



El Colegio de la Frontera Sur

Impacto de los plaguicidas utilizados en cultivos
mecanizados sobre pequeños mamíferos en la zona maya de
Quintana Roo

TESIS

presentada como requisito parcial para optar al grado de
Doctor en Ciencias y Desarrollo Sustentable

por

Moisés Andrade Herrera

2018

A la memoria de mi madre, sin su guía no hubiera podido lograr los objetivos hasta ahora reunidos en mi vida. A mi padre, gran ejemplo de lucha y constancia en el trabajo.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis se logró realizar gracias al apoyo y consejos de muchas personas durante los cuatro años del doctorado con quienes estoy profundamente agradecido.

En primer lugar agradecer al CONACyT por otorgarme una beca académica. A la Dra. Griselda Escalona Segura por aceptarme y confiar en mí para desempeñarme en el doctorado, también por todo el apoyo brindado durante los cuatro años del programa. A mis asesores el Dr. Jorge Albino Vargas Contreras y el Dr. Rafael Reyna Hurtado por sus comentarios brindados para enriquecer el presente trabajo. A los sinodales, la Dra. Esperanza Huerta Lwanga y los Drs. Jorge Mendoza Vega y Oscar Renata Guiascón, por sus pertinentes comentarios en favor de la calidad de la tesis.

Particularmente al Dr. Jaime Rendón von Osten, por su valioso apoyo, guía y consejos para llevar a buen puerto este trabajo doctoral. Al M. C. Mauricio González Jaúregui, por su apoyo y consejos en la realización de esta tesis. Pero principalmente a ambos por su amistad.

A la familia Vázquez Andrade y Medina Hum, por su hospitalidad durante mi estancia en José María Morelos. A las autoridades de la CONANP por las facilidades para ingresar al Área de protección de Flora y Fauna de Bala'an K'aax. Así como a las comunidades de Xnoh Cruz y Sabana San Francisco por la oportunidad de trabajar en sus ejidos. Principalmente a Fausto Pacheco y su familia, grandes anfitriones, su apoyo derivó en

una gran amistad. Al M.C. Jesús Chi y Olga Loría, por su valioso apoyo en el análisis de suelos, trabajo de laboratorio y por su invaluable amistad.

A Yuriko, Jorge, "Chepe", Guillermo, Edwin, Arantxa, y a todas las amistades forjadas durante este proceso de aprendizaje, que de forma directa o indirecta contribuyeron en el complemento de todo lo que conlleva la vida académica. Al Instituto EPOMEX y sus autoridades por las facilidades para realizar diversas actividades relacionadas con mi trabajo.

A mi padre, mis hermanos Alberto, Leticia, Alma y a toda mi familia, quienes constituyen un soporte moral a la distancia. Finalmente a Arianne Medina Hum, por su apoyo en el trabajo de campo y principalmente por ser mi compañera de vida, mi soporte y por acompañarme en todo esta meta llamada doctorado

INDICE

RESUMEN	1
CAPITULO 1. Introducción General	3
INTRODUCCIÓN	4
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	15
Objetivos particulares.....	16
METODOS GENERALES	16
LITERATURA CITADA	21
Capítulo 2.	33
Abstract	34
Introduction.	36
Materials and Methods.	39
2.1 <i>Soil samples</i>	39
2.2 <i>Texture, pH. and Organic matter soil determination</i>	40
2.3 <i>Pesticide determination</i>	41
2.4 <i>Soil preparation for exposure</i>	42
2.5 <i>Bioassay</i>	43
2.6 <i>Statistical Analysis</i>	44
Results and Discussion	45
Conclusions	55
References	57
Capítulo 3.	65
Literatura Citada	87
Peso Húmedo.....	101
Peso Seco.....	101
Capítulo 4.	103
INTRODUCCIÓN	104
MATERIALES Y MÉTODOS	108
Área de estudio.....	108

<i>Capturas</i>	110
<i>Análisis de los Biomarcadores</i>	111
<i>Análisis estadísticos</i>	112
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	112
CONCLUSIONES	122
LITERATURA CITADA	123
Capítulo 5.	130
Conclusiones	131

RESUMEN

La utilización de plaguicidas sintéticos para combatir las plagas influyen en la salud de diversos organismos incluyendo al hombre. Para conocer su impacto se utilizan herramientas de evaluación como especies bioindicadoras, y biomarcadores (BM) para evaluar el daño derivado de la exposición. En este sentido, diversos invertebrados del suelo (lombrices de tierra) y pequeños mamíferos silvestres pueden ser bioindicadores adecuados para este propósito debido a sus propiedades ecológicas. En la zona maya de Quintana Roo, los campos agrícolas están aledaños a zonas forestales y se utilizan paquetes tecnológicos basados en el uso de plaguicidas y fertilizantes sintéticos para el cultivo de sandía y papaya principalmente, los cuales son aplicados sin las medidas de seguridad necesarias por lo que el contacto con las especies silvestres es casi inevitable.

Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo fueron documentar la toxicidad de diferentes suelos agrícolas y su influencia en la fauna silvestre expuesta accidentalmente, tanto a escala espacial (zona de aplicación y zona conservada) y a escala temporal (lluvias-secas). Se obtuvieron muestras de suelo (análisis de presencia de plaguicidas) y se usaron lombrices de tierra, ratones y murciélagos, como bioindicadores, en los que se evaluó la toxicidad a través de biomarcadores (BM) enzimáticos como la acetilcolinesterasa (AChE), glutatión-S-Transferasa (GST) y catalasa (CAT). Se detectaron bajas concentraciones de algunos plaguicidas organoclorados tanto en el suelo como en el tejido hepático (ratones), lo que no representa un riesgo a corto plazo debido a esta condición. Asimismo, el análisis de BM mostró que la toxicidad por la exposición es moderada. También se registró una disminución en la actividad de la AChE

(tanto en ratones como en murciélagos) para la temporada lluviosa, lo que sugiere una influencia de compuestos anticolinérgicos para esta temporada. Sin embargo, a escala espacial, no se encontraron diferencias significativas en la actividad de los BM (en murciélagos), lo que sugiere que la toxicidad en este estudio se encuentra modulada por la temporalidad, más que por la distancia a la zona de aplicación de plaguicidas. Finalmente, este es el primer trabajo que documenta los efectos subletales en fauna silvestre derivados de la exposición accidental a plaguicidas en la región. Asimismo, se recomienda realizar más estudios complementando baterías de BM y comparando con sitios más alejados para tener un escenario más completo.

Palabras clave: *bioindicador, biomarcador, lombrices de tierra, murciélagos, plaguicidas, ratones*

CAPITULO 1. Introducción General



INTRODUCCIÓN

Constantemente son liberados al ambiente compuestos químicos orgánicos que no forman parte natural del ecosistema. Estos compuestos químicos se denominan xenobióticos y son originados principalmente en comunidades urbanas e industriales (van der Oost *et al.*, 2003). Un tipo particular de estos compuestos son los plaguicidas, los cuales son definidos por la UNEP (United Nations Environment Programme) como “cualquier sustancia tóxica diseñada para interferir o modificar mecanismos fisiológicos de los animales que se consideren nocivos”.

Hay diversas maneras de clasificar a los plaguicidas, pueden agruparse en naturales y sintéticos, por su persistencia en el ambiente o su toxicidad. Sin embargo, las clasificaciones más comunes se dan por su estructura química y por su acción biológica (Ramírez y Lacasaña 2001). Asimismo, la Organización Mundial de la Salud (OMS), sugiere una clasificación de acuerdo a su peligrosidad, entendiendo esto como su capacidad de producir daño agudo a la salud debido a la exposición en un tiempo relativamente corto (RAP-AL, 2018). La gran demanda de alimentos, provocó que entre la década de 1930 y 1940, se intensificara el uso de plaguicidas sintéticos, iniciando con la aparición del dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), como mecanismo para el control y erradicación de plagas que amenazaban los cultivos y la salud humana (Karam *et al.*, 2004; Albert y Benítez, 2005).

Posteriormente, frente al aparente éxito del DDT se desarrollaron diversos plaguicidas, destinados a mejorar las cosechas mediante la erradicación de plagas, surgiendo los plaguicidas organoclorados (OC), los cuales son de composición química similar al DDT; los plaguicidas organofosforados (OF), éstos a partir de las investigaciones neurotóxicas desarrolladas en Alemania durante la segunda guerra mundial y finalmente los plaguicidas piretroides y carbamatos en la década de los años cuarenta (Albert y Benítez, 2005). Sin embargo, fue hasta la segunda mitad del siglo XX cuando se advirtió de manera alarmante el efecto nocivo del uso de los plaguicidas tanto en la salud humana como en poblaciones de plantas y animales. En 1962 el libro “La primavera silenciosa” de Rachel Carson, es el primero que relata los daños provocados por el uso de DDT. A partir de entonces, la documentación sobre las desventajas de la utilización de plaguicidas sintéticos se incrementó, se reportó la desaparición de fauna silvestre expuesta accidentalmente a los plaguicidas. Además se advirtió sobre la consecuente resistencia de las plagas a los diversos compuestos químicos utilizados (Restrepo, 1988).

Los efectos deletéreos en las poblaciones biológicas son a menudo difíciles de determinar en organismos silvestres, debido a que muchos de esos efectos solo son detectables cuando ya ha pasado un periodo considerable de tiempo (van der Oost *et al.*, 2003). Lo anterior dio lugar a la profesionalización del estudio toxicológico en los ecosistemas acuáticos y terrestres a partir del desarrollo de la disciplina de la ecotoxicología, la cual estudia los efectos de los contaminantes desde nivel de organismo hasta niveles ecológicos superiores (Hoffman *et al.*, 2003). En el marco de la ecotoxicología, los trabajos para determinar los impactos de los plaguicidas en ambientes

terrestres se enfocan principalmente en la detección de contaminantes persistentes en los organismos o en matrices ambientales (Badii et al., 2009). Para realizar estos trabajos, se utilizan dos herramientas para evaluar el impacto de los xenobióticos en el ambiente y valorar la perturbación de zonas contaminadas, los bioindicadores y biomarcadores bioquímicos (Rattner, 2009).

Los bioindicadores (BI), son especies que están bien adaptadas a las características específicas de su ambiente, y que sean susceptibles para reaccionar a cambios e impactos que se suscitan en él (Paoletti, 1999; van Straalen y Krivolutskii, 1996). Asimismo, derivado de la necesidad de indicadores más sensibles a la exposición a xenobióticos y que permitan caracterizar efectos subletales, surgen los biomarcadores (BM) bioquímicos (Bickham *et al.*, 2000). Los BM son una respuesta biológica a la exposición de un compuesto(s) químico(s), generando una medida del grado de exposición y algunas veces también muestra el efecto tóxico (Peakall, 1994). Van Gastel y Van Brummelen (1996), consideran un BM como cualquier respuesta biológica a un compuesto químico en el ambiente, ésta respuesta se da por debajo del nivel de organismo y medida dentro del mismo o en sus productos (orina, heces, pelo, plumas). Es decir, valoran los impactos por contaminación antes de que se manifiesten en los organismos o ecosistemas ya que pudieran estar en una fase de efectos irreversibles. Estas dos herramientas ayudan a caracterizar los impactos de los xenobióticos, permitiendo la identificación y determinación cuantitativa de los factores causales de sus efectos. Estos efectos pueden derivar en pérdida de biodiversidad en las zonas expuestas (Paoletti, 1999; Burger *et al.*, 2007).

Diversos atributos son tomados en cuenta para la elección de un bioindicador, por ejemplo, un tamaño poblacional alto, alta tasa de recambio, sensibles a variaciones ambientales o facilidad para su muestreo (Paoletti, 1999). En este sentido, las lombrices de tierra son consideradas como un importante organismo modelo para investigaciones ecotoxicológicas, particularmente en disturbios o contaminación del suelo, debido a sus características fisiológicas, funciones ecológicas, hábitos alimenticios y al medio que habitan (Feng et al., 2015; Velki y Ećimović, 2016). De hecho los efectos de diversos plaguicidas son evaluados en lombrices de tierra en condiciones controladas de laboratorio (Nam et al., 2017; Stepić et al., 2013). Sin embargo, aún existe una brecha en el conocimiento del efecto de los plaguicidas sobre las lombrices en condiciones realistas (Pelosi et al., 2014).

Asimismo, los mamíferos pequeños también son considerados buenos BI para estudios ecotoxicológicos, tanto en laboratorio como en vida libre, debido a los rasgos biológicos como alta fecundidad, ciclos de vida cortos y alta tasa de recambio, también por su papel ecológico en el ambiente como dispersor de semillas, control de plaga de insectos y su nivel trófico (Foget y Milleron 1991; Hermoso de Mendoza-García *et al.*, 2008; Kolf-Clauw *et al.*, 2007; Mangan y Adler, 2002). Además, son elegidos también por su capacidad de acumular contaminantes y metales pesados (Crocker, 2005; Marcheselli *et al.*, 2010). Las principales familias de mamíferos pequeños que se utilizan para monitorear impactos por contaminación son: Soricidae (musarañas), Cricetidae (ratones, ratas) y Muridae (ratones y ratas del viejo mundo). No obstante, los roedores son los animales más utilizados para este fin (Talmage y Walton, 1991).

Los pequeños mamíferos son utilizados como sustitutos para validar modelos de exposición en humanos por diversas agencias de protección al ambiente (Sheffield et al., 2001). Los estudios para determinar el daño fisiológico provocado por xenobióticos sobre mamíferos silvestre son escasos, se realizan principalmente en condiciones controladas de laboratorio exponiendo a ratones a diferentes mezclas de contaminantes y caracterizando su respuesta fisiológica (Chang, 1990; Chanda, 1997; Fairbrother, 1994; Olson y Hinsdill, 1984; Ratner y Hoffman, 1984; Timur, 2003). Sin embargo, a partir del desarrollo de mejores técnicas y biomarcadores se han realizado algunos trabajos con roedores silvestres que muestran los efectos nocivos de los xenobióticos en vida libre (Westlake et al., 1983; Marques et al., 2008; Fritch et al., 2010).

Los ratones son los mamíferos más utilizados en estudios toxicológicos para evaluar los efectos de plaguicidas en condiciones controladas (Köhler y Triebkorn 2013). Pero a pesar de lo anterior, han sido poco considerados como BI para estudios en vida libre. En estos trabajos, principalmente se utiliza como criterio de evaluación la muerte y declinación poblacional (Sheffield et al., 2001), dejando de lado los efectos subletales. Por otro lado, a pesar de las importantes funciones ecológicas de los murciélagos, principalmente como dispersores de semillas y controlando plagas de insectos, son pocos los trabajos que los utilizan como indicadores de zonas contaminadas (Bayat et al., 2014). Los murciélagos fueron empleados ya desde mediados de la década de los sesentas, para dilucidar los efectos nocivos del DDT (Luckens y Davis, 1964). Asimismo, estudios recientes han demostrado que pueden ser muy sensibles a la exposición de plaguicidas, recomendando su uso para la evaluación de riesgos ambientales (Stahlschmidt y Brühl, 2012). Estos trabajos analizan principalmente, la declinación poblacional y el deterioro

en la salud (carcinogénesis, inmunotoxicidad, disrupción endócrina), de los murciélagos expuestos y acumulación de contaminantes persistentes como el DDT y el lindano en sus tejidos (Amaral *et al.*, 2012; Bayat *et al.*, 2014; Berny, 2007; Geluso *et al.*, 1976; Kannan *et al.*, 2010; Swanepoel *et al.*, 1999).

En México, el uso de los plaguicidas sintéticos se remonta a finales de la década de los años cuarenta en coincidencia con la revolución verde (etapa de intensificación de la producción agrícola con amplio uso de plaguicidas sintéticos), siendo México uno de los primeros países en adoptar esta corriente (Albert, 2005). En un principio, además del control de vectores de enfermedades, en México los plaguicidas fueron utilizados de forma intensiva en el cultivo del algodón, lo cual provocó una resistencia de las plagas a los compuestos químicos utilizados, generando así que su producción resultara incosteable trayendo como consecuencia su abandono (Albert, 2005). Históricamente en México las regiones que usan más agroquímicos son Sinaloa, Chiapas, Veracruz, el bajío, Sonora-Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Estado de México y Puebla-Oaxaca; calculándose que entre ellas se aplica el 80 % de los plaguicidas usados en el país, utilizándose principalmente herbicidas, seguidos de insecticidas y fungicidas (Albert, 2005).

Los datos que se han generado en el país sobre los efectos adversos de los plaguicidas son insuficientes (Albert, 2005). Las investigaciones sobre los plaguicidas en México no se dedican a los productos que se utilizan en la actualidad, y se limitan a determinar los residuos de compuestos persistentes en alimentos, tejidos humanos o en matrices ambientales, sin evaluar los efectos adversos en salud pública o ambiental (Albert, 2005). Los estudios sobre contaminación en México se realizan principalmente

en ambientes costeros, siendo escasos los trabajos en fauna silvestre en ambientes terrestres (Andrade-Herrera, 2011). En este sentido, Clark *et al.*, (1995), evaluaron muestras de guano de nueve cuevas de murciélagos en el norte del país, encontraron residuos de DDT, los cuales fueron relacionados con la declinación en las poblaciones locales. Otro estudio que permitió evaluar los daños por contaminación en roedores silvestres en vida libre es el de Gómez-Ugalde (2003), que evaluó la influencia y existencia de contaminantes atmosféricos y metales pesados en tejidos de tres especies de ratones habitantes de los Parques Nacionales Cumbres del Ajusco y Desierto de los Leones en la ciudad de México. Encontró efectos negativos de los metales pesados a nivel histológico y registró diversas patologías en el hígado, además procesos inflamatorios y necrosis celular. Por otro lado, en los pulmones se encontraron daños como neumoconiosis, procesos inflamatorios e hiperplasia septal adematosa.

En la Península de Yucatán, la utilización de plaguicidas se incrementó a partir de la reordenación henequera (1984-1987), lo cual provocó la diversificación de su uso a partir de la variedad de cultivos que se han implementado en la región, principalmente mediante la utilización de OC y OF para el cultivo de la papaya y sandía. Dichos plaguicidas son aplicados por los agricultores de manera inadecuada, sin equipos de protección y con dosis excesivas. Sin embargo, son pocos los registros sobre el uso y sus efectos en la región (Cobos-Gasca *et al.*, 2011). Al respecto, se han realizados algunos trabajos en donde se documentan los daños ocasionados en fauna silvestre por el uso de plaguicidas. La gran mayoría de estas investigaciones reportan la presencia y efectos de diversos plaguicidas en organismos que habitan ambientes acuáticos (Buenfil-

Rojas *et al.*, 2014; Charruau *et al.*, 2013 Morales-Rodríguez y Cobos-Gasca 2005; Rendón-von Osten, 2005; Rendón-von Osten *et al.*, 2009).

En ambientes terrestres son pocos los trabajos realizados, y se han llevado a cabo principalmente en aves, midiendo los niveles de actividad de colinesterasas en sangre, en organismos capturados en zonas próximas a cultivos de papaya (Pérez-Cabrera, 2003; Cobos *et al.*, 2006). Asimismo, son pocos los estudios que reporten el daño generado por presencia de plaguicidas en pequeños mamíferos. Por ejemplo, Vargas-Contreras *et al.*, (2012), detectaron varios plaguicidas OCs presentes en el guano (excremento de murciélago) depositado en la cueva “El Volcán de los Murciélagos”, la cual está dentro de la Reserva de la Biosfera de Calakmul. Concluyen que las concentraciones encontradas pueden no afectar la salud de los murciélagos de forma inmediata, sin embargo, pueden repercutir a largo plazo, por ejemplo, en la reproducción y la estabilidad de las poblaciones que perchan en la cueva.

Finalmente, en el Estado de Quintana Roo, los trabajos para identificar los impactos de diversos contaminantes se centran en las zonas cercanas a las costas y en cuerpos de agua. Se enfocan principalmente en la presencia de los contaminantes en matrices ambientales como sedimentos o bien en organismos y sus productos como cocodrilos o en sus huevos (Álvarez- Legorreta, 2001; Charruau *et al.*, 2013). Son más escasos los trabajos en los que se utilizan herramientas como los biomarcadores para valorar la exposición y efecto de contaminantes. Particularmente Buenfil (2014), utilizó metalotioneinas (MTs) para evaluar la exposición a metales pesados en cocodrilos de pantano (*Crocodylus moreletii*) que habitan en el río Hondo, cerca de la bahía de Chetumal. Reportó que los cocodrilos del río Hondo están acumulando metales pesados

tales como cadmio y mercurio. Además, los análisis de MTs en plasma sanguíneo, sugiere que existe una exposición reciente, principalmente al cadmio.

La zona maya de Quintana Roo, comprende principalmente los municipios de José María Morelos y Felipe Carrillo Puerto, está ubicada en el centro de la Península de Yucatán y posee amplias zonas de conservación. Sus principales actividades económicas son la ganadería y la agricultura y es de llamar la atención que las zonas de cultivo se encuentran colindantes a áreas protegidas, particularmente al Área de Protección de Flora y Fauna de *Bala'an Ka'ax* (APFFBK). Esta área forma parte del corredor biológico que se conecta con la Reserva de la Biosfera de Calakmul, y alberga diversas especies que son prioritarias para la conservación (CONANP, 2007).

En esta región los cultivos más importantes son los de temporal como el maíz, el frijol, calabaza y los cítricos (base de la alimentación). Asimismo, en los últimos años se han diversificado los cultivos, con fines productivos para su comercialización, estos son más extensos, con utilización de maquinaria y sistemas tecnificados de riego (SAGARPA, 2015a). En ellos además, se emplean paquetes tecnológicos basados en el uso de agroquímicos, particularmente en cultivos como la papaya y la sandía (SAGARPA, 2015a), principalmente en algunas comunidades del municipio de José María Morelos, como *Xnoh cruz* (colindante con el APFFBK) o Puerto Arturo. En este sentido, ambas zonas comparten fauna silvestre, particularmente pequeños mamíferos y aves que tienen mayor movilidad y pueden desplazarse entre ambas regiones. Sin embargo, a pesar de lo antes mencionado, es alarmante que sea prácticamente nula la información sobre los riesgos potenciales en salud humana, ambiental y conservación de la biodiversidad, generados a partir de las prácticas agrícolas la región.

Atendiendo a esta situación se identificó el siguiente **problema**:

En la Península de Yucatán, hay pocos trabajos que investiguen la influencia de los plaguicidas usados en sus cultivos. Particularmente en la zona maya de Quintana Roo, las actividades agrícolas tecnificadas han aumentado y se utilizan mayores extensiones de terreno, por lo que se deforestan amplias extensiones de selva y se acercan cada vez más a las áreas de conservación. Aunado a lo anterior, se están implementando más paquetes tecnológicos y mayor diversidad de agroquímicos sintéticos. En este sentido, no se ha tomado en cuenta la toxicidad producida por los plaguicidas en el ambiente; particularmente el suelo (medio sobre el cual se vierten los diversos agroquímicos) retiene algunos plaguicidas, los cuales pueden estar en contacto con la fauna silvestre que entra en contacto con él.

