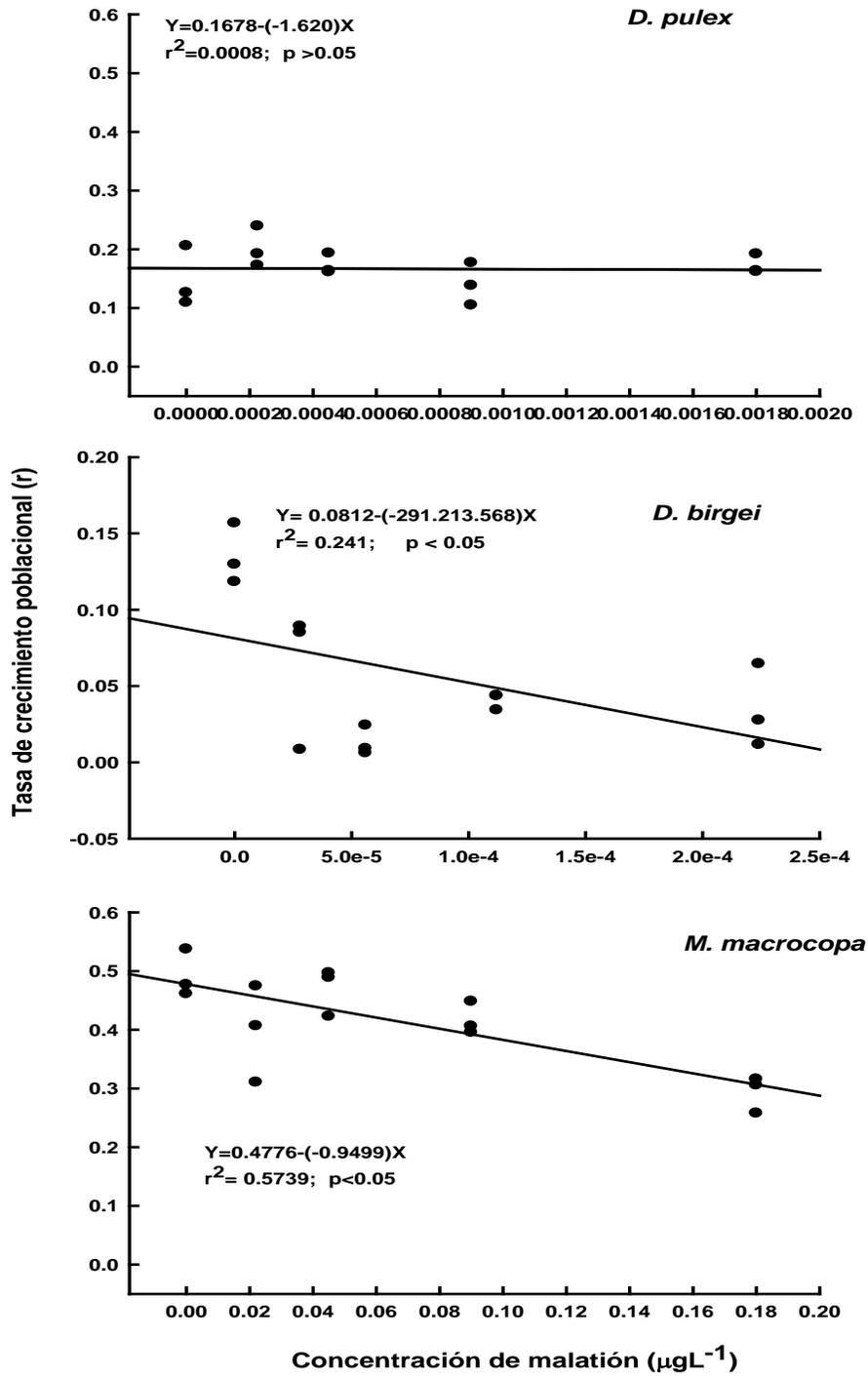


Figura 11. Tasa de crecimiento poblacional de las tres especies expuestas a diferentes concentraciones de malatión.

Tabla 2. Análisis de varianza de una vía de tasa de crecimiento poblacional y abundancia máxima. GL= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, MC= media cuadrática, F= prueba de Fisher, p= valor de significancia ($p < 0.05$; < 0.001). Las variables contenidas en esta tabla son tasa de crecimiento poblacional y abundancia máxima.

| Variable | GL | SC | MC | F | p |
|--|----|---------|----------|--------|------------------|
| Tasa de crecimiento poblacional | | | | | |
| <i>D. Pulex</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 0.00709 | 0.00177 | 1.539 | 0.264 |
| Residual | 10 | 0.0115 | 0.00115 | | |
| <i>D. Birgei</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 0.0263 | 0.00659 | 9.919 | < 0.05 |
| Residual | 10 | 0.00664 | 0.000664 | | |
| <i>M. Macrocopa</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 0.0721 | 0.180 | 7.632 | < 0.05 |
| Residual | 10 | 0.0236 | 0.00236 | | |
| Abundancia máxima | | | | | |
| <i>D. pulex</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 0.202 | 0.0506 | 1.867 | 0.193 |
| Residual | 10 | 0.271 | 0.0271 | | |
| <i>D. birgei</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 1.364 | 0.341 | 67.082 | <0.001 |
| Residual | 10 | 0.0508 | 0.00508 | | |
| <i>M. macrocopa</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 2.510 | 0.628 | 9.036 | <0.05 |
| Residual | 10 | 0.695 | 0.0695 | | |

Tablas de vida

Las variables que se obtuvieron a partir de las tablas de vida son: supervivencia, fecundidad, promedio de vida, esperanza de vida al nacer, tasa reproductiva bruta y neta, tiempo generacional y tasa de crecimiento poblacional.

En el caso de *D. pulex*, el malatión no altera la supervivencia de los neonatos en los primeros días de exposición (figura 12). En todos los tratamientos, incluyendo al testigo, la supervivencia comenzó a disminuir entre los días 15 y 16. Todos los individuos de la población mueren después de 20 y 21 días de comenzar el experimento, en todos los tratamientos. No se aprecian diferencias significativas entre los tratamientos con malatión y el testigo.

En el caso de *D. birgei* (figura 13) la supervivencia en el tratamiento testigo tiene una ligera disminución que comienza en el tercer día; en cuatro días, de 1 indmL⁻¹ disminuye a 0.75 indmL⁻¹. El día 28, la supervivencia decae drásticamente, al día 30 el valor poblacional es cero. En los tratamientos con malatión, aunque la disminución de la supervivencia en los primeros días no es diferente al testigo, el tiempo de vida de la población es menor. A los 20 días se comienza a notar una fuerte reducción en las 3 concentraciones más altas, entre los días 21 y 23 la población muere, 5 días antes que el tratamiento testigo.

En el caso de *M. macrocopa*, la estimación de supervivencia para los individuos en el tratamiento testigo comenzó a disminuir a partir del día 4. El tiempo total de supervivencia del último individuo de *M. macrocopa* fue de 14 días (figura 14). La exposición a malatión tiene efectos significativos en el tiempo de supervivencia de los organismos; en todos los tratamientos, los organismos expuestos al plaguicida sobreviven entre 6 y 8 días, la mitad del tiempo que los individuos en el tratamiento testigo.

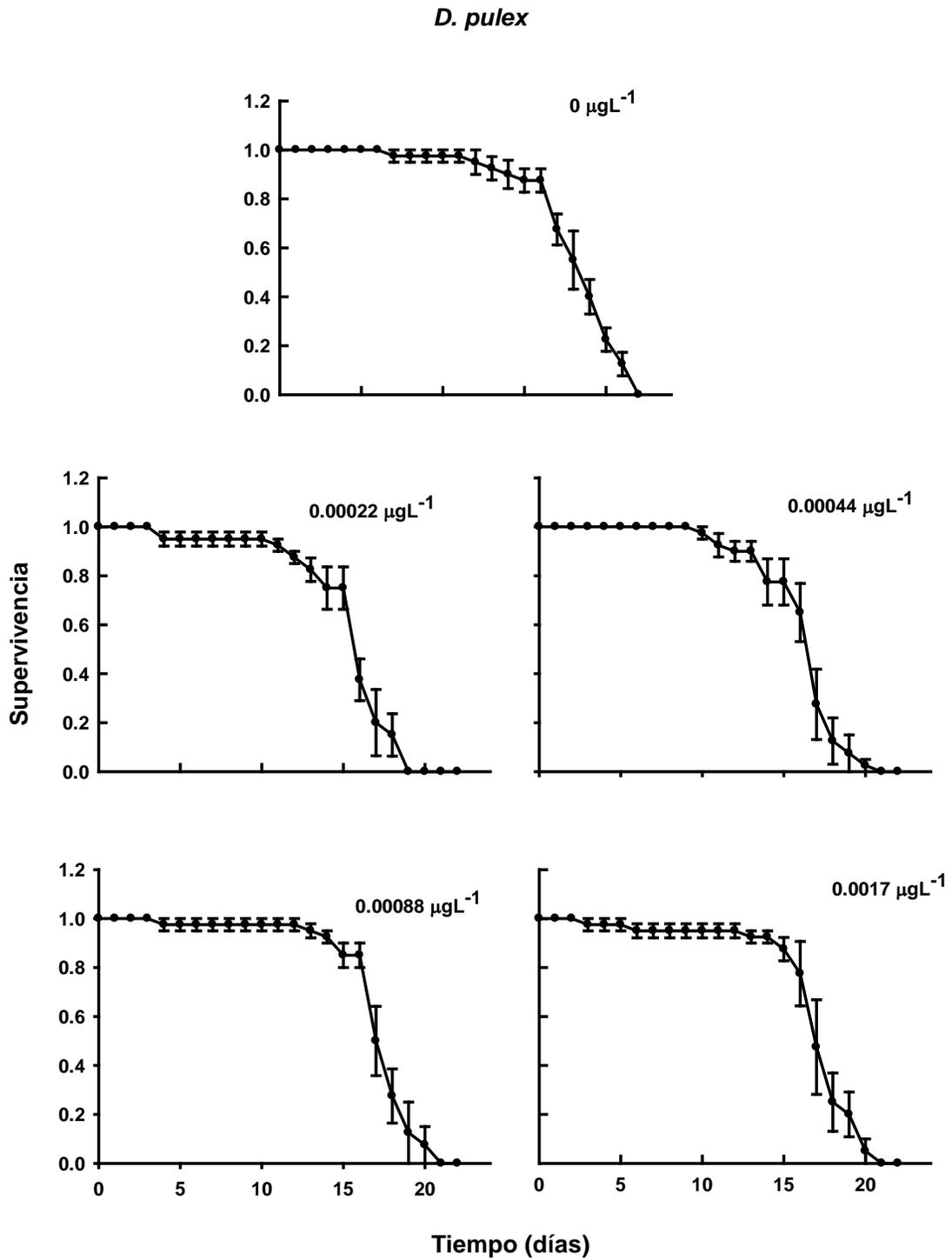


Figura 12. Curvas de supervivencia de *D. pulex* expuesta a cuatro concentraciones diferentes de malatión y alimentadas diariamente con 1×10^6 celmsL⁻¹ de *Chlorella vulgaris*.

D. birgei

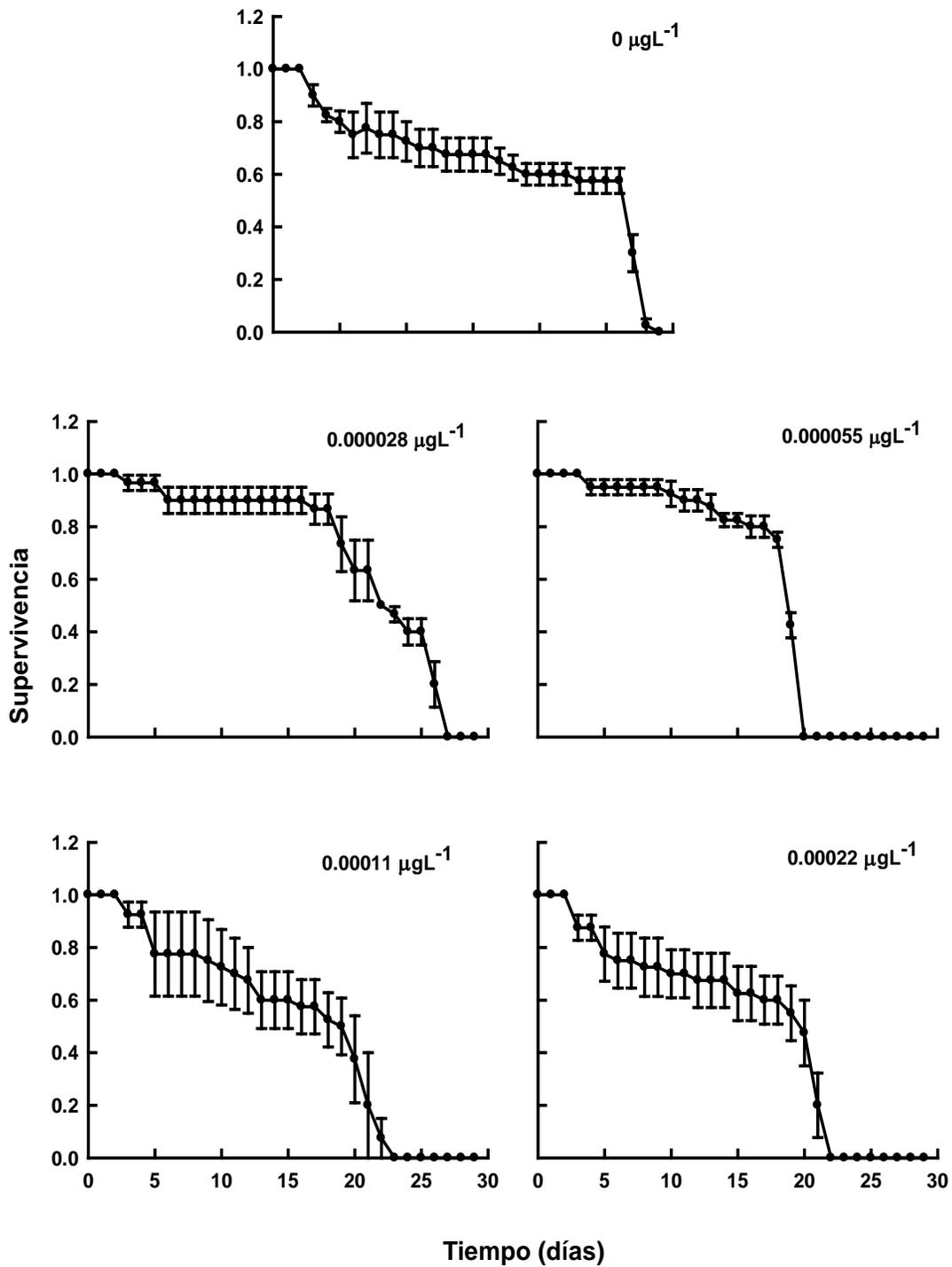


Figura 13. Curvas de supervivencia de *D. birgei* expuesta a cuatro concentraciones diferentes de malatión y alimentadas diariamente con 1×10^6 cel/mL de *Chlorella vulgaris*.

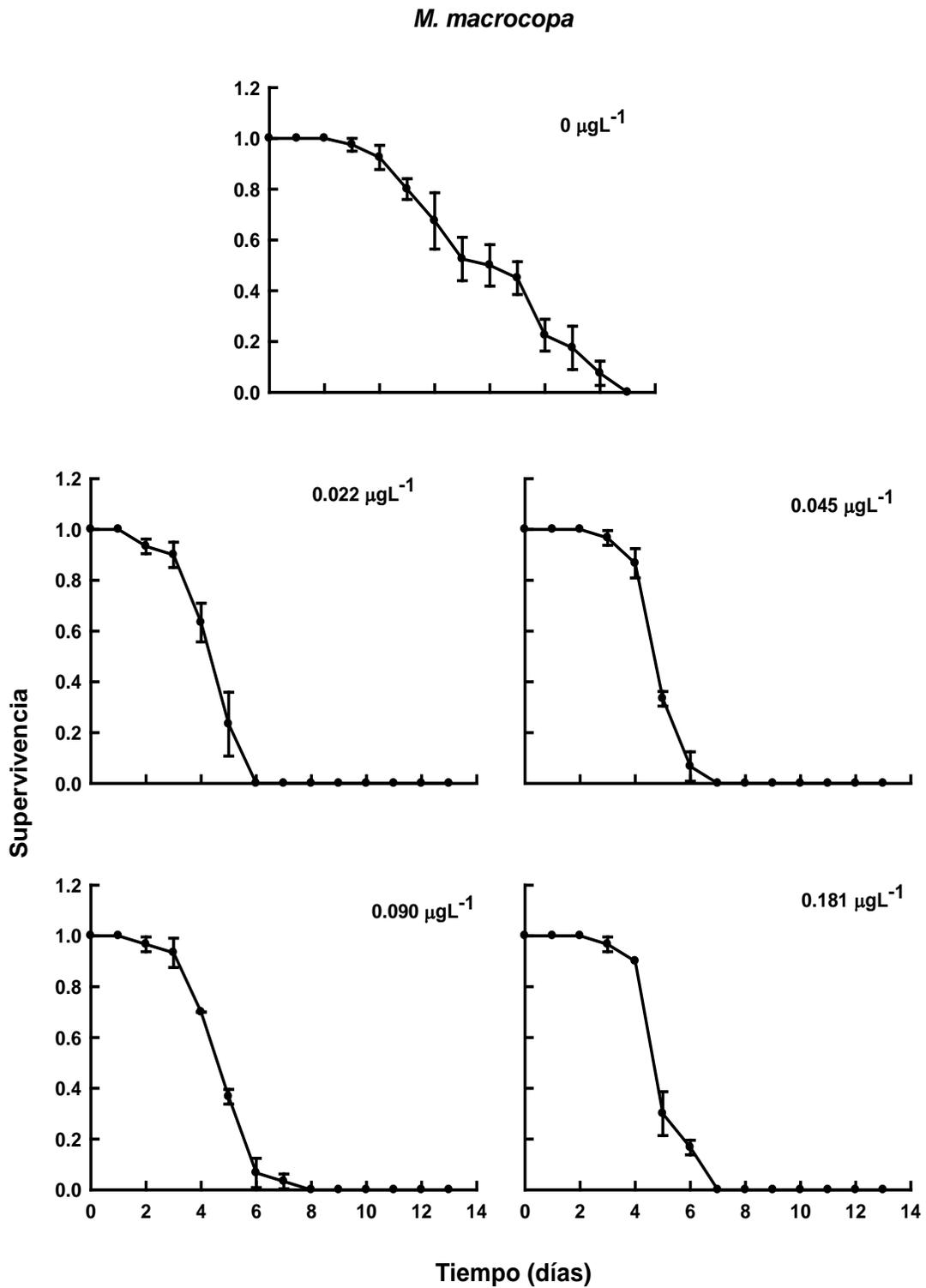


Figura 14. Curvas de supervivencia de *M. macrocopa* expuesta a cuatro concentraciones diferentes de malatión y alimentadas diariamente con 1×10^6 cel smL^{-1} de *Chlorella vulgaris*.

En el tratamiento testigo de *D. pulex* los neonatos comienzan a nacer el día 9 y continúan produciéndose hasta el día 18. Los organismos en este tratamiento alcanzan un máximo de fecundidad de 2 neonatos/hembra/día en el doceavo día (figura 15).

Mientras tanto, todos los tratamientos en los que los organismos están expuestos al malati3n presentan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.001$) respecto al tratamiento control. En el tratamiento con la menor concentraci3n de plaguicida ($0.00022 \mu\text{gL}^{-1}$), la fecundidad de los organismos disminuye en un 50%. En las tres concentraciones m3s elevadas la cantidad de neonatos disminuye hasta un 80%. En todos los tratamientos con plaguicida, la producci3n de neonatos se detiene 4 d3as antes que en el tratamiento testigo. Estad3sticamente, entre los tratamientos no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, la diferencia entre la fecundidad estimada en el tratamiento testigo y la de los organismos expuestos al malati3n, tiene un valor de significancia de $p < 0.001$.