Asimismo, los compuestos tóxicos (dependiendo de su persistencia) pueden migrar a zonas aledañas al punto donde fueron aplicados, alcanzando accidentalmente a la fauna silvestre. Particularmente en esta región pueden llegar al APFFBK, dentro de la cual no se han realizado investigaciones para determinar presencia o efectos de compuestos tóxicos. Estos efectos de los plaguicidas en la fauna silvestre que cohabita esta región son desconocidos, el establecer estatus de salud y situaciones de riesgo para estos organismos son necesarios para posibles planes de manejo.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la creciente utilización de plaguicidas sintéticos en la zona maya de Quintana Roo derivado del aumento en la superficie de campos agrícolas; se hace necesaria la generación de información de los impactos que pueden estar provocando en

el ambiente y en la fauna silvestre. En este sentido, debido a de la carencia de trabajos que describan sus efectos ecológicos en la región, la presente investigación busca documentar la presencia de residuos de plaguicidas y su inherente toxicidad en campos de diversos usos agrícolas así como en la zona de protección de flora y fauna de Bala'an Ka'ax. A través de especies bioindicadoras se pretenden establecer posibles escenarios de riesgo por exposición en fauna silvestre. Asimismo, busca contribuir al conocimiento de los daños ecológicos generados por el uso de estos compuestos en áreas próximas a zonas de conservación. Esta información puede cooperar para la implementación de posibles medidas para la evaluación de riesgos ambientales por contaminación en la zona maya, con el fin de hacer propuestas para la regulación y uso de plaguicidas en la región.

HIPÓTESIS

En los cultivos tecnificados del municipio de José María Morelos, Quintana Roo se utilizan una gran variedad de agroquímicos, principalmente plaguicidas organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretorides; los cuales son aplicados de forma intensiva en el suelo durante las diferentes fases del proceso de cultivo. La utilización de estos compuestos provoca toxicidad edáfica, la cual alcanzará a diversas especies que habitan esta matriz ambiental. Asimismo, a partir de la migración de los plaguicidas, llegarán a zonas aledañas entrando en contacto con fauna silvestre que habita en los ecosistemas forestales. Por lo que, derivado de la exposición accidental, se altera la actividad de diversas enzimas (biomarcadores) involucradas en procesos del sistema nervioso (inhibición de Acetilcolinesterasa), metabolismo de desintoxicación (activación de Glutación-S-transferasa) y antioxidantes (activación de Catalasa) en los organismos

expuestos, especialmente en animales que se alimentan en la cercanía de estas zonas. Entre los taxa bioindicadoras se encuentran las lombrices de tierra, los ratones y los murciélagos fruteros, por lo que:

(H1) Se encontrarán plaguicidas en los suelos agrícolas, lo que genera toxicidad edáfica, la cual está caracterizada por la alteración en la actividad de los BM en las lombrices de tierra expuestas a muestras de suelo agrícola en comparación con muestras de suelo de zonas conservadas.

(H2) Durante la temporada de aplicación de plaguicidas, los BM evaluados en ratones y murciélagos expuestos, se encontrarán alterados de su actividad basal, la cual es registrada en la temporada de no aplicación (efecto a escala temporal). Es decir, la acetilcolinesterasa (AChE) estará inhibida, la Glutación-S-transferasa (GST) estará activada al igual que la catalasa (CAT).

(H3) En los campos agrícolas se encuentran depositados en el ambiente mayor concentración de plaguicidas en comparación a las zonas forestales y de conservación. Por lo tanto, en los animales capturados en las comunidades agrícolas presentarán inhibición de la AChE y activación de la GST y CAT en comparación con los organismos capturados en la zona de conservación (efecto a escala espacial).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de plaguicidas en suelos agrícolas y de conservación de la zona maya, particularmente en el municipio de José María Morelos. Asimismo, caracterizar el efecto a su exposición, mediante la evaluación de BM en organismos

bioindicadores (lombrices de tierra, ratones y murciélagos), in situ dentro de campos de cultivo de José María Morelos, Quintana Roo el APFFBK.

Objetivos particulares

- i) Diagnosticar ambientalmente la presencia de residuos de plaguicidas en suelos de diversos campos agrícolas de la región. Asimismo, empleando experimentalmente lombrices de tierra (*Eisenia fetida*) como bioindicadores de la toxicidad del suelo, a través de bioensayos en condiciones controladas (Capítulo II).
- ii) Evaluar el efecto (a escala temporal) de la exposición a plaguicidas a nivel de suelo, empleando ratones silvestres capturados en las zonas agrícolas como bioindicadores. A través de contrastar la actividad de BM en individuos de la especie *Mus musculus* entre temporadas climáticas (Capítulo III).
- iii) Evaluar la exposición a residuos de plaguicidas a escala espacio-temporal, utilizando murciélagos como bioindicadores. Analizando la actividad de BM en murciélagos fruteros del género *Artibeus* comparando individuos capturados en una zona agrícola y en la APFFBK (evaluación espacial), asimismo comparando entre temporadas climáticas (evaluación temporal, capítulo IV).

METODOS GENERALES

Localidades de estudio. El periodo de muestreo abarcó del mes de febrero de 2015 a abril de 2016. Las localidades de estudio se encuentran en el municipio de José

María Morelos, en el estado de Quintana Roo, entre los 19°47'13"N y 88°51'41"W y aproximadamente a 31 msnm. El clima es cálido-subhúmedo, con lluvias en verano, con una temperatura promedio anual de 25.9°C y una precipitación pluvial de 1268 mm. El tipo de vegetación predominante es el bosque tropical perenniifolio y subcaducifolio (Miranda y Hernández, 1963).

La primera zona de muestreo (área de exposición) se encuentra en la comunidad agrícola de *Xnoh Cruz* (19°35'24.70"N y 89°10'51.20"W). Cuenta con 169 habitantes, quienes se dedican a la producción de cultivos tecnificados principalmente de sandía y otros de temporal como maíz, calabaza y jícama (INEGI, 2018). En sus campos utilizan paquetes tecnológicos con base en la utilización de diversos agroquímicos. Las zonas de cultivo son amplias y se encuentran rodeadas de grandes extensiones de selva mediana subcaducifolia, las cuales albergan fauna silvestre que puede entrar en contacto con los plaguicidas utilizados. La segunda zona de muestreo (área conservada), se encuentra en los márgenes del APFFBK, en las coordenadas 19°29'2.00"N y 89°02'7.40"). Se localiza aproximadamente a 20 km, al sureste de la zona de aplicación de plaguicidas. Los tipos de vegetación predominantes son la selva mediana subperennifolia, selva mediana subcaducifolia y selva baja subperennifolia. Asimismo, el APFFBK se encuentra bajo protección federal decretado en el año de 2005 (SEMARNAT, 2007), (Fig. 1).

Especies bioindicadoras. Se determinó utilizar tres grupos de bioincadores. En una primera instancia para determinar la toxicidad edáfica se utilizaron lombrices de tierra de la especie *Eisenia fetida*, la cual es un organismo ampliamente utilizado en estudios toxicológicos en bioensayos bajo condiciones controladas, principalmente debido al

amplio conocimiento fisiológico de la especie, además de su rápida respuesta a la exposición a contaminantes (Feng *et al.*, 2015; OECD, 1984).

Por otro lado, para evaluar la exposición de fauna silvestre, se eligieron, ratones y murciélagos. Para los ratones se escogieron individuos adultos de la especie *Mus musculus*, debido a que posterior a los muestreos prospectivos fue la especie más abundante, aunado a que fue capturada en ambas estaciones climáticas y no estar en ninguna categoría de riesgo (NOM-059-SEMARNAT, 2010), de hecho es considerada una plaga para los campos de cultivo. En el caso de los murciélagos se analizaron con un solo género a individuos de las especies *A. lituratus* y *A. jamaicensis*, debido al éxito de muestreo y a que posterior al análisis de biomarcadores no presentaban diferencias entre especies (son parte del mismo gremio alimenticio). Asimismo, no se encuentran bajo ninguna categoría de riesgo de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT 2010 y son habituales en las zonas de muestreo dentro de las cuales se alimentan.

Muestras de suelo. La colecta de suelos se realizó durante el mes de junio de 2015. Se colectaron 10 muestras de suelo, nueve de sitios de cultivos de diferentes especies vegetales y una muestra procedente APFFBK, bajo la expectativa de este sitio sea utilizado para determinar niveles bajos de plaguicidas al no ser un suelo de cultivo. Los muestreos se realizaron previo acuerdo y permiso con los dueños de las parcelas de cultivo. Cada muestra consistió en un kilogramo de suelo superficial, la cual se empacó en papel aluminio para evitar el contacto con otro tipo de contaminantes. Se conservaron en refrigeración hasta su traslado al laboratorio en donde se almacenaron en congelación (-4°C) y en oscuridad para evitar la acción microbiana y la degradación de la materia orgánica y de los plaguicidas.

Muestras biológicas. Las lombrices de tierra se obtuvieron del cultivo del Instituto Tecnológico de Chiná (ITC) y fueron mantenidas en el laboratorio del Instituto de Ecología, Pesquerías y Oceanografía del Golfo de México (EPOMEX) con el mismo sustrato y el mismo alimento, se eligieron únicamente individuos adultos aproximadamente de la misma envergadura y con desarrollo del clitelo. Los ratones se capturaron utilizando trampas Sherman® cebadas con hojuelas de avena con vainilla (Jones *et al.*, 1996), colocadas cada cinco metros a ambos lados a lo largo de un transecto de 125 metros (Burnham *et al.*, 1985), durante una noche.

La captura de los murciélagos se realizó mediante la utilización de tres redes de niebla (6 x 3 metros) por cada noche de muestreo (Selem-Salas *et al.*, 2004). El tiempo de muestreo abarcó de las 19:00 a las 01:00 hrs (6 horas de muestreo), las redes se revisaron cada 30 minutos para la colecta de los individuos capturados. En ambos sitios de captura, las redes fueron colocadas en zonas de paso y alimentación de los murciélagos. Tanto ratones y murciélagos fueron identificados mediante la utilización de guías de campo, tomando medias morfométricas convencionales (Kunz *et al.*, 1996; Romero-Almaraz *et al.* 2000). Finalmente fueron sacrificados in situ, mediante dislocación cervical de acuerdo a la NOM-033-ZOO- 1995, que estipula el sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Se diseccionaron y colectaron muestras de cerebro, hígado, y músculo esquelético para los análisis posteriores. Los tejidos se conservaron en nitrógeno líquido, se transportaron al laboratorio y se almacenaron a -80°C.

Trabajo de laboratorio. El trabajo de laboratorio se abordó de acuerdo a cada uno de los objetivos trazados en la tesis, asimismo, cada uno de los métodos utilizados se encuentran a detalle en cada uno de los capítulos del presente trabajo. Exclusivamente

para el capítulo uno, se realizaron análisis de características del suelo (Textura, materia orgánica y pH). También se realizó una determinación de presencia de plaguicidas y finalmente un bioensayo de exposición con lombrices de tierra para determinar la toxicidad de los suelos muestreados según la técnica descrita por Alejo *et al.*, (2012). En el capítulo dos, se realizó la determinación de plaguicidas en tejido hepático de los ratones muestreados y finalmente para los tres capítulos se realizaron evaluaciones de BM (AChE, GST y CAT) en cada uno de los bioindicadores seleccionados.

La textura del suelo fue determinada de acuerdo al método de hidrómetro de Bouyoucos (1962), obteniendo los porcentajes de arena, arcilla y limo, para clasificar el tipo de suelo con ayuda del triángulo de texturas. El pH se determinó de acuerdo al método AS-02 de la NOM-021-RECNAT 2000. Finalmente el contenido de materia orgánica (MO) se determinó de acuerdo a la NOM-021-RECNAT 2000 a través del cálculo del carbón orgánico mediante la técnica de titulación de Gaudette *et al.*, (1994). La determinación de plaguicidas tanto en suelo (capítulo dos) como en tejido hepático (capítulo tres), se realizó de acuerdo a una modificación del método de microondas de Wang *et al.*, (2010). En ambos casos la determinación se hizo mediante la utilización de mezclas de 24 plaguicidas OC y 8 plaguicidas OF a través de una cromatografía de gases.

Finalmente en los tres BI se evaluaron las actividades de los tres BM, a través de microensayos. La AChE se evaluó de acuerdo al método descrito por Ellman *et al.* (1961) adaptado a microplaca por Guilhermino *et al.* (1996). Expresando la actividad como nmol de acetilcolina hidrolizados por minuto por miligramo de proteína. La GST se determinó por el método de Habig *et al.* (1974), la actividad se expresó como nmol de S-(2,4-

dinitrofenil) glutatión generados por minuto por miligramo de proteína. Y finalmente la actividad de la CAT se calculó midiendo la disminución H_2O_2 mediante el método de Aebi (1984), la actividad fue expresada como nmol de peróxido generados por minuto por miligramo de proteína.

Análisis estadísticos. Todos los análisis fueron realizados con el programa estadístico R versión 3.2.4 (R Core Team, 2016). Los paquetes de software fueron específicos para cada análisis. Las pruebas estadísticas se describen a detalle en cada capítulo, sin embargo, en cada uno de ellos se determinó su estadística descriptiva, así como pruebas de normalidad para establecer las pruebas a seguir, ya sea paramétricas o no paramétricas (Zar, 2007).

LITERATURA CITADA

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105:121–126.

Albers, P. H., G. Linder and J. D. Nichols. 1990. Effects of tillage practices and carbofuran exposure on small mammals. *Journal of Wildlife Management*. 54(1):135-142.

Albert, L.A. 2005. Panorama de los plaguicidas en México. *Revista de Toxicología en línea* 8:1–17.

Albert, L.A., y J. A. Benítez. 2005. Impacto ambiental de los plaguicidas en los ecosistemas costeros. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 p.

- Amaral, T. S.; T. F. Carvalho; M. C. Silva; L. S. Goulart; M. S. Barros; M. C. Picanço y M. B. Freitas.** 2012. Metabolic and histopathological alterations in the fruit-eating bat *Artibeus lituratus* induced by the organophosphorous pesticide fenthion. *Acta Chiropterologica*, 14(1): 225-232.
- Andrade Herrera, M.** 2011. Evaluación del efecto de la contaminación atmosférica en dos especies del género *Peromyscus* (Rodentia: Muridae) que cohabitan el Parque Nacional Desierto de los Leones. TESIS DE MAESTRÍA. D.F., México.
- Badii, M.H., Hernández, S., Guerrero, S.** 2009. Efecto de los plaguicidas en pequeños mamíferos: Implicaciones de sustentabilidad. *CULCyT: Cultura Científica y Tecnológica*, ISSN-e 2007-0411. 6(30):5–16.
- Bayat S., F. Geiser, P. Kristiansen y S. C. Wilson.** 2014. Organic contaminants in bats: Trends and new issues. *Environmental International*. 63:40-52.
- Berny, P.** 2007. Pesticide and the intoxication of wild animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 30:93-100.
- Bickham, J. W.; S. Sandhu; P. D. N. Hebert; L. Chikhi y R. Athwal.** 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: Implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research*. 463:33-51.
- Bouyoucos, G.J.** 1962. Hydrometer Method Improved for Making Particle Size Analyses of Soils. *Agronomy Journal* 54:464.
- Buenfil Rojas A. M., T. Álvarez Legorreta y J. R. Cedeño Vázquez.** 2014. Metals and metallothioneins in morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) from a transboundary

river between México and Belize. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 1-9

Burger, J.; C. Fossi; P. McClellan-Green y E. D. Orlando. 2007. Methodologies, bioindicators, and biomarkers for assessing gender-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals. Environmental Research. 104:135-152.

Burnham, K. P., D. R. Anderson y J. L. Laake. 1985. Efficiency and bias in strip and line transect sampling. The journal of Wildlife Management. 49(4):1012-1018.

Charruau P., Y. Hénaut y T. Álvarez Legorreta. 2013. Organochlorine pesticides in nest substratum and infertile eggs of American crocodiles (Reptilia, Cricodylidae) in Mexican Caribbean atoll. Caribbean Journal of Science. 47(1):1-12.

Chanda, S. M., S. R. Mortensen, V. C. Moser, and S. Padilla. 1997. Tissue-Specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an in Vitro and in Vivo comparison. Fundamental and Applied Toxicology. 38:148-157

Chang, M.; J. R. Burgess; R. W. Scholz y C. C. Reddy. 1990. The induction of specific rat liver Glutathione S-Transferase subunits under inadequate selenium nutrition causes an increase in prostaglandin F₂α formation. The Journal of Biological Chemistry. 265(10):5418-5423.

Clark, D. R.; A. Moreno-Valdez; M. A. Mora. 1995. Organochlorine residues in bat guano from nine Mexican caves, 1991. Ecotoxicology. 4(4):258-265.

Cobos Gasca, V., M. Mora y G. Escalona. 2006. Inhibición de la colinesterasa plasmática en el zorzal pardo (*Turdus grayi*) expuesto al diazinón en cultivos de

papaya maradol en Yucatán, México. *Revista de toxicología*. 23:17-21.

Cobos Gasca, V. M.; R. Barrientos Medina y C. Chi Novelo. 2011. Los plaguicidas y su impacto sobre la fauna silvestre de la Península de Yucatán. *Bioagrocencias*. 4(2):4-9.

CONANP. 2007. Programa de manejo del Área de Protección de Flora y Fauna de Bala'an k'aax, 1a ed. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, México, D.F.

Crocker, D. R. 2005. Estimating the exposure of birds and mammals to pesticides in long-term risk assessments. *Ecotoxicology*. 14:833-851.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.J., Featherstone, R.M. 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology* 7:88–95.

Fairbrother, A. 1994. Inmunotoxicology of captive and wild birds. En R. J. Kendall y T. H. Lacher, Jr. (Eds). *Wild Life Toxicology and population modeling. A Special Publication of SETAC, CRC Press, Inc, Florida, 251-261*

Feng, L., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, P., Jiang, H. 2015. Inhibition and recovery of biomarkers of earthworm *Eisenia fetida* after exposure to thiacloprid. *Environmental Science and Pollution Research* 22:9475–9482.

Foget P. M., y T. Milleron. 1991. Evidence for secondary seed dispersal by rodents in Panama. *Oecologia*. 87:596-599.

Fritch, C.; R. P. Cosson; M Coeurdassier; F. Raoul, P. Giraudoux, N. Crini, A. de

- Vaufleury, R. Scheifler.** 2010. Responses of wild small mammals to pollution gradient: Host factors influence metal and metallothionein levels. *Environmental Pollution*. 158:827-840.
- Gaudette, H.E., Flight, W.R., Toner, L., Folger, D.W.** 1994. An Inexpensive Titration Method for the Determination of Organic Carbon in Recent Sediments. *Journal of Sedimentary Research* 44:249–253.
- Geluso, K. N.; J. S. Altenbach y D. E. Wilson.** 1976. Bat mortality: Pesticides poisoning and migratory stress. *Science*, 194(4261):184-186.
- Gómez-Ugalde, R. M.** 2003. Efectos de la contaminación atmosférica en poblaciones de pequeños roedores silvestres (*Microtus mexicanus*, *Peromyscus melanotis* y *Peromyscus difficilis*) en México, D. F. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona. Barcelona, España. 409 pp.
- Guilhermino, L., Lopes, M.C., Carvalho, A.P., Soared, A.M.V.M.** 1996. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia Magna*. *Chemosphere* 32:727–738.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B.** 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* 249:7130–7139.
- Hermoso de Mendoza García, M.; F. Soler Rodríguez y M. Pérez López.** 2008. Los mamíferos salvajes terrestres como bioindicadores: nuevos avances en Ecotoxicología. *Observatorio Medioambiental*. 11:37-62.

Hoffman, D. J.; B. A. Rattner; G. A. Burton Jr., y J. Cairns Jr. 2003. Handbook of Ecotoxicology. Lewis Publishers. 755 pp. Jones, C., W. J. McShea, M. J. Conroy and T. H. Kunz. 1996. Capturing mammals. Chap. 8, pp. 115-155, En: Wilson, D. E., F. R. Cole, J. D. Nichols, R. Rudran y M. S. Foster, (Eds). Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Mammals. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C.

INEGI. 2014. Anuario Estadístico y Geográfico de Quintana Roo 2013. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México.

INEGI. 2018. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI. URL <http://www.beta.inegi.org.mx/default.html> (consultado 5.11.18).

Kannan, K., S. H. Yun, R. J. Rudd, M. Behr. 2010. High concentrations of persistent organic pollutants including PCBs, DDT, PBDEs and PFOS in little brown bats with white-nose syndrome in New York, USA. Chemosphere. 80:613-618.

Karam, M. A.; G. Ramírez; L. P. Bustamante-Montes y J. M. Galván. 2004. Plaguicidas y salud de la población. Ciencia Ergo Sum. 1(11): 246-254.

Köhler, H.-R., Triebkorn, R. 2013. Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? Science 341:759–765.

Kolf-Clauw, M., A. Génin y M. Pérez López. 2007. Micromamíferos y metales pesados: Biomonitorización del medio ambiente. Observatorio medioambiental. 10:19-37.

Kunz, T. H., C. Wemmer y V. Hayssen. 1996. Sex, age, and reproduction. Pp. 279-290 In: DonE. Wilson, F. Russell Cole, James D. Nichols, Rasanayagam Rudran, and

Mercedes S. Foster (Eds.) Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Mammals. Smithsonian Institution Press. Washington and London.

Luckens, M. M., y W. H. Davis. 1964. Bats: Sensivity to DDT. Science. 146(3646):948

Mangan, S. A. y G. H. Adler. 2002. Seasonal dispersal of arbuscular mycorrhizal fungi by spiny rats in a neotropical forest. Oecological, 31(4):587-597.

Marcheselli, M.; L. Sala y M. Mauri. 2010. Bioaccumulation of PGEs of other traffic-related metals in populations of the small mammal *Apodemus sylvaticus*. Chemosphere. 80:1247-1254.

Marques, C. C.; S. I. Gabriel; T. Pinheiro; A. M. Viegas-Crespo; M. L. Mathias y M. J. Bebianno. 2008. Metallothionein levels in Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to elemental pollution: An ecophysiological approach. Chemosphere. 71:1340-1347.

Martínez-Valenzuela, C. y S. Gómez-Arroyo. 2007. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 23(4):185-200.

Miranda, F. y E. Hernández X. 1963. Los tipos de vegetación de México y su clasificación. Bol. Soc. Bot. Mex. 29:1-179.

Morales Rodríguez M., y V. Cobos Gasca. 2005. DDT y derivados en huevo de la tortuga de carey *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766), en las costas del estado de Campeche, México, p. 237-248. En: Botello, A. V., J. Rendón von Osten, G, Gold Bouchot y C. Agraz Hernández (Eds.) Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. 2da., Edición. UACAM, UNAM, INE. 696p

- Nam, T.-H., Kim, L., Jeon, H.-J., Kim, K., Ok, Y.-S., Choi, S.-D., Lee, S.-E.** 2017. Biomarkers indicate mixture toxicities of fluorene and phenanthrene with endosulfan toward earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Geochemistry and Health* 39:307–317.
- NOM-021-RECNAT.** 2000. Norma Oficial Mexicana 021 Establece las especificaciones de fertilidad , salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreos y análisis. Diario Oficial de la Federación. México.
- NOM-033-ZOO.** 1995. Norma Oficial Mexicana 033 Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Diario Oficial de la Federación, Mexico.
- NOM-059-SEMARNAT.** 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059, Protección ambiental- Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo, Diario Oficial de la Federación.
- OECD.** 1984. Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing.
- Olson, L. J., R. D. Hinsdill.** 1984. Influence of feeding chlorocholine chloride and glyphosine on selected immune parameters in deer mice, *Peromyscus maniculatus*. *Toxicology*. 30(2): 103-114.
- Paoletti, M.G.** 1999. Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74:1–18.
- Peakall, D.B.** 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1).