En el caso de *D. birgei* (figura 16), en el grupo testigo, la producci3n de neonatos comienza en el d3a 6 y persiste hasta el d3a 24, un periodo total de 21 d3as. *D. birgei* alcanza un m3ximo de fecundidad de 2 neonatos/hembra/d3a, lo mismo que *D. pulex*, pero un d3a antes. Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la producci3n de neonatos en el tratamiento testigo y la producci3n en los tratamientos con malati3n. En el tratamiento con la menor concentraci3n ($0.000028 \mu\text{gL}^{-1}$) la producci3n total de neonatos disminuye un 50% aunque el tiempo durante el que se produjeron neonatos es tres d3as m3s que el tratamiento testigo. En las siguientes concentraciones, el periodo de producci3n de neonatos es de 8 d3as ($0.000055 \mu\text{gL}^{-1}$) y 14 d3as en la concentraci3n de $0.00011 \mu\text{gL}^{-1}$; en estos tratamientos la fecundidad disminuy3 74 y 61%, respectivamente. En la concentraci3n m3s elevada ($0.00022 \mu\text{gL}^{-1}$), la disminuci3n de la fecundidad fue del 58%, el tiempo durante el cual se produjeron neonatos fue de s3lo 14 d3as.

La producci3n de neonatos en el caso de *M. macrocopa* (figura 17), en el tratamiento testigo comienza en el d3a 4 y contin3a hasta el d3a 14. A los d3as 5 y 7 se obtiene el valor m3ximo de fecundidad de 6 neonatos/hembra/d3a, tres veces m3s que *D. pulex* y *D. birgei*. En los tratamientos con malati3n, la producci3n de neonatos disminuye a partir de la concentraci3n m3s baja; existen diferencias estadísticas significativas ($p < 0.001$) entre el tratamiento testigo y todos los tratamientos con plaguicida, no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos con malati3n.

A partir de la concentración más baja ($0.022 \mu\text{gL}^{-1}$) la producción de neonatos disminuye en un 60%, la producción de neonatos sólo se mantiene durante 4 días. En las concentraciones de 0.045 y $0.090 \mu\text{gL}^{-1}$ de malatión, la producción de neonatos disminuye 79 y 83%, respectivamente; el tiempo durante el cual se producen dichos neonatos tan sólo se mantiene entre 2 y 3 días. La concentración más elevada de plaguicida ($0.181 \mu\text{gL}^{-1}$) causa una disminución en la fecundidad del 73%, los días productivos fueron sólo 4.

En relación a los efectos del malatión en el promedio de vida de los organismos (figura 18), la prueba de Tukey no muestra diferencias significativas entre los tratamientos con y sin plaguicida en el caso de *D. pulex*; el promedio de vida de los individuos en el tratamiento testigo es en promedio 18 días, mientras que los individuos expuestos al plaguicida tienen un promedio de vida de entre 15 y 17 días ($p > 0.05$).

En la figura 18, se muestran también los resultados sobre los efectos del malatión en el promedio de vida de individuos de *D. birgei* y *M. macrocopa*. En el caso de *D. birgei*, se encuentran diferencias significativas entre el promedio de vida de los individuos del tratamiento testigo y el promedio de vida de los organismos expuestos a la concentración más elevada de malatión ($p < 0.05$). Los valores de promedio de vida de los individuos del tratamiento testigo y el que se observó en la concentración más elevada existe una diferencia de 6 días, la disminución en el promedio de vida fue de 30%. El promedio de vida de los organismos en el tratamiento testigo es de 20 días, dos días más que *D. pulex*.

En el caso de *M. macrocopa* el promedio de vida del tratamiento testigo es de 8 días y es estadísticamente diferente al promedio de vida observado en los organismos en los tratamientos con malatión. Todos los tratamientos con malatión tienen un promedio de vida similar, 5 días. La reducción del promedio de vida en los organismos expuestos a malatión es del 40%.

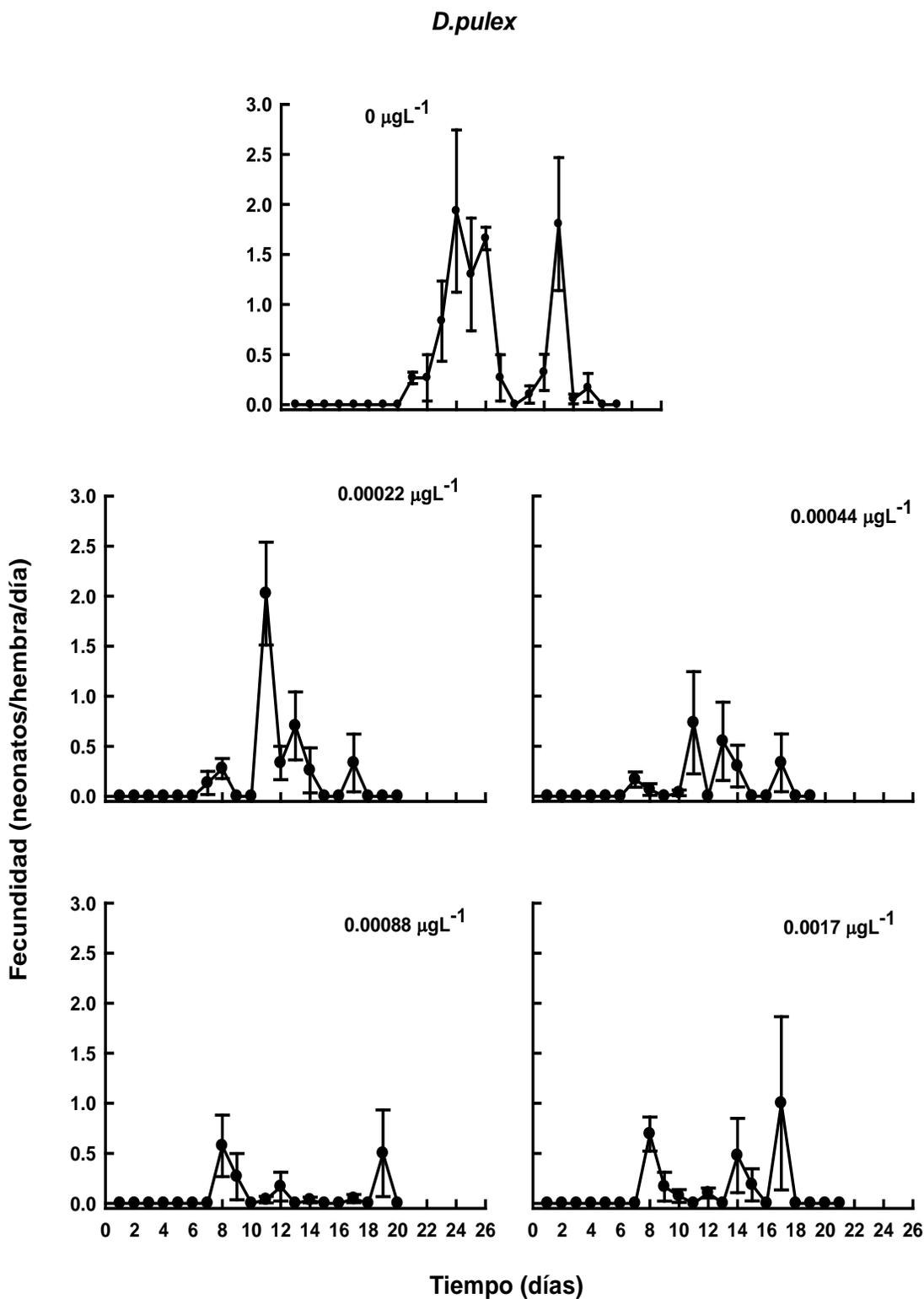


Figura 15. Proporción de neonatos por hembra por día de *D. pulex*. Resultados obtenidos en las cuatro concentraciones de malatión.

D. birgei

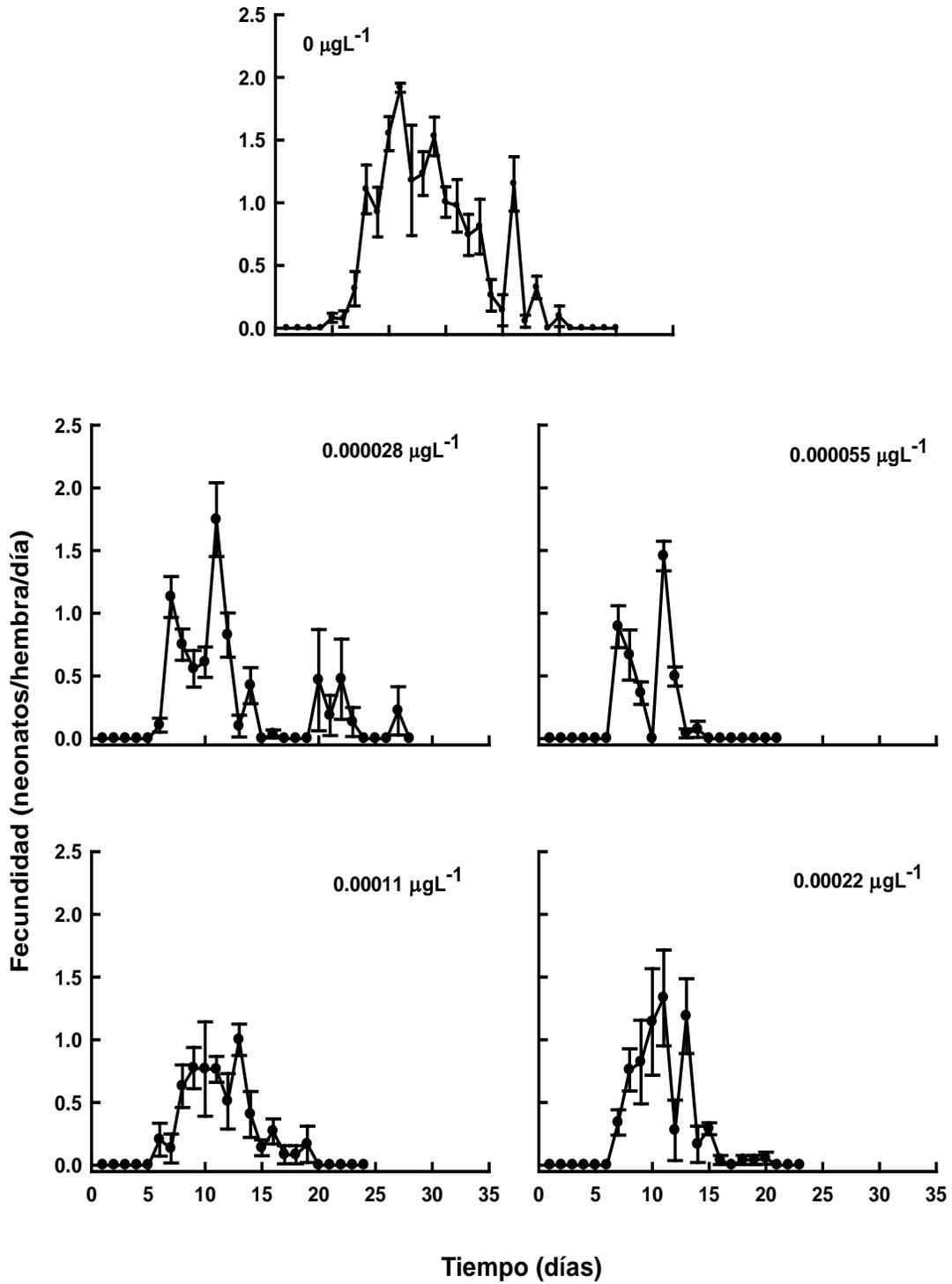


Figura 16. Proporción de neonatos por hembra por día de *D. birgei*. Resultados obtenidos en las cuatro concentraciones de malatión.

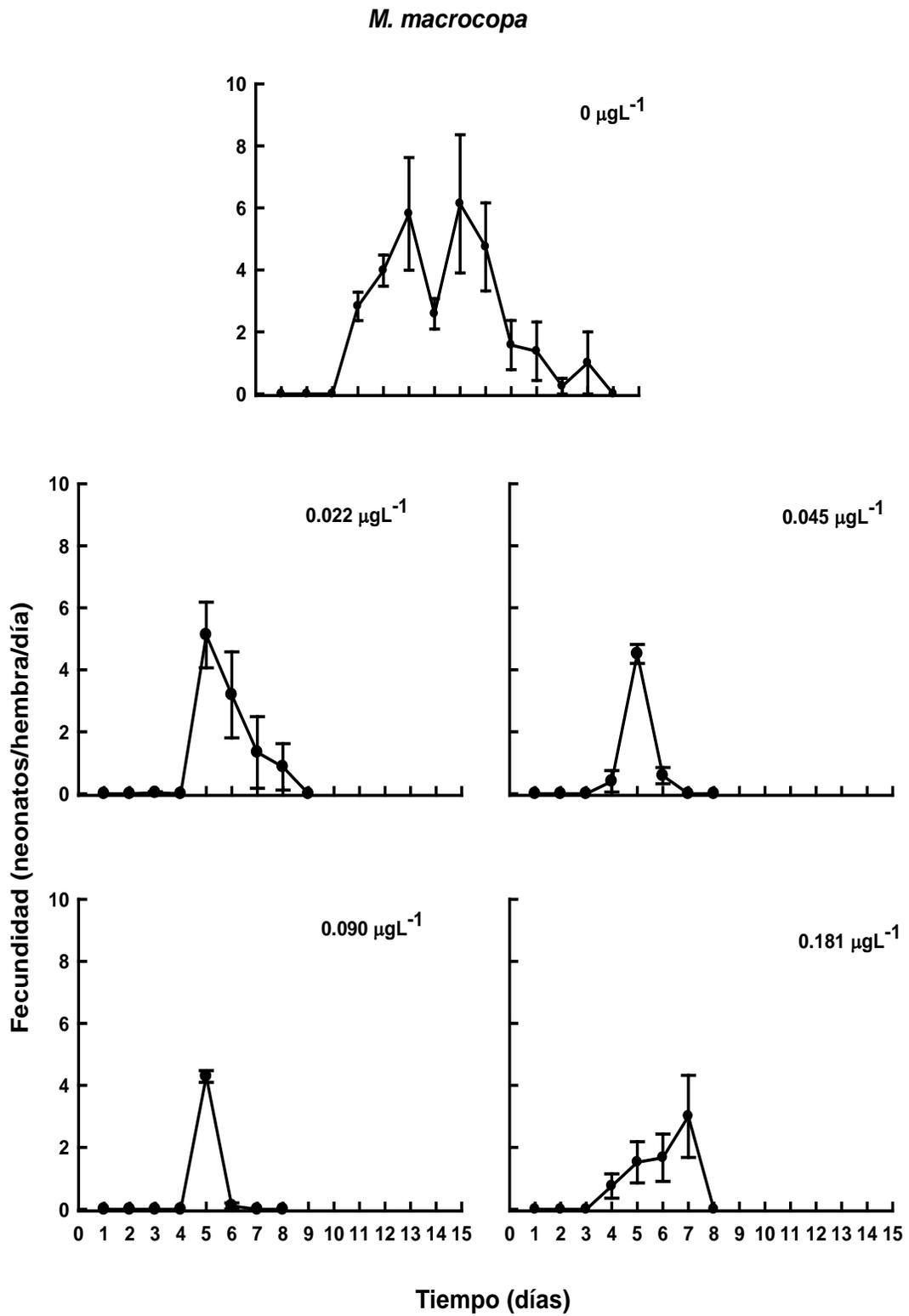


Figura 17. Proporción de neonatos por hembra por día de *M. macrocopa*. Resultados obtenidos en las cuatro concentraciones de malatión.

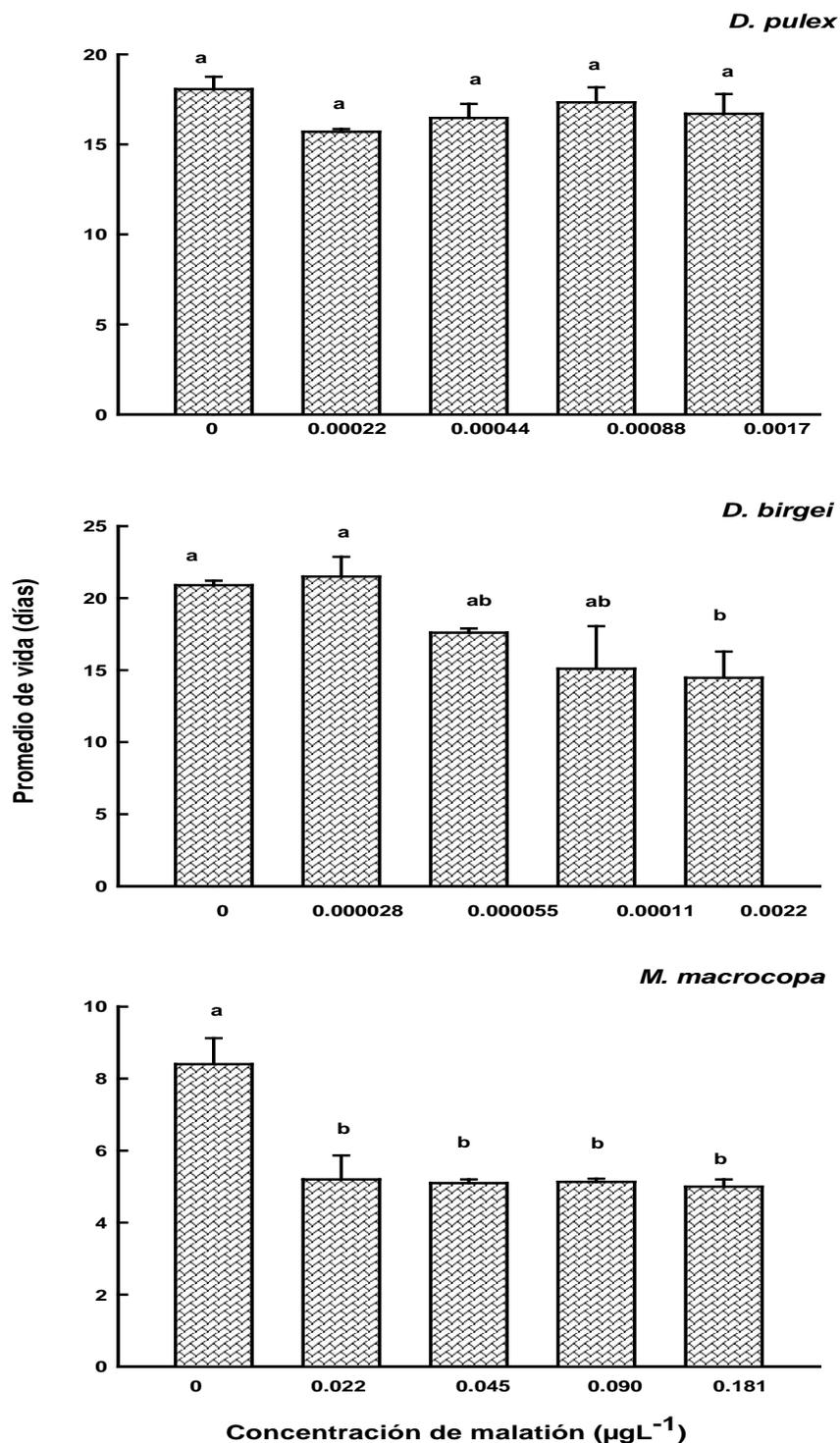


Figura 18. Promedio de vida en días de los individuos de cada especie. En la parte superior: *D. pulex*, en medio: *D. birgei* y abajo: *M. macrocopa*. Cada especie fue expuesta a sus respectivas concentraciones de malatión. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Otra variable que se analiza a través de las tablas de vida es la esperanza de vida (figura 19). En el caso de *D. pulex*, la esperanza de vida de los individuos en todos tratamientos, incluido el tratamiento testigo, es similar estadísticamente. La esperanza de vida varía entre 15 y 17 días. Esto quiere decir que a partir del momento de nacimiento se esperaría que organismos vivan entre 15 y 17 días. Los resultados no muestran que los valores en la esperanza de vida no sean modificados como consecuencia de la exposición al malatión en los individuos de *D. pulex*.

La esperanza de vida para los individuos de *D. birgei* en el tratamiento testigo es de 20 días, tres días más que *D. pulex*. La exposición al malatión no muestra efecto en la esperanza de vida en las tres concentraciones más bajas; sin embargo, en la concentración más elevada de plaguicida ($0.00022 \mu\text{gL}^{-1}$) la esperanza de vida disminuye en un 20%, esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Los individuos de *M. macrocopa*, en el tratamiento testigo muestran una esperanza de vida más corta que *D. pulex* y *D. birgei*. Como ya pudo observarse en los resultados de promedio de vida, *M. macrocopa* tiene un ciclo de vida mucho más corto que las otras dos especies, lo que se ve reflejado también en la esperanza de vida. En el tratamiento testigo, los individuos de *M. macrocopa* tienen un promedio de esperanza de vida de 8 días, este resultado es estadísticamente diferente a la esperanza de vida que presentan los organismos expuestos a malatión. En todos los tratamientos con malatión, la esperanza de vida es de 4 días, 50% menos que los organismos que no estuvieron expuestos al plaguicida. Estos resultados muestran que la esperanza de vida de los organismos disminuye al ser expuestos al malatión; es importante mencionar también que no se encontraron diferencias significativas entre los resultados de los tratamientos con plaguicida, lo que quiere decir que la concentración de plaguicida no muestra una relación con la magnitud de la disminución en la esperanza de vida.

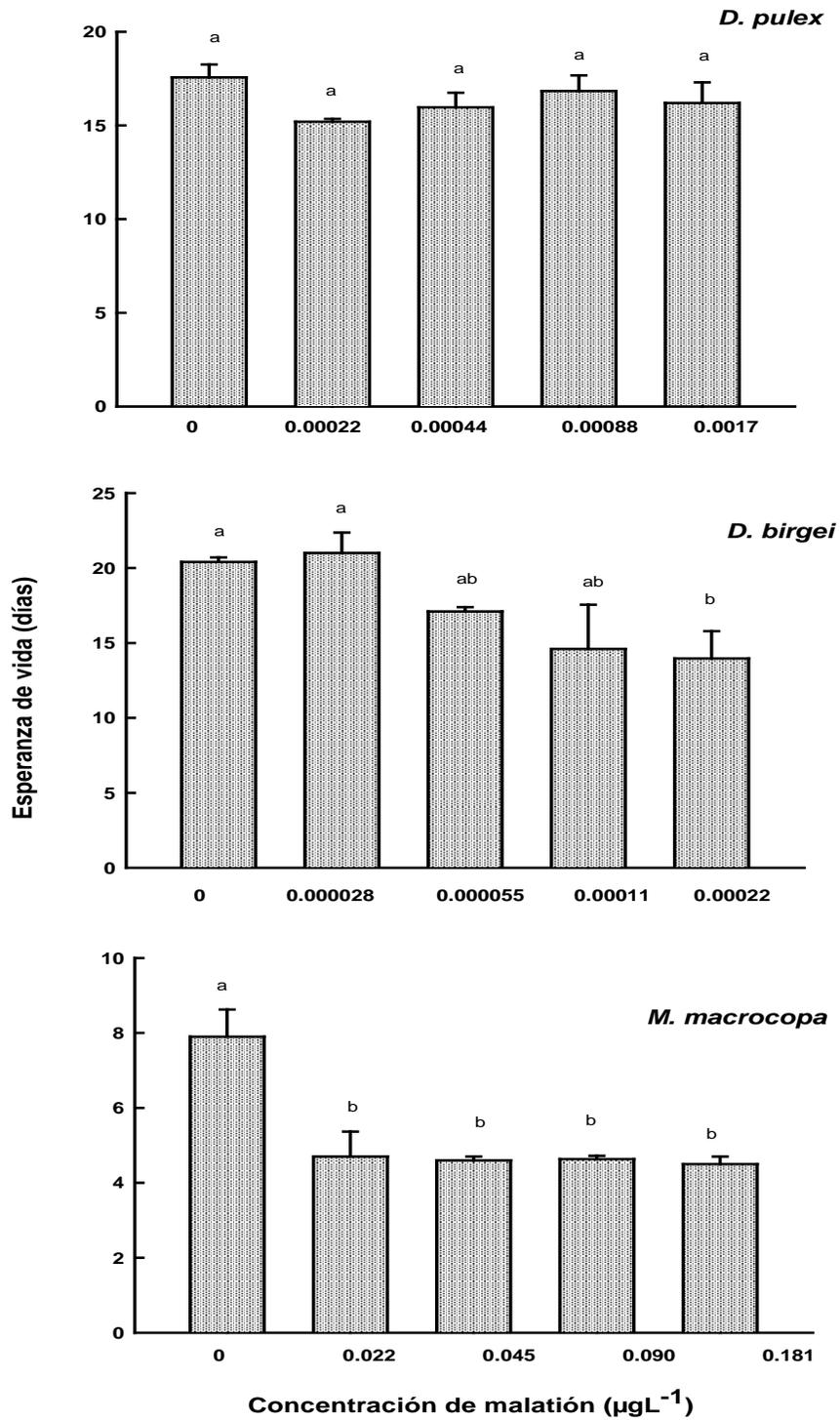


Figura 19. Esperanza de vida en días de los individuos de cada especie. En la parte superior: *D. pulex*, en medio: *D. birgei* y abajo: *M. macrocopa*. Cada especie fue expuesta a cuatro diferentes concentraciones subletales de acuerdo a su sensibilidad. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

A través de los análisis de las tablas de vida, se registra también el efecto de malatión sobre valores de reproducción bruta y neta en las tres especies.

Los valores de reproducción bruta y neta en los individuos de *D. pulex* expuestos a malatión son muy variables, no es posible registrar una diferencia significativa (tabla 3) entre los individuos expuestos al plaguicida y aquellos en el tratamiento control. Sin embargo, en las concentraciones intermedias (0.00045 y 0.0009 μgL^{-1}) la cantidad de crías por hembra se reduce hasta en un 75% (figura 20); el incremento de estos valores en los individuos que se encuentran en el tratamiento con la concentración más alta, podría representar una respuesta al estrés por parte de esta especie. Sin embargo, son necesarios estudios más especializados sobre el efecto de plaguicidas en variables reproductivas para entender esta relación. Durante el tiempo que los individuos de *D. pulex* son expuestos a las concentraciones intermedias, la drástica disminución en los valores de reproducción compromete el remplazo de estos individuos en la población; por lo tanto, es posible notar efectos negativos en la tasa de crecimiento poblacional en estos tratamientos (figura 23).

En el caso de *D. birgei*, es estadísticamente significativa (<0.001) la diferencia entre los valores de tasa de reproducción bruta y neta (tabla 3). El efecto se evidencia desde la concentración de malatión más baja, donde la cantidad total de crías producidas se reduce la mitad (figura 20). Aunque el efecto en estas variables es significativo, la tasa de crecimiento poblacional se ve afectada principalmente hasta que los organismos son expuestos a las tres concentraciones más elevadas del plaguicida (figura 23), reduciéndose en un 40%.

Los efectos del malatión son más evidentes aún en los individuos de *M. macrocopa*, desde las concentraciones subletales más bajas la diferencia es estadísticamente significativa respecto a los individuos que se encuentran en el tratamiento testigo (<0.001), y la tasa de reproducción bruta se reduce hasta en un 85% (figura 20); en el caso de la tasa reproductiva neta (figura 21) se observa que esta disminución se acentúa conforme la concentración de malatión aumenta. Debido a que la cantidad de crías que podrían reemplazar a la generación previa, la tasa de crecimiento poblacional también decrece de manera significativa (<0.001) con el aumento de la concentración de malatión en el medio (figura 23), desde una reducción del 40% en la concentración más baja (0.022 μgL^{-1}), hasta en un 70% en una concentración 8 veces mayor (0.181 μgL^{-1}).

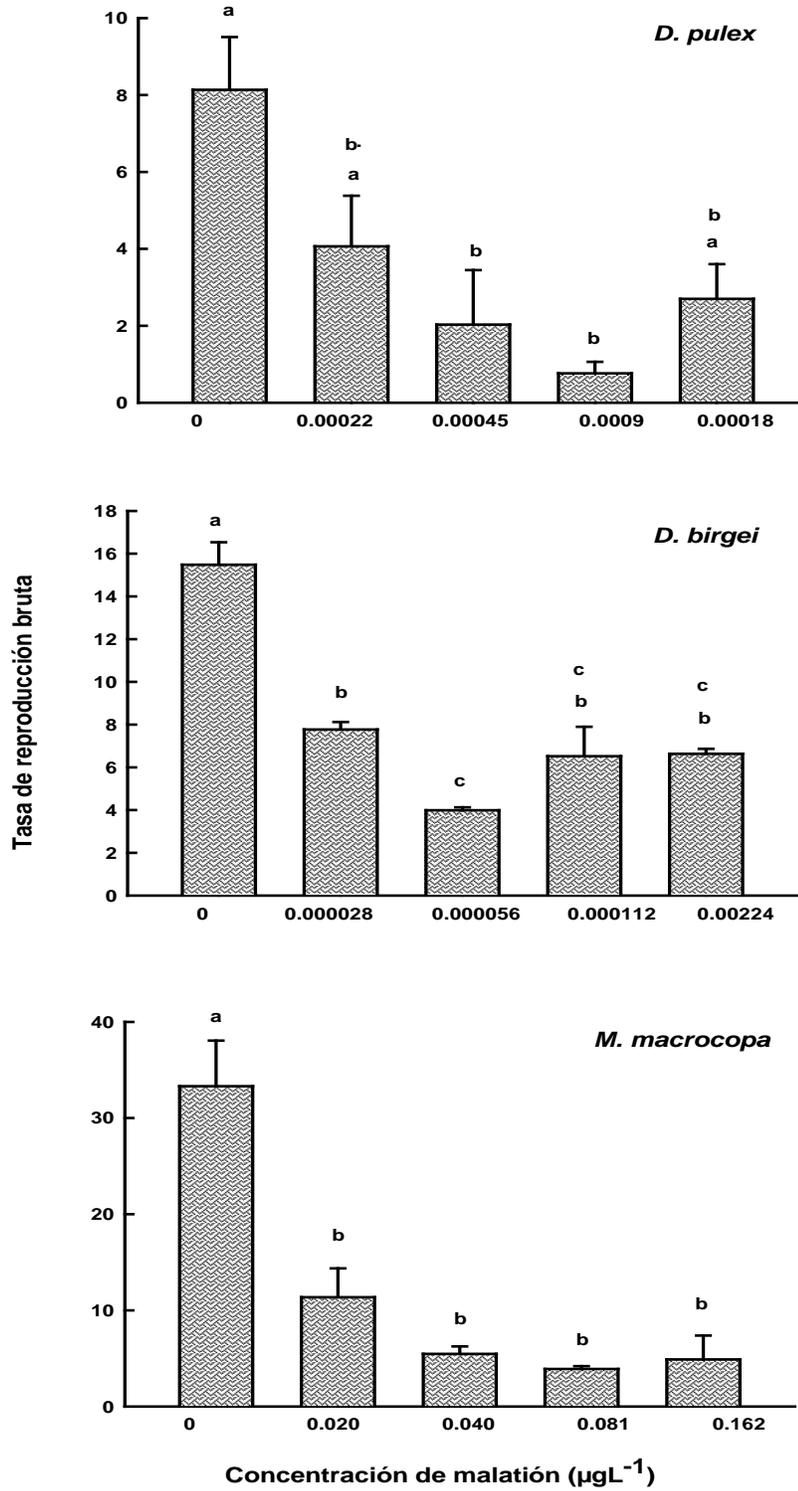


Figura 20. Tasa de reproducción bruta de cada especie. En la parte superior: *D. pulex*, en medio: *D. birgei* y abajo: *M. macrocopa*. Cada especie fue expuesta a cinco diferentes concentraciones subletales de acuerdo a su sensibilidad. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

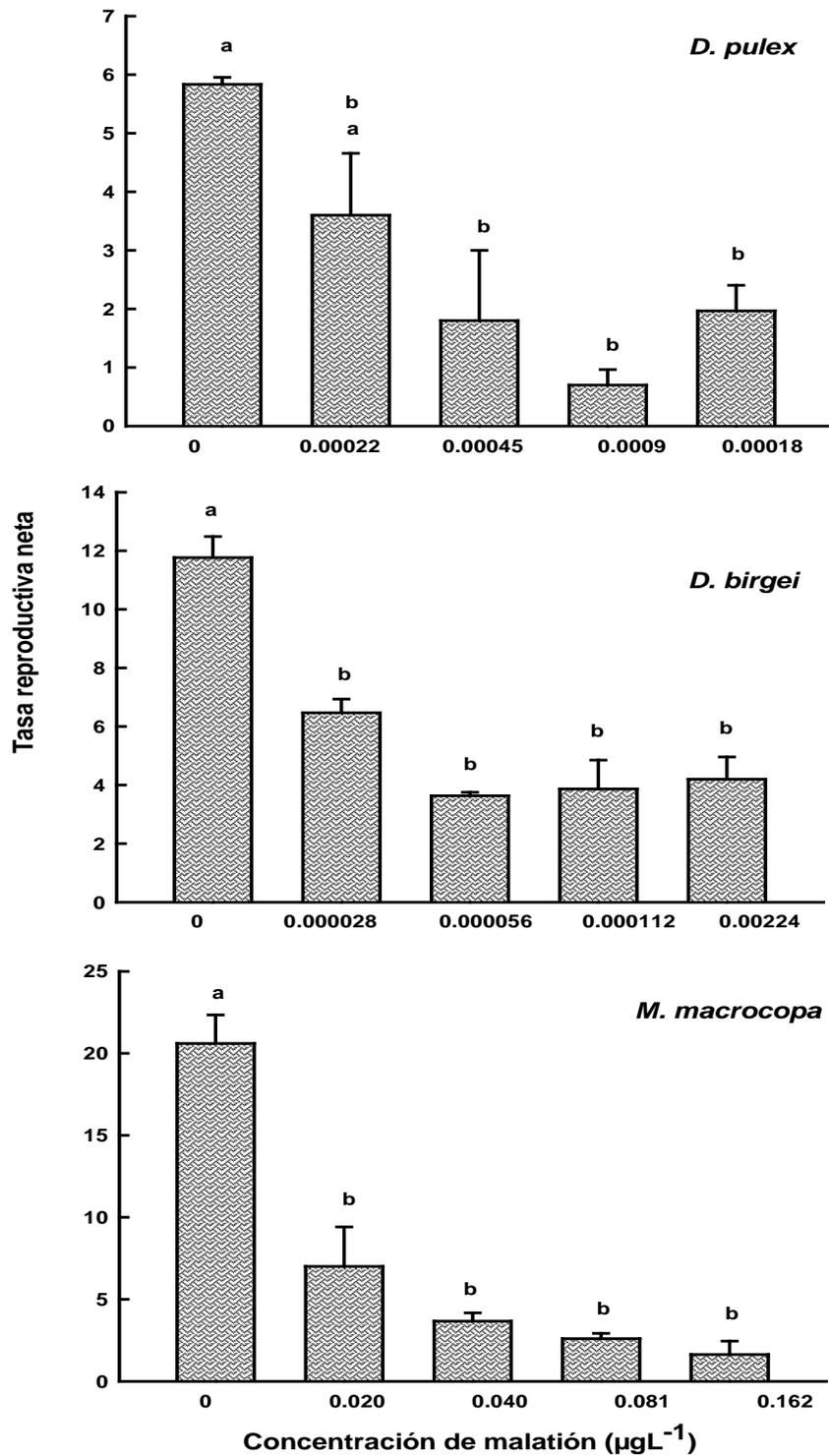


Figura 21. Tasa de reproducción neta de cada especie. En la parte superior: *D. pulex*, en medio: *D. birgei* y abajo: *M. macrocopa*. Cada especie fue expuesta a cuatro diferentes concentraciones subletales de acuerdo a su sensibilidad. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

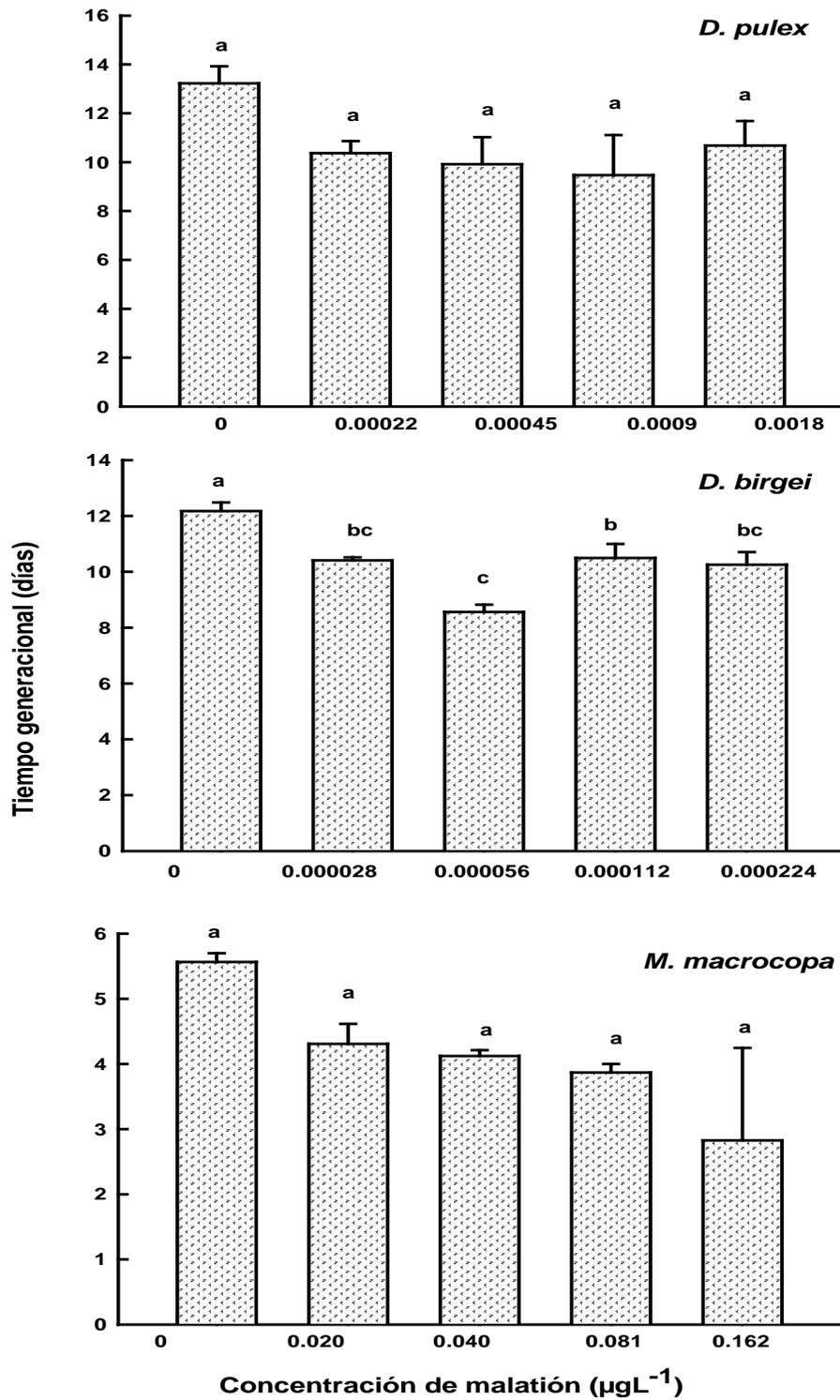


Figura 22. Tiempo generacional de cada especie. En la parte superior: *D. pulex*, en medio: *D. birgei* y abajo: *M. macrocopa*. Cada especie fue expuesta a cuatro diferentes concentraciones subletales de acuerdo a su sensibilidad. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