Introduction. *Ecotoxicology* 3:157–160.

Pelosi, C., Barot, S., Capowiez, Y., Hedde, M., Vandenbulcke, F. 2014. Pesticides and earthworms. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 34:199–228.

Pérez Cabrera, S. I. 2003. Comparación de los niveles de colinesterasa en aves paserines expuestas a plaguicidas organofosforados en la unidad hortícola Santa Cruz Pachón de Mutul con respecto a las de la reserva ecológica Cuxtal en Yucatán, México. TESIS DE LICENCIATURA. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UADY.49.

R Core Team, 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.r-project.org/>

Ramírez, J.A., Lacasaña, M. 2001. Plaguicidas: Clasificación, Uso, Toxicología Y Medición De La Exposición. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales* 4:67–75.

RAP-AL. 2018. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina [WWW Document]. URL <https://rap-al.org/> (consultado 5.10.18).

Rattner, B.A. 2009. History of wildlife toxicology. *Ecotoxicology* 18:773–783.

Rendón von Osten, J. 2005. Uso de biomarcadores en ecosistemas acuáticos. En: Botello, A. V., J. Rendón von Osten, G, Gold Bouchot y C. Agraz Hernández (Eds.) *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. 2da., Edición. UACAM, UNAM, INE. 696p.

Rendón von Osten, J., A. M. V. M. Soares y L. Guilhermino. 2009. Black-Bellied whistling duck (*Dendrocygna autumnalis*) brain cholinesterase characterization and

diagnosis of anticholinesterase pesticide exposure in wild populations from Mexico. *Environmental Toxicology*. 24(2):313-317.

Restrepo, I. 1988. *Naturaleza muerta_los plaguicidas en Mexico.pdf*. *Ciencias* 13:40–50.

Romero-Almaraz, M. L., C. Sánchez-Hernández, C. García-Estrada y R. D. Owen. 2000. *Mamíferos pequeños: manual de técnicas de captura, preparación, preservación y estudio*. UNAM-UAEM. México, 151.

SAGARPA. 2015. *Avance e producción agrícola con tecnificación del riego en Quintana Roo*. Chetumal, Quintana Roo.

Selem Salas, C. I., J. Sosa Escalante y S. Hernández Betancourt. 2004. *Aves y mamíferos*, en: Bautista Zuñiga, F., H. Delfín González, J. L. Palacio Prieto y M. C. Delgado Carranza (Eds). *Técnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales*. 1ra., Edición. UNAM, UADY, CONACYT, INE. 507p.

SEMARNAT. 2007. *Programa de conservación y manejo Área de protección de flora y fauna Bala'an K'aax*, 1a ed. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, México, D. F.

Sheffield, S.R., Sawicka-Kapusta, K., Cohen, J.B., Rattner, B.A. 2001. *Rodentia and lagomorpha*, en: Shore, R, F., Rattner, B.A. (Eds.), *Ecotoxicology of Wild Mammals*. John Wiley & Sons Ltd., New York, pp. 215–314.

Stahlschmidt, P., y C. A. Brühl. 2012. *Bats at risk? Bat activity and insecticide residue analysis of food items in an apple orchard*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31(7):1556-1563.

- Stepić, S., Hackenberger, B.K., Velki, M., Hackenberger, D.K., Lončarić, Ž.** 2013. Potentiation Effect of Metolachlor on Toxicity of Organochlorine and Organophosphate Insecticides in Earthworm *Eisenia andrei*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91:55–61.
- Sullivan, T. P., C. Novotny, R. A. Lautenschlager and R. G. Wagner.** 1998. Silvicultural use of herbicide in sub-boreal spruce forest: Implications for small mammal population dynamics. *Journal of Wildlife Management*. 62(4):1196-1206.
- Swanepoel, R. E.; P. A. Racey; R. F. Shore y J. R. Speakman.** 1999. Energetic effects of sublethal exposure to lindane on pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus*). *Environmental pollution* 104: 169-177.
- Talmage, S. S. y B. T. Walton.** 1991. Small mammals as monitors of environmental contaminants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 119:47-145.
- Timur, S.; S. Önal; N. Ü. Karabay; F. Sayim y F. Zihnioğlu.** 2003. In vivo effects of malathion on glutathione-S-transferase and acetylcholinesterase activities in tissues of neonatal rats. *Turkish Journal of Zoology*, 27(3).
- UNEP.** 2014. United Nations Environment Programme. www.unep.org
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E.** 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57–149.
- Van Gestel, C. A. M., y T. C. Van Brummelen.** 1996. Incorporation of the biomarker

concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*. 5(4),217-225.

van Straalen, N. M., y Krivolutsky, D. A. 1996. Bioindicator systems for soil pollution.

Kluwer Academic Publishers. Netherland. 265pp.

Vargas Contreras, J., G. Escalona Segura, J. Arroyo Cabrales, J. Rendón von Osten

y L. Navarro. 2012. Conservación de murciélagos en Campeche. *THERYA*. 3(1):5-

12.

Velki, M., y Ečimović, S. 2016. Important Issues in Ecotoxicological Investigations Using

Earthworms, en: de Voogt, P. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and*

Toxicology. Springer, Cham, pp.157–184.

Wang, P., Zhang, Q., Wang, Y., Wang, T., Li, X., Ding, L., Jiang, G. 2010. Evaluation

of Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction and microwave-assisted

extraction for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated

diphenyl ethers in soil and fish samples. *Analytica Chimica Acta* 663:43–48.

Westlake, G. E., A. D. Martin, P. I. Stanley, y C. H. Walker. 1983. Control enzyme levels

in the plasma, brain and liver from wild birds and mammals in Britain. *Comparative*

Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 76(1), 15-24.

Zar, J. H. 2007. *Biostatistical analysis*. 5a Ed. Prentice-Hall, Inc. 662 pp.

Capítulo 2.

Presence of pesticides and toxicity assessment of agricultural soils in the Quintana Roo Mayan zone, Mexico using biomarkers in earthworms (*Eisenia fetida*).

Artículo sometido a la revista: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, con número de asignación EES-18-594.



Presence of pesticides and toxicity assessment of agricultural soils in the Quintana Roo Mayan zone, Mexico using biomarkers in earthworms (*Eisenia fetida*)

Moises Andrade-Herrera^a, Griselda Escalona-Segura^a, Mauricio González-Jáuregui^b,
Ángel Rafael Reyna-Hurtado^a, Jorge A. Vargas-Contreras^c, Jaime Rendón-von Osten^{d*}

^aEl Colegio de la Frontera Sur. Unidad Campeche. Avenida Rancho Polígono 2-A, Ciudad Industrial, C.P. 24500. Lerma, San Francisco de Campeche, Campeche, México.

^bInstituto de Ecología. Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, Xalapa 91070, Veracruz, México.

^cFacultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Campeche. Avenida Agustín Melgar S/N entre calle 20 y Juan de la Barrera, col. Buenavista, C. P. 24039. San Francisco de Campeche, Campeche, México.

^dCentro EPOMEX. Universidad Autónoma de Campeche.

*Corresponding Author.

Abstract

Agriculture intensification and use of pesticides for pest control have led to biodiversity loss due to soil toxic compounds. Thus, soil contamination studies are important in order to understand the negative effects of the physicochemical interactions. The uses of biomarkers through bioindicators are useful tools for assessing toxicity in agricultural environments complemented by the determination of the presence of pesticides. The objectives of this study were to determine the presence of organochlorine (OCPs) and organophosphate (OPPs) pesticides and the soil's potential toxicity from agricultural fields with different crops from central Quintana Roo State, using a set of enzymatic biomarkers, namely acetylcholinesterase (AChE), glutathione-S-Transferase (GST) and catalase (CAT) on earthworms (*Eisenia fetida*). During the study, earthworms were exposed for 96 hours on nine different agricultural soils as well as on a reference soil from a conservation area. In all samples soils only OCPs were detected in low concentrations (ranged from

undetected to 1.40 ppm). However, no correlation was found between these pesticides and the activity of the analyzed biomarkers. AChE and CAT activity were significantly inhibited in at least one agricultural soil compared to the conservation area; whereas GST showed no significant differences. The AChE activity suggests the presence of anticholinergic substances in the sampled soils that were neither detected nor determined analytically. The characterization of oxidative stress BMs were not correlated with the OCPs analyzed. Our results demonstrated the necessity of conducting additional toxicity studies under field conditions, given the complexity of environmental conditions outside the laboratory.

Keywords: Biomarkers, Earthworms, *Eisenia fetida*, Inhibition, OCPs, Soil Toxicity.

Introduction.

The need of more efficient harvest in agricultural crops have required the implementation of technological packages, these technologies include the use of pesticides for pest control that threatens crops (Givaudan et al., 2014; Ortíz et al., 2014). A pesticide is "any substance or combination of substances intended for preventing, destroying or controlling any pest, i.e., unwanted plant or animal species which affect or otherwise interfere with the production of food, agricultural products or wood" (FAO, 2006). However, these toxic compounds also affect non target species through excessive use and therefore, increasing harmful pest resistance to these compounds (Restrepo, 1988; Velki y Hackenberger, 2013a).

Agriculture intensification often leads to habitat and biodiversity loss, mainly through land use change and pesticides (Hole et al. 2005), however the effects of these pesticides on different taxa on soil fauna are not well known (Pelosi *et al.* 2014). Currently soil pollution has gained greater relevance (Feng *et al.* 2015). The soil is an extremely complex environment in which different types of physico-chemical interactions occur that can alter absorption and bioavailability of compounds by an organism which inhabits this environment (Yang et al. 2012). To this effect, measurements of soil toxicity analysis, with bioindicator organisms that are sensitive and responsive to changes caused by xenobiotics agents are used (Paoletti, 1999).

In this sense, soil earthworms are naturally exposed to the soil solid and aqueous phases, therefore they are directly in contact with pesticides, thus have been considered and used as a suitable bioindicator of disturbances or contamination of the soil (Feng *et al.*, 2015; O'Halloran, 2006; Schreck *et al.*, 2012; Velki y Hackenberger, 2013a; Yang *et al.*, 2012).

In fact, mortality and/or reproduction of the Californian red worm (*Eisenia fetida*), are parameters evaluated under controlled laboratory conditions to determine the effects of pesticides, prior to their release to the market (Pelosi *et al.*, 2014).

Biochemical biomarkers are tools that indicate adverse effects on organisms in short term, can also predict possible long-term damage, allowing actions of prevention and to avoid irreversible effects in the environment (Shugart *et al.*, 1992). In this sense, they help to assess the toxicity of pesticides in bioindicators organisms beyond conventional toxicity tests (Peakall 1994; Yang *et al.* 2012; Velki & Hackenberger 2013). Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme used as an indicator of neurotoxicity, particularly determining its concentration based on the magnitude of enzymatic inhibition by exposure to organophosphorus and carbamates pesticides (Rodríguez-Castellanos y Sanchez-Hernandez, 2007). It is known that exposure to various pesticides promotes the formation of reactive oxygen species (ROS), the detoxification activity characterization and oxidative stress generated from exposure to contaminants present in soils are taken as effect biomarkers, which involves two enzymes in these processes, Glutathione S-transferase (GST, xenobiotics biotransformation phase II) and Catalase (CAT, oxidative stress) (van der Oost *et al.*, 2003).

The biomarkers (BM) use and the soil exogenous compounds determination can be very useful to evaluate the effect of pesticides in natural environments. The interaction between pollutants and environment is a toxicity determining factor of pesticides in living organisms; However, few field studies have been conducted, Mainly dose-response trials are performed under controlled laboratory conditions (Feng *et al.*, 2015; Stepíc *et al.*, 2013; Velki y Hackenberger, 2013b; Yang *et al.*, 2012).

According to FAO (2017a), in Mexico the use of synthetic pesticides have been increasing, since 2013 it was reported more than 100 tons of active ingredients used, mainly herbicides and insecticides. In this regard, during the last year in the State of Quintana Roo technified agricultural activities have intensified (SAGARPA, 2015b). Specifically in the Mayan areas, within the municipality of Jose Maria Morelos, agriculture under irrigation system increased from 1,200 ha in 2007 to 2,616 ha in 2014, growing mainly pumpkin, grain corn, maradol papaya, cucumber and watermelon (SAGARPA, 2015b).

Nevertheless, generally in the Yucatan Peninsula, there are few studies dealing with soil toxicity and their consequences on the environment, most studies relate to the determination of pollutants residues, or effects on streams and water bodies (Metcalf et al., 2011; Rodríguez Polanco et al., 2015). Particularly in the State of Quintana Roo, information regarding the toxic effect on soil from different pesticides used in agriculture areas are practically non-existent; therefore, the objectives of this study was to determine the presence of pesticides and the potential toxicity in soils from agricultural fields with different crops from central Quintana Roo State. This was done by bioassays evaluating biomarkers in earthworm (*Eisenia fetida*) exposed to soil samples collected. Likewise the presence and concentration of organochlorine (OCPs) and organophosphate (OPPs) pesticides in agricultural soil samples were also determined to correlate the possible influence of these contaminants in the toxicity.

Materials and Methods.

2.1 Soil samples

The soil samples were carried out within the Maya Zone of Quintana Roo, in the municipality of José María Morelos during the month of June 2015. Ten soil samples were collected, nine from sites under different crops: three corn, two papaya, two watermelon, one lemon, one jicama, and one sample in the *Bala'an Ka'ax* Flora and Fauna Protected area as a control site from the Flora and Fauna Protection Area Bala'an Ka'ax (APFFBK), under the expectation that this site could be used to determine low levels of pesticides as a non crop soil (Table 1, figure 1). Samples were collected with proper agreement and permission from agricultural land owners.

Each soil sample consisted of one kilogram of superficial soil, packed in aluminum foil to prevent contact with another type of contaminants. They were stored under refrigeration until transported to the laboratory where it was stored and frozen (-4°C) in darkness to prevent microbial actions, organic matter and contaminants degradation.

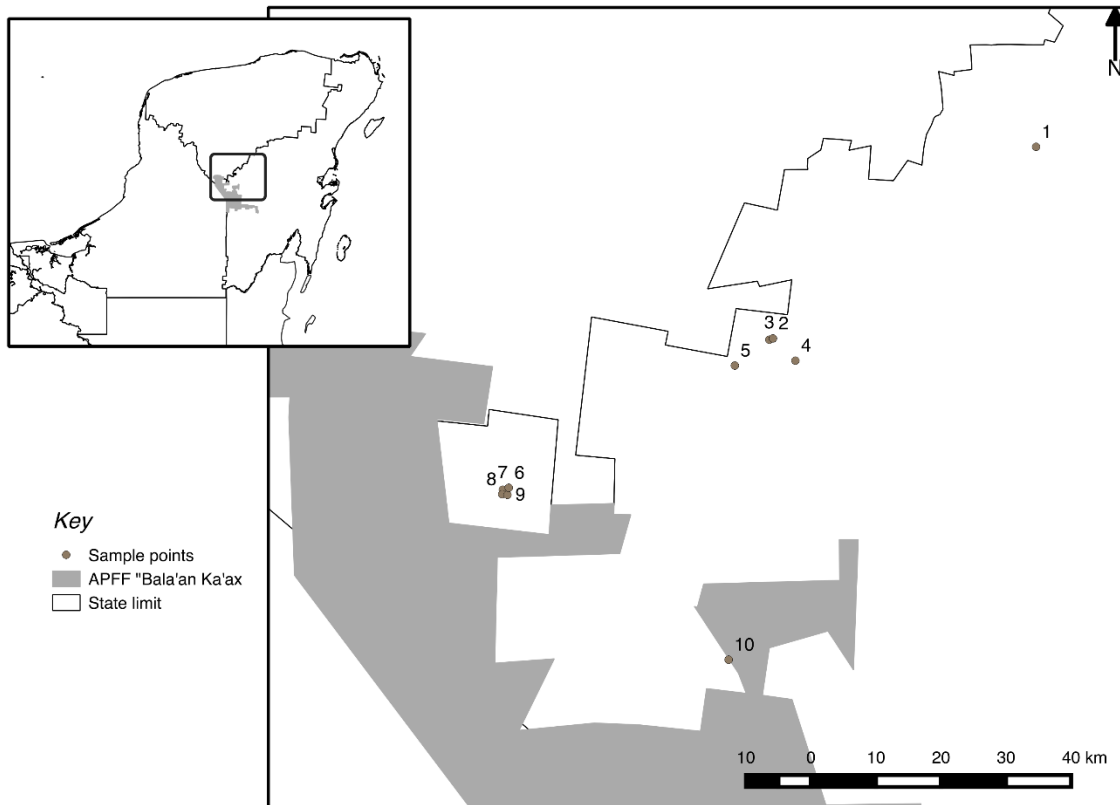


Figure 1. Sampling area located in the State of Quintana Roo, México, where the sampled sites and the APFFBK are observed

2.2 Texture, pH. and Organic matter soil determination.

The soil texture was determined according to the hydrometer method of Bouyoucos (1962). 50 g of soil sample was taken and shook for 15 mins with 30 ml of a mixture of sodium oxalate, sodium metasilicate and sodium hexametaphosphate. Likewise, distilled water was added until the solution was brought to a volume of 1 liter. The mixture and readings were taken with hydrometer at 40 sec and two hours, the temperature was also taken with a digital thermometer (FLUKE 62MAX+) for subsequent calculations of the percentage of silt, clay and sand with the triangle of textures. The pH was determined according to the AS-02 method belonging to NOM-021-RECNAT-2000. Reference buffer

solutions, pH 4, 7 and 10 were used for potentiometer calibration (HANNA Instruments® HI 2223). Initially, 10 g of soil is taken with 15 ml of distilled water, was stirred at intervals of 5 mins for 30 mins, then reposed 15 mins and the readings are carried out with the potentiometer already stabilized.

The organic matter (OM) was determined by the titration method of Gaudette *et al.* (1994). 0.2 g of the soil sample was taken and added with 5 ml of a 1N solution of potassium dichromate and mixed with 10 ml of concentrated sulfuric acid; after 30 mins the sample is diluted with 100 ml of distilled water, added 5 ml of phosphoric acid, a pinch of sodium fluoride and 7 diphenylamine indicator drops. Finally titrated with ferrous sulfate solution until reaching a bright green color. This method determines organic carbon percentage (OC), the OM is calculated multiplying CA percentage by 1,724, considering that 58% of the soil organic matter is carbon (NOM-021-RECNAT, 2000).

2.3 Pesticide determination

Soils samples were dehydrated to 45°C during 24 hours, then spread for analysis. Only high purity grade (98% HPLC) solvents were used. The glass material was washed with Extran®, dried for 4 hours at 200 °C and rinsed with acetone and hexane. Five grams of pulverized sample were used and placed in Teflon-coated tubes with 50 ml of a mixture of hexane and dichloromethane (1: 1), then extracted by microwave for 10 mins. Samples were run through filter paper with 15 ml of acetone, 15 ml of dichloromethane and 15 ml of hexane.

Subsequently, the samples were filtered on a glass column packed with silica gel, glass wool and sodium sulfate. To prepare the column acetone, dichloromethane and hexane

(15 ml of each solvent and in that order) were added. The glass was first rinsed with 20 ml of acetone, then 20 ml of a dichloromethane-hexane mixture (1: 1) and finally 20 ml of dichloromethane evaporated to dryness and re-suspended in 500 µl of hexane for analysis by gas chromatography; the pesticides were quantified using a Varian 3800 gas chromatograph equipped with a Ni63 electron capture detector (SGE Analytical Science, USA). The temperature of the injector and detector were 150 and 300 °C respectively. The contaminants concentration was obtained by calculating the area under the curve with the software Star Chromatography Workstation version 6 and the calibration standards. A battery of OCPs and OFPs was used to identify and quantify pesticides. The OCPs analyzed were HCHs (α , β , γ , δ), aldrin, dieldrin, endrin, endrin aldehyde, endrin ketone, endosulfan (α , β and sulfate), DDTs (ppDDE, ppDDD, ppDDT), chlordanes Gamma), methoxychlor, heptachlor and epoxide heptachlor (SUPELCO® 47426-U CLP Organochlorine pesticide Mix). Likewise the OFPs analyzed were azinphos-methyl, chlorpyrifos, dichlorvos, disulfoton, ethoprophos, fenchlorfos, parathion-methyl and prothiofos (SUPELCO® Organophosphorous pesticide Mix A).

2.4 Soil preparation for exposure

Soil sample humidity was determined as well as the amount of water required to reach the 70% humidity required for the experimental exposure of earthworms according to OECD (1984) method described. Plastic trays with the cover were prepared with 500 gr of each soil sample to avoid excessive humidity loss.

2.5 Bioassay

Adult worms of the species *Eisenia fetida* were used, which were obtained from commercial crops and kept in the laboratory with the same food and vermiculture substrate from which they were obtained. Worms were removed from the substrate and deposited in Petri dishes with filter paper and distilled water for 1 hour for the disposal of their stomach contents. Ten worms were placed on each tray (one tray per soil sample) and exposed for 96 hours. After the time span, the worms were extracted, washed and placed in cryovials (Corning®) for its preservation in ultra-freezing (-80 ° C).

Three enzyme biomarkers, acetylcholinesterase (AChE), glutathione-S-transferase (GST) and catalase (CAT) were analyzed. For the biomarkers analysis all samples were homogenized during 20 seconds, using a homogenizer (PRO Scientific 250®), with the buffer solution specific for each biomarker (BM) according to the method used. AChE activity was determined according to Ellman et al., (1961), adapted to microplate (Guilhermino *et al.*, 1996), the samples were prepared with an of 0.1 M potassium phosphate buffer solution, pH 7.2. The kinetic enzymatic was registered to the wavelength of 414 nm and expressed in nmol of acetylcholine hydrolyzed by a minute per protein mg and using an absorption coefficient of $13.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

The GST determination activity was performed according to the method described by Habig et al., (1974), a 0.1 M potassium phosphate buffer solution, pH 6.5 was used for the preparation of the samples, determining the kinetic enzymatic to a wavelength of 340 nm, expressing the activity as nmol of S- (2,4-dinitrophenyl) glutathione generated by minute by protein milligram and an absorption coefficient of $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was used. The CAT activity was measured with the decrease of H₂O₂ at 240 nm by the method of (Aebi,

1984), using a potassium phosphate buffer solution 50 mM pH 7, expressing the activity as nmol of peroxide generated per minute per protein milligram. Protein concentration was determined by the Bradford (1976) at 595 nm and expressed as mg/ml. Enzymatic activities of all BM and protein analyzes was determined using microplates (Corning®) in a spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan Spectrum).

2.6 Statistical Analysis

To determine if the different types of culture generated a different toxicological response in earthworms, linear models (LM) were used using as response variable the activity of each of the biomarkers and the predictive variable crop field/type. When at least on field/type of culture presented significant difference with the null model, a post hoc test was applied for vectors contrast to determine which fields/types of soil were different. Spearman correlations and a principal component analysis (PCA) were also performed to explore possible correlations between pollutants with soil physicochemical properties (pH, MO and % sand, clay and silt) and with the activity of the biomarkers evaluated in earthworms in each agricultural soils.