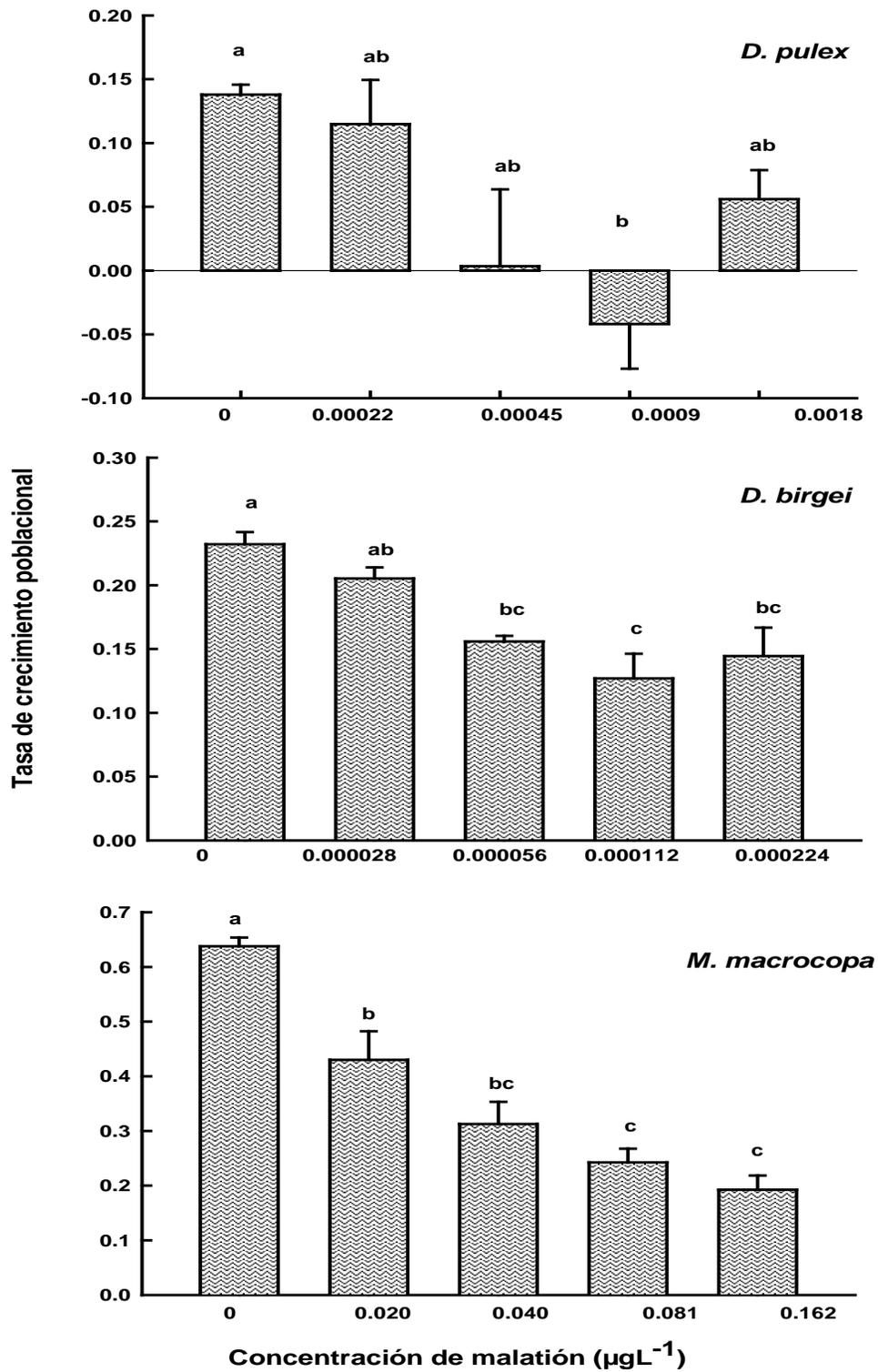


Figura 23. Tasa de crecimiento poblacional de cada especie. En la parte superior: *D. pulex*, en medio: *D. birgei* y abajo: *M. macrocopa*. Cada especie fue expuesta a cuatro diferentes concentraciones subletales de acuerdo a su sensibilidad. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 3. Análisis de varianza de una vía de las variables de tabla de vida. GL=grados de libertad, SC=suma de cuadrados, MC=media cuadrática, F= prueba de Fisher, p = valor de significancia (p< 0.05, <0.001)

| Variable | GL | SC | MC | F | p |
|--------------------------|----|---------|--------|--------|-----------------|
| Promedio de vida | | | | | |
| <i>D. pulex</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 18.157 | 4.539 | 2.688 | 0.093 |
| Residual | 10 | 16.887 | 1.689 | | |
| <i>D. birgei</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 125.031 | 31.258 | 3.699 | <0.05 |
| Residual | 10 | 84.507 | 8.451 | | |
| <i>M. macrocopa</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 26.067 | 6.517 | 10.602 | <0.01 |
| Residual | 10 | 6.147 | 0.615 | | |
| Esperanza de vida | | | | | |
| <i>D. pulex</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 18.157 | 4.539 | 2.688 | 0.093 |
| Residual | 10 | 16.887 | 1.689 | | |
| <i>D. birgei</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 125.031 | 31.258 | 3.699 | 0.043 |
| Residual | 10 | 84.507 | 8.451 | | |
| <i>M. macrocopa</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 26.067 | 6.517 | 10.602 | <0.01 |
| Residual | 10 | 6.147 | 0.615 | | |

Continúa tabla 3.

| Variable | GL | SC | MC | F | p |
|--|----|---------|----------|--------|------------------|
| Tiempo generacional | | | | | |
| <i>D. pulex</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 19.605 | 4.901 | 1.450 | 0.288 |
| Residual | 10 | 33.798 | 3.380 | | |
| <i>D. birgei</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 19.712 | 4.928 | 12.981 | <0.001 |
| Residual | 10 | 3.796 | 0.380 | | |
| <i>M. macrocopa</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 11.725 | 2.931 | 2.063 | 0.169 |
| Residual | 10 | 12.790 | 1.421 | | |
| Tasa de crecimiento poblacional | | | | | |
| <i>D. pulex</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 0.0828 | 0.0207 | 4.732 | 0.021 |
| Residual | 10 | 0.0537 | 0.00437 | | |
| <i>D. birgei</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 0.0232 | 0.00581 | 9.115 | 0.002 |
| Residual | 10 | 0.00638 | 0.000638 | | |
| <i>M. macrocopa</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 0.378 | 0.0946 | 28.546 | <0.001 |
| Residual | 10 | 0.0356 | 0.00356 | | |

Continúa tabla 3.

| Variable | GL | SC | MC | F | p |
|-----------------------------------|----|----------|---------|--------|------------------|
| Tasa de reproducción bruta | | | | | |
| <i>D. pulex</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 121.070 | 30.267 | 5.339 | 0.015 |
| Residual | 10 | 56.690 | 5.669 | | |
| <i>D. birgei</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 228.352 | 57.088 | 29.684 | <0.001 |
| Residual | 10 | 19.232 | 1.923 | | |
| <i>M. macrocopa</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 1839.189 | 459.797 | 19.919 | <0.001 |
| Residual | 10 | 230.835 | 23.083 | | |
| Tasa de reproducción neta | | | | | |
| <i>D. pulex</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 96.887 | 24.222 | 5.315 | 0.015 |
| Residual | 10 | 45.573 | 4.557 | | |
| <i>D. birgei</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 140.591 | 35.148 | 25.531 | <0.001 |
| Residual | 10 | 13.767 | 1.377 | | |
| <i>M. macrocopa</i> | | | | | |
| Entre grupos | 4 | 745.162 | 186.290 | 35.796 | <0.001 |
| Residual | 10 | 46.838 | 5.204 | | |

8. DISCUSIÓN

Los cladóceros son un grupo relevante en ecotoxicología, los géneros más utilizados son *Daphnia*, *Ceriodaphnia* y *Moina*. Los trabajos de ecotoxicología usan repetidamente la misma especie: *D. magna* y nace la disyuntiva entre las perspectivas globales y las nacionales o locales (Ramírez-Mangas *et al.*, 2001, Hayasaka *et al.*, 2012, Sarma y Nandini, 2006). En México, por ejemplo, la norma oficial mexicana para estudios de ecotoxicología (NMX-AA-087-1995-SCFI) se basa en estudios hechos con *D. magna* lo cual podría no ser representativo para el país, pues se trata de una especie exótica que no se encuentra de manera natural en México.

En el presente proyecto, se utilizaron especies que se encuentran de manera natural en cuerpos de agua mexicanos y que además pueden tener importancia o relevancia a nivel global. Los organismos cultivados fueron revisados taxonómicamente. *Daphnia pulex* y *Diaphanosoma birgei* presentaron todas las características que reconocen a tales especies, se revisaron estructuras como la presencia o ausencia de ocelo, la garra postabdominal, los márgenes del caparazón, las antenas, los apéndices, la forma de la cabeza, el tamaño de la espina en el caso de *D. pulex*. Las claves taxonómicas con las que se identificaron estas especies corresponden a Dumont (2005) en el caso de *D. pulex* y Korinek (2002) para *D. birgei*.

En el caso de *Moina macrocopa*, los organismos cultivados en laboratorio presentaron la mayoría de las características con las que se reconoce a la especie *M. macrocopa*. Sin embargo, hubo características que no coincidieron, por ejemplo, según Goulden (1968) y Elías-Gutiérrez (2008) esta especie generalmente presenta pelos en todo el cuerpo mientras que los organismos cultivados carecían de pelo en la cabeza. Así también, la seta anterior del penúltimo segmento del primer apéndice torácico tiene, según la literatura, una hilera unilateral de espinas gruesas. Sin embargo, en nuestros organismos estas espinas no son cortas y gruesas sino delgadas y largas. Es por eso que se trató como *Moina cf macrocopa*.

8.1 Determinación de la concentración real de “Malatión 500”

Varios trabajos que involucran toxicidad de pesticidas o metales pesados, utilizan concentraciones nominales (Groner y Relyea, 2011). Generalmente, no se considera la concentración real de éstos durante las condiciones experimentales, debido a la dificultad, la carencia del equipo, entre otras causas (Wong, 1995). Otro de los inconvenientes que se presentan al intentar medir la concentración real de malatión durante un experimento de toxicidad crónica es que estos tóxicos, de manera natural interactúan con el alimento en el medio (microalgas), lo que puede aumentar o disminuir su toxicidad. Por otro lado, los hábitos de filtración y los cambios en la densidad poblacional de estas especies zooplanctónicas a lo largo del experimento, puede modificar la concentración del plaguicida con la que los organismos hacen contacto.

Sin embargo, para realizar este trabajo se hizo el esfuerzo de medir las concentraciones reales del producto comercial. Los cuales generalmente contienen una concentración menor a la indicada en la etiqueta. En este caso, la etiqueta mencionaba una concentración de 500 gL^{-1} y lo que se encontró a través de una cromatografía de gases fue que contenía 470 gL^{-1} . Sin embargo, existe desconocimiento sobre la toxicidad de las sustancias que acompañan al ingrediente activo en el producto comercial. No se sabe exactamente qué sustancias son, en que concentración se encuentran, si pudieran tener efectos tóxicos sobre los cladóceros y/o si afecta la toxicidad del malatión.

El realizar sólo una réplica por cada solución nos da la desventaja de no poder decidir si *C. vulgaris* tiene algún efecto en la degradación de malatión en el medio, debido a que no se cuenta con un intervalo de error que nos permita detectar si hay diferencias significativas entre ambos resultados y por lo tanto no podemos afirmar la actividad de la microalga como responsable de la degradación de malatión después de 24 horas. Los resultados muestran una concentración final de malatión de 21 mgL^{-1} en la solución con *C. vulgaris* y 30 mgL^{-1} sin *C. vulgaris*.

8.2 Experimentos de toxicidad

8.2.1 Prueba de toxicidad aguda

La sensibilidad expresada por los organismos representa las aptitudes biológicas y ecológicas de cada especie (Kammenga y Laskowski, 2000). Por lo tanto, es relevante tomar en cuenta las distintas respuestas de los diferentes grupos de zooplankton que componen una comunidad. En la tabla 4 pueden verse algunos de los estudios de toxicidad realizados con malatión. La CL_{50} en especies de cladóceros puede variar entre 5 y 20 μgL^{-1} dependiendo de la especie. En este trabajo la CL_{50} fue menor de la que se ha reportado en varios trabajos; probablemente se debe a las condiciones experimentales de este proyecto, a la ausencia de alimento, o incluso por realizar comparaciones de toxicidad con estudios pasados que no especifican si se trata de concentraciones reales o no, entre otros.

Hay reportes en donde, la concentración de alimento en el medio disminuye los efectos tóxicos sobre especies zooplanctónicas, tanto en pruebas agudas como crónicas. Por ejemplo, Gama-Flores *et al.*, (2004) reportaron que en la presencia de *C. vulgaris* la CL_{50} (24 h) de metil paratión para el rotífero *Brachionus angularis*, es cuatro veces más alta que en ausencia de alimento (microalga). Generalmente, durante pruebas agudas de toxicidad no se alimenta a los individuos para evitar involucrar otras variables que puedan modificar la toxicidad del contaminante. Los cladóceros pueden resistir un periodo de inanición aproximado de tres días; de este modo, durante un experimento de toxicidad crónica esta inanición podría ser una variable que afecte negativamente la supervivencia de los individuos. En el presente trabajo se condujo el experimento de toxicidad aguda sin alimento; de este modo, se evita la incorporación del plaguicida por el alga que funciona de alimento; el método obtiene mayor potencial de ser replicable al anular las variables biológicas propias de las microalgas en el medio, y así los cladóceros tienen un contacto más directo con el plaguicida. De manera general, los resultados de la prueba de toxicidad aguda muestran que la especie *M. macrocopa* es la especie menos sensible y *D. birgei* la más sensible. Varios autores (Sarma *et al.*, 2007; Hayasaka *et al.*, 2012) relacionan la sensibilidad de una especie con su tamaño, describiendo a las especies más pequeñas como las más sensibles (Sarma *et al.*, 2007; Hayasaka *et al.*, 2012).

Sin embargo, especies bentónicas como *Alona* o *Chydorus* de tamaño menor a 500 μm son menos sensibles que especies grandes como *Daphnia*; esto podría deberse a que las especies planctónicas son más sensibles que las especies bentónicas. Esto indica que para explicar la sensibilidad de una especie deben sumarse varios parámetros, como sus hábitos de distribución en el cuerpo de agua o características morfológicas, ciclo de vida y fisiológicas. En los presentes resultados, *D. birgei* es la especie más pequeña y la más sensible. Las especies de *Diaphanosoma* generalmente se encuentran en cuerpos de agua no contaminados; tiene un tamaño de 700 μm (Korinek, 2002); es decir, es dos veces menor que *Moina* (1 500 μm) y cinco veces menor que *Daphnia* (3 500 μm). La alta sensibilidad de *D. birgei* podría estar relacionada tanto con su tamaño como con sus hábitos pelágicos. *Daphnia* y *Moina* son especies litorales (Elías-Gutierrez *et al.*, 2008); la zona litoral es la región de un cuerpo de agua con mayor potencial a la ocurrencia de cambios abruptos en el ambiente como pueden ser los vertimientos de sedimentos y reciben escurrimientos de agua o de contaminantes.

Las pruebas de toxicidad aguda tienen la ventaja de brindar resultados rápidos, las normas referentes a los “niveles que no deben excederse” están basadas en este tipo de pruebas realizadas con cladóceros, por lo tanto, es necesario que se utilicen especies nativas, representativas de la región. Es necesario que en México se evalúe con mayor rigurosidad la toxicidad del malatión que hasta ahora es considerado por la Comisión Intersecretarial para el control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias tóxicas (CICOPLAFEST) como un plaguicida de toxicidad alta para peces, abejas y otros insectos benéficos (Diario Oficial de la Federación, 1991).

8.2.2 Pruebas de toxicidad crónica – efecto subletal

Crecimiento poblacional

En las curvas de crecimiento poblacional de los tratamientos testigo de *D. pulex* y *D. birgei*, debido a sus ciclos de vida largo, se nota la primera fase del crecimiento avanza de manera lenta a lo largo de los días. Mientras que las curvas de *M. macrocopa* muestran un crecimiento exponencial desde los primeros dos días, debido a que su ciclo de vida es mucho más corto. Estas respuestas son similares en tratamientos control, realizados por otros autores (Sarma *et al.*, 2005).

En los tratamientos con plaguicida puede notarse que la especie *M. macrocopa* fue la especie con la menor sensibilidad en la prueba. A una concentración de $0.18 \mu\text{gL}^{-1}$ la densidad poblacional máxima se redujo a la mitad comparada con el testigo. Mientras que la normatividad de la EPA establece una concentración continua que no debe ser rebasada en un medio acuático de $0.1 \mu\text{gL}^{-1}$ de malatión. En las otras dos especies expuestas al plaguicida en este trabajo, se utilizaron concentraciones mucho menores, que tuvieron efectos sumamente negativos, por lo menos en *D. birgei* en la que los tratamientos con plaguicida presentan diferencias significativas respecto al tratamiento control.

En el caso de *D. pulex* no se presentaron cambios estadísticamente significativos (tomando en cuenta el crecimiento poblacional, tasa de crecimiento y densidad poblacional máxima) utilizando concentraciones subletales menores a los niveles que no deben rebasarse propuestas por la EPA.

Tablas de vida

Al evaluar la toxicidad de un contaminante a nivel poblacional se infieren las consecuencias para una población a partir de los efectos que se observan sobre los individuos que la componen. Estos efectos son diversos y pueden afectar procesos a nivel bioquímico, fisiológico y de comportamiento, los cuales determinan las tasas de crecimiento, supervivencia, desarrollo y reproducción (Caswell, 2000). El efecto que exista de un contaminante en una de estas variables llamadas *tasas vitales* no se puede generalizar para todas, pues los efectos no siempre tienen la misma dirección en todas las variables y la sensibilidad de los individuos muchas veces depende de la edad de éstos.

Por estas razones se necesitan modelos demográficos estructurados que pueden tomar valores que se obtienen a nivel individual y hacer cálculos sobre la respuesta a nivel poblacional. Uno de estos pueden ser los modelos poblacionales de matriz que son relativamente fáciles de construir, analizar e interpretar (Caswell, 1989). En este trabajo se realizaron experimentos llamados *respuesta de tabla de vida*. El realizar este tipo de experimentos permite la vinculación de los efectos a nivel individual y las consecuencias a nivel poblacional permitiendo señalar la edad y los procesos demográficos sobre los cuales los contaminantes ejercen sus efectos.

Con este método se pudo obtener variables como el promedio de vida, fecundidad, tasa de crecimiento poblacional, tasa de reproducción bruta y neta. Primero se compararon los resultados obtenidos mediante tablas de vida en los tratamientos control con datos publicados en la literatura sobre la biología de estas especies. Por ejemplo, Sarma *et al.*, (2005) mencionan que las especies del género *Moina* tienen un promedio de vida de 5 a 13 días, similar al que se registra en el tratamiento control del presente trabajo (entre 7 y 9 días). En la tabla 5 (a y b), se comparan algunos de los resultados obtenidos en los tratamientos control, de las tres especies, con aquellos encontrados en la literatura. Al revisar esta tabla, se pueden observar diferencias naturales que existen entre las tres especies; *M. macrocopa* tiene un ciclo de vida de casi la mitad del tiempo que las otras dos especies, vive la mitad del tiempo y tiene una tasa de crecimiento que duplica la de las otras dos especies.

Tabla 5a. Comparación de los resultados obtenidos en las variables de Promedio de vida y Tiempo generacional

| | Promedio de vida (días) | | Tiempo generacional (días) | |
|---------------------|-------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| | Literatura | Tratamiento control | Literatura | Tratamiento control |
| <i>D. pulex</i> | | 16 - 18 | 8 - 10 ¹ | 11 - 14 |
| <i>D. birgei</i> | 13 - 16 ² | 20 - 21 | | 11 - 12 |
| <i>M. macrocopa</i> | 5 - 13 ³ | 7 - 9 | 4 - 8 ³ | 5 |

Fuentes: ¹Ferrao-Filho *et al.*, 2000; ²Sipaúba-Tavares y Bachion, 2002; ³Nandini y Sarma 2000

Tabla 5b. Comparación de los resultados obtenidos en las variables de Tasa reproductiva neta y tasa de crecimiento poblacional y Tiempo generacional

| | Tasa reproductiva neta (neonatos/hembra) | | Tasa de crecimiento poblacional | |
|---------------------|---|---------|---------------------------------|---------|
| | Literatura | Control | Literatura | Control |
| <i>D. pulex</i> | 3-41 ¹ | 5-12 | 0.08-0.51 ⁴ | 0.1-0.2 |
| <i>D. birgei</i> | | 10-13 | 0.37-0.57 ² | 0.2 |
| <i>M. macrocopa</i> | 11-26 ³ | 17-20 | 0.06-0.52 ⁵ | 0.6 |

Fuentes: ¹Ferrao-Filho *et al.*, 2000; ⁴Lurling y Van Donk 1997; ²Sipaúba-Tavares y Bachion 2002;

³Nandini y Sarma 2000; ⁵Nandini y Sarma 2002

Al exponer individuos de las tres especies de cladóceros a malatión, se observaron algunas alteraciones en sus tasas vitales. En el caso de *D. pulex*, las principales modificaciones fueron a nivel reproductivo. Las curvas de supervivencia de esta especie no muestran grandes cambios entre el tratamiento control y los cuatro tratamientos que contenían malatión. Sin embargo, al observar la variable de fecundidad puede notarse que en los tratamientos con malatión la cantidad de neonatos por hembra decrece.

Por otro lado, en la especie *D. birgei*, los efectos negativos del plaguicida se notan desde las concentraciones más bajas. Aunque los efectos de malatión sobre la supervivencia de esta especie no fueron tan fuertes, la fecundidad sí fue una de las variables que más resultaron afectadas, en todos los tratamientos con malatión, la cantidad de neonatos disminuye, así como los días durante los cuales se producen, y esta disminución aparece desde la menor concentración de malatión.

Respecto a *M. macrocopa*, las curvas de supervivencia en los tratamientos con malatión muestran una disminución continua desde los primeros cuatro días. Así mismo, se ve afectada la fecundidad con una progresiva disminución de neonatos mientras la concentración de malatión aumenta.

Los efectos del malati3n no se ven representados de la misma manera en todas las tasas vitales de las especies. Por ejemplo, el tiempo generacional, la esperanza de vida y el promedio de vida de *D. pulex* y *D. birgei* no parecen ser variables sensibles al malati3n bajo ninguna de las concentraciones aqu3 utilizadas, los resultados no muestran diferencias estadísticas.

En el caso de *M. macrocopa* tampoco se ve afectado el tiempo generacional, sin embargo, la esperanza de vida y el promedio de vida se ven afectados de forma negativa; todos los tratamientos tiene valores parecidos entre ellos, dos veces por debajo del control.

En resumen, para las tres especies las variables m3s sensibles fueron las tasas de reproducci3n bruta y neta, y la tasa de crecimiento poblacional.

La disminuci3n en las variables reproductivas y de supervivencia cuando se exponen a un plaguicida se ha reportado en varios trabajos y describen a la supervivencia como una variable menos sensible que aquellas involucradas en la reproducci3n. Rao y Sarma (1987) evaluaron diferentes concentraciones de DDT sobre la especie zooplanct3nica *Brachionus patulus* y reportaron que el tiempo generacional y promedio de vida fueron menos afectados que la tasa reproductiva neta y bruta.

De la misma manera, Wong (1995) reporta una disminuci3n en la fecundidad en un 40% a partir de una exposici3n de *M. macrocopa* a $0.01 \mu\text{gL}^{-1}$ de malati3n, tambi3n reporta una mayor sensibilidad en las variables reproductivas que de sobrevivencia.

Forbes *et al.* (1999) analizaron un gran n3mero de trabajos publicados referentes a las diferentes variables de historia de vida a nivel poblacional y el efecto de varias sustancias t3xicas. Ellos concluyeron que la tasa de crecimiento poblacional brinda la mejor medida sobre las respuestas a las sustancias t3xicas, ya que integra interacciones potencialmente complejas entre los rasgos de historia de vida y proporciona una medida m3s relevante del impacto ecol3gico.

Las concentraciones de malati3n que se usaron en el caso de *M. macrocopa*, se encuentran por encima de las 3nicas concentraciones de malati3n que se han evaluado en cuerpos de agua mexicanos, esto es $0.015 - 0.0087 \mu\text{g/L}$ en el R3o Culiac3n (Leyva, 2009).

Para el caso de las especies *D. pulex* y *D. birgei*, las concentraciones subletales resultaron ser más bajas que las encontradas en el Río Culiacán. Cabe mencionar que este sistema acuático se encuentra rodeado de zonas agrícolas y es uno de los más contaminados del país. Es decir, que el Río Culiacán posee concentraciones altas de contaminantes, que podría estar generando efectos negativos en las tasas vitales de organismos zooplantónicos.

Los efectos del malatión presentados en este trabajo, se presentan bajo el supuesto de que los disolventes y emulsificantes, utilizados en el producto comercial Malatión 500, no tienen ningún efecto significativo en las tasas vitales de los individuos. Por referencias bibliográficas se sabe que estas sustancias pueden ser no iónicas, organosiliconas y algunas mezclas no iónicas – organosiliconas (Stark y Walthall, 2003) y la toxicidad de éstos no se encuentra aún determinada por la EPA. Aunque algunos autores (Abdelghani *et al.*, 1997; Henry *et al.*, 1994) han discutido sobre la toxicidad de algunos disolventes y emulsificantes y sus efectos en la reproducción de organismos zooplanctónicos (Sharma y Singh, 2001; Howe *et al.*, 1998). Por esta razón, enlazar los trabajos de ecotoxicología con química analítica es fundamental para tener certeza de la naturaleza y concentración de las sustancias tóxicas.

Es sabido que en México existen cuerpos de agua contaminados y se necesita distinguir la fuente de estos contaminantes, qué tóxicos hay actualmente en estos cuerpos de agua mexicanos, en qué concentración y con qué temporalidad. Según Gilliom (2007), en un reporte hecho en Estados Unidos, los plaguicidas se encuentran comúnmente como un complejo de mezclas que incluyen acetoclor, atracina, carbaril, clorpirofos, diazinón, malatión y metolaclor.

Al realizar estos experimentos y llevar a cabo búsquedas exhaustivas de literatura científica y normativa, es necesario mencionar que en México se necesitan realizar protocolos ecotoxicológicos que tomen como modelo especies locales. Tal podría ser el caso de *D. pulex*; esta especie es un buen modelo en bioensayos ecotoxicológicos, se cuenta con suficiente información biológica, se ha experimentado lo suficiente con ella como para conocer su respuesta ante diferentes condiciones de estrés ambiental, de temperatura, concentración y tipo de alimento, entre otras condiciones útiles para su cultivo en laboratorio (Alva-Martínez *et al.*, 2004).

9. CONCLUSIONES

- ♣ La especie más sensible en una prueba de toxicidad aguda con malatión fue la especie más pequeña, *D. birgei*, CL_{50} de 1.12 ngL^{-1} .
- ♣ El malatión tuvo efectos negativos en la dinámica poblacional de las especies de cladóceros, en especial de *D. birgei* que muestra respuesta a partir de las concentraciones más bajas (0.028 ngL^{-1}) y en *M. macrocopa*, cuyos efectos son más aparentes en las concentraciones más altas (a partir de 162 ngL^{-1}).
- ♣ No todas las variables responden de la misma manera a la exposición a malatión. Las variables más sensibles fueron las relacionadas con la reproducción: fecundidad, tasa de reproducción bruta, neta y tasa de recrecimiento poblacional.

10. RECOMENDACIONES

En un ambiente natural, los pesticidas no están solos en el medio. Se ha encontrado que los pesticidas y metales exhiben efectos sinérgicos, las mezclas de cobre-malati6n, cadmio-malati6n se encuentran entre las mezclas m1s t6xicas. Por lo que, ser1a interesante realizar experimentos que involucraran observaciones en campo y laboratorio para determinar los efectos reales en las comunidades acu1ticas de estas mezclas.

Analizar los efectos de contaminantes en una poblaci6n y de manera controlada en el laboratorio puede ser un buen comienzo para evaluaciones ecotoxicol6gicas. Sin embargo, considero que cada vez es m1s necesario inferir estos efectos en una red tr6fica o en una comunidad. Una opci6n podr1a ser la realizaci6n de microcosmos, en la que se evaluaran variables ecol6gicas de organismos de diferentes niveles tr6ficos, con plaguicidas solos e interactuando con otros contaminantes, de manera que se pudiera diferenciar los efectos directos e indirectos de los contaminantes y sus mezclas.

Es indispensable, que los estudios ecotoxicol6gicos sean el inicio de propuestas de restauraci6n y conservaci6n de los cuerpos de agua del pa1s. Se necesita que las agencias gubernamentales y privadas asuman con responsabilidad la cuesti6n de la contaminaci6n de los cuerpos de agua mexicanos. Tiene que existir por lo menos un registro de las concentraciones de cada plaguicida utilizado en el pa1s, en las zonas agr1colas. De la misma manera, se necesita que la utilizaci6n de los plaguicidas se realice de manera responsable con el ambiente y la salud de la poblaci6n.

I. REFERENCIAS

- Addelghani, A., P. Tchounwou, A. Anderson, H. Sujono, L. Heyer y A. Monkiedje. 1997. Toxicity evaluation of single and chemical mixtures of roundup, Garlon-3A, 2, 4-D and syndets surfactant to channel catfish (*Ictalurus punctatus*), Bluegill sunfish (*Lepomis microchirus*) and carfish (*Procambarus spp.*) *Environ. Toxic. Water*, 12(3): 237-243.
- Agrawal, A., R. Pandey y B. Sharma. 2010. Water pollution with species reference to pesticide contamination in India. *J. Water Resource and Protection*. 2: 432-448.
- Albert, L. 2005. Panorama de los plaguicidas en México. Servicios de Salud de Nayarit y Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios. *Revista de toxicología en línea*, (8): 1-17.
- Alva-Martínez, A., S. Sarma y S. Nandini. 2004. Population growth of *Daphnia pulex* (Cladocera) on a mixed diet (*Microcystis aeruginosa*) with *Chlorella* or *Scenedesmus*). *Crustaceana*, 77(8): 973-988.
- APHA. 1998. American waterworks association and water pollution control federation. Standard methods for analysis of water and wastewater. 20th ed. American Public Health Association. USA.
- Astorga-Rodríguez, J. 2011. Evaluación preliminar de riesgo ecológico por el uso de plaguicidas en una zona agrícola de Sinaloa. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. 148 p.
- Borowitzka, M. y L. Borowitzka. 1988. Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press. London.
- Buratti, F., A. D'Aniello, M. Volpe, A. Meneguz y E. Testai. 2005. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome P450 isoforms. *Drug metabolism and disposition*. 33:295-302.
- Campbell, P., R. Newcomb, R. Russell y J. Oakeshott. 1998. Two different amino acid substitutions in the active-site esterase E3, confer alternative types of organophosphorus

insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect biochemistry and molecular biology*. 22:139-150.

Carlile, W. 2006. *Pesticide Selectivity, Health and the environment*. United Kingdom. Cambridge university press.

Caswell, H. 1989. The analysis of life table response experiments. Decomposition of treatment effects on population growth rate. *Ecol. Model.*, 46: 221-237.

Caswell, H. 2000. Life table response experiments in ecotoxicology. En Kammenga J. & R. Laskowski (Eds) *Demography in ecotoxicology*. John Wiley & Sons Ltd. USA.

Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). 2015. Lista actualizada de Productos recomendados por el CENAPRECE para el combate de insectos vectores de enfermedades a partir de 2015. Secretaría de prevención y promoción de salud. México.

Cooney, J. 1995. Freshwater tests. En G. Rand (Ed) *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment* (pp. 71-102). USA: Taylor & Francis Pub.

Daniels, R. y J. Allan. 1981. Life table evaluation of chronic exposure to a pesticide. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 485-494.

De Meester, L. 1994. Life histories and habitat selection in *Daphnia*: divergent life histories of *D. magna* clones differing in phototactic behaviour. *Oecologia*. 97: 333-341.

Dodson, S. y D. Frey. 2001. The cladocera and other Brachiopoda. En Thorpe, J., A. Covich (Eds). *Ecology and systematics of north american freshwater invertebrates*. 2nd ed. Academic Press. USA.

Dumont, H. y S. Negrea. 2002. *Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental water of the world. Introduction to the class branchiopoda*. Backhuys Publishers, Leiden, Holanda.

Dumont, H. 2005. En Benzie, J. (Ed) *Guides to the identification of the macroinvertebrates of the continental waters of the world. The genus Daphnia, including Daphniopsis (Anomopoda: Daphniidae)*. Backhuys Publishers, Leiden. Holanda.

Elías-Gutiérrez, M., E. Morales, M. Gutiérrez, M. Silva, J. Granados y T. Garfias. 2008. Cladocera y Copepoda de las aguas continentales de México. Guía ilustrada. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Colegio de la Frontera Sur, Fondo mixto de la Secretaría del Medio ambiente y Recursos Naturales-Consejo Nacional de ciencia y Tecnología y la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

EPA. 1985. Methods of measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. US Environment Protection Agency EPA/600/4- 85/013.

EPA. 2006. Registration Eligibility Decision (RED) for Malathion.

EPA. 2009. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Malathion.

Espina, S. y C. Vanegas. 2005. Ecotoxicología y contaminación [versión electrónica]. En A. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot & C. Agraz-Hernández (Eds). Golfo de México, Contaminación e impacto ambiental: Diagnostico y tendencias (pp. 79-120). México: Auton. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología.

FAOSTAT. 2012. Estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. <http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE>

Finney, D. 1971. Probit analysis. Cambridge: Cambridge University pres.

Gama-Flores, J, S. Sarma y S. Nandini. 2004. Acute and chronic toxicity of the pesticide methyl parathion to the rotifer *Brachionus angularis* (Rotifera) at different algal (*Chlorella vulgaris*) food densities. *Aquat. Ecol.*, 38: 27-36.

Gama-Flores, J, S. Sarma y S. Nandini. 2009. Combine effects of exposure time and copper toxicity on the demography of *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera). *J. Environ. Sci. Heal. A* 44(1): 86-93.

Ghazy, M., M. Habashy y E. Mohammady. 2011. Effect of pH on survival, growth and reproduction rates of the crustacean, *Daphnia magna*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5(11): 1 -10.

Giddings, J., B.Ronald, M. Annunziato y A. Hosmer. 1996. Effects of diazinon on large outdoor pond microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 15(5): 618-629.

Gilliom, R., J., Barbash, C. Crawford, P. Hamilton, J. Martin, N. Nakagaki, L. Nowell, J. Scott, P. Stackelberg, G. Thelin y D. Wolock. 2007. The quality of our nation's waters – pesticides in the nation's streams and ground water, 1992-2001. US Geological survey circular 1291. USA.

Goulden, C. 1986. Transactions of the American Philosophical Society. New series-volume 58, part 6. The systematic and evolution of the moinidae. Philadelphia.

Groner, M. y R. Relyea. 2011. A tale of two pesticides: how common insecticides effect aquatic communities. *Freshwater biol.*, 56: 2391-2404.

Hanazato, T. 2001. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environ. Pollut.*, 112: 1-10.

Hanazato, T. y M. Yasuno. 1989. Effects of carbaryl on the spring zooplankton communities in ponds. *Environ. Pollut.*, 56: 1-10.

Hayasaka, D., T. Korenaga, K. Suzuki, F. Sánchez-Bayo y K. Goka. 2012. Differences in sesceptibility of five cladoceran species to two systemis insecticides, imidacloprid and fipronil. *Ecotoxicology*, 21: 421-427.

Henry, C., K. Higgins, K. Buhl. 1994. Acute toxicity and hazard assessment of rodeo, X-77 spreader and chem-trol to aquatic invertebrates. *Arch. of Environ. Con. Tox.*, 27 (3): 392-399.

Hoffman, D., B. Rattner, G. Burton y J. Cairns. 2003. Handbook of ecotoxicology. 2nd Edition. Lewis Pub.

Kareiva, P., J. Stark, y U. Wennergren. 1996. Using demographic theory, community ecology and spatial models to illuminate ecotoxocology. En Baird D., L. Maltby, P. Greig-Smith y E. Douben (Eds) ECOtoxicology: Ecological dimensions. Chapman & Hall pub. London.

- Karpouzas, D. y B. Singh. 2006. Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: metabolic pathways and molecular basis. *Adv. Microb. Physiol.*, 51(225): 119-185.
- Kashiwada, S., K. Mochida, Y. Ozoe y T. Nakamura. 1995. Contribution of zooplankton to disappearance of organophosphorus insecticides in environmental water. *J. Pesticide Sci.* 20(4): 503-512.
- Kilham, S., D. Kreeger, C. Goulden y S. Lynn. 1997. Effects of algal food quality on fecundity on population growth rates of *Daphnia*. *Freshwater biology*. 38: 639- 347.
- Kiorboe, T. 2008. A mechanistic approach to plankton ecology. Princeton University Press. United Kingdom. p130-133.
- Kerr, S y W. Vass. 1973. Pesticide residues in aquatic invertebrates. En Edwards, C. (Ed) *Environmental pollution by pesticides*. Plenum press. London.
- Koivisto, S. 1995. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests?. *Environmental pollution*. 90(2): 263-267.
- Korinek, V. 2002. En Fernando C. (Ed) *Guide to tropical freshwater zooplankton. Identification, ecology and impacts on fisheries*. Backhuys Publishers, The Netherlands. p 69-97.
- Krebs, C. 1985. *Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance*. 3rd edition. Harper & row, New York.
- Levine, M. 2007. *Pesticides: a toxic time bomb in our midst*. Praeger publishers. USA.
- Nandini, S. y S. Sarma. 2000. Lifetable demography of four cladoceran species in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) density. *Hydrobiologia*, 435: 117-126.
- Nandini, S. y S. Sarma. 2002. Competition between *Moina macrocopa* and *Ceriodaphnia dubia*: a life table demography study. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 87(1): 85-95.
- Manahan, S. 2003. *Toxicological chemistry and biochemistry*. 3rd edition. Lewis publisher. Florida.USA.

Maroni, T., C. Colosio, A. Ferioli, A y A. Fait. 2000. Biological monitoring of pesticide exposure: a review. *Toxicology*. 143(1): 1-118.

Martínez-Tabche, L., C. Galar, M. Ramírez, R. Morales y F. Germán. 1994. Parathion effect on acetylcholinesterase from fish through an artificial trophic chain: *Ankistrodesmus falcatus-Moina macrocopa-Oreochromis hornorum*. *B. Environ. Contam. Tox.*, 52: 360-366.

Meyer, J., C. Ingersol y L. McDonald. 1987. Sensivity analysis of population growth rates estimated from cladoceran chronic toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, 6: 115-126.

Ministerio de Salud Argentino. 2008. Químicos prohibidos y restringidos en Argentina. Departamento de Salud Ambiental. Buenos Aires, Argentina. 19p.

Newhart, K. 2006. Environmental fate of malathion. California Environmental Protection Agency. Department of Pesticide Regulation. Environmental Monitoring Branch, p 20.

Odenkirchen E. & S. Wentz. 2007. *Risk of malathion Use to the Federally Listed California Red-legged Frog (Rana aurora draytonii)*. Environmental Protection Agency Environmental Fate and Effects Division, Washintong, DC.