Prior to the analysis it was verified if the assumptions of the test, such as the homoscedasticity of variances and normality of the residuals were met. All analyzes were performed using software R version 3.2.4 (R Core Team, 2016) with the gmodels package 2.16.2 (Warnes et al., 2005) for linear model analyzes and the NADA 1.6-1 package (Lopaka, 2013) and vegan (Oksanen *et al.*, 2017) for the realization of correlations and PCA.

Results and Discussion

In the present study, concentrations of pesticides OPPs and OCPs in agricultural soils of Quintana Roo and analysis of three biomarkers of effect on earthworms (*E. fetida*) exposed to samples of these soils with different crops and management are reported simultaneously. The 10 soil samples correspond to nine different crops and a reference soil from a conservation area. According to their texture (% of clay, sand and silt) four types of soil were characterized, four were clay loam, four clay, one silty clay loam and one sandy clay. The percentage of organic matter fluctuated between 1.7 and 3%, which is normal values for farming lands and tropical areas (FAO, 2017b). Also found the soils are slightly alkaline, obtaining pH values between 7.3 and 8.1 (Table 1).

The PCA generated 5 principal components with eigenvalues >1 explaining 77.2% of the total variance in the data. The first and second components explain together 49.5% of the variability of the data. A positive correlation pattern is observed between component 1 with Heptachlor, Drines and Chlordans and negative with sand. The second component had a positive correlation with silt and negative with the clay (Fig 2).

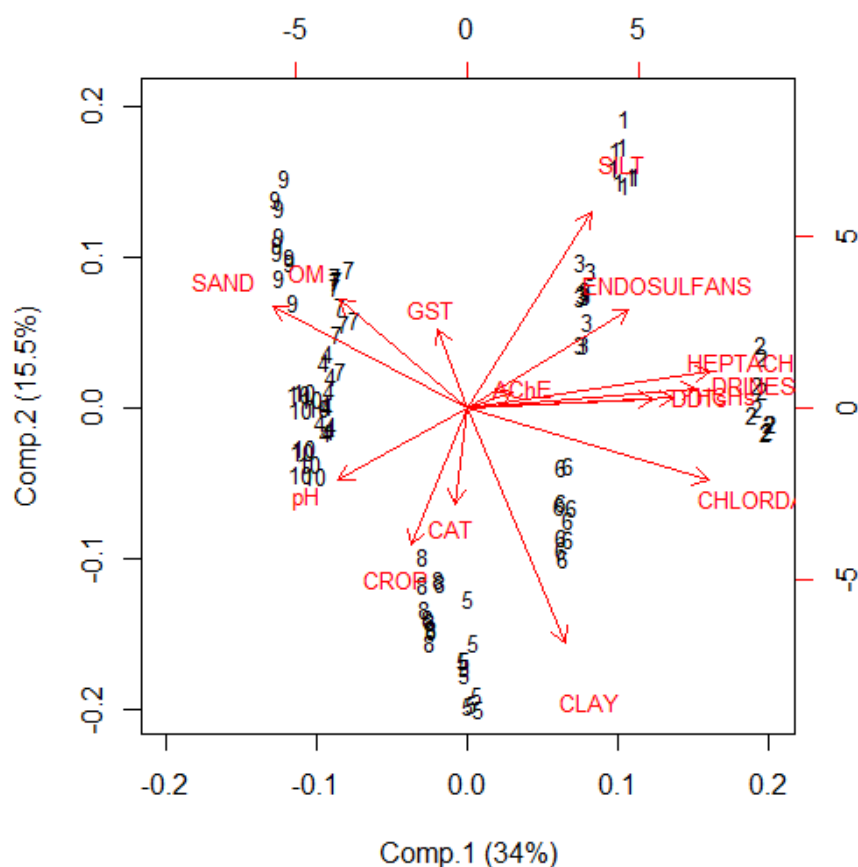


Figure 2. Results of the principal component analysis of the two dominant components, produced by the biomarkers (AChE, GST and CAT), OCPs and the physicochemical parameters, are plotted. Black data represent individuals (worms) per soil.

In this regard, previous studies suggest that a high content of silt and MO causes a greater stability of the pollutants in soil and therefore greater accumulation in the environment, this is because the molecules of OCPs have a high tendency to bind to the organic carbon in soil (Aiyesanmi y Idowu, 2012; Leal Soto *et al.*, 2014). Also, little variability is observed among the worms of each group (soil), therefore individual variability was not a factor in the results.

Table 1. Soils samples in the José María Morelos municipality, Quintana Roo, the type of crop, name of the rural community to which they belong as well as the physicochemical characteristics of soils (texture, OM and pH) is show. The weight is expressed in grams.

ID	Crop	Community	Code	Dry weight	% soil moisture	Texture	% OM	pH
1	Corn	Santa Gertrudis	MSG	2.8221	19	clay loam	2.1429	7.8
2	Papaya	Candelaria	PCA	2.888	19	clay	1.7143	7.3
3	Lime	Candelaria	LCA	2.8673	19	silty clay loam	2.0714	7.6
4	Watermelon	Puerto Arturo	SPA	2.5671	31	sandy clay	3.0714	7.9
5	Papaya	Puerto Arturo	PPA	2.5991	34	clay	2.0714	8
6	Corn	X Noh Cruz	MXC	2.9143	18	clay	1.8571	7.9
7	Jícama	X Noh Cruz	JXC	2.9089	19	clay loam	1.9286	7.7
8	Watermelon	X Noh Cruz	SXC	2.921	13	clay	1.7857	7.6
9	Corm	X Noh Cruz	MAX	2.6222	31	clay loam	3.0000	7.7
10	Conservation soil	APFF <i>Bala'an Ka'ax</i>	BKA	2.7594	24	clay loam	2.0000	8.1

Presence of pesticides OCPs and OPPs were determined. However, only OCPs were reported because in all samples analyzed no OPPs were detected, possibly by the physico-chemical characteristics of this pesticides (Mínguez-Alarcón et al., 2014), their low persistence and soil characteristics of the Yucatan Peninsula, which causes low adsorption of this type of pesticides and present greater mobility, making it difficult to determine them (Lorenzo-Flores et al., 2017). Concentrations of OCPs found in agricultural soils ranged from undetected (ND) to 1.40 ppm (*ppDDD*), in general low concentrations were recorded relative to soil allowable limit determined by the EPA, (1990). Aldrin was detected in all soil samples analyzed, while endrin was the least registered pesticide (only in 3 soils), both pesticides are banned for use in México (COFEPRIS, 2017). Likewise, *ppDDD* and epoxide heptachlor were also found in nine of the 10 samples (Table 2).

Table 2. Mean and standard deviation (parenthesis) of BM activity in each soil samples; below shows the concentration of OCPs in each of the soils analyzed. The BMs activity is expressed as nMol/min/mg protein and the concentration of OCPs in ppm. ND= non detected.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AChE	31.014 (12.3)	45.333 (9.68)	43.317 (11.4)	42.044 (10.4)	36.475 (8.91)	38.220 (8.06)	25.858 (14.2)	22.918 (13.4)	40.642 (16.4)	43.118 (10.8)
GST	36.612 (18.0)	28.233 (16.3)	26.801 (11.7)	40.303 (17.0)	26.705 (15.2)	32.073 (13.5)	35.835 (12.9)	21.890 (15.0)	29.403 (12.2)	35.105 (20.1)
CAT	14.837 (8.26)	16.768 (4.78)	13.559 (4.80)	19.837 (9.30)	25.425 (10.6)	14.341 (6.52)	13.809 (6.15)	13.818 (2.46)	18.074 (12.6)	18.435 (7.20)
α -HCH	0.061	0.126	ND	ND	0.018	0.015	ND	0.018	ND	0.008
β -HCH	0.055	0.194	ND	0.011	ND	0.023	ND	ND	ND	ND
γ -HCH	0.026	0.023	0.011	ND	ND	ND	ND	0.008	ND	ND
δ -HCH	0.028	0.014	0.009	ND	ND	ND	0.004	0.004	ND	ND
ALD	0.340	0.262	0.252	0.222	0.212	0.169	0.197	0.152	0.134	0.152
DIEL	0.036	0.236	0.007	ND	ND	0.012	ND	ND	ND	ND
END	0.058	0.615	ND	ND	ND	0.028	ND	ND	ND	ND
END-ALD	0.028	0.351	0.025	0.012	0.043	0.017	0.019	ND	ND	ND
END-KET	0.055	0.480	0.015	ND	0.017	ND	ND	ND	ND	ND
END I (α)	0.047	0.206	0.017	ND	0.007	0.027	0.022	0.035	ND	ND
END II (β)	0.132	0.846	0.049	0.038	0.050	0.052	0.036	ND	ND	ND
END SULF	0.028	0.348	0.007	0.010	0.013	0.010	ND	ND	ND	ND
<i>pp</i> DDE	0.114	0.386	0.020	0.012	0.066	0.021	0.007	ND	ND	ND
<i>pp</i> DDD	0.286	1.403	0.091	0.076	0.067	0.041	0.026	0.024	ND	0.034
<i>pp</i> DDT	0.047	0.166	0.032	0.060	0.011	ND	ND	ND	0.005	0.014
TRANS CHLOR	0.029	0.081	0.008	0.007	0.008	0.012	ND	ND	ND	0.008
CIS CHLOR	0.072	0.355	0.021	ND	0.028	0.050	0.012	ND	0.012	0.016
METHOX	0.134	1.353	0.034	0.046	0.060	0.054	0.037	0.018	ND	ND
HEPTCL	0.053	0.146	0.022	0.017	0.015	0.024	ND	0.009	ND	0.008
HEP EPOX	0.044	0.041	0.030	0.030	0.011	0.024	0.020	0.024	0.023	ND

The results found in the present study are consistent with other studies where OCPs are determined in agricultural soils, with low concentrations of pesticides (Harner *et al.*, 1999;

Nawab *et al.*, 2003). However, they differ with other studies conducted in agricultural fields in Mexico, where concentrations (ppm) exceed those found in the present study (Cantu-Soto *et al.*, 2011; Sánchez-Osorio *et al.*, 2017). The agricultural soils with the highest number of pesticides were 1 (MSG, maize) and 2 (PCA, papaya) where it was detected all analyzed OCPs (20 OCPs). The highest pesticide concentrations were in soil 2, i.e., concentrations of 1.40 ppm ppDDD and 1.35 ppm methoxychlor were detected. The soil with the lowest number of OCPs was nine (MAX, maize) where only aldrin, epoxide heptachlor, cis chlordane and *pp*DDT were found; Had even fewer pesticides than the sample taken in the ZPFFBK conservation area with 7 pesticides found (Table 2).

It is noteworthy that although low concentrations of banned and restricted OCPs were found in practically all samples analyzed. In this regard, low concentrations (0.047 to 0.207 ppm) of DDT derivatives were found in most of the analyzed samples, which coincides with what was found in other agricultural fields of the country, such as Chiapas, that were 0.001 to 0.349 ppm (Martínez-Salinas *et al.*, 2011) being a pesticide banned in Mexico since 1999. Anyway, their presence in agricultural fields and their proximity to water wells and urban areas represents a risk situation for the human population. Other prohibited pesticides were heptachlor, dieldrin, endrin (used as rodenticide) and chlordane which is also used as an insecticide (Torres Romero, 2007). Lindano (γ -HCH) was registered only in 4 soil samples and have very low concentrations. This compound is still allowed in Mexico for the control of lice in the human population (Cantu-Soto *et al.*, 2011).

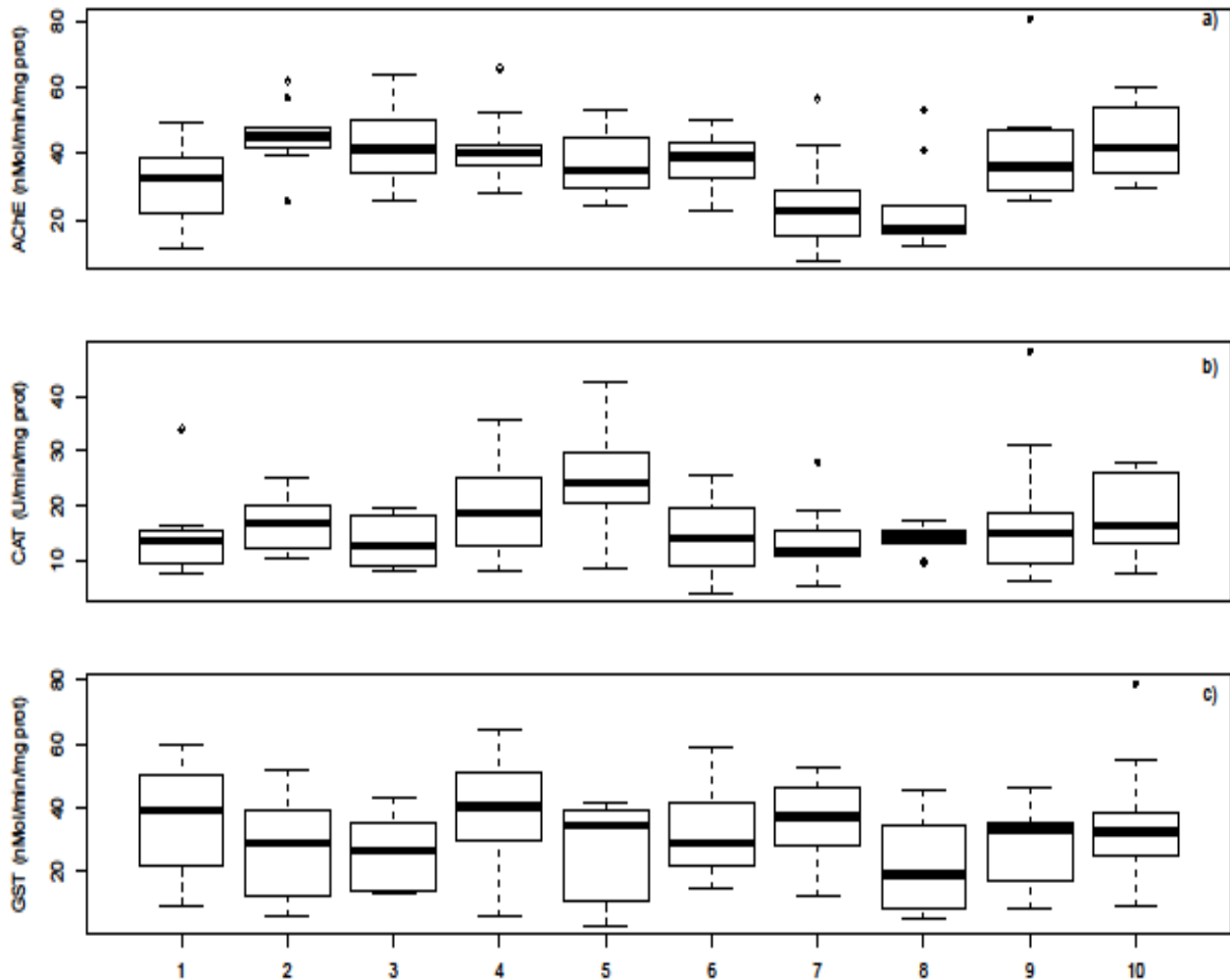


Figure 3. BM activity in soil earthworms (*E. fetida*) exposed to agriculture soils. AChE (a), CAT (b) and GST (c). The results are expressed as means in the quartile (box) and SD, the circles express extremes values in the analysis.

The activity mean as well as the standard deviations of the biomarkers (AChE, GST, CAT) are summarized in Table 2 and Figure 3. In the present study, only 98 worms were evaluated after 96 hours of exposure because at 48 hours two individuals on soil 1 died. Significant differences were found in AChE activity between soils ($F_{(9,88)} = 4.314$ $P < 0.001$). The highest cholinergic activity, was found in sample two (45.33 nMol/min/mg) and three (43.31 nMol/min/mg), which are papaya and lemon respectively, both in the agricultural community of Candelaria and in soil 10 (43.11 nMol/min/mg) corresponding to APFFBK, free area of agricultural activities. Conversely, the lowest activity was recorded in soil 8

(22.91 nMol/min/mg) and 7 (25.85 nMol/min/mg), watermelon and jicama cultivations respectively, both from the X noh Cruz community. The difference in activity represents a 50% of cholinergic activity inhibition, being the soil 8 earthworms the most affected in relation to the rest of the soils (Fig 3 and Table 5). Finally, soil conservation (soil 10) only showed significant differences in relation to soils 1, 7 and 8, where cholinergic activity was inhibited 30, 40 and 50%, respectively.

The results are consistent with other studies carried out under laboratory conditions, in which earthworms were exposed to various concentrations of anticholinergic pesticides (Chakra Reddy y Venkateswara Rao, 2008; Hackenberger *et al.*, 2008; Jordaan *et al.*, 2012; Rault *et al.*, 2008; Velki y Hackenberger, 2013b), i.e., (Velki y Hackenberger, 2013a), recorded more than 60% inhibition of AChE activity in *E. fetida* individuals exposed to high concentrations of dimethoate (OPP). Therefore, the magnitudes of cholinergic inhibition found in the watermelon and jicama soils of X noh Cruz suggest the presence of anticholinergic pesticides in these soils.

The highest activity of AChE occurred in soils with the highest frequency of OCPs as well as concentrations, however, these BM was not negatively correlated with any of the detected OCPs (Table 4). The AChE is inhibited in the presence of OPPs and carbamates (Rodríguez-Castellanos y Sanchez-Hernandez, 2007), in this sense, although not detected in the analysis, farmers reported the use of carbamates, neonicotinoids and pyrroles as insecticides and acaricides; also, empty containers of these pesticides were found inside agricultural fields. In addition, the magnitudes of cholinergic inhibition found in the watermelon and jicama soils of the X noh Cruz community suggest the presence of anticholinergic pesticides in these cultures. AChE Inhibition is considered the most

sensitive way to determine the use of OPPs and carbamates. However, OPPs were probably not detected in their medium persistence, since their half-lives range from days up to 12 weeks (COFEPRIS, 2017), and carbamate pesticides were not determined analytically and could be present in the soils analyzed.

Exposure to various types of pesticides can cause oxidative stress in organisms either by excessive free radical production or by altering the activity of the enzymes involved in defense mechanisms (Stepić *et al.*, 2013). GST makes the exogenous compounds more polar conjugating the tripeptide glutathione to facilitate its excretion avoiding situations of oxidative stress (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009a; Yang *et al.*, 2012). In the present work, GST activity did not show significant differences between the soils analyzed ($F_{(9,88)}=1.33$ $P>0.05$), finding a maximum value of 40.30 nMol/min/mg in the soil 4, and a minimum of 21.89 nMol/min/mg in soil 8, a similar trend to found in AChE. In addition to this, no significant correlations of GST were found with any of the OCPs analyzed (Table 4), possibly due to the low concentrations (below 0.5 ppm) found in soils analyzed as well as the exposure period. In previous works, increases in GST activity occurred at concentrations above 90 ppm and within one week of exposure (Hans *et al.*, 1993; Nam *et al.*, 2017; Stepić *et al.*, 2013), However, there are few references to the effect of OCPs on GST.

The CAT activity in the exposed organisms had an average activity of 16.93 nMol/min/mg, with a maximum of 25.42 nMol/min/mg (soil 5) and a minimum of 13.56 nMol / min / mg in soil 3; where it was found greater activity than that reported by other studies (3-11 U/min/mg) by using the same species for toxicological studies on exposures under controlled laboratory conditions to various pesticides (Feng *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). CAT activity showed significant differences between soils ($F_{(9,88)}=$

2.29 $P < 0.05$), particularly soil 5 (highest activity) with all soils with the exception of 4 (Table 5). Likewise, did not correlate significantly with any detected OCPs. Although the activity of CAT tends to increase in the presence of various pesticides to maintain adequate levels of ROS, the enzyme can be inhibited in the presence of neonicotinoids (Du *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014). In this sense, soils 8 and 7 presented the lowest BM activities in the bioassay, these samples belong to the community of X noh Cruz, where peasants report using mixtures of pesticides (mainly neonicotinoids, carbamates and endosulfan) for the Production of watermelon, the main cultivation technified community, so that could be the reason for the low activity of CAT. However, changes in toxicity can also be induced by masking the toxic effect of a single pesticide, due that this interaction may exert antagonistic, additive or synergistic effects (Stepić *et al.*, 2013).

Table 4. Spearman correlations between OCP concentrations and physicochemical characteristics with BM activity in earthworms. The values in bold represent the significance of $p \leq 0.05$.

	AChE	GST	CAT
α -HCH	0.648	0.249	0.499
β -HCH	0.093	0.242	0.940
γ -HCH	0.908	0.363	0.157
δ -HCH	0.385	0.565	0.057
ALDRIN	0.275	0.447	0.971
DIELDRIN	0.057	0.961	0.285
ENDRIN	0.224	0.724	0.619
ENDRIN ALDEHIDE	0.270	0.951	0.386
ENDRIN KETONE	0.117	0.557	0.347
ENDOSULFAN I (α)	0.122	0.397	0.136
ENDOSULFAN II (β)	0.091	0.674	0.647
ENDOSULFAN SULFATE	0.038	0.600	0.130
ppDDE	0.104	0.754	0.392
ppDDD	0.001	0.400	0.462
ppDDT	0.001	0.394	0.535
TRANS CHLORDANE	0.004	0.711	0.379
CIS CHLORDANE	0.048	0.923	0.723
METHOXYCHLOR	0.531	0.524	0.329
HEPTACHLOR	0.026	0.988	0.983
HEPTACHLOR EPOXIDE	0.273	0.756	0.135
pH	0.569	0.160	0.047
% MO	0.412	0.127	0.506

In order to achieve reproducibility, most of the toxicity work on earthworms are carried out under controlled laboratory conditions (Olvera-Velona *et al.*, 2008; Rodríguez-Castellanos y Sanchez-Hernandez, 2007). However, BM responses may be influenced by other factors such as the physicochemical characteristics of the soil, in addition to exposure to xenobiotic agents. In the present work, CAT was positively correlated with pH, which could mean that alkalization of the soil can lead to the production of ERO in exposed earthworms (Table 4). The complex characteristics of each site to be evaluated necessitate the implementation of *in situ* bioassays, due to the influence of soil properties and the nature

of each pollutant, i.e., the bioavailability of the xenobiotic. In our analysis, the presence of various OCPs was significantly correlated with conditions such as pH, OM, and percentages of sand, clay and silt (Table 4, Fig. 2). So it's important to make toxicological bioassays in field conditions, and evaluate the toxicity in the most real possible conditions.

Table 5. *Post hoc* contrast vector test. Comparison of BM activity (AChE and CAT) among the soils analyzed $t_{(98, 0.05)}$. Significant differences $p \leq 0.05$ are represented by an asterisk right to the statistical value. The superior portion corresponds to AChE and the lower part to CAT. Soils are represented by numbers.