PAN. 2008. Pesticide Action Network Europe. <http://www.pan-europe.info/Links/banned.html>

Perry, A., I. Yamamoto, I. Ishaaya y R. Perry. 1998. Insecticides in agriculture and environment, retrospects and prospects. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Ramade, F. 1987. Ecotoxicology. John Willey & Sons Pub. Great Britain.

Ramírez, J. y M. Lacasaña. 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch. Prev. Riesgos Labor*. 4(2): 67-75.

Ramírez-Mangas, E., S. Sarma, S. Nandini. 2001. Acute and chronic toxicity of ammonium chloride to the cladoceran *Daphnia pulex* in relation to algal food density. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 67(6): 834-840.

Relyea, R. 2004. Synergistic impacts of malathion and predatory stress on six species of north American tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23(4): 1080-1084.

- Relyea, R. 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol. Appl.*, 15(2): 618-627.
- Relyea, R. y J. Hoverman. 2006. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecol. Lett.* 9: 1157- 1171.
- Relyea, R. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*, 159: 363- 376.
- Richman, S. 1958. The transformation of energy by *Daphnia pulex*. Ecological monographs. 28(3): 273-291.
- Robles-Mendoza, C., C. García-Basilio, S. Cram-Heydrich, M. Hernandez-Quiroz y C. Vanegas-Pérez. 2009. Organophosphorus pesticides effect on early stages of the axolotl *Ambystoma mexicanum* (Amphibia: Caudata). *Chemosphere*, 74: 703- 710.
- Rohr, J. y P. Crumrine. 2005. Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecol. Appl.* 15(4): 1135-1147.
- Sánchez-Chávez, G y R. Salceda. 2008. Enzimas polifuncionales: el caso de la acetilcolinesterasa. *REB, UNAM*, 27(2): 44-51.
- Sarma, S., S. Nandini y R. Gulati. 2005. Life history strategies of cladocerans: comparisons of tropical and temperate taxa. *Hydrobiologia*, 542: 315-333.
- Sarma, S. y S. Nandini. 2006. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. *J. Environ. Sci. Heal. B*, 41: 1417-1430.
- Sarma, S., VM. Peredo-Álvarez y S. Nandini. 2007. Comparative study of the sensitivities of neonates and adults of selected cladoceran (Cladocera: Crustacea) species to acute toxicity stress. *J. Environ. Sci. Heal. A*, 42(10): 1449-1452.
- Scholten, M., E. Foekema, H. Van Dokkun, N. Kaag, y R. Jak. 2005. Eutrophication management and ecotoxicology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.

- Shanahan, M., C. Jordan, S. Trent y J. Williams. 2003. What's your poison? Health threats posed by pesticides in developing countries. Environmental justice foundation. U.K.
- Sharma, S. y M. Singh. 2001. Surfactants increase toxicity of glyphosate and 2, 4-D to Brazil pusley. *HortScience.*, 36: 726-728.
- Sokal, R. y F. Rohlf. 1995. Biometry. 3rd Edition. W.H. Freeman and Company. USA. 451-554p.
- Taylor, B. 1988. Analyzing population dynamics of zooplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 33(6): 1266- 1273.
- Terra, N., I. Feiden, F. Lucheta, S. Gonçalves y J. Gularte. 2010. Bioassay using *Daphnia magna* Straus, 1820 to evaluate the sediment of Caí River (Rio Grande do Sul, Brazil). *Acta limnologica brasiliensia.* 22(4): 442-454.
- Unión Europea. 2008. Reglamento (CE) No. 689-2008 del Parlamento Europeo y del Consejo. Relativo a la exportación e importación de productos químicos peligrosos. 35p.
- Umebayashi, O. 1975. Practical culture of microalgae, In: Culture of marine life textbook for marine research course. Japan international cooperation agency. Government of Japan, 6:131–144.
- Wiener S. y R. Hoffman. 2004. Nerve agents: A comprehensive review. *J. Intensive Care Med.*, 19(1): 22- 37.
- Willens, S., M. Stoskopf, R. Baynes, G. Lewbart, S. Taylor & S. Kennedy-Stoskopf. 2006. Percutaneous malathion absorption by anuran skin in flow-through diffusion cells. *Environ. Toxicol. Phar.*, 22: 255-262.
- Wong , C. 1993. Effects of chromium, copper, nickel and zinc on longevity and reproduction of the cladoceran *Moina macrocopa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 50: 633-639.
- Wong, C. 1995. Acute and chronic toxicity of malathion to the freshwater cladoceran *Moina macrocopa*. *Water Air Soil Poll.*, 84: 399-405.

Wong, C. 1997. Effects of diazinon on some population parameters of *Moina macrocopa* (Cladocera). *Water Air Soil Poll.*, 94(3-4): 393-399.

Yu, S. 2008. The toxicology and biochemistry of insecticides. Crc Press Taylor & Francis group. USA.

Zavala-Aguirre, J., O.Torres-Bugarin y A. Zamora-Perez. 2007. Aquatic ecotoxicology approaches in Western Mexico. *J. Environ. Sci. Heal. A.*, 42: 1503-1511.

Zhang, A., X. Xie, J. Ye, C. Lin & X. Hu. 2011. Stereoselective toxicity of malathion and its metabolites, malaoxon and isomalathion. *Environ. Chem. Lett.*, 9: 369-373.

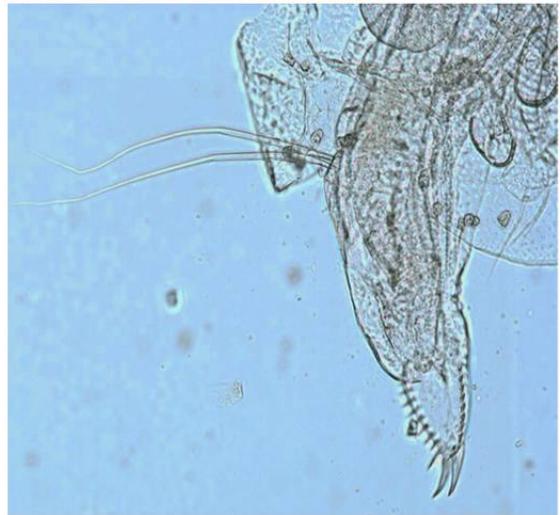
II. ANEXOS

Anexo 1. Disección de cada *Daphnia pulex*



a) *Daphnia pulex*; b) garra post-abdominal, procesos abdominales, espina; c) garra post-abdominal.

Anexo 2. Disección de cada *Diaphanosoma birgei*a) *Diaphanosoma. birgei*;

Anexo 3. Disección de *Moina macrocopa*

a) *Moina macrocopa*; b) primer apéndice torácico; c) garra post-abdominal.

Anexo 4. Medio de cultivo basal Bold

| | |
|---------------------------------------|---|
| 1.-NaNO ₃ | 250g L ⁻¹ |
| 2.- MgSO ₄ | 75g L ⁻¹ |
| 3.- K ₂ HPO ₄ | 75g L ⁻¹ |
| 4.- KH ₂ PO ₄ | 175g L ⁻¹ |
| 5.- NaCl | 25g L ⁻¹ |
| 6.- EDTA | 50g + 31g de KOH L ⁻¹ |
| 7.- FeSO ₄ | 4.98g L ⁻¹ + 1 mL H ₂ SO ₄ L ⁻¹ |
| 8.- H ₃ BO ₃ | 11.42 g L ⁻¹ |
| 9.- CaCl ₂ | 25g L ⁻¹ |
| 10.- Elementos traza: | |
| a) ZnSO ₄ | 8.82 g L ⁻¹ |
| b) MnCl ₂ | 1.44g L ⁻¹ |
| c) MoO ₃ | 0.71g L ⁻¹ |
| d) CuSO ₄ | 1.57g L ⁻¹ |
| e) Co (NO ₃) ₂ | 0.49g L ⁻¹ |

Para realizar el cultivo de microalgas se mezclan 30 mL de cada una de las 10 soluciones mencionadas, obteniendo un volumen total de 300 mL. De esto, se toman 30 mL y se vierten en una botella de plástico de 2 L de capacidad, hasta completar 10 botellas.

Se agrega 1.8 L de agua destilada a cada botella y 5 mL de *Chlorella vulgaris*, la cual tiene que ser revisada al microscopio para verificar que la sepa de alga sea pura.

Las botellas se conectan a un sistema de aireación y luz constantes durante 14 días, aproximadamente.

Cada dos días se adiciona 0.5 g de bicarbonato de sodio a cada botella y se recupera el agua destilada que se haya perdido por evaporación.

Anexo 5. Determinación de la concentración real de malatión en el producto comercial "malatión 500"

UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA
LABORATORIO DE ANALISIS INSTRUMENTAL

REPORTE DE SERVICIO EXTERNO

Toluca México a 11 de Abril del 2011.

Folio 11-0836

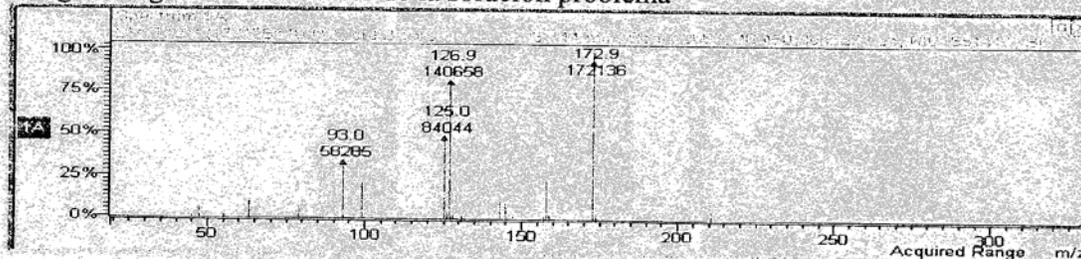
Identificación Malation 500

ANALISIS SOLICITADO

Concentración de malation.

Se analizo la muestra por medio de Cromatografía de gases acoplado a amasas, la extracción de la muestra se realizo empleando la técnica de extracción en fase sólida con cartuchos C₁₈ de 1cc.

Fragmentograma del extracto de la solución problema



| Parámetro | Concentración % |
|-----------|-----------------|
| MALATION | 47 |

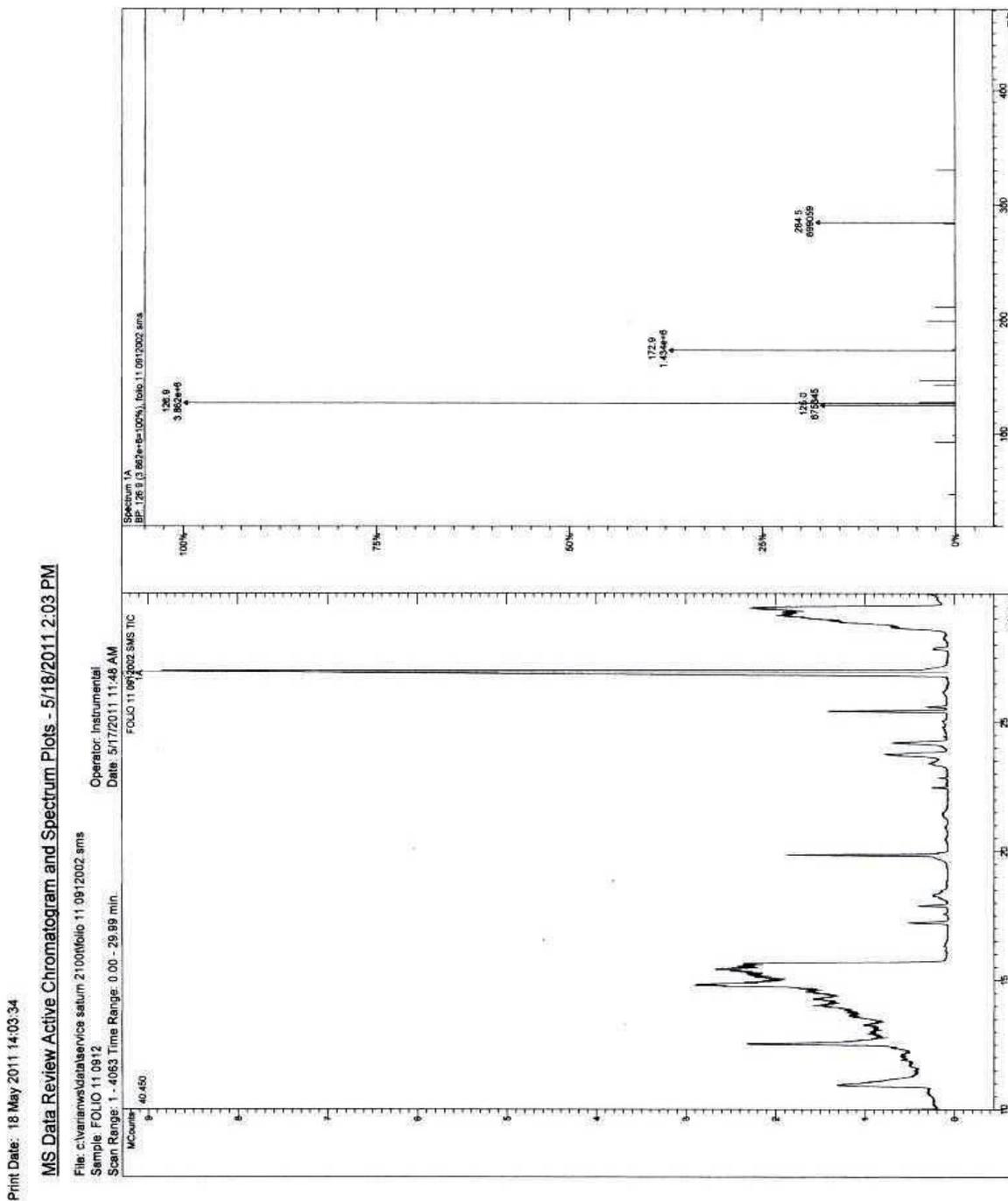
Atentamente

“PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO”

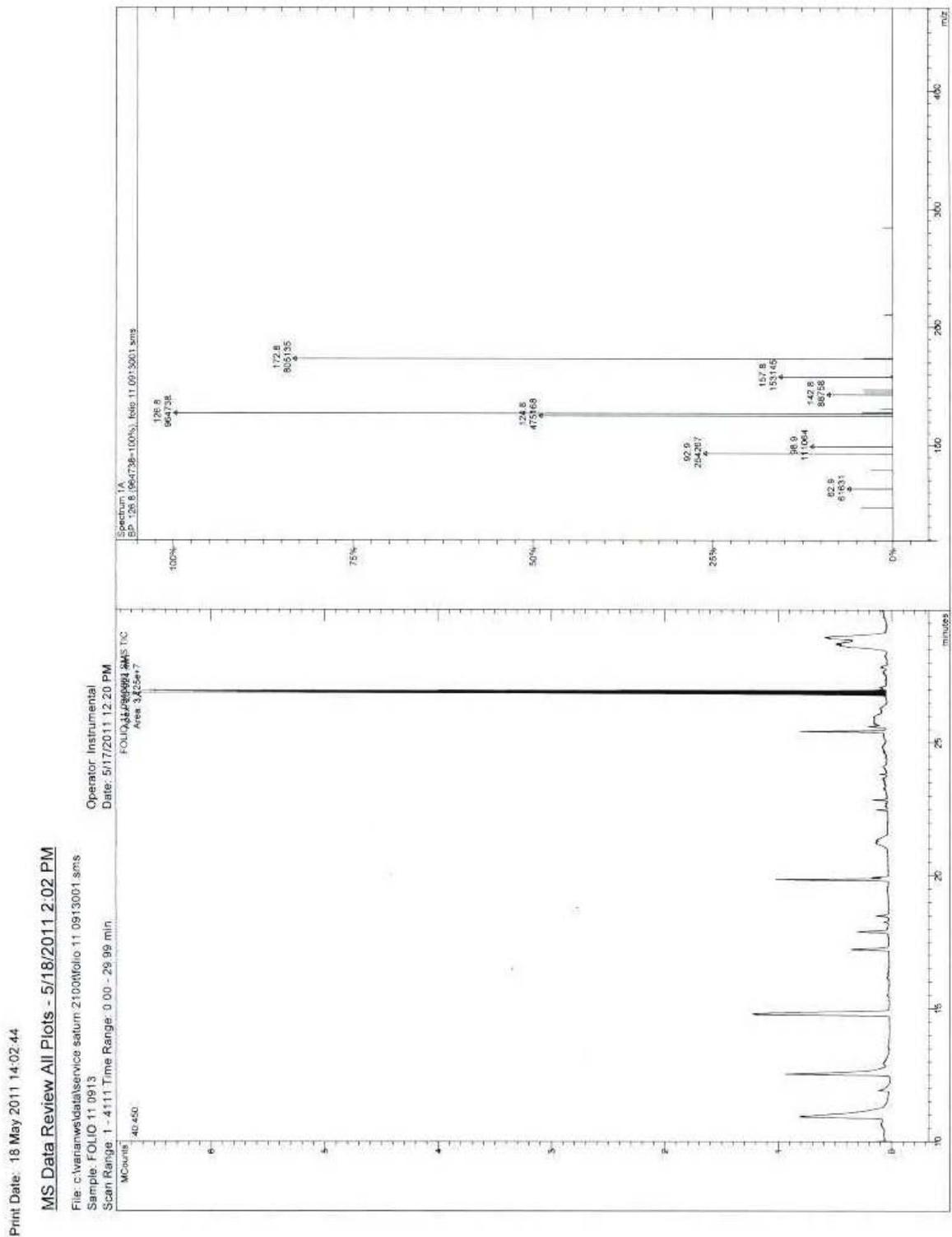
“2011, 160 Aniversario de la Promulgación de la Ley Orgánica del Instituto Literario del Estado de México”

M en C. A. Maria Magdalena García Fabila.
Responsable del Laboratorio de Análisis Instrumental.

Anexo 6. Cromatograma de malatión después de 24 horas de almacenamiento en ausencia de *Chlorella vulgaris*. El laboratorio de Instrumental (UAEM), reporta una concentración final de malatión de 30 mgL⁻¹.



Anexo 7. Cromatograma de la concentración de malatión después de 24 horas de almacenamiento en presencia de *Chlorella vulgaris*. El laboratorio reporta una concentración final 21 mgL⁻¹.





Journal of Environmental Biology

ISSN : 0254-8704

CODEN : JEBIDP

REPRINT

Effect of malathion on the demography of *Daphnia pulex* Leydig and *Diaphanosoma birgei* Korinek (Cladocera)

Esmeralda Bravo-Hernández, S.S.S. Sarma and S. Nandini



Volume 35

Number 1 (Special Issue)

January 2014

Pages 57-65

Effect of malathion on the demography of *Daphnia pulex* Leydig and *Diaphanosoma birgei* Korinek (Cladocera)

Esmeralda Bravo-Hernández¹, S.S.S. Sarma^{2*} and S. Nandini²

¹Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, 04510, Mexico

²Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Iztacala. Av. De los Barrios #1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlanepantla. Estado de México. C.P. 54090, Mexico

*Corresponding Author E-mail: ssssarma@gmail.com

Publication Info

Paper received:
19 October 2012

Revised received:
20 July 2013

Accepted:
05 September 2013

Abstract

Malathion is a common pesticide used to control insects in agricultural, domestic and industrial sectors in different parts of the world. In this work we evaluated the effects of sublethal concentrations of malathion on the survivorship and reproductive variables of two cladoceran species *Daphnia pulex* and *Diaphanosoma birgei* using standard life table demography method. Based on preliminary tests, we selected four sublethal concentrations of malathion for each cladoceran species. For *D. pulex*, the malathion concentrations were 0.225, 0.45, 0.9 and 1.8 ng l⁻¹ and for *D. birgei*, these were 0.0281, 0.0562, 0.1125, 0.225 ng l⁻¹. Our results showed that in general, *Daphnia pulex* was less sensitive than *Diaphanosoma birgei* to malathion. The average lifespan of *Daphnia pulex* in controls was about 19 days while under similar conditions, that of *D. birgei* was about 21 days. For either cladoceran species, increased pesticide concentration resulted in decreased survival; this was more evident in the treatment containing the highest concentration of malathion (0.225 ng l⁻¹) for *D. birgei*. Fecundity of *D. pulex* and *D. birgei* also decreased with increase in the concentration of malathion. For a given cladoceran species, compared to controls, the gross reproductive, net reproductive rates and the population growth rate significantly decreased due to malathion. Compared to the survivorship variables (age-specific survival, life expectancy and average lifespan), the reproductive parameters (gross reproductive rate, net reproductive rate and the rate of population increase) of the two cladoceran species were decreased by the pesticide.