		Acetilcholinesterase									
SUELOS		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Catalase	1		0.012 *	0.030 *	0.051	0.330	0.200	0.358	0.150	0.088	0.032 *
	2	0.602		0.702	0.533	0.096	0.180	<0.001 *	<0.001 *	0.375	0.675
	3	0.73	0.359		0.809	0.197	0.335	0.001 *	<0.001 *	0.612	0.969
	3	0.179	0.380	0.075		0.293	0.469	0.002 *	<0.001 *	0.790	0.838
	4	0.005 *	0.014 *	<0.001 *	0.112		0.741	0.046 *	0.011 *	0.430	0.21
	5	0.893	0.487	0.822	0.118	0.002 *		0.741	0.004 *	0.646	0.354
	6	0.781	0.398	0.942	0.087	0.001 *	0.002 *		0.578	0.006 *	0.001 *
	7	0.783	0.399	0.940	0.087	0.001 *	0.880	0.087		0.001 *	<0.001 *
	8	0.383	0.708	0.198	0.614	0.037 *	0.287	0.224	0.225		0.639
	BKA	0.332	0.633	0.165	0.688	0.047 *	0.243	0.187	0.188	0.917	

Conclusions

The present work provides the first information on the concentration of organochlorine pesticides in agricultural soils of Quintana Roo, Mexico and the first toxic effects evaluated through the expression of BM stress indicators in earthworms exposed to soil samples. Low concentrations of pesticides were detected in all analyzed samples. Likewise, residues of pesticides banned in the country were found, which confirms the persistence

and its recent use. OCPs were detected in the soil of the conservation area, which is at risk because of the proximity to the agricultural communities.

The characterization of BMs of oxidative stress was not correlated with OCPs, possibly due to the low pesticides concentrations in soil. However, the activity of these BMs may be influenced by the presence of other stressing compounds, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of pyrogenic origin, derived from burnings in traditional agricultural processes (slash, grave and burning). AChE was found to be inhibited in several soils, suggesting the presence of anticholinergic compounds that were not detected. In general, the soil with the lowest activity of the three BMs was soil 8, which is a watermelon crop of the X noh Cruz community, where the technified agricultural activity is intense. Finally, more studies are recommended to determine the presence of contaminants, as well as to determine the soil toxicity in this region of the country, which is of great importance in biodiversity and culture.

Acknowledgments

The authors are grateful to the farmers who kindly allowed to take soil samples from their plots, as well as share information on their agricultural practices, particularly Fausto Pacheco, for their support and collaboration. Also to M. C. Wilbert Evan Martinez for his contribution in the translation of the document. Finally to CONACYT which provided the doctoral scholarship for the realization of this work.

References

- Aebi, H.**, 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105, 121–126.
- Aiyesanmi, A.F., Idowu, G.A.**, 2012. Organochlorine Pesticides Residues in Soil of Cocoa Farms in Ondo State Central District, Nigeria. *Environment and Natural Resources Research* 2, 65–73.
- Bouyoucos, G.J.**, 1962. Hydrometer Method Improved for Making Particle Size Analyses of Soils. *Agronomy Journal* 54, 464.
- Bradford, M.M.**, 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 72, 248–254.
- Cantu-Soto, E.U., Meza-Montenegro, M.M., Valenzuela-Quintanar, A.I., Félix-Fuentes, A., Grajeda-Cota, P., Balderas-Cortes, J.J., Osorio-Rosas, C.L., Acuña-García, G., Aguilar-Apodaca, M.G.**, 2011. Residues of organochlorine pesticides in soils from the southern Sonora, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 87, 556–560.
- Chakra Reddy, N., Venkateswara Rao, J.**, 2008. Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 574–582.
- COFEPRIS**, 2017. Catálogo de Plaguicidas. Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios. URL [http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas y Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx](http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas_y_Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx) (consultado 8.15.17).

Du, L., Li, G., Liu, M., Li, Y., Yin, S., Zhao, J., 2015. Biomarker responses in earthworms (*Eisenia fetida*) to soils contaminated with di-n-butyl phthalates. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 4660–4669.

EPA, 1990. Resource conservation and recovery act 55 FR 30789.27. EUA.

FAO, 2017a. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [WWW Document]. FAOSTAT, uso de plaguicidas. URL <http://faostat3.fao.org/browse/R/RP/S> (consultado 3.14.17).

FAO, 2017b. Conservation of natural resources for sustainable Agriculture [WWW Document]. Training modules - Land and Water Digital Media Series 27Rev.1. URL <http://www.fao.org/ag/ca/CD27Rev.1English.html> (consultado 8.12.17).

FAO, 2006. Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/3/a-a0220s.pdf>

Feng, L., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, P., Jiang, H., 2015. Inhibition and recovery of biomarkers of earthworm *Eisenia fetida* after exposure to thiacloprid. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 9475–9482.

Gaudette, H.E., Flight, W.R., Toner, L., Folger, D.W., 1994. An Inexpensive Titration Method for the Determination of Organic Carbon in Recent Sediments. *Journal of Sedimentary Research* 44, 249–253.

Givaudan, N., Binet, F., Le Bot, B., Wiegand, C., 2014. Earthworm tolerance to residual agricultural pesticide contamination : Field and experimental assessment of detoxification capabilities. *Environmental Pollution* 192, 9–18.

- Guilhermino, L., Lopes, M.C., Carvalho, A.P., Soared, A.M.V.M.,** 1996. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia Magna*. *Chemosphere* 32, 727–738.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B.,** 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* 249, 7130–7139.
- Hackenberger, B.K., Jaric-Perkusik, D., Stepic, S.,** 2008. Effect of temephos on cholinesterase activity in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 583–589.
- Hans, R.K., Khan, M.A., Farooq, M., Beg, M.U.,** 1993. Glutathione-S-transferase activity in an earthworm (*Pheretima posthuma*) exposed to three insecticides. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 509–511.
- Harner, T., Wideman, J.L., Jantunen, L.M.M., Bidleman, T.F., Parkhurst, W.J.,** 1999. Residues of organochlorine pesticides in Alabama soils. *Environmental Pollution* 106, 323–332.
- Jordaan, M.S., Reinecke, S.A., Reinecke, A.J.,** 2012. Acute and sublethal effects of sequential exposure to the pesticide azinphos-methyl on juvenile earthworms (*Eisenia andrei*). *Ecotoxicology* 21, 649–661.
- Leal Soto, D.S., Valenzuela Quintanar, A.I., Gutiérrez Coronado, M. de L., Bermúdez Almada, M. del C., Hernández García, J., Aldana Madrid, M.L., Grajeda Cota, P., Silveira Gramont, M.I., Meza Montenegro, M.M., Palma Durán, S.A., Leyva García, G.N., Camarena Gómez, B.O., Valenzuela Navarro, C.P.,** 2014. Organochlorine Pesticide Residues in Agricultural Soils. *Terra Latinoamericana* 32, 1–11.

- Limón-Pacheco, J., Gonsebatt, M.E.**, 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674, 137–147.
- Lopaka, L.**, 2013. *Nondetects and Data Analysis for Environmental Data*.
- Lorenzo-Flores, A., Giacomán Vallejos, Germán Ponce Caballero, M. del C., Ghozeisi, H.**, 2017. Adsorption of organophosphorus pesticides in tropical soils: The case of karst landscape of northwestern Yucatan. *Chemosphere* 166, 292–299.
- Martínez-Salinas, R.I., Díaz-Barriga, F., Batres-Esquivel, L.E., Pérez-Maldonado, I.N.**, 2011. Assessment of the Levels of DDT and its Metabolites in Soil and Dust Samples from Chiapas, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 86, 33–37.
- Metcalfe, C.D., Beddows, P.A., Gold Bouchot, G., Metcalfe, T.L., Li, H., Lavieren, H. Van,** 2011. Contaminants in the coastal karst aquifer system along the Caribbean coast of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Environmental Pollution* 159, 991–997.
- Mínguez-Alarcón, L., Mendiola, J., Torres-Cantero, A.M.**, 2014. Pesticides and heavy metal toxicity, en: *Male Infertility*. pp. 181–192.
- Nam, T.-H., Kim, L., Jeon, H.-J., Kim, K., Ok, Y.-S., Choi, S.-D., Lee, S.-E.**, 2017. Biomarkers indicate mixture toxicities of fluorene and phenanthrene with endosulfan toward earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Geochemistry and Health* 39, 307–317.
- Nawab, A., Aleem, A., Malik, A.**, 2003. Determination of organochlorine pesticides in agricultural soil with special reference to γ -HCH degradation by *Pseudomonas* strains. *Bioresource Technology* 88, 41–46.

NOM-021-RECNAT, 2000. NOM-021-RECNAT, DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN. México.

O'Halloran, K., 2006. Toxicological Considerations of Contaminants in the Terrestrial Environment for Ecological Risk Assessment. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal 12, 74–83.

OECD, 1984. Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing. doi:10.1787/9789264070042-en

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, B.R., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H., 2017. Vegan: Community Ecology Package.

Olvera-Velona, A., Capowiez, Y., Mascle, O., Ortiz-Hernandez, L., Benoit, P., 2008. Assessment of the toxicity of ethyl-parathion to earthworms (*Aporrectodea caliginosa*) using behavioural, physiological and biochemical markers. Applied Soil Ecology 40, 476–483.

Ortíz, I., Avila-chávez, M.A., Torres, L.G., 2014. Plaguicidas en México : usos, riesgos y marco regulatorio. Revista latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal 4, 26–46.

Paoletti, M.G., 1999. Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. Agriculture, Ecosystems and Environment 74, 1–18.

Peakall, D.B., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. Ecotoxicology 3, 157–160.

Pelosi, C., Barot, S., Capowiez, Y., Hedde, M., Vandenbulcke, F., 2014. Pesticides and earthworms. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 34, 199–228.

R Core Team, 2016. R: A language and environment for statistical computing [WWW Document]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.r-project.org/>

Rault, M., Collange, B., Mazzia, C., Capowiez, Y., 2008. Dynamics of acetylcholinesterase activity recovery in two earthworm species following exposure to ethyl-parathion. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 3086–3091.

Restrepo, I., 1988. *Naturaleza muerta_los plaguicidas en Mexico.pdf*. *Ciencias* 13, 40–50.

Rodríguez-Castellanos, L., Sanchez-Hernandez, J.C., 2007. Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. *Journal of Pesticides Sciences* 32, 360–371.

Rodríguez Polanco, A.G., Navarro, J.A.A., Sánchez Solorio, J., Mena Rejón, G.J., Marrufo Gómez, J., Del Valis Casillas, T.A., 2015. Contamination by organochlorine pesticides in the aquifer of the Ring of Cenotes in Yucatán, México. *Water and Environmental Journal* 29, 140–150.

SAGARPA, 2015. Avance de siembras y cosechas por cultivo [WWW Document]. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP. URL <http://www.siap.gob.mx/avance-de-siembras-y-cosechas-por-cultivo/>

Sánchez-Osorio, J.L., Macías-Zamora, J.V., Ramírez-Álvarez, N., Bidleman, T.F., 2017. Organochlorine pesticides in residential soils and sediments within two main agricultural

areas of northwest Mexico: Concentrations, enantiomer compositions and potential sources. *Chemosphere* 173, 275–287.

Schreck, E., Gontier, L., Dumat, C., Geret, F., 2012. Ecological and physiological effects of soil management practices on earthworm communities in French vineyards. *European Journal of Soil Biology* 52, 8–15.

Shugart, L.R., McCarthy, J.F., Halbrook, R.S., 1992. Biological Markers of Environmental and Ecological Contamination: An Overview. *Risk Analysis* 12, 353–360.

Stepić, S., Hackenberger, B.K., Velki, M., Hackenberger, D.K., Lončarić, Ž., 2013. Potentiation Effect of Metolachlor on Toxicity of Organochlorine and Organophosphate Insecticides in Earthworm *Eisenia andrei*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91, 55–61.

Stepić, S., Hackenberger, B.K., Velki, M., Loncaric, Z., Hackenberger, D.K., 2013. Effects of individual and binary-combined commercial insecticides endosulfan , temephos , malathion and pirimiphos-methyl on biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 6, 715–723.

Torres Romero, T., 2007. Informe Final del Proyecto Integración del Diagnóstico Nacional sobre la Gestión de Compuestos Orgánicos Persistentes en México.

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57–149.

- Velki, M., Hackenberger, B.K.**, 2013a. Inhibition and recovery of molecular biomarkers of earthworm *Eisenia andrei* after exposure to organophosphate dimethoate. *Soil Biology and Biochemistry* 57, 100–108.
- Velki, M., Hackenberger, B.K.**, 2013b. Biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests. *Chemosphere* 90, 1216–1226.
- Warnes, G.R., Bolker, B., Lumley, T., Johnson, R.C.**, 2005. Various R Programming Tools for Model Fitting, Intramural Research Program, of the NIH, National Cancer Institute, Center for Cancer Research. R package.
- Yang, X., Song, Y., Kai, J., Cao, X.**, 2012. Enzymatic biomarkers of earthworms *Eisenia fetida* in response to individual and combined cadmium and pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 86, 162–167.
- Zhang, Q., Zhang, B., Wang, C.**, 2014. Ecotoxicological effects on the earthworm *Eisenia fetida* following exposure to soil contaminated with imidacloprid. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 12345–12353.

Capítulo 3.

Presencia de plaguicidas organoclorados y caracterización de biomarcadores en ratones silvestres que habitan campos agrícolas de la zona Maya de Quintana Roo, México.

Artículo aceptado en la revista: *Therya* de la Asociación Mexicana de Mastozoología A. C. con el número de asignación MS600



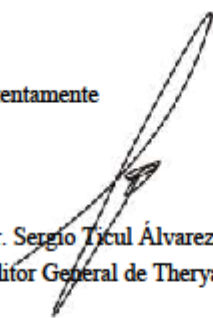
Therya

M en C. Moises Andrade Herrera
El Colegio de la Frontera Sur.
Unidad Campeche.
Avenida Rancho Poligono 2-A, Ciudad Industrial,
C.P. 24500. Lerma, San Francisco de Campeche

Por medio de la presente me permito hacer constancia que en manuscrito **“Presencia de plaguicidas organoclorados y caracterización de biomarcadores en ratones silvestres que habitan campos agrícolas.”** cuyos autores son **Moises Andrade Herrera, Griselda Escalona Segura, Mauricio González Jáuregui, Rafael Reyna Hurtado, Jorge A. Vargas Contreras, y Jaime Rendón von Osten.** Ha sido aceptado para su publicación en el fascículo de septiembre del 2018 de la revista **THERYA.**

Se extiende la presente a constancia para el uso que él considere pertinente, el día seis de junio del dos mil diez y ocho.

Atentamente



Dr. Sergio Ticul Álvarez Castañeda
Editor General de Therya

Presencia de plaguicidas organoclorados y caracterización de biomarcadores en ratones silvestres que habitan campos agrícolas

**Moises Andrade Herrera^a, Griselda Escalona Segura^a, Mauricio González Jáuregui^b,
Rafael Reyna Hurtado^a, Jorge A. Vargas Contreras^c, Jaime Rendón von Osten^{d*}**

^aEl Colegio de la Frontera Sur. Unidad Campeche. Avenida Rancho Polígono 2-A, Ciudad Industrial, C.P. 24500. Lerma, San Francisco de Campeche, Campeche, México.

^bInstituto de Ecología. Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, Xalapa 91070, Veracruz, México.

^cFacultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Campeche. Avenida Agustín Melgar S/N entre calle 20 y Juan de la Barrera, col. Buenavista, C. P. 24039. San Francisco de Campeche, Campeche, México.

^dInstituto EPOMEX. Universidad Autónoma de Campeche. Campus VI. Av. Héroe de Nacozari 480. 24070. Campeche, Campeche, México

**Corresponding Author.*

RESUMEN

El uso de plaguicidas en cultivos aledaños a áreas de conservación, significa un riesgo para la fauna silvestre expuesta accidentalmente cuyos efectos son desconocidos, particularmente en la Península de Yucatán, México. Los ratones silvestres que habitan las regiones agrícolas, desempeñan un papel ecológico importante, además pueden servir como bioindicador de exposición a contaminantes. Los objetivos del presente trabajo fueron determinar la presencia de plaguicidas organoclorados (OC) en hígado y evaluar la exposición a partir de la respuesta temporal de los biomarcadores enzimáticos (BM), tales como acetilcolinesterasa (AChE), glutatión-S-transferasa (GST) y catalasa (CAT). Ratones silvestres (*Mus musculus*) fueron capturados entre junio de 2015 y abril de 2016 en un cultivo de sandía de una comunidad agrícola, en Quintana Roo, México. Los individuos fueron sacrificados in situ y se le diseccionaron los tejidos (hígado, cerebro y músculo esquelético). La presencia de plaguicidas se determinó por cromatografía de gases. La actividad de los BM se determinó por espectrofotometría. Se capturaron 35 individuos, con un éxito de captura de 2.33%. Los OC más detectados fueron los drines en ambas temporadas climáticas. La temporada lluviosa influyó más en la actividad de los biomarcadores, ya que la AChE mostró menor actividad (16 y 40% en cerebro y músculo respectivamente), la GST aumentó su actividad para la misma temporada (77% mayor), y finalmente la CAT no mostró diferencias significativas entre temporadas. No hubo correlación significativa entre las concentraciones de OC y la actividad de BM, a excepción de los drines y la AChE en cerebro. Las concentraciones de OC encontradas en el presente trabajo, están por debajo (entre 2 y 20 veces) de las reportadas en otros trabajos con roedores en condiciones controladas. La actividad de los BM refleja que las lluvias parecen acentuar los efectos de los plaguicidas sobre los ratones, sin embargo, puede no representar un escenario de riesgo para su sobrevivencia. La utilización de ratones silvestres como bioindicadores, es una

herramienta útil y práctica para vislumbrar disturbios ocasionados por el uso de plaguicidas en zonas agrícolas. Se recomiendan trabajos complementarios y ampliar la batería de BM, para poder determinar con mayor precisión cuales son los contaminantes que afectan en mayor medida la fisiología de los animales silvestres expuestos accidentalmente.

Palabras clave: Acetilcolinesterasa, Catalasa, Gutación-S-transferasa, Biomarcadores, Mus musculus, plaguicidas organoclorados, Vida silvestre

ABSTRACT

The use of pesticides in crops bordering conservation areas means a risky for wildlife that is exposed accidentally and its effects in the Yucatan Peninsula Mexico are still unknown. Wild mice that inhabit agricultural regions play an essential ecological role, can also be used in the wild harvest as a useful bioindicator of exposure to contaminants in wildlife. The objectives of the work were to determine the presence of organochlorine pesticides (OC) in the liver and evaluate seasonally the response of enzymatic biomarkers (BM) such as acetylcholinesterase (AChE), glutathione-S-transferase (GST) and catalase (CAT). Wild mice (*Mus musculus*) were captured between June 2015 and April 2016 in a watermelon crop of an agricultural community in Quintana Roo, Mexico. We sacrificed individuals in situ and tissues were dissected (liver, brain and skeletal muscle). Determination of pesticides was carried out by gas chromatography. We determine BM activity by spectrophotometry. We captured 35 individuals reaching a capture success of 2.33%. The OCs most detected were the drines in both climatic seasons. The rainy season had a higher influence on the activity of the biomarkers since the AChE showed less activity (16 and 40% in brain and liver respectively). The GST was activated during the same season (77% higher), while the CAT did not show significant differences between seasons. There was no significant correlation between OC concentrations and biomarker activity, except for drines and AChE in the brain. The concentrations of OC found in the present work are below (between 2 and 20 times lower) those reported in other work with rodents under controlled conditions. The activity of the BM reflects that precipitations seem to accentuate the effects of the pesticides on mice, however, it may not represent a risk scenario for their survival. The use of wild mice as bioindicator is a useful and practical tool to detect disturbances caused using pesticides in agricultural areas. Additional work is recommended using an extended BM battery,

to determine more precisely which are the contaminants that most affect the physiology of wild animals accidentally exposed.

Keywords: Acetylcholinesterase, Catalase, Glutathione-S-Transferase, Biomarkers, Mus musculus, organochlorine pesticides, Wildlife

Introducción

La tecnificación de la agricultura a través de paquetes tecnológicos en donde se utilizan altas cantidades de plaguicidas está generando situaciones de riesgo para la fauna silvestre que entra en contacto con estos compuestos tóxicos, que pueden causarles alteraciones en su salud que aún se desconocen. La constante carga de plaguicidas y otros compuestos agroquímicos en las tierras de cultivo provocan entre otras cosas acidificación, pérdida de la biodiversidad edáfica y toxicidad del suelo (Givaudan *et al.* 2014). Los plaguicidas no solo causan efectos en las especies que se consideran plagas, también impactan a la fauna silvestre que circunda los campos agrícolas (Johnston, 2000). Los daños de los plaguicidas en los organismos expuestos dependen principalmente de su toxicocinética (forma de entrada y distribución) y su toxicodinámica (efectos en el organismo) y están influenciados por factores externos, como la naturaleza del plaguicida, su composición química, persistencia, dosis, tiempo de exposición, estado de salud y susceptibilidad del organismo (Ramírez y Lacasaña 2001). En el caso de los organoclorados sus principales características es su alta persistencia, transportarse a grandes distancias de su fuente de aplicación, su bioacumulación y sus efectos adversos a largo plazo (Mackay *et al.* 2001).

En este sentido, históricamente las aves son el grupo en el que se han documentado más efectos adversos por intoxicaciones accidentales en vida libre (Köhler y Triebkorn 2013) ya que se consideran organismos altamente sensibles a la exposición a plaguicidas. Particularmente un grupo que ha recibido menor atención respecto a los daños causados por plaguicidas son los roedores; principalmente por ser considerados plagas, sin embargo, se deja de lado el relevante papel ecológico que desempeñan, principalmente en lo que respecta a la dispersión de semillas y control de otro tipo de plagas como insectos y otros invertebrados, asimismo sirven como alimento para otros depredadores mayores (Ceballos 2005).

De forma general los pequeños mamíferos han sido utilizados como sustitutos para validar modelos de exposición en humanos por diversas agencias de protección al ambiente, por ejemplo, la USEPA (United States Environmental Protection Agency) los ha usado constantemente como centinelas para protección ambiental y para el ser humano (Sheffield *et al.* 2001).

Particularmente, los roedores se han considerado para caracterizar diversos efectos de plaguicidas en condiciones controladas, que van desde la evaluación de umbrales de tolerancia determinando la dosis letal 50 (DL₅₀), es decir, la dosis determinada en donde muere el 50 % de la población (Dell’Omo *et al.* 2003; Hirano *et al.* 2017), daños por disrupción endocrina (Bhaskar y Mohanty 2014; Ghodrat *et al.* 2014), estrés oxidativo (Zhao *et al.* 2016; Morales-Prieto y Abril 2017; Latchoumycandane y Mathur 2002), efectos genotóxicos (Peris-Sampedro *et al.* 2016) o bien efectos neurotóxicos (Chen *et al.* 2016; Dell’Omo y Shore 1996; Westlake *et al.* 1983). Todos estos estudios se han realizado aplicando diferentes dosis de uno o más (mezclas) de plaguicidas.

Sin embargo, son pocos los estudios que consideran a los ratones como bioindicadores ambientales en condiciones de vida silvestre. Se han evaluado dinámicas poblacionales de roedores en zonas contaminadas como indicador de perturbación. Principalmente se relacionan a muertes accidentales y depresiones poblacionales provocadas por exposiciones agudas a plaguicidas organofosforados (OF) y carbamatos (CB) (Barrett y Darnell 1967; Giles y Jr. 1970; Sheffield *et al.* 2001). Por ejemplo Block *et al.* (1999), evaluaron el impacto poblacional a largo plazo del plaguicida OF Counter[®] (terbufos), a partir de parámetros poblacionales en dos especies de ratones silvestres (*Peromyscus maniculatus* y *P. leucopus*) en un campo agrícola en Iowa, EUA, concluyendo que el OF parece no tener una influencia en la reproducción y otros parámetros poblacionales que ponga en riesgo su demografía a largo plazo. Otros trabajos realizados en vida libre se realizaron evaluando la acumulación de compuestos orgánicos persistentes (COP) en tejidos (Perez-Gonzalez *et al.* 2017) o bien, evaluando el efecto de

diferentes contaminantes a nivel histológico (Gómez-Ugalde, 2003) o bioquímico analizando biomarcadores (BM) enzimáticos (Andrade-Herrera 2011; Chi Coyoc *et al.* 2016).

En México existen pocos estudios que reportan la influencia de los plaguicidas usados en campos de cultivo sobre roedores silvestres. Específicamente en la Península de Yucatán, los estudios relacionados al uso de plaguicidas se centran en su presencia y acumulación (Rendón-von Osten *et al.* 2005; Charruau *et al.* 2013) y relativamente pocos estudios que reporten el daño sobre la fauna aledaña a zonas de cultivo en donde se utilicen plaguicidas (Noreña-Barroso *et al.* 2004; Cobos *et al.* 2006; Buenfil-Rojas *et al.* 2016). De acuerdo con esto, en el Estado de Quintana Roo, particularmente en la zona maya, los principales cultivos tecnificados son la caña de azúcar, la papaya maradol y la sandía (SAGARPA 2015). En ellos se observó que se implementan diversos paquetes tecnológicos basados en el uso de agroquímicos para lograr la eficiencia en las cosechas. Por ejemplo, en campo se registró el uso de Endosulfán 35 Le Cag® (endosulfán), Furadán® (carbofurán), Herbipol® (2,4-D Amina) y Cerillo® (paraquat), Lannate® (metomilo) o Velfosato® (glifosato) principalmente. Se observó que estos plaguicidas son aplicados en cantidades excesivas, además los agricultores no toman en cuenta las condiciones de seguridad necesarias (equipos de protección).

Por lo tanto, debido a la carencia de trabajos en la región en donde se analicen los efectos de la agricultura tecnificada sobre la salud de la fauna silvestre y en particular de los pequeños mamíferos; es necesario generar conocimiento que aporte evidencia de las situaciones de riesgo que puedan estar afrontando estos animales. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue analizar la influencia de los plaguicidas usados en un cultivo tecnificado de sandía sobre ratones silvestres (*Mus musculus*), en una primera instancia determinando la presencia de plaguicidas en tejido hepático de los individuos capturados, posteriormente caracterizar el efecto tóxico

mediante el uso de biomarcadores enzimáticos (AChE en cerebro y músculo y GST y CAT en hígado) y finalmente evaluando la posible relación entre los plaguicidas detectados con la actividad de los biomarcadores.

Materiales y Métodos

Trabajo de campo. El sitio de muestreo se encuentra ubicado en las coordenadas 19° 35' 24.70" N, -89° 10' 51.20" O, dentro del Municipio de José María Morelos, Quintana Roo en un campo de cultivo tecnificado de sandía dentro de la comunidad Maya de *X noh Cruz* (Figura 1). La zona se encuentra rodeada de campos de maíz de temporal y de manchones de selva mediana, además se encuentra colindante al Área de Protección de Flora y Fauna de *Bala'an Ka'ax* (APFFBK).

Las capturas se realizaron entre los meses de junio de 2015 y abril de 2016. Los ratones fueron capturados mediante 50 trampas Sherman® colocadas cada cinco metros a ambos lados a lo largo de un transecto de 125 metros dentro del campo agrícola. Las trampas fueron cebadas con una mezcla de hojuelas de avena con vainilla y se dejaron durante una noche. Los individuos capturados fueron identificados utilizando guías de campo, y se les tomaron las medidas morfométricas convencionales. Posteriormente fueron sacrificados *in situ* mediante dislocación cervical de acuerdo a la NOM-033-SAG/ZOO- 2014, que estipula el sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres; se diseccionaron y colectaron muestras de cerebro, hígado y músculo esquelético para los análisis posteriores. Los tejidos se almacenaron en nitrógeno líquido, se transportaron al laboratorio y se almacenaron a -80°C.

Trabajo de Laboratorio. El trabajo de laboratorio se dividió en dos fases; la primera consistió en determinar la presencia de plaguicidas organoclorados (OC) en el tejido hepático de los ratones y finalmente se caracterizó el efecto de la exposición a los diversos xenobióticos

evaluando tres BM enzimáticos, acetilcolinesterasa (AChE) que refleja neurotoxicidad, glutatión-S-Transferasa (GST) que indica procesos de detoxificación (biotransformación fase II) y catalasa (CAT), biomarcador que caracteriza al estrés oxidativo.

Determinación de plaguicidas en tejido hepático. Se utilizaron disolventes con alto grado de pureza (98% HPLC); el material de vidrio fue lavado con Extran® y enjuagado con abundante agua destilada, posteriormente fue secado por 4 horas a 200°C y enjuagado con acetona y hexano.

El análisis de plaguicidas en tejido hepático de los ratones se realizaron de acuerdo al método descrito por Zhang *et al.* (2007). Se tomó una fracción de tejido hepático, se secaron en horno durante 24 hrs a 45°C y se pesó para su posterior análisis. Las extracciones de los compuestos presentes en las muestras se realizaron con una mezcla de acetona:hexano (1:1) mediante baño ultrasónico por 20 minutos. Después de la extracción, se determina la cantidad de grasa para determinar las concentraciones de plaguicida con base en grasa ($\mu\text{g/g}$ de grasa). La purificación de las muestras se realizó mediante una columna de vidrio empacada con 7 g de sílica gel y 1 g de sulfato de sodio. La elución de la muestra se realizó de manera subsecuente con 20 ml de hexano, 20 ml de una mezcla de diclorometano y hexano (1:1) y 20 ml de diclorometano, enseguida se evaporaron a sequedad y se resuspendieron en 50 μl de hexano para su análisis por cromatografía de gases. Los contaminantes fueron cuantificados usando un cromatógrafo de gases Varian 3800 con detector de captura de electrones Ni^{63} (GC-ECD) y equipada con una columna capilar HT8 (60 m x 0.25 mm; 25 μm de grosor de fase líquida) (SGE Analytical Science, USA). La temperatura del inyector y el detector fue de 150 y 350°C respectivamente. La concentración de los contaminantes fue obtenida mediante el cálculo del área bajo la curva con el software Star Chromatography Workstation versión 6 y con la

calibración de los estándares. Para identificar y cuantificar los plaguicidas se utilizó una mezcla de estándares de 20 plaguicidas OC, CRM No. 47426 SUPELCO® EPA CLP Organochlorine Pesticide Mix, y los estándares de Sigma-Aldrich Mirex No. 45887, 2,4'-DDE No. 36663, 2,4'-DDD No. 35485 y 2,4'-DDT No. 45839 los cuales fueron agrupados en familias para su análisis (Tabla 1).

Actividad de biomarcadores (BM) enzimáticos. Los tres BM, se analizaron en tejidos específicos de acuerdo a su sitio de acción, AChE se evaluó en cerebro y músculo esquelético en tanto que GST y CAT en hígado. Para los tres BM todas las muestras se homogenizaron durante 20 segundos, utilizando un homogenizador (PRO Scientific 250®), con la solución amortiguadora específica para cada BM de acuerdo al método empleado. La actividad de la AChE se determinó de acuerdo al método de Ellman *et al.* (1961), adaptado a microplaca (Guilhermino *et al.* 1996) las muestras se prepararon con una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.2. La cinética enzimática fue registrada a una longitud de onda de 414 nm y expresada en unidades (U) de acetilcolina hidrolizada por minuto por mg de proteína y utilizando un coeficiente de extinción de $13.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La determinación de actividad de la GST se realizó de acuerdo al método descrito por Habig *et al.* (1974). Se empleó una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.5 para la preparación de las muestras, determinando la cinética enzimática a una longitud de onda de 340 nm, expresando la actividad como U de S-(2,4-dinitrofenil) glutatión generados por minuto por miligramo de proteína y se utilizó un coeficiente de absorción de $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La actividad de la CAT se midió con la disminución del H₂O₂ a 240 nm, mediante el método de Aebi (1984), utilizando una solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM pH 7, expresando la actividad como U de peróxido generado por minuto por miligramo de proteína. La

concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (1976), a 595 nm y se expresa como mg/ml. Para todos los análisis de biomarcadores y de proteína se determinó su actividad utilizando microplacas (Corning®) en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan Spectrum®).

Análisis estadísticos. Todos los análisis se realizaron utilizando el software R versión 3.2.4 (R Core Team, 2016). Se probó que la actividad de los BM cumplieran con el supuesto de distribución normal mediante una prueba de Shapiro-Wilk, y posteriormente se evaluaron las diferencias comparando su actividad entre temporadas climáticas (lluvias-secas), a través de una *t*-student cuando se cumplió el supuesto, o una prueba de Wilcoxon cuando no se cumplió (Tabla 2), el nivel de significancia se consideró con un $\alpha \leq$ de 0.05 (Zar, 2010). Posteriormente mediante el paquete NADA 1.6-1 (Lopaka 2013) se determinaron las medidas de tendencia central y dispersión de los plaguicidas, tomando en cuenta los datos censurados por la izquierda de acuerdo al límite de detección del cromatógrafo.

Se empleó el paquete “vegan” (Oksanen *et al.* 2017) para realizar correlaciones entre las concentraciones de los plaguicidas detectados (clasificados por familia del compuesto) en tejido hepático, y los BM analizados, explorando las posibles correlaciones entre sí. Se usaron correlaciones con los datos transformados a rangos (correlaciones de Spearman) debido a que los datos de concentraciones se encuentran censurados por la izquierda por los límites de detección y cuantificación (Helsel 2012).

Resultados y discusión

En el presente trabajo se reportan concentraciones de plaguicidas presentes en tejido hepático (reportados con base grasa, peso seco y peso húmedo) así como los posibles efectos caracterizados a partir de la expresión de tres BM enzimáticos en tres tejidos de ratones

silvestres. Se estableció capturar individuos adultos de la especie *Mus musculus*, debido a que fue la especie de ratón más capturada durante el periodo de muestreo, asimismo por su abundancia en la zona de estudio ya que se encuentra de manera natural entre los cultivos de maíz que rodean a los de sandía (Alcérreca *et al.* 2009). Los restos de los animales no fueron depositados en ninguna colección biológica ya que tanto la piel como el esqueleto (principalmente el cráneo) no quedaban en buenas condiciones después de las disecciones. Durante el trabajo de campo se capturaron un total de 35 individuos (17 en temporada de lluvias y 18 en temporada de secas), durante 30 noches de trampeo, con un éxito de captura de 2.33 %.

Presencia de Plaguicidas OC en tejido hepático. De los 24 plaguicidas OC analizados, los más detectados en la temporada de lluvias fueron los de la familia de los drines (aldrín, endrín, endrín aldehído, endrín cetona y dieldrín) los cuales fueron detectados en 10 individuos capturados, seguido de los Hexaclorociclohexanos (HCHs) que fueron detectados en 7 organismos; por el contrario, el menos detectado fue el metoxicloro, el cual se encontró únicamente en dos individuos. En el caso de la temporada de secas, de los 18 organismos analizados igualmente fueron los congéneres de los drines los más detectados junto con los derivados del Dicloro difenil tricloroetano (DDT) y los heptacloros, que fueron detectados en ocho organismos cada uno, y al igual que en la temporada de lluvias, el metoxicloro fue el menos detectado, ya que sólo se identificó en tres individuos (Tabla 4).

Por otro lado, los compuestos que se encontraron en una mayor concentración, en ambas temporadas fueron los isómeros del DDT y el metoxicloro, alcanzando valores de concentración máximos de 702 y 524 $\mu\text{g/g}$ base grasa respectivamente, ambos en organismos capturados en la temporada de secas. El compuesto registrado en menor concentración fue el clordano en ambas

temporadas, encontrando una media de concentración de 6.63 ± 11.3 y 15.02 ± 29.3 $\mu\text{g/g}$ base grasa en lluvias y secas respectivamente.

Las concentraciones encontradas en el presente trabajo, están por debajo de los umbrales de toxicidad por exposición (principalmente por ingesta), encontrados en diversas investigaciones con roedores silvestres en condiciones controladas de laboratorio (Jefferies *et al.* 1973; Morris 1968; Sheffield *et al.* 2001; Wolfe y Esher 1980), las cuales son de 2 a 20 veces más altas a las encontradas en este estudio. Estos trabajos son conducidos principalmente para establecer dosis letales y tolerancias a diversos OC, como drines, HCHs y DDTs, en estos trabajos se reportan daños tanto a nivel fisiológico como conductual, pero solo algunos reportan los residuos de los OC en los tejidos de los organismos.

Cabe recordar que la bioacumulación en los mamíferos silvestres está principalmente determinada por la ingesta, aunque los contaminantes pueden ser absorbidos por vía dérmica o inhalatoria (Linder y Joermann 2001). En este aspecto, generalmente los trabajos con roedores silvestres en condiciones de vida libre se enfocan principalmente a evaluar las variaciones en el tamaño poblacional o registrando presencia y ausencia en zonas donde se han empleado plaguicidas OC (Sheffield *et al.* 2001). Son pocos los trabajos que cuantifican la presencia de OC en tejidos, éstos se realizan principalmente para identificar residuos de DDT, dieldrín y heptacloro. En el caso del DDT, los valores encontrados en los ratones del presente estudio (entre 0.001 y 1.834 $\mu\text{g/g}$ de peso seco) son similares a los reportados por Lincer y Sherburne (1974), en donde encuentran valores entre 0.01 y 0.13 $\mu\text{g/g}$ base peso seco. Asimismo, Laubscher *et al.* (1971), en campos agrícolas de Tucson, Arizona, encontraron concentraciones de DDT y sus metabolitos en hígado de *Peromyscus eremicus* y *P. maniculatus* de entre 0.006 a

0.92 $\mu\text{g/g}$ base peso húmedo, las cuales son hasta cinco veces más altas a las encontradas en el presente trabajo (0.001 a 0.200 $\mu\text{g/g}$ de peso húmedo).

Sin embargo, las concentraciones encontradas en el presente trabajo son sumamente inferiores a las encontradas por Chi Coyoc *et al.* (2016), quienes registraron altas concentraciones de DDTs, HCHs y Drines (0.876, 0.546 y 0.451 $\mu\text{g/g}$ base peso seco respectivamente) en hígado de roedores silvestres (*Oryzomys couesi*, *Peromyscus leucopus* y *Reithrodontomys gracilis*). Estas concentraciones fueron hasta 35 (DDT), 49 (HCHs) y 37 (Drines) veces más altas en relación a las registradas en el presente estudio. Con estos resultados se podría inferir que las concentraciones encontradas pueden no representar una situación de riesgo para los roedores expuestos, sin embargo, los efectos de los diversos contaminantes están influenciados por diversos factores tanto ambientales como fisiológicos de cada especie e incluso de cada individuo (Peakall y McBee 2001).

Finalmente, de manera general, se observa una mayor concentración de todos los OC para la temporada de secas en relación a la temporada de lluvias (Tabla 4). Esto podría deberse a que durante las lluvias parte de los compuestos tóxicos se lixivian a mayor profundidad del suelo, provocando menor exposición para los organismos que habitan en la superficie (González Váldez *et al.* 2013). Aunado al tipo de suelo del área de trampeo el cual es franco-arcilloso (Andrade Herrera *et al.* 2018), el cual favorece a la lixiviación de contaminantes por su bajo contenido de materia orgánica, la cual se adhiere los OC y los hace más persistentes en las capas superiores del suelo (Cárdenas y Márquez, 2015). Por otro lado, otros factores asociados a la temporalidad pueden explicar la mayor concentración de OC en la temporada seca, por ejemplo, ésta coincide con la época invernal, durante la cual los organismos se mueven menos por la baja de

temperaturas (periodos reproductivos durante la temporada de lluvias), por lo que el contenido de grasas es mayor en los organismos (Caldas *et al.* 1999).

Actividad de los biomarcadores enzimáticos. En los BM, se encontraron diferencias significativas entre temporadas climáticas en AChE y GST, en tanto que en CAT no se registraron estas diferencias (Tabla 2). En el caso de la AChE, fue evaluada tanto en cerebro como en músculo, registrando una media de actividad (18.32 U/min/mg de proteína) mayor en el cerebro en relación al músculo (7.35 U/min/mg de proteína), lo cual representa una diferencia de poco más de dos órdenes de magnitud entre ambos tejidos. Sin embargo, en ambos tejidos se presenta el mismo patrón, es decir, la actividad registrada en la temporada seca fue mayor que la temporada lluviosa (figura 2). En el cerebro la AChE presentó una inhibición de poco más del 16% ($t_{(32)} = -2.075$, $p < 0.05$) hacia la temporada de lluvia; en tanto que en el músculo la inhibición fue de cerca del 40% ($t_{(20)} = -3.18$, $p < 0.01$) también en las lluvias (Tabla 2).

La AChE es considerada como el mejor BM evaluando la exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos, los cuales son los principales plaguicidas anticolinérgicos. Sin embargo, dadas sus características (poco persistentes en el ambiente, altamente hidrosolubles) se dificulta su cuantificación tanto en el ambiente como en los tejidos animales (Sheffield *et al.* 2001). Rattner y Hoffman (1984) reportan la inhibición de la AChE a partir de administrar dosis orales subletales del insecticida organofosforado (OF) Acefato a ratones silvestres (*M. musculus*, *P. leucopus* y *M. pennsylvanicus*); ellos encontraron porcentajes de inhibición similares a las reportadas en el presente trabajo (16 a 40 %) cuando se le administraron dosis entre 25 y 100 mg/kg de alimento durante 5 días. Asimismo, los porcentajes de inhibición encontrados en nuestros resultados parecen no representar un peligro para las poblaciones de ratones, ya que

además en otras investigaciones se caracterizaron inhibiciones mayores al 40 %, las cuales no fueron letales en los ratones expuestos (Dell'Omo y Shore 1996; Meyers y Wolff 1994).

En la actualidad, son pocos los trabajos en situaciones de campo que caractericen la inhibición de AChE en roedores silvestres. En este sentido, nuestros resultados de inhibición de AChE (de 16 a 40 %) son consistentes con algunos trabajos realizados en condiciones silvestres pero en otras especies de roedores como *Microtus pennsylvanicus* (Jett, 1986), *M. pinetorum* (Durda *et al.* 1989), *P. maniculatus* y *P. leucopus* (Block *et al.* 1999), *M. musculus* (Edward *et al.* 1983; Custer *et al.* 1985) y particularmente en México con *O. couesi* y *R. gracilis* (Chi Coyoc *et al.* 2016). En estos trabajos, se concluye que las magnitudes de inhibición encontradas no representan una intoxicación aguda letal, por lo que no estaba en riesgo la estabilidad poblacional.

En el presente trabajo, la AChE presenta una menor actividad durante la época de lluvias, cuando se cultivan principalmente maíz, calabaza y frijol, empleándose diversos herbicidas para la preparación de la tierra como glifosato o paraquat, asimismo algunos insecticidas para protección de sus cultivos como el carbofurán, endosulfán o imidacloprid. Los datos encontrados denotan una mayor exposición en la temporada lluviosa a compuestos anticolinérgicos, los cuales, si bien no fueron analizados, los campesinos refirieron utilizarlos para el control de algunas plagas.

Diversos xenobióticos generan estrés oxidativo a partir de la producción de especies reactivas de oxígeno (Limón-Pacheco y Gonsebatt 2009). Para evitar entrar en una situación de estrés oxidativo, las células inician sus procesos de desintoxicación y antioxidantes para aminorar el efecto tóxico, en donde se involucran las dos enzimas utilizadas como BM, GST (fase II del metabolismo de xenobióticos) y CAT (antioxidante), es decir, incrementan su actividad en casos

de exposición a compuestos tóxicos (van der Oost *et al.* 2003). La actividad de la GST en los ratones capturados exhibió diferencias significativas entre temporadas climáticas ($W=253$, $p<0.001$) presentando mayor actividad en la temporada de lluvias en relación a la temporada de secas (98.36 y 30.53 U/min/mg de proteína respectivamente) lo que representa una diferencia de casi 77 % en la expresión del BM entre ambas temporadas (Tabla 2, Figura 2).

La GST se activa, actuando sobre los compuestos tóxicos haciéndolos más hidrosolubles, facilitando su excreción del organismo (van der Oost *et al.* 2003). Se ha documentado poco la influencia de los plaguicidas sobre la GST de ratones en zonas agrícolas; sin embargo, en un estudio se caracterizó su activación en trabajadores agrícolas, a partir de exposiciones a carbamatos y γ HCH (Lukaszewicz-Hussain, 2010), este último es uno de los plaguicidas encontrados en los tejidos de algunos ratones en el presente trabajo. En este sentido, la actividad de la GST se incrementó significativamente hacia la temporada de lluvias, esto sugiere que las precipitaciones pluviales hacen disponibles algunos xenobióticos en el suelo, los cuales aumentan la reacción de las enzimas de desintoxicación como la GST. Un patrón similar fue encontrado en ratones silvestres (*Peromyscus* spp) en zonas boscosas de la Ciudad de México en donde la actividad de la GST fue significativamente mayor durante la temporada de lluvias (Andrade-Herrera 2011).

Al contrario que en todos BM anteriores, la CAT no arrojó diferencias significativas entre las temporadas de lluvias y secas (6.15 y 6.24 U/min/mg de proteína respectivamente). Sin embargo los valores promedio encontrados en el presente trabajo están por arriba de los reportados en otros trabajos (experimentales) en donde los promedios de actividad van de 0.2 a 2.5 U/min/mg de proteína (Ayed-Boussema *et al.* 2012; Panemangalore y Bebe 2000; Yilmaz *et al.* 2004). En este aspecto, la catalasa es un biomarcador que puede reaccionar de diversas

formas, es decir, ya sea que se registre una inhibición o una activación, esto puede depender de diversos factores, pero principalmente se debe a la dosis del xenobiótico, por el tiempo de exposición al mismo o bien por la mezcla de varios compuestos (van der Oost *et al.* 2003).

Experimentalmente, la exposición dérmica a diversos plaguicidas provoca un incremento en la actividad de la CAT, por ejemplo, Panemangalore y Bebe (2000), registraron un aumento del 13 % de actividad respecto a sus controles después de 4 semanas de exposición a una mezcla de OF. Efectos similares fueron encontrados en otros trabajos en donde se exponen ratas y ratones a diversos plaguicidas (OF, OC, piretroides, neonicotinoides entre otros) vía ingesta, con aumentos en la actividad del 25 % en promedio (Jin *et al.* 2011, 2013). Cuando los plaguicidas son administrados de forma intraperitoneal se encuentran ambos efectos, por ejemplo, Ayed-Boussema *et al.* (2012), registraron aumento de actividad de hasta tres órdenes de magnitud en ratones después de la administración de diversas dosis del OF Dimetoato durante 30 días; y por el contrario Yilmaz *et al.* (2004), encontraron una inhibición significativa de la CAT después de administrar un herbicida sistémico hormonal durante tres días en ratones albinos (*Mus musculus*).