Key words

Life history, Lifespan, Pesticide, Zooplankton

Introduction

Malathion is a common pesticide used to control insects in agricultural, domestic and industrial sectors. Despite the benefits of pesticide use, dispersion of a large amount of malathion causes environmental and human health problems (Krieger, 2010). Zooplankton species that inhabit freshwater bodies such as rivers, reservoirs and lakes are vulnerable to adverse effect of pesticide from urban and agricultural run offs (Levine, 2007). The natural zooplankton communities of freshwater bodies are composed of ciliates, rotifers, cladocerans and copepods (Thorp and Covich, 2010). In terms

of biomass, cladocerans usually dominate in many freshwater bodies. Compared to copepods, cladocerans exhibit strong grazing impact on phytoplankton (Dumont and Negrea, 2002). Cladocerans are also considered as key group for standard ecotoxicological tests due to their sensitivity to changes in the aquatic environment (Hoffman *et al.*, 2003).

There are about 620 species of cladocerans worldwide (Forró *et al.*, 2003). However, fewer than 10 out of 95 genera of Cladocera are widely used in the assessment of water quality. The genera *Daphnia*, *Ceriodaphnia*, *Diaphanosoma* and *Moina* are commonly used as bioassay organisms in ecotoxicological

evaluations because of their availability, sensitivity, taxonomic stability and ease with which they can be cultured on long term basis (Sarma and Nandini, 2006). *Daphnia* is generally considered as predominantly a temperate genus while *Diaphanosoma* is tropical (Košinek, 2002).

Mexican waterbodies have different species of cladocerans including the genera *Daphnia* and *Diaphanosoma* (De la Lanza and García, 2002; Elías-Gutiérrez et al., 2008). *Daphnia pulex* and *Diaphanosoma birgei* are easily cultured using microalgae such as *Chlorella* and *Scenedesmus*. Both the cladoceran species are known to respond rapidly to stress (García-García et al., 2006). Under toxicant stress changes in feeding and filtration rates, somatic growth and body size can be easily quantified. However, demographic responses of cladocerans to toxicants are considered to be more sensitive than other variables such as somatic growth (Dumont and Negrea, 2002).

Life table demography is an important ecological method for quantifying the effects of pesticides and herbicides (Calow, 1997). Using life table demography method, it is possible to quantify offspring production in an age-specific manner. Cladocerans are particularly well suited for this because of their predominantly parthenogenetic mode of reproduction (Dumont and Negrea, 2002). Usually for most cladocerans, reproductive variables such as gross and net reproductive rate and the rate of population increase are more sensitive to toxic stress than non-reproductive parameters such as swimming speed or survival (Calow, 1997). Therefore, cladoceran reproductive variables are more widely used to quantify the sublethal effects of toxic substances such as pesticides and heavy metals (Sarma and Nandini, 2006).

Malathion is produced and extensively used in Mexico in spite of the fact that it is known to cause health problems to people living close to the production facilities (Fuentes-Matus et al., 2010). It has a high mutagenic potential and high levels of residues in grains from the Mexican State of Sonora ranging from 2 to 25 ng g⁻¹ (Aldana-Madrid et al., 2008). It also bio-accumulates up to 10-fold in primary producers and 140-fold in secondary consumers in aquatic ecosystems (Favari et al., 2002). In spite of the knowledge on the dangers of this pesticide, little quantified information is available on its toxicity to zooplankton. In this work we evaluated the effects of sub-lethal concentrations of malathion on the survivorship and reproductive variables of two cladoceran species *Daphnia pulex* and *Diaphanosoma birgei*.

Materials and Methods

Plankton cultures : The test cladoceran species *Daphnia pulex* and *Diaphanosoma birgei* were isolated from a local fresh water body in Mexico City. Using a single parthenogenetic female, stock cultures were separately established. For culturing cladocerans

and for experiments we used reconstituted moderately hard water (EPA medium) and the single celled *Chlorella vulgaris* as the diet. The EPA medium was prepared by dissolving 0.095 g of NaHCO₃, 0.06 g of CaSO₄, 0.06 g of MgSO₄ and 0.002 g KCl in one litre of distilled water (Weber, 1993).

Chlorella vulgaris (Strain CL-V-3) was originally obtained from the algal cultures section of CICESE (Ensenada, Mexico) and was batch-cultured in 2 l transparent bottles using Bold' basal medium (Borowitzka and Borowitzka, 1988). Alga in log phase of growth was concentrated through centrifugation (3000 rpm for 5 min.), rinsed and resuspended in distilled water. The algal density was enumerated using haemocytometer. The stock cultures as well experimental test jars were maintained at 23±1°C, pH 7.0 to 7.5 and continuous but diffused fluorescent illumination (Nandini and Sarma, 2003).

Preparation of sublethal concentrations of malathion : Commercial product of malathion (malathion 500) was purchased and the real concentration was determined at the Instrumentation Laboratory of the Autonomous University of State of Mexico (Toluca City, Mexico). All concentrations of the pesticide were accordingly based on the actual concentration of the active ingredient. Because the tested cladoceran species differed in their tolerance to malathion, we separately conducted a series of preliminary range finding tests. Based on these tests, we selected four sublethal concentrations of malathion for each cladoceran species. Thus, for *D. pulex*, the malathion concentrations were 0.225, 0.45, 0.9 and 1.8 ng l⁻¹ and for *D. birgei*, these were 0.0281, 0.0562, 0.1125, 0.225 ng l⁻¹. For both the cladoceran species we used daily prepared pesticide concentrations through serial dilution from a stock solution of 1 µg l⁻¹.

Life table demography experiments : Life table demography tests were separately conducted each cladoceran species. The general experimental conditions were as follows: 50 mL transparent jars as test containers; each malathion concentration was dissolved in 20 ml distilled water plus 20 ml of EPA medium with 1x10⁶ cells ml⁻¹ of *C. vulgaris*. Each test jar received 10 neonates (<24 h) of one of the two cladoceran species. We used three replicates for each concentration containing 10 neonates. The commercial product contained in addition to active ingredient (diethyl 2-[(dimethoxyphosphorothioyl)sulfanyl]butanedioate), inert solvents and emulsifiers whose concentrations did not exceed 1 µl per test jar. At this concentration, the solvents and emulsifiers present in the malathion 500 have no known effect on cladocerans (Sarma and Nandini, 2006). Hence no negative controls were set up.

Following initiation of the experiments, daily we quantified the number of individuals living in each cohort and transferred them to fresh jars containing the desired algal food density and toxicant level. Dead adults and newly born offspring when present were quantified and discarded. The experiments were terminated

when the last individual in each cohort had died.

Based on the data collected, we derived the following survivorship and reproductive variables (Krebs, 1985):

$$\text{Average lifespan : } L_x = \frac{n_x1 + n_x2}{2}$$

$$\text{Age specific life expectancy : } e_x = \frac{T_x}{n_x}$$

$$\text{Gross reproductive rate : } R = \sum_0^{\infty} m_x$$

$$\text{Net reproductive rate : } R_0 = \sum_0^{\infty} l_x \cdot m_x$$

$$\text{Generation time: } T = \frac{\sum l_x \cdot m_x \cdot X}{R_0}$$

Rate of population increase per day (solved iteratively)

$$\sum_{x=w}^n e^{-rx} \cdot l_x \cdot m_x = 1$$

Where, l_x = Proportion of surviving to start of age x (days), m_x = offspring produced per female at age x , T_x = cumulative number of individuals from age x to maximum age, n_x = number of live individuals at the start of age x .

The differences among the treatments were statistically evaluated using one-way-analysis of variance (ANOVA) (Sokal and Rohlf, 2000).

Results and Discussion

Data on the age specific survivorship curves of *D. pulex* and *D. birgei* subjected to different concentrations of malathion are presented in Fig. 1. In general, *D. pulex* was less sensitive than *D. birgei*. For either cladoceran species, increase in the pesticide concentration resulted in decreased survival which was more evident in the treatments with the highest toxicant concentration (0.225 ng l⁻¹) for *D. birgei*. In control, the typical rectangular survivorship curves (Krebs, 1985) were observed for *D. pulex* while these slightly differed for the first few days for *D. birgei*.

Age-specific life expectancy curves of the tested cladocerans showed decreased survival with increasing age of the cohort. The presence of pesticide caused further decrease in the survival (Fig. 2). Fecundity patterns (Fig. 3) of *D. pulex* and *D. birgei* showed decreased offspring production with increase in the concentration of malathion. In general, offspring production was highest during the first two weeks and thereafter reduced. For

both cladoceran species, not only the magnitude but also frequency of offspring production was reduced with increase in the pesticide level.

Data on the selected life history variables of *D. pulex* and *D. birgei* exposed to different sublethal concentrations of malathion are presented in Table 1. For a given cladoceran species, compared to control, the gross reproductive and net reproductive rates, generation time and the rate of population increase were all decreased due to pesticide. The average lifespan of *Daphnia pulex* in control was about 19 days while under similar conditions, that of *D. birgei* was about 21 days. Compared to the survivorship variables, the reproductive parameters of the two cladoceran species were more adversely affected by the pesticide. Statistical analysis using one-way ANOVA showed that survival-related (except the average lifespan of *D. pulex*) and reproduction-related variables (except generation time for *D. pulex*) were significantly affected by the concentration of malathion ($p < 0.05$, F-test, Table 2).

The selection of cladoceran species in the present work was based on their availability in tropical high altitude waterbodies. *Daphnia* generally being a temperate genus is also found at high altitude waterbodies while *Diaphanosoma* is predominantly a tropical taxon (Košinek, 2002). Both are known to occur in the same waterbodies in many parts of Mexico (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008). Malathion, wherever is applied, due to agricultural runoffs eventually reaches the ponds and lakes and thus affects cladocerans (Olvera-Hernández *et al.*, 2004; Anon., 2006). The relative sensibilities of various aquatic invertebrates, including cladocerans, to malathion toxicity vary considerably (Martínez-Tabche *et al.*, 1991). Most tests involving the evaluation of toxic effects of malathion are based on short term median lethal concentration tests. The median lethal concentration (LC₅₀) for various cladoceran species including *D. pulex* and *M. macrocopa* varied from 1-16 µg l⁻¹ (Tomlin, 2006; Relyea, 2009). At a sublethal level of 0.01 µg l⁻¹ of malathion, the survival of *Moina macrocopa* was affected and, in addition, reproduction was reduced to about 40% (Wong *et al.*, 1995). Several studies indicate that the response of different taxa of cladocerans to toxicants is significantly different (Sarma and Nandini, 2006). Most studies on the ecotoxicology of cladocerans focus on *Daphnia* and *Ceriodaphnia*. Little information is available on the effects of sublethal levels of pesticides to *Diaphanosoma* (Leboulanger *et al.*, 2011). While studies show that the genus *Moina* is quite resistant to toxicants, it has been shown that *Diaphanosoma* is as much sensitive to heavy metals as daphniids (García-García *et al.*, 2006). Our findings corroborate the similar sensitivity levels of *Daphnia pulex* and *D. birgei* to the pesticide malathion.

In assessing the toxicity of substances at or beyond the population level, there is a problem of inferring the consequences based on the effects observed at the individual level (Caswell,

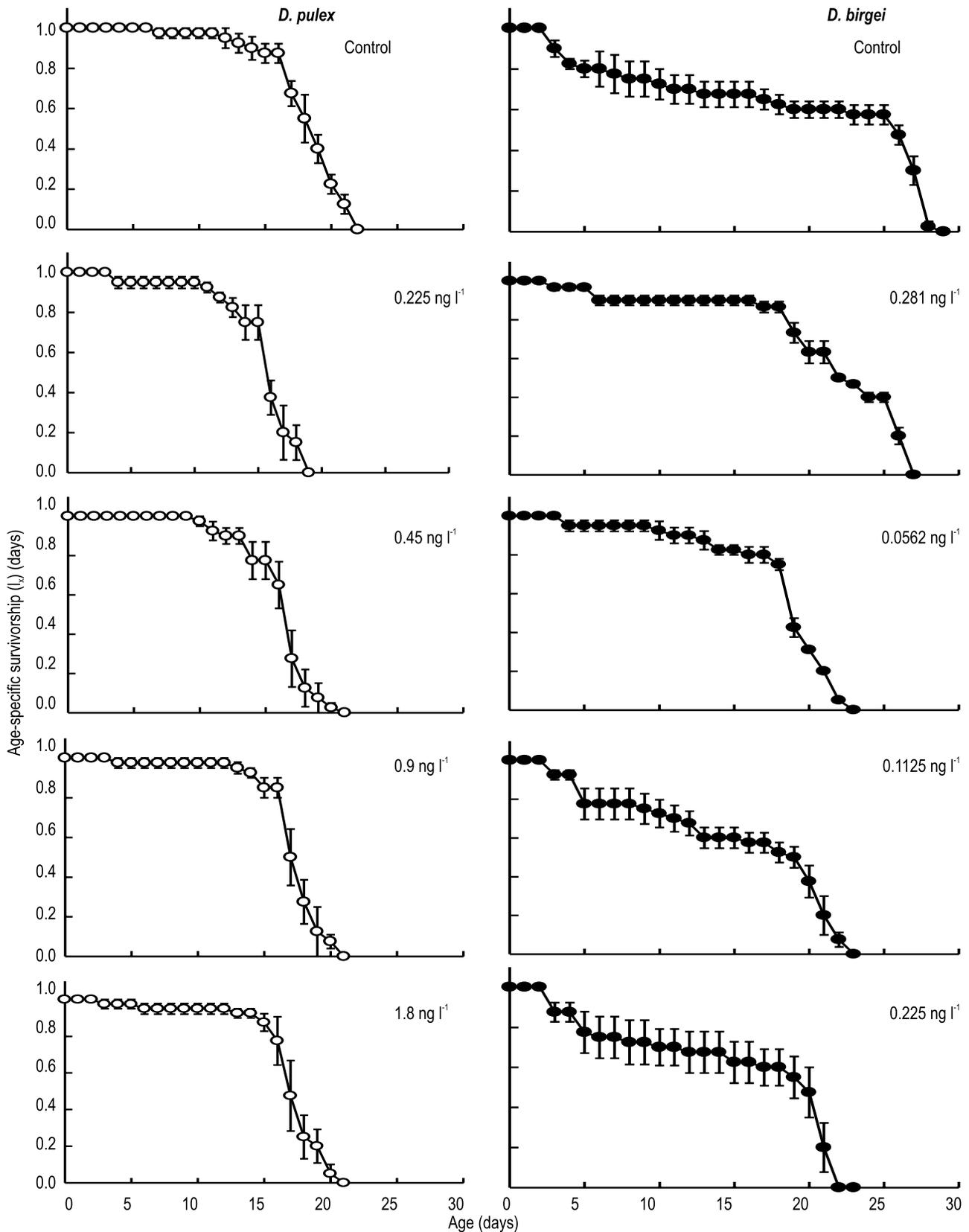


Fig. 1: Age specific survivorship curves (proportion of survival) (l_x) of *Daphnia pulex* (open circles) and *Diaphanosoma birgei* (closed circles) exposed to different concentrations of malathion (ng l^{-1}). Data represent mean \pm SE based on three replicates (cohorts of 10 individuals each)

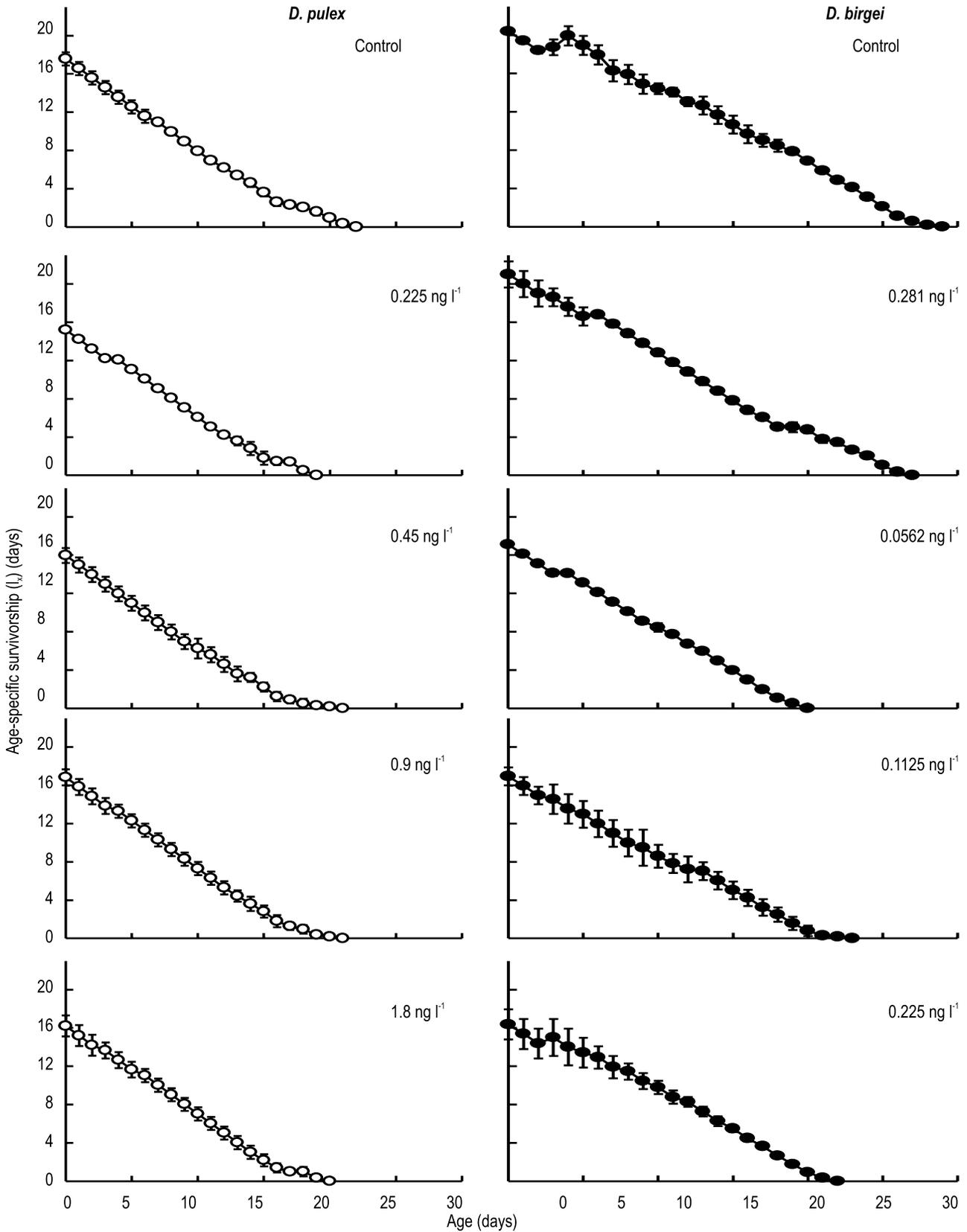


Fig. 2 : Age specific life expectancy curves (ex) of *Daphnia pulex* (open circles) and *Diaphanosoma birgei* (closed circles) exposed to different concentrations of malathion (ng l⁻¹). Data represent mean ± SE based on three replicates (cohorts of 10 individuals each)