Correlación entre los plaguicidas y la actividad de los BM. Se realizaron correlaciones de Spearman entre los plaguicidas OC detectados (por familia) y la actividad de los BM registrada por los ratones capturados para explorar la influencia de estos contaminantes en la actividad de estos BM en los organismos expuestos. Los análisis únicamente mostraron una correlación significativa ($\rho = -0.489, p < 0.01$), la cual fue entre los compuestos de la familia de los Drines y la actividad de la AChE en cerebro (Tabla 3). En este sentido, si bien la exposición a los plaguicidas OC provoca diversos efectos tóxicos en los organismos, particularmente la inhibición de la AChE es provocada principalmente por la exposición a plaguicidas OF y CB (Rodríguez-Castellanos y Sánchez-Hernández 2007, los cuales no fueron analizados en el presente trabajo.

Sin embargo, los campesinos comentan la utilización de mezclas de diversos insecticidas y acaricidas, entre ellos organofosforados, piretroides, carbamatos y neonicotinoides, particularmente en el cultivo de la sandía, encontrándose además envases vacíos de estos plaguicidas dentro de los campos agrícolas, por lo que estos contaminantes (o sus mezclas) pueden ser los responsables de los resultados encontrados.

Particularmente en México, hay pocos trabajos que reporten el efecto de agentes xenobióticos en roedores silvestres, por ejemplo, Andrade-Herrera (2011), correlacionó las concentraciones de contaminantes del aire reportadas en la Ciudad de México con la actividad de biomarcadores enzimáticos, encontrando que la temporada de secas tiene un mayor impacto, posiblemente debido a las inversiones térmicas, ya que los contaminantes suspendidos en el ambiente pueden tener efectos adversos. Por el contrario, en el presente trabajo, las lluvias parecen afectar en mayor medida la fisiología de los ratones ya que particularmente la AChE y la GST se vieron afectadas en dicha temporada. Las lluvias pueden precipitar y depositar los diferentes compuestos tóxicos en el suelo, y hacerlos más disponibles para los roedores, los cuales habitan en esta matriz ambiental.

Conclusiones

El presente trabajo es el primero en México en mostrar de manera conjunta la presencia de plaguicidas y sus efectos bioquímicos (neurotóxicos y respuestas de mecanismos de defensa y antioxidantes) en ratones de vida libre. El estudio muestra que los ratones bioacumulan plaguicidas en sus tejidos, lo cual representa un riesgo para la fauna silvestre que se encuentre cerca de estas zonas de cultivo. El uso de BM es una herramienta útil para determinar daños subletales en fauna silvestre debido a la exposición a contaminantes. Particularmente en este trabajo, la actividad de los BM muestra que hay una mayor influencia de los plaguicidas hacia la

temporada de lluvias, posiblemente por la presencia de diversos plaguicidas presentes en el ambiente y son depositados en el suelo durante las precipitaciones. Asimismo, la utilización de ratones silvestres como bioindicadores, son útiles para identificar efectos ocasionados por el uso de plaguicidas en áreas de cultivo. Para estudios futuros se recomienda emplear sangre como una matriz no destructiva, además de que en sangre se tienen los compuestos que fueron ingeridos recientemente. Hace falta analizar otros tipos de plaguicidas y ampliar la batería de biomarcadores, para conocer otros posibles efectos adversos y, a su vez, determinar con mayor precisión cuales son los contaminantes que afectan en mayor medida la fisiología de los animales expuestos, ya que el uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos puede estar impactando la fauna silvestre circundante.

Literatura Citada

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105:121–126.

Alcérreca Aguirre, C., R. Robles de Benito, L. Pereira Lara, D. Amtochew Alonzo. 2009. *Mamíferos de la Península de Yucatán, Guía completa.* Ed. Dante. Mérida Yucatán, México.

Andrade-Herrera, M. 2011. Evaluación del efecto de la contaminación atmosférica en dos especies del género *Peromyscus* (Rodentia: Muridae) que cohabitan en el Parque Nacional Desierto de los Leones. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.

Andrade Herrera, M., G. Escalona Segura, M. González Jáuregui, R. Reyna Hurtado, J. A. Vargas Contreras, y J. Rendón von Osten. 2018. Presence of pesticides and toxicity

assessment of agricultural soils in the Quintana Roo Mayan zone, Mexico using biomarkers in earthworms (*Eisenia fetida*). Artículo enviado para su publicación.

- Ayed-Boussema, I., K. Rjiba, A. Moussa, N. Mnasri, y H. Bacha.** 2012. Genotoxicity associated with oxidative damage in the liver and kidney of mice exposed to dimethoate subchronic intoxication. *Environmental Science and Pollution Research* 19:458–466.
- Barrett, G. W., y R. M. Darnell.** 1967. Effects of Dimethoate on Small Mammal Populations. *American Midland Naturalist* 77:164-175.
- Bhaskar, R., y B. Mohanty.** 2014. Pesticides in mixture disrupt metabolic regulation: In silico and in vivo analysis of cumulative toxicity of mancozeb and imidacloprid on body weight of mice. *General and Comparative Endocrinology* 205:226–234.
- Block, E. K., T. E. Lacher, L. W. Brewer, G. P. Cobb, y R. J. Kendall.** 1999. Population Responses of *Peromyscus* Resident in Iowa Cornfields Treated with the Organophosphorus Pesticide COUNTER®. *Ecotoxicology* 8:189–200.
- Bradford, M. M.** 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254.
- Buenfil-Rojas, A. M., T. Alvarez-Legorreta, y J. R. Cedeño-Vazquez.** 2016. Metals and metallothioneins in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) from Rio Hondo. *Toxicology Letters* 259:S96.
- Caldas, E. D., R. Coelho, L. C. K. R. Souza, y S. C. Siba.** 1999. Organochlorine Pesticides in Water, Sediment, and Fish of Paranoá Lake of Brasilia, Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and toxicology* 62:199–206.

- Cárdenas, S. y A. Márquez.** 2015. Persistencia de plaguicidas organoclorados en suelos, agua y sedimentos de la cuenca del Tucutunemo, Municipio Zamora, Estado Aragua. In: Memorias del XXI Congreso Venezolano de la ciencia del suelo.
- Ceballos, G.** 2005. Orden Rodentia. pp. 530. In Los mamíferos silvestres de México (Ceballos G. y G. Oliva, Eds.). Fondo de Cultura Económica. México, D. F.
- Charruau, P., Y. Hénaut, y T. Álvarez-Legorreta.** 2013. Organochlorine pesticides in nest substratum and infertile eggs of American crocodiles (Reptilia, Crocodylidae) in a Mexican Caribbean atoll. Caribbean Journal of Science 47:1–12.
- Chen, X. P., T. T. Wang, X. Z. Wu, D. W. Wang, y Y. S. Chao.** 2016. An in vivo study in mice: mother's gestational exposure to organophosphorus pesticide retards the division and migration process of neural progenitors in the fetal developing brain. Toxicology Research 5:1359–1370.
- Chi Coyoc, T. E., G. Escalona Segura, A. Vallarino Moncada, J. A. Vargas Contreras, G. E. Castillo Vela, y J. Lara Reyna.** 2016. Organochlorine and anticholinergic pesticides in wild mice from wetland ecosystems of the Gulf of Mexico. Therya 7:465–482.
- Cobos, V., M. Mora, y G. Escalona.** 2006. Inhibición de colinesterasa plasmática en el zorzal pardo (*Turdus grayi*), expuesto a diazinón en cultivos de papaya maradol en Yucatán, México. Revista de Toxicología 23:17–21.
- Custer, T. W., E. F. Hill, y H. M. Ohlendorf.** 1985. Effects of wildlife of ethyl and methyl parathion applied to California USA rice fields. California Fish and Game 71:220–224.
- Dell'Omo, G., M. G. Pleskacheva, D. P. Wolfer, H. P. Lipp, y R. F. Shore.** 2003. Comparative Effects of Exposure to an Organophosphate Pesticide on Locomotor Activity

of Laboratory Mice and Five Species of Wild Rodents. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70:138–145.

Dell’Omo, G., y R. F. Shore. 1996. Behavioral and physiological effects of acute sublethal exposure to dimethoate on wood mice, *Apodemus sylvaticus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31:91–97.

Durda, J. L., R. A. Powell, y G. T. Barthalmus. 1989. Physiological and behavioral effects of guthion on pine voles, *Microtus pinetorum*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 43:80–86.

Edward Montz, W., P. F. Scanlon, y R. L. Kirkpatrick. 1983. Effects of field application of the anti-cholinesterase insecticide methomyl on brain acetylcholinesterase activities in wild *Mus musculus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 31:158–163.

Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. J. Andres, y R. M. Featherstone. 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology* 7:88–95.

Ghodrat, E. M., P. Kazem, H. Shapour, Y. Parichehr, y N. Golamreza. 2014. The effects of pyridaben pesticide on gonadotropic, gonadal hormonal alternations, oxidative and nitrosative stresses in Balb/C mice strain. *Comparative Clinical Pathology* 23:297–303.

Giles Jr., R. H. 1970. The Ecology of a Small Forested Watershed Treated with the Insecticide Malathion: S35. *Wildlife Monographs* 3-81.

Givaudan, N., F. Binet, B. Le Bot, y C. Wiegand. 2014. Earthworm tolerance to residual agricultural pesticide contamination: Field and experimental assessment of detoxification capabilities. *Environmental Pollution* 192:9–18.

Gómez-Ugalde, R. M. 2003. Efectos de la contaminación atmosférica en poblaciones de pequeños roedores silvestres (*Microtus mexicanus*, *Peromyscus melanotis* y *Peromyscus difficilis*) en México, D. F. Tesis de Doctorado. Universitat de Barcelona. Barcelona, España.

González Váldez, L. S., R. Irigoyen Campuzano, V. Ortega Martínez, y S. V. Jáquez Matas. 2013. Comportamiento de plaguicidas persistentes en el medio ambiente. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango del Instituto Politécnico Nacional 1:1–17.

Guilhermino, L., M. C. Lopes, A. P. Carvalho, y A. M. V. M. Soares. 1996. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia Magna*. Chemosphere 32:727–738.

Habig, W. H., M. J. Pabst, y W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. The Journal of Biological Chemistry 249:7130–7139.

Helsel, D. R. 2012. Statistics for Censored Environmental Data Using Minitab and R. 2a ed. John Wiley and Sons.

Hirano, T., S. Yanai, T. Takada, N. Yoneda, T. Omotehara, N. Kubota, K. Minami, A. Yamamoto, Y. Mantani, T. Yokoyama, H. Kitagawa, y N. Hoshi. 2017. NOAEL-dose of a neonicotinoid pesticide, clothianidin, acutely induce anxiety-related behavior with human-audible vocalizations in male mice in a novel environment. Toxicology Letters 282:57-63.

Jefferies, D. J., B. Stainsby, y M. C. French. 1973. The ecology of small mammals in arable

- fields drilled with winter wheat and the increase in their dieldrin and mercury residues. *Journal of Zoology* 171:513–539.
- Jett, D. A.** 1986. Cholinesterase inhibition in meadow voles (*Microtus Pennsylvanicus*) following field applications of orthene®. *Environmental Toxicology and Chemistry* 5:255-259.
- Jin, Y., J. Wang, X. Pan, L. Wang, y Z. Fu.** 2013. cis-Bifenthrin enantioselectively induces hepatic oxidative stress in mice. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107:61–67.
- Jin, Y., L. Wang, M. Ruan, J. Liu, Y. Yang, C. Zhou, B. Xu, y Z. Fu.** 2011. Cypermethrin exposure during puberty induces oxidative stress and endocrine disruption in male mice. *Chemosphere* 84:124–130.
- Johnston, J. J.** 2000. Introduction to Pesticides and Wildlife. 771:1–5.. In *Pesticides and Wildlife* (J. J. Johnston Ed.). Washington, DC: American Chemical Society.
- Köhler, H. R., y R. Triebkorn.** 2013. Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? *Science* 341:759–765.
- Latchoumycandane, C., y P. Mathur.** 2002. Induction of oxidative stress in the rat testis after short-term exposure to the organochlorine pesticide methoxychlor. *Archives of Toxicology* 76:692–698.
- Laubscher, J. A., G. R. Dutt, y C. C. Roan.** 1971. Chlorinated insecticide residues in wildlife and soil as a function of distance from application. *Pesticide Monitoring Journal* 5:251-258.
- Limón-Pacheco, J., y M. E. Gonsebatt.** 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation*

- Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 674:137–147.
- Lincer, J. L., y J. A. Sherburne.** 1974. Organochlorines in Kestrel Prey: A North-South Dichotomy. *The Journal of Wildlife Management* 38:427-434.
- Linder, G. y G. Joermann.** 2001. Assessing Hazard and Risk of Chemical Exposures to wild mammals: Food-chain analysis and its role in Ecological Risk Assessment. Pp. 635-670. In *Ecotoxicology of Wild Mammals* (Shore, R. F. y B. A. Rattner, eds.). 1a ed. John Wiley and Sons Ltd.
- Lopaka, L.** 2013. Nondetects and Data Analysis for Environmental Data. R package version.
- Lukaszewicz-Hussain, A.** 2010. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98:145–150.
- Mackay, D., L. S. McCarty, y MacLeod, M.** 2001. On the validity of classifying chemicals for persistence, bioaccumulation, toxicity, and potential for long-range transport. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:1491-1498.
- Meyers, S. M., y J. O. Wolff.** 1994. Comparative toxicity of azinphos-methyl to house mice, laboratory mice, deer mice, and gray-tailed voles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 26:478–482.
- Morales-Prieto, N., y N. Abril.** 2017. REDOX proteomics reveals energy metabolism alterations in the liver of *M. spretus* mice exposed to p, p'-DDE. *Chemosphere* 186:848–863.
- Morris, R. D.** 1968. Effects of endrin feeding on survival and reproduction in the deer mouse, *Peromyscus maniculatus*. *Canadian Journal of Zoology* 46:951–958.

Noreña-Barroso, E., R. Sima-Alvarez, G. Gold-Bouchot, y O. Zapata-Perez. 2004.

Persistent organic pollutants and histological lesions in Mayan catfish *Ariopsis assimilis* from the Bay of Chetumal, Mexico. *Marine Pollution Bulletin* 48:263–269.

Oksanen, J., F. G. Blanchet, M. Friendly, R. Kindt, P. Legendre, D. McGlinn, P. R.

Minchin, B. R. O'Hara, G. L. Simpson, P. Solymos, M. H. H. Stevens, E. Szoecs y H.

Wagner. 2017. *Vegan: Community Ecology Package*. R package.

Panemangalore, M., y F. N. Bebe, 2000. Dermal exposure to pesticides modifies antioxidant

enzymes in tissues of rats. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes* 35:399–416.

Peakall, D. B. y McBee, K. 2001. Biomarkers for Contaminant Exposure and Effects in

mammals. Pp. 551–576 In *Ecotoxicology of Wild Mammals* (Shore, R. F. y B. A. Rattner, eds.). 1a ed. John Wiley & Sons Ltd..

Perez-Gonzalez, E., U. G. Osuna-Martinez, M. N. Herrera-Moreno, G. D. Rodriguez-Meza,

H. A. Gonzalez-Ocampo, y M. Bucio-Pacheco. 2017. Organochlorine Pesticides in Gonad, Brain, and Blood of Mice in Two Agricultural Areas of Sinaloa. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 98:454–459.

Peris-Sampedro, F., I. Reverte, P. Basaure, M. Cabré, J. L. Domingo, y M. T. Colomina.

2016. Apolipoprotein E (APOE) genotype and the pesticide chlorpyrifos modulate attention, motivation and impulsivity in female mice in the 5-choice serial reaction time task. *Food and Chemical Toxicology* 92:224–235.

R Core Team. 2016. *R: A language and environment for statistical computing*.

Ramírez, J. A., y M. Lacasaña. 2001. *Plaguicidas: Clasificación, Uso, Toxicología Y*

Medición De La Exposición. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales*. 4:67–75.

Rattner, B. A., y D. J. Hoffman. 1984. Comparative toxicity of acephate in laboratory mice, white-footed mice, and meadow voles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 13:483–491.

Rendón von Osten, J., M. Memije-Canepa, y N. A. Ek-Moo. 2005. Plaguicidas Orgánicos Persistentes (POPs) en Sedimentos de la Costa Sur de Campeche, México. Pp. 249–260 In *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias* (A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot, y C. Agraz-Hernández, Eds.). 2da. edición.). Universidad Autónoma de Campeche. Campeche, México.

Rodríguez-Castellanos, L., y J. C. Sanchez-Hernandez. 2007. Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. *Journal of Pesticides Sciences* 32:360–371.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2014.

Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Que establece Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. Mexico. 26 de agosto de 2015 .

SAGARPA. 2015. Avance e producción agrícola con tecnificación del riego en Quintana Roo. Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación.

Sheffield, S. R., K. Sawicka-Kapusta, J. B. Cohen, y B. A. Rattner. 2001. Rodentia and lagomorpha. Pp. 215–314 In *Ecotoxicology of Wild Mammals* (F. Shore, R y B. A. Rattner, Eds.). New York. John Wiley and Sons Ltd.

van der Oost, R., J. Beyer, y N. P. E. Vermeulen. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*

13:57–149.

Westlake, G. E., A. D. Martin, P. I. Stanley, y C. H. Walker. 1983. Control enzyme levels in the plasma, brain and liver from wild birds and mammals in Britain. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 76:15–24.

Wolfe, J. L., y R. J. Esher. 1980. Toxicity of carbofuran and lindane to the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*) and the cotton mouse (*P. gossypinus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 24:894–902.

Yilmaz, H. R., E. Yüksel, y Y. Türköz. 2004. The effect of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on some antioxidant enzymes in kidneys of the second cross offsprings mice. *Arastirma* 11:6-9.

Zar, J. H. 2010. *Biostatistical Analysis* (5th ed.). Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River, N.J.

Zhang, H., Z. Wang, B. Lu, C. Zhu, G. Wu, y V. Walter. 2007. Occurrence of organochlorine pollutants in the eggs and dropping-amended soil of Antarctic large animals and its ecological significance. *Science in China Series D: Earth Sciences* 50:1086–1096.

Zhao, Y., Y. Zhang, G. Wang, R. Han, y X. Xie. 2016. Effects of chlorpyrifos on the gut microbiome and urine metabolome in mouse (*Mus musculus*). *Chemosphere* 153:287–293.

Figuras y tablas

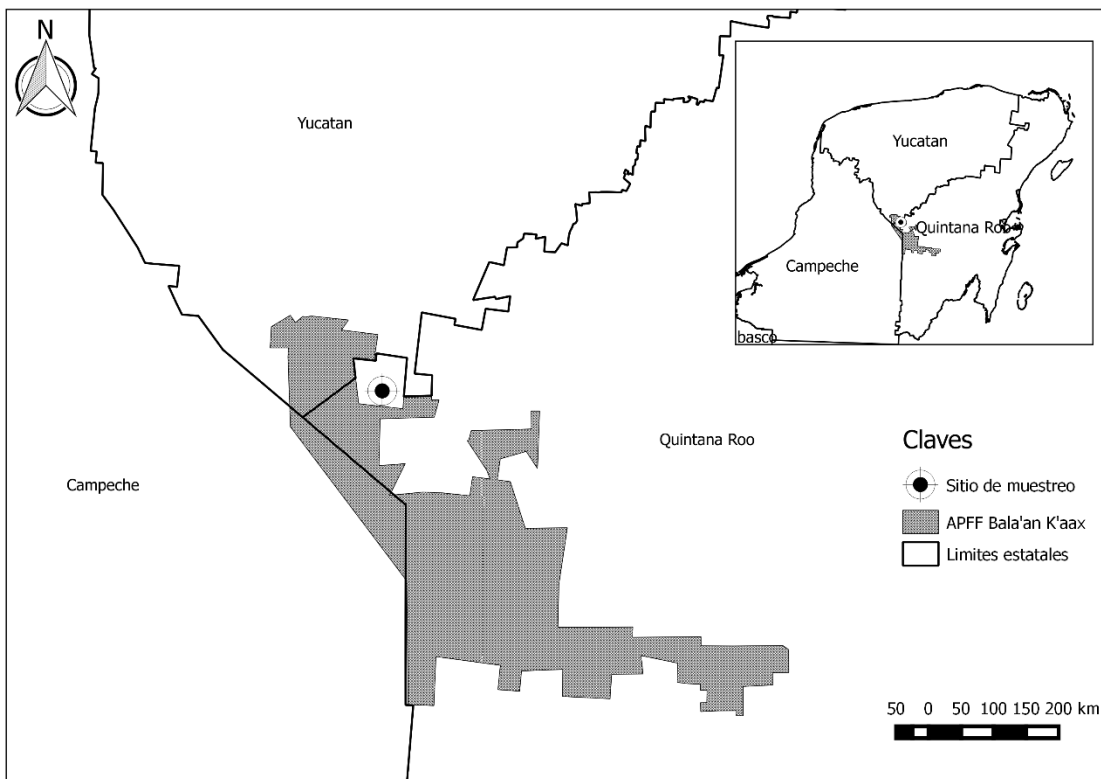


Figura 1. Área de muestreo, ubicada en las coordenadas $19^{\circ} 35' 24.70''$ N, $-89^{\circ} 10' 51.20''$ O; dentro de la comunidad Maya de Xnoh Cruz, en el municipio de José María Morelos, Quintana Roo, la cual se encuentra aledaña al APFF de *Bala'an k'aax*.

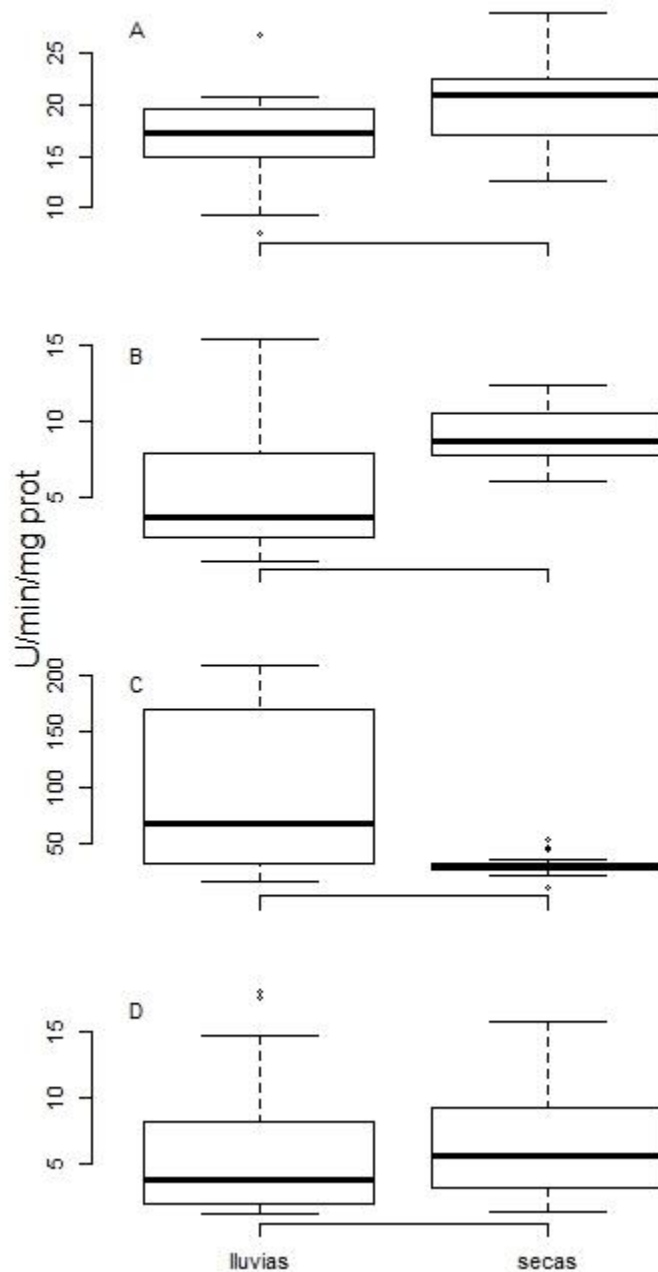


Figura 2. Actividad de los BM en tejidos de *Mus musculus*, capturados en campos agrícolas. La comparación se realizó por temporadas climáticas, la AChE fue evaluada en cerebro (A) y músculo (B), en tanto que GST (C) y CAT (D) fueron analizadas en hígado. Los resultados están representados como las medianas, los cuartiles (caja); las actividades son expresadas como U/minuto/mg de proteína.

Tabla 1. Plaguicidas organoclorados (OC) analizados en tejido hepático de *Mus musculus*; LD=

Limite de detección, LR= Límite de Reporte

Isómero y/o Metabolitos Analizados	LD µg / g	Grupo	LR µg/g
α HCH	0.003		
β HCH	0.004	HCHs	0.007
χ HCH	0.003		
δ HCH	0.002		
Aldrin	0.004		
Dieldrin	0.004	DRINES	0.0018
Endrin	0.009		
Endrin aldehído	0.010		
Endrin cetona	0.005		
Endosulfán I (alfa)	0.005	Endosulfanes	0.007
Endosulfán II (beta)	0.006		
Endosulfán sulfato	0.005		
o,p' DDE	0.005	DDTs	0.001
p,p' DDE	0.004		
o,p' DDD	0.031		
p,p' DDD	0.025		
o,p' DDT	0.013		
p,p' DDT	0.010		
Trans Clordano	0.004	Clordanos	0.009
Cis Clordano	0.004		
Metoxicloro	0.018	Metoxicloro	0.01
Mirex	0.006	Mirex	0.006
Heptacloro	0.004	Heptacloro	0.013
Heptacloro Epóxido	0.004		

Tabla 2. Medias de actividad de los BM por temporada climática, los valores están expresados como U/min/mg de proteína. También se presentan los valores estadísticos t (paramétricos), W (no paramétricos); ds= desviación estándar; máx= valor máximo; min= valor mínimo; gl= grados de libertad; p= probabilidad estadística; * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001 .

Temporada	n	AChE cerebro				t	W	gl	p	$\alpha = 0.05$
		media	DS	máx	min					
lluvias	17	16.81	4.55	26.86	7.43	-2.0752	-	31.99	0.046	*
secas	17	20.07	4.63	29	12.55					
		AChE músculo								
lluvias	17	5.5	4.32	15.42	0.87	-3.1859	-	20.49	0.004	**
secas	18	9.07	1.68	12.43	6.01					
		GST								
lluvias	17	98.36	74.8	208.6	15.75	-	253	-	0.0006	***
secas	18	30.53	9.48	52.6	10.63					
		CAT								
lluvias	17	6.15	5.76	17.99	1.19	-	127	-	0.404	-
secas	18	6.24	3.94	15.72	1.32					

Tabla 3. Correlaciones de Spearman entre concentraciones de plaguicidas organoclorados y caracterización de la actividad de los BM analizados en los ratones. Los valores en negritas representan la significancia de $p \leq 0.05$.

	AChE CEREBRO		ACHE MÚSCULO		GST		CAT	
	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p
HCHs	0.036	0.842	-0.014	0.937	0.043	0.805	-0.260	0.131
DRINES	-0.489	0.003	-0.084	0.630	0.118	0.501	0.172	0.323
ENDOSULFAN	-0.240	0.172	-0.259	0.133	-0.036	0.839	-0.079	0.653
DDTs	-0.093	0.601	0.022	0.899	0.008	0.965	0.061	0.730
CLORDANOS	-0.392	0.022	-0.260	0.131	0.062	0.724	0.010	0.954
HEPTACLOROS	-0.186	0.293	-0.119	0.497	-0.058	0.741	0.033	0.849
METOXICLORO	-0.192	0.277	-0.068	0.697	0.099	0.573	-0.072	0.680

Tabla 4. Resumen de concentraciones de contaminantes ($\mu\text{g/g}$) en hígado de *Mus musculus*. OC= Plaguicida

Organoclorado; D= número de datos detectados; ND= número de datos no detectados; DE= Desviación estándar.

Peso Grasa

	Lluvias							Secas						
	D	ND	ND %	Min	Máx	Media	DE	D	ND	ND %	Min	Máx	Media	DE
OC														
HCHs	7	10	58.82	0.007	82.213	10.34	28.37	5	13	72.222	0.007	303.116	23.37	75.94
DRINES	10	7	41.176	0.002	135.532	21.69	43.936	8	10	55.555	0.002	279.35	22.691	66.579
ENDOSULFAN	4	13	76.47	0.007	89.165	23.127	27.844	5	13	72.222	0.007	195.783	18.027	48.257
DDTs	4	13	76.47	0.01	303.812	39.522	111.434	8	10	55.555	0.01	702.315	45.947	170.208
CLORDANOS	9	8	47.058	0.009	32.109	6.633	11.318	6	12	66.666	0.009	120.856	15.023	29.304
HEPTACLOROS	5	21	70.588	0.013	54.537	10.606	17.97	8	10	55.555	0.013	227.825	18.473	54.433
METOXICLORO	2	15	88.235	0.01	232.528	232.53	0.01	3	15	83.333	0.01	524.625	60.177	137.962

Peso Húmedo

	Lluvias							Secas						
	D	ND	ND %	Min	Máx	Media	DE	D	ND	ND %	Min	Máx	Media	DE
OC														
HCHs	7	10	58.82	0.005	0.023	0.009	0.007	5	13	72.222	0.004	49.93	2.77	12.78
DRINES	7	10	58.82	0.002	0.042	0.009	0.013	8	10	55.555	0.002	0.079	0.012	0.024
ENDOSULFAN	4	13	76.47	0.007	0.031	0.028	0.001	5	13	72.222	0.007	0.080	0.015	0.022
DDTs	4	13	76.47	0.001	0.094	0.019	0.031	8	10	55.555	0.001	0.200	0.021	0.057
CLORDANOS	9	8	47.058	0.004	0.357	0.028	0.087	6	12	66.666	0.003	0.064	0.010	0.016
HEPTACLOROS	5	21	70.588	0.003	0.017	0.007	0.009	8	10	55.555	0.003	0.065	0.009	0.014
METOXICLORO	2	15	88.235	0.010	0.072	0.072	0.000	3	15	83.333	0.008	0.148	0.016	0.040

Peso Seco

	Lluvias							Secas						
	D	ND	ND %	Min	Máx	Media	DE	D	ND	ND %	Min	Máx	Media	DE
OC														
HCHs	7	10	58.82	0.007	0.035	0.011	0.009	5	13	72.222	0.007	0.125	0.019	0.029
DRINES	7	10	58.82	0.002	0.057	0.012	0.018	8	10	55.555	0.002	0.943	0.066	0.229
ENDOSULFAN	4	13	76.47	0.007	0.037	0.037	0.0001	5	13	72.222	0.007	1.040	0.070	0.263

DDTs	4	13	76.47	0.001	0.127	0.025	0.043	8	10	55.555	0.001	1.834	0.122	0.449
CLORDANOS	9	8	47.058	0.006	0.765	0.054	0.189	6	12	66.666	0.009	0.821	0.060	0.202
HEPTACLOROS	5	21	70.588	0.004	0.023	0.008	0.010	8	10	55.555	0.004	0.094	0.013	0.021
METOXICLORO	2	15	88.235	0.010	0.097	0.097	0.000	3	15	83.333	0.010	0.216	0.028	0.056

Capítulo 4.

Biomarcadores en murciélagos fruteros del Género *Artibeus* a partir de la exposición accidental a plaguicidas en campos agrícolas en Quintana Roo, México.



INTRODUCCIÓN

Los estudios para conocer los daños ambientales por exposición a xenobióticos están cobrando mayor relevancia. Los xenobióticos son compuestos sintéticos exógenos al ambiente en el que se encuentran (van der Oost *et al.*, 2003). Estos compuestos pueden ser perjudiciales para los organismos que se encuentren expuestos de forma accidental. Un grupo particular de xenobióticos son los plaguicidas, los cuales son utilizados de forma intensiva en cultivos con sistemas de riego tecnificado (Köhler y Triebkorn 2013).

Para evaluar el daño que pueden causar dichos compuestos, se realizan pruebas toxicológicas de exposición y tolerancia en condiciones controladas, ya sea exponiendo a un compuesto o a una mezcla de ellos (Köhler y Triebkorn 2013). Sin embargo, los efectos de los plaguicidas en situaciones de vida silvestre aún están poco claros, ya que en el ambiente intervienen diversos factores que pueden influir en la disponibilidad y toxicidad de los plaguicidas (Bonnineau *et al.*, 2012). Éstas evaluaciones ecotoxicológicas, comúnmente emplean organismos bioindicadores (especies adaptadas a su ambiente) las cuales responderán a los estímulos derivados de la exposición accidental (Paoletti, 1999); así como diversas herramientas para caracterizar la magnitud de los efectos, éstas pueden ser desde determinar la presencia del contaminante o bien biomarcadores, los cuales pueden ser desde efectos conductuales, o bien expresión enzimática, molecular o genética (Peakall y McBee, 2001).

En vida libre, los bioindicadores para contaminación más estudiados son las aves a partir de su versatilidad ecológica (Jones *et al.*, 2009) y los pequeños mamíferos por su fácil muestreo y bajo costo (Shore y Doubent, 1994). Dentro del grupo de los pequeños

mamíferos, los murciélagos pueden ser un excelente bioindicador, para exposición por plaguicidas, dada su importancia ecológica, características fisiológicas y sus hábitos alimenticios. Sin embargo, son poco utilizados como bioindicadores toxicológicos (Jones *et al.*, 2009). Por ejemplo, para el año de 2013 en publicaciones referentes al efecto de los plaguicidas en organismos (laboratorio o vida libre), los trabajos realizados con murciélagos representaron menos del 1% (Köhler y Triebkorn, 2013).

Los trabajos con quirópteros (la mayoría de estos trabajos realizados hasta antes de 1997), principalmente están enfocados en determinar la bioacumulación de contaminantes orgánicos en sus tejidos (Clark Jr. y Shore, 2001). Dichos estudios son hechos en especies de murciélagos insectívoros ya que sus hábitos alimenticios los hacen más propensos a incorporar estos contaminantes en sus organismos; finalmente relacionan estos datos a las bajas o pérdidas poblacionales de las especies expuestas (Bayat *et al.*, 2014).

En la actualidad se está recobrando el interés por estudiar a los murciélagos desde un punto de vista ecotoxicológico, particularmente poniendo mayor interés a los efectos subletales derivados de la exposición a diversos xenobióticos, esto los pueden hacer susceptibles a enfermedades o a deficiencias en sus actividades normales (Amaral *et al.*, 2012; Eidels *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2018). Es importante conocer los efectos subletales (de los cuales se tiene poca información) para establecer situaciones de riesgo para este grupo de mamíferos, ya que se estima que alrededor del 16% de las especies de murciélagos del mundo están en alguna categoría de riesgo, considerando como uno de los principales factores la urbanización y particularmente la intensificación agrícola (Park, 2015). En este sentido, los biomarcadores (BM) son una herramienta importante

para conocer estos efectos, previo a que sucedan daños a una escala mayor. Los BM son una respuesta biológica derivada de la exposición a compuestos químicos, generando una medida del grado de exposición y algunas veces también muestra el efecto tóxico (Peakall, 1994), además nos pueden dar señales tempranas de intoxicación, antes de tener efectos irreversibles (enfermedades, declinación poblacional).

Dentro de la amplia gama de BM, hay tres enzimas que reflejan el efecto adverso de la exposición a plaguicidas. La AChE es un BM de neurotoxicidad, la cual que evalúa la exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos (van der Oost *et al.*, 2003). En presencia de estos plaguicidas, la actividad de la AChE se encontrará inhibida en relación a su condición normal. La glutatión-S-transferasa (GST) es un BM que evalúa la exposición a una amplia variedad de xenobióticos, los cuales al entrar al organismo provocan situaciones de estrés oxidativo en las células, es una enzima involucrada en los procesos de biotransformación (fase II del metabolismo de xenobióticos), presenta baja especificidad de sustrato y su función es hacer más hidrosoluble al compuesto exógeno y permitir que sea excretado más fácil del organismo (van der Oost *et al.*, 2003). Y la catalasa (CAT) que es una enzima antioxidante involucrada en los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo, convierten el H_2O_2 (proveniente de fases previas de desintoxicación) en agua y O_2 , se encuentran principalmente en suborganelos como los peroxisomas y en menor medida en mitocondria y retículo endoplásmico (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009b), además de la degradación del H_2O_2 , cuando éste se encuentra en concentraciones bajas, la CAT participa en la desintoxicación de otros sustratos, como fenoles y alcoholes (Regoli y Giuliani, 2014).

En México, la intensificación agrícola en la Península de Yucatán, y su conducente tecnificación, principalmente mediante a implementación de sistemas de riego, monocultivos y el uso repetido de plaguicidas, provoca un escenario de riesgo para la fauna silvestre que cohabita en las zonas de cultivo de esta región. Particularmente en el Municipio de José María Morelos en el Estado de Quintana Roo, las principales actividades agrícolas son maíz, frijol, calabaza, cítricos (cultivos de temporal), así como cultivos tecnificados como la caña de azúcar, papaya y sandía (SAGARPA, 2015a). En los cultivos tecnificados de esta región (sandía y papaya) se utilizan diversos agroquímicos para evitar pérdidas a causa de plagas o deficiencias nutrimentales en el suelo. Sin embargo, son aplicados sin medidas apropiadas de seguridad, por lo que pueden representar un riesgo para los organismos expuestos accidentalmente a estos compuestos.

Los cultivos en este Municipio se encuentran aledaños a zonas de selva mediana, y próximas a áreas de conservación, por ejemplo, el Área de Protección de Flora y Fauna de *Bala'an Ka'ax* (APFFBK). Esta reserva es refugio de diversas especies de fauna, muchas de ellas en alguna categoría de riesgo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana 059, y aunque el inventario en esta zona de conservación es incompleto, se estima que alberga 47 especies de murciélagos (SEMARNAT, 2007); entre la cuales se encuentran tres especies de murciélagos fruteros del género *Artibeus*, los cuales desempeñan una labor importante en cuanto a la dispersión de semillas de frutos de la región, como el zapote (*Manilkara zapota*), la guayaba (*Psidium guayava*), nance (*Byrsonima crassifolia*) y ramón (*Brosimum alicastrum*).

Por lo tanto, resulta interesante conocer las repercusiones toxicológicas que puedan tener los plaguicidas utilizados en los cultivos productivos de esta región sobre la quiroptero fauna expuesta de manera accidental, con el propósito de elucidar posibles efectos subletales. Para este propósito se evaluaron biomarcadores enzimáticos de exposición sobre murciélagos fruteros del género *Artibeus* (bioindicadores), los cuales se alimentan de los árboles que se encuentran en la periferia de los cultivos. En una primera instancia, a una escala espacial comparando individuos capturados en una en una zona de cultivo tecnificado y contrastando los resultados con murciélagos del mismo género procedentes de un área conservada (APFFBK). Asimismo, se evaluó el efecto a una escala temporal contrastando la respuesta de los biomarcadores entre temporadas de lluvias y secas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Se determinaron dos sitios de captura de murciélagos. Uno se ubicó en las coordenadas 19°35'24.70"N y 89°10'51.20"O; está dentro de la zona de influencia de plaguicidas, está inmerso en un cultivo con riego tecnificado perteneciente a la comunidad indígena de *X noh cruz* (Figura 1). El campo agrícola es destinado durante los primeros cinco meses del año para el cultivo de sandía (enero–mayo) particularmente para la comercialización, en tanto que el resto del año se utiliza para cultivos de temporal de autoconsumo como el maíz, calabaza y frijol. La zona está rodeada de manchones de selva mediana y a una distancia de 50 km de la cabecera municipal.

El segundo sitio se encuentra en las coordenadas 19°29'2.00"N, 89° 2'7.40"O, ubicadas dentro del APFFBK y a 20 kilómetros de distancia del punto 1, esta zona se tomó como un sitio de referencia (zona conservada) de no contacto directo con plaguicidas usados en zonas de cultivo. Los tipos de vegetación predominantes son la selva mediana subperennifolia, selva mediana subcaducifolia y selva baja subperennifolia. Asimismo, el APFFBK se encuentra bajo protección federal decretado en el año de 2005 (SEMARNAT, 2007).

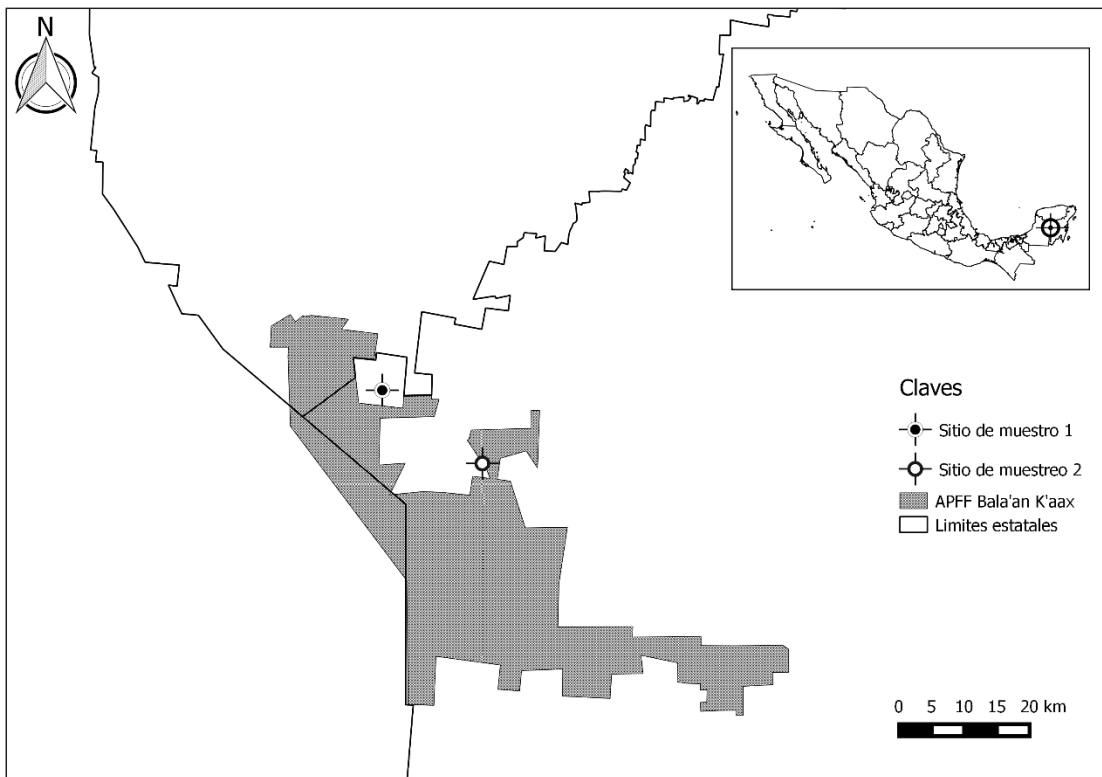


Figura 1. Localización de los sitios de muestreo. Sitio 1 (19°35'24.70"N, 89°10'51.20"O) ubicado dentro del campo agrícola de la comunidad rural de Xnoh cruz y Sitio 2 (19°29'2.00"N, 89° 2'7.40"O) ubicado dentro del APFFBK,, ambos dentro del Municipio de José María Morelos en el Estado de Quintana Roo.

Capturas

Se capturaron individuos adultos de dos especies de murciélagos del Género *Artibeus* (*A. lituratus* y *A. jamaicensis*), debido a que fueron las dos especies más capturadas durante el periodo de muestreo. Las capturas fueron realizadas entre febrero y septiembre de 2015 (seis meses, divididos en lluvias y secas) Se determinó este periodo de muestreo ya que coincide tanto con las principales actividades agrícolas de la comunidad de Xnoh cruz (Sitio 1). El resto del año (octubre, noviembre, diciembre) las tierras de cultivo se dejan en reposo. Los animales se capturaron mediante la utilización de tres redes de niebla (6 x 3 m) por cada noche de muestreo. El tiempo de muestreo abarcó de las 19:00 a las 01:00 hrs, las redes se revisaron cada 30 min para la colecta de los individuos. En ambos sitios de captura, las redes fueron colocadas en zonas de paso y alimentación de los murciélagos. En la zona de cultivo se instalaron cerca de árboles frutales (zapote, nance) ubicados en las orillas de las parcelas, en tanto que en la APFFBK se colocaron a la orilla de un cuerpo de agua. Los individuos fueron identificados mediante utilización de guías de campo y se les tomaron medidas morfométricas convencionales. El éxito de captura fue calculado dividiendo el número de animales capturados entre el esfuerzo de captura (número de redes por hrs/noche).

Posteriormente los individuos seleccionados fueron sacrificados *in situ*, mediante dislocación cervical de acuerdo a la NOM-033-ZOO- 1995, para la eutanasia de animales domésticos y silvestres. Se diseccionaron y tomaron muestras de cerebro, hígado y músculo esquelético para los análisis de biomarcadores, los tejidos se almacenaron en nitrógeno líquido y se transportaron al laboratorio donde se conservaron a -80°C.

Análisis de los Biomarcadores

Se analizaron tres biomarcadores enzimáticos para evaluar la exposición a plaguicidas. La acetilcolinesterasa (AChE), evaluada en cerebro, el cual es el lugar de mayor concentración en vertebrados (Çokuğraş, 2003). Su actividad se determinó de acuerdo al método de Ellman *et al.* (1961), adaptado a microplaca (Guilhermino *et al.*, 1996) las muestras se prepararon con una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.2. La cinética enzimática fue registrada a una longitud de onda de 414 nm y expresada en nanomoles de acetilcolina hidrolizada por minuto por miligramo de proteína (nmol/min/mg de prot) y utilizando un coeficiente de extinción de $13.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La actividad de la GST se determinó en hígado (órgano al que llegan todas las sustancias transportadas en el torrente sanguíneo) de acuerdo al método de Habig *et al.* (1974). Se empleó una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.5 para la preparación de las muestras, determinando la cinética