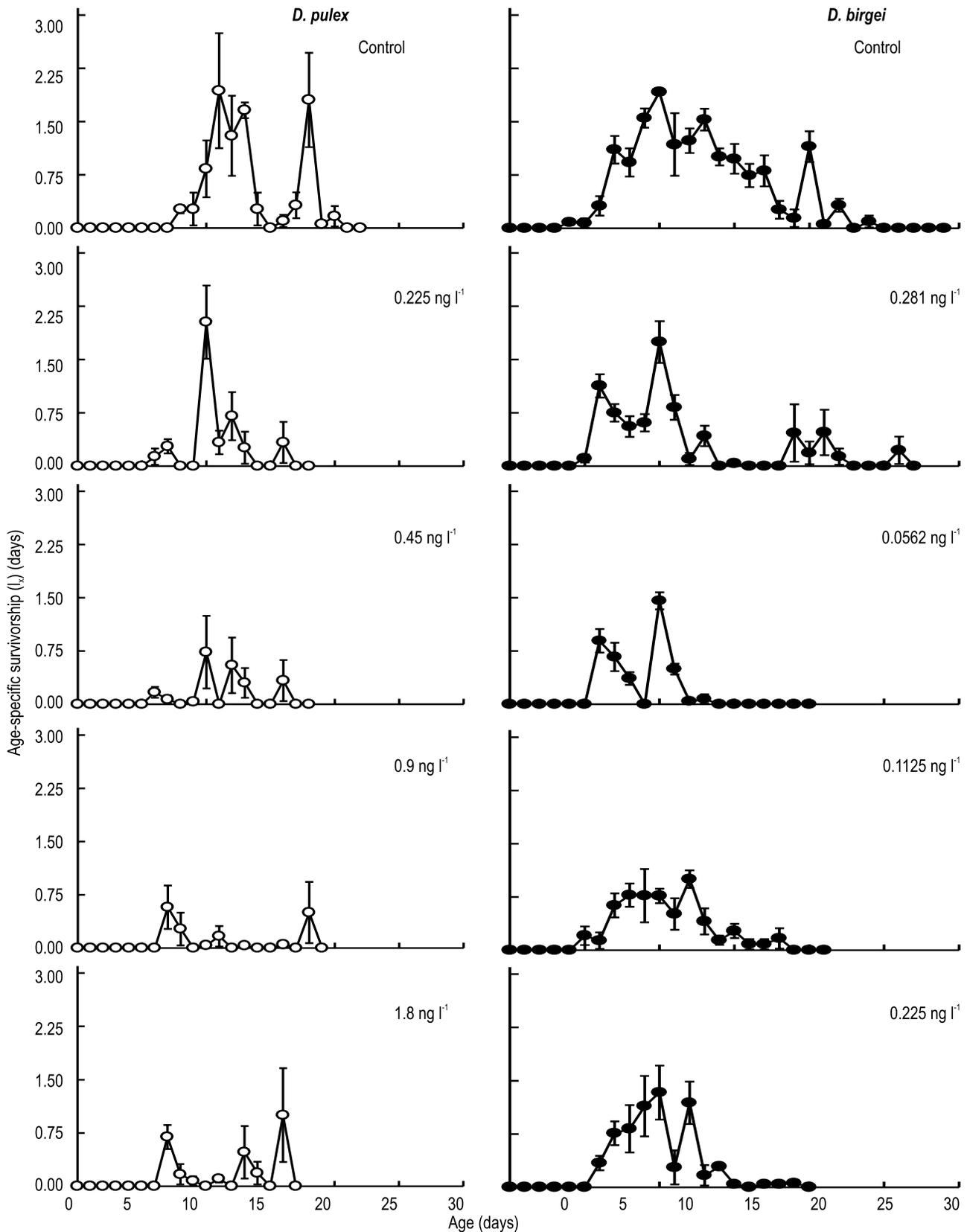


Fig. 3 : Age specific reproduction (offspring female⁻¹ day⁻¹) (mx) of *Daphnia pulex* (open circles) and *Diaphanosoma birgei* (closed circles) exposed to different concentrations of malathion (ng l⁻¹). Data represent mean \pm SE based on three replicates (cohorts of 10 individuals each)

Table 1 : Data on the selected life history variables of *Daphnia pulex* and *Diaphanosoma birgei* exposed to different concentrations of malathion. Shown are mean±standard error based on 3 replicates (cohorts)

| Species / Variable | Malathion concentration (ng l ⁻¹) | | | | |
|--------------------|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Control | 0.225 | 0.45 | 0.9 | 1.8 |
| <i>D. pulex</i> | | | | | |
| Avg. life span | 18.9±0.2 ^a | 16.0±1.3 ^b | 16.5±0.9 ^b | 16.8±0.3 ^b | 15.9±0.4 ^b |
| GRR | 9.0±2.1 ^a | 4.07±1.3 ^{ab} | 2.0±1.4 ^b | 1.01±0.1 ^b | 2.7±0.9 ^{ab} |
| NRR | 8.0±2.1 ^a | 3.6±1.1 ^{ab} | 1.8±1.2 ^b | 0.7±0.3 ^b | 1.9±0.4 ^b |
| GT | 12.8±0.7 ^a | 10.3±0.5 ^a | 9.9±1.1 ^a | 9.4±1.5 ^a | 10.6±1.0 ^a |
| r | 0.16±0.02 ^a | 0.11±0.03 ^{ab} | 0.01±0.06 ^{ab} | -0.04±0.03 ^b | 0.05±0.02 ^{ab} |
| <i>D. birgei</i> | | | | | |
| Avg. life span | 20.9±0.3 ^{ab} | 21.5±1.3 ^a | 17.6±0.3 ^{ab} | 15.1±2.9 ^{ab} | 13.5±0.9 ^b |
| GRR | 15.4±1.0 ^a | 7.7±0.3 ^c | 4.9±0.1 ^b | 6.5±1.3 ^{bc} | 5.9±0.5 ^{bc} |
| NRR | 11.7±0.7 ^a | 6.4±0.4 ^b | 3.6±0.1 ^b | 3.8±0.9 ^b | 4.2±0.7 ^b |
| GT | 12.1±0.3 ^a | 10.4±0.1 ^{bc} | 8.5±0.3 ^c | 10.4±0.5 ^c | 9.5±0.8 ^b |
| r | 0.23±0.01 ^a | 0.20±0.01 ^{ac} | 0.15±0.01 ^{cb} | 0.12±0.01 ^b | 0.13±0.02 ^{cb} |

Avg. life span = average life span; GRR: gross reproductive rate; NRR: net reproductive rate; GT: generation time and r: rate of population increase

2000). In life table demographic approach this is not the case because we used cohort populations for each treatment. Under sub-lethal concentrations, malathion exerts stronger effects on reproduction than on survival (Wong *et al.*, 1995). In the present study, we evaluated both survivorship and reproductive variables of both cladoceran species subjected to different concentrations of malathion. Age-species survivorship and life expectancy provide information on how a cohort population experiences mortality in relation to age (Caswell, 2000). Ideal survivorship curves appear rectangular with little mortality in younger age groups but as they age, physiological changes lead to rapid decline in survival (Krebs, 1985). The survivorship close to this condition was observed in control of *D. pulex* and *D. birgei* where the cohort experienced little mortality during most part, but declined rapidly as the population became 3 week-old. There was a significant effect of malathion on the average life span and generation time of *D. birgei* but not *D. pulex* which indicates the greater sensitivity of *Diaphanosoma* as compared to *Daphnia*; the former taxa could be considered as a part of the battery of species for toxicity testing, particularly in tropical countries.

Age specific reproduction in cladocerans varies depending on the species. Most cladoceran species of the genus *Daphnia* need about a week to reach age at first maturity and thereafter release offspring in distinct clutches (Sarma *et al.*, 2005). The number of offspring per clutch varies with age. Usually younger females tend to have lower offspring per clutch and as age advances the somatic growth takes places thereby providing more space in the brood pouch which in turn facilitates production of higher number of offspring (Nandini and Sarma, 2000). Thus peak offspring production is associated with the cladocerans at mid-reproductive age (Nandini and Sarma, 2000). Toxicants change this trend (García-García *et al.*, 2006). In the present study for both cladoceran species, peak offspring production was

during 10-12 days and thereafter it decreased. Malathion not only reduced the duration of offspring production but also the magnitude. Our observations were similar to those recorded earlier where the neonate production by the cladocerans was strongly reduced with an increase in the concentration of the pesticide (Wong *et al.*, 1995).

The use of extremely low levels toxicants sometimes causes enhanced survival or reproductive output in zooplankton. For example it has been observed that stimulation occurred in longevity of *D. pulex* when exposed to dieldrin and reproductive rate was also reported to be higher for the same species when subjected to low levels of copper (Daniels and Allan, 1981; Meyer *et al.*, 1987). In the present study, marginal enhancement of offspring production by *D. pulex* at the highest concentration tested (e.g., 1.8 ng l⁻¹) was observed. However, these were not statistically significant as compared to other concentrations of the pesticide, but were significantly lower when compared to control (Table 1). In *D. birgei*, the negative effects of pesticide were noticeable from the lowest concentration onwards. For example, compared to control, the gross reproduction was reduced by 50% when exposed to 0.0281 ng l⁻¹ of malathion.

In ecotoxicological tests, it is also important to compare the demographic data in control with those available in literature under comparable conditions. The general ranges of life history variables of tropical and temperate cladocerans have been reviewed (Sarma *et al.*, 2005). Generally, cladocerans have mean lifespan of 5 to 150 days depending on the temperature and species; temperate daphniids have longer duration than tropical Sididae. This was also event in this work and in addition, the range of average lifespan recorded for the tested species is similar to that reported in the literature (Sarma *et al.*, 2005). The gross and net reproductive rates observed here for both cladoceran species

Table 2 : Results of one way analysis of variance performed for the selected life history variables of *Daphnia pulex* and *Diaphanosoma birgei* exposed to different concentrations of malathion.

| Variable | DF | SS | MS | F | p |
|-----------------------|----|--------|--------|-------|-------|
| Average lifespan | | | | | |
| <i>D. pulex</i> | | | | | |
| Among groups | 4 | 18.157 | 4.539 | 2.688 | 0.093 |
| Error | 10 | 16.887 | 1.689 | | |
| <i>D. birgei</i> | | | | | |
| Among groups | 4 | 125.03 | 31.258 | 3.699 | 0.043 |
| Error | 10 | 84.507 | 8.451 | | |
| Gross repro. Rate | | | | | |
| <i>D. pulex</i> | | | | | |
| Among groups | 4 | 121.07 | 30.267 | 5.339 | 0.015 |
| Error | 10 | 56.69 | 5.669 | | |
| <i>D. birgei</i> | | | | | |
| Among groups | 4 | 228.35 | 57.088 | 29.68 | 0.001 |
| Error | 10 | 19.232 | 1.923 | | |
| Net repro. Rate | | | | | |
| <i>D. pulex</i> | | | | | |
| Among groups | 4 | 96.887 | 24.222 | 5.315 | 0.015 |
| Error | 10 | 45.573 | 4.557 | | |
| <i>D. birgei</i> | | | | | |
| Among groups | 4 | 140.59 | 35.148 | 25.53 | 0.001 |
| Error | 10 | 13.767 | 1.377 | | |
| Generation time | | | | | |
| <i>D. pulex</i> | | | | | |
| Among groups | 4 | 19.605 | 4.901 | 1.45 | 0.288 |
| Error | 10 | 33.798 | 3.38 | | |
| <i>D. birgei</i> | | | | | |
| Among groups | 4 | 19.712 | 4.928 | 12.98 | 0.001 |
| Error | 10 | 3.796 | 0.38 | | |
| Rate of pop. Increase | | | | | |
| <i>D. pulex</i> | | | | | |
| Among groups | 4 | 0.0828 | 0.0207 | 4.732 | 0.02 |
| Error | 10 | 0.0437 | 0.0044 | | |
| <i>D. birgei</i> | | | | | |
| Among groups | 4 | 0.0232 | 0.0058 | 9.115 | 0.002 |
| Error | 10 | 0.0064 | 0.0006 | | |

DF = degrees of freedom, SS = sum of squares, MS = mean square, F: F-ratio

were also within the range (3-100 offspring per female) reported in literature (Dumont and Negrea, 2002).

Our results showed that reproductive rates of cladocerans were more sensitive to pesticide than survivorship related variables. For example, generation time and life expectancy at birth of *D. pulex* were not sensitive to malathion under any of the concentrations used here; the results showed no statistical differences when compared to control. It is also known that reproductive variables of zooplankton are more adversely affected by pesticides than duration of life or generation time. For example, when the rotifer *Platyonus patulus* (= *Brachionus patulus*) was exposed to different concentrations of DDT (Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane), the generation time was not

adversely affected and on the other hand, gross and net reproductive rates decreased due to the pesticide (Rao and Sarma, 1986). The rate of population increase is a significant variable in ecotoxicity tests. Based on a large set of published work in relation to the life history variables and the effect of various toxic substances it has been concluded that the rate of population growth is a sensitive variable in evaluating the responses of organisms to toxic substances (Forbes and Calow, 1999). Here, the rate of population increase for both cladoceran species was found to be highly sensitive to malathion levels and thus could be a good measure to evaluate the toxic effects of pesticides to zooplankton.

Our results showed that *Diaphanosoma* was sensitive to malathion than *Daphnia*. For either cladoceran species tested here, not all survivorship and reproductive variables were consistently sensitive to malathion. It is generally believed that survivorship variables are less sensitive than reproduction-related parameters. It was also observed that generation was less sensitive for *Daphnia* but not for *Diaphanosoma*.

Acknowledgments

One of us (EBH) is thankful to PCMyL (UNAM, Mexico) and CONACyT (No. 53835) for the scholarship. This work was supported by a project from PAPIIT-IN213513 (UNAM).

References

- Aldana-Madrid, M.L., S. Valdez-Hurtado, N.D. Vargas-Valdez, N.J. Salazar-Lopez, M.I. Silveira-Gramont, F.G. Loarca-Piña, G. Rodríguez-Olibarria, F.J. Wong-Corral, J. Borboa-Flores and A. Burgos-Hernández: Insecticide residues in stored grains in Sonora, Mexico: Quantification and toxicity testing. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **80**, 93-96 (2008).
- Anon.: Reregistration eligibility decision (RED) for malathion. United States Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, EPA 738-R-06-030(2006).
- Borowitzka, M.A. and L.J. Borowitzka: Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press, London, United Kingdom (1988).
- Calow, P.: Handbook of Ecotoxicology. John Wiley & Sons, New York (1997).
- Caswell, H.: Matrix Population Models, 2nd Edn., Sinauer Associates, Sunderland, MA (2000).
- Daniels, R.E. and J.D. Allan: Life table evaluation of chronic exposure to a pesticide. *Can. J. Fish. Aqu. Sci.*, **38**, 485-494(1981).
- De la Lanza, E.G. and C.J.L. García: Lagos y presas de México. Mexico, (2002).
- Dumont, H. and S. Negrea: Introduction to the class Branchiopoda. Guides to the identification of the micro invertebrates of the continental waters of the world, Backhuys Publishers, The Netherlands (2002).
- Elías-Gutiérrez, M., E. Suárez Morales, M. Gutiérrez Aguirre, M. Silva Briano, J.G. Granados Ramírez and T. Garfias Espejo: Cladocera y Copepoda de las aguas continentales de México. Guía ilustrada. UNAM, Mexico City, Mexico (2008).
- Favari, L., E. López, L. Martínez-Tabche and E. Díaz-Pardo: Effect of

- insecticides on plankton and fish of Ignacio Ramirez Reservoir (Mexico): A biochemical and biomagnification study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **51**, 177-186 (2002).
- Forbes, V.E. and P. Calow: Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology? *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**, 1544-1556 (1999).
- Forró, L., N.M. Korovchinsky, A.A. Kotov and A. Petrusek: Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**, 177-184 (2008).
- Fuentes-Matus, C., S. Vega y León, G. Díaz-González, M. Noa-Pérez and R. Gutiérrez-Tolentino: Determination of residues of malathion and malaoxon in mango varieties Ataulfo and Tommy Atkins produced in Chahuities, Oaxaca. *Agrociencia*, **44**, 215-223 (2010).
- García-García, G., S. Nandini and S.S.S. Sarma: Turbidity mitigates lead toxicity to cladocerans (Cladocera). *Ecotoxicol.*, **15**, 425-436 (2006).
- Hoffman, D.J., B.A. Rattner, G.A. Burton Jr. and J. Cairns Jr.: Handbook of Ecotoxicology. 2nd Edn., Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, USA (2003).
- Kořinek, V.: Cladocera. In: Ed.: Fernando, C. H. Guide to Tropical Freshwater Zooplankton. Identification, Ecology and Impacts on Fisheries. Backhuys Publishers, The Netherlands: 69-97 (2002).
- Krebs, C.J.: Ecology; The experimental analysis of distribution and abundance. 3rd Edn., Harper & Row, New York (1985).
- Krieger, R. (ed.): Handbook of Pesticide Toxicology. 3rd edition, 2 vols. Elsevier, San Diego, California (2010).
- Leboulanger, C., M. Bouvy, C. Carré, P. Cecchi, L. Amalric, A. Bouchez, M. Pagano and G. Sarazin: Comparison of the effects of two herbicides and an insecticide on tropical fresh water plankton in microcosms. *Archi. Environ. Conta. Toxicol.*, **61**, 599-613 (2011).
- Levine, M.J.: Pesticides: A toxic time bomb in our midst. Praeger Publishers, Connecticut, USA (2007).
- Martínez-Tabche, L., R. Alfaro, E. Sánchez-Hidalgo and C. Galar: Toxic effect of parathion on *Moina macrocopa* metabolism. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **47**, 51-56 (1991).
- Meyer, J.S., C. G. Ingersol and L.L. McDonald: Sensitivity analysis of population growth rates estimated from cladoceran chronic toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, **6**, 115-126 (1987).
- Nandini, S. and S.S.S. Sarma: Life table demography of four cladoceran species in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) density. *Hydrobiologia*, **435**, 117-126 (2000).
- Nandini, S. and S.S.S. Sarma: Population growth of some genera of cladocerans (Cladocera) in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) levels. *Hydrobiologia*, **491**, 211-219 (2003).
- Olvera-Hernández, E., I. Martínez-Tabche and F. Martínez-Jerónimo: Bioavailability and effects of malathion in artificial sediments on *Simocephalus vetulus* (Cladocera: Daphniidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **73**, 197-204 (2004).
- Rao, T.R. and S.S.S. Sarma: Demographic parameters of *Brachionus patulus* Müller (Rotifera) exposed to sublethal DDT concentrations at low and high food levels. *Hydrobiologia*, **139**, 193-200 (1986).
- Relyea, R.A.: A cocktail of contaminants. How mixtures of pesticides at low concentrations affect communities. *Oecologia*, **159**, 363-376 (2009).
- Sarma, S.S.S. and S. Nandini: Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. *J. Environ. Sci. Hlth.*, Part B, **41**, 1417-1430 (2006).
- Sarma, S.S.S., S. Nandini and R.D. Gulati: Life history strategies of cladocerans: comparisons of tropical and temperate taxa. *Hydrobiologia*, **542**, 315-333 (2005).
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf: Biometry, W.H. Freeman and Company, San Francisco (2000).
- Thorp, J.H. and A.P. Covich (eds): Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. 3rd Edn., Academic Press / Elsevier, New York (2010).
- Tomlin, C.D.S.: The Pesticide Manual: A World Compendium. 14th edn., British Crop Protection Council: Alton, Hampshire, UK (2006).
- Weber, C. I.: Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4th edn., United States Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, EPA/600/4-90/027F (1993).
- Wong, C.K., K.M. Chu and F.F. Shum: Acute and chronic toxicity of malathion to the freshwater cladoceran *Moina macrocopa*. *Water Air Soil Poll.*, **84**, 399-405 (1995).

© Triveni Enterprises

Your article is protected by copyright. This e-reprint is only for personal use. No part of reprint should be reproduced in any form or by any means without prior written permission in writing from the publisher.

Published by :

Triveni Enterprises

1/206, Vikas Nagar, Lucknow - 226 022 (India)
Tel.: +91-522-4017359 (O) ; +91-522-2769018 (R)
Website: www.jeb.co.in; e-mail: editor@jeb.co.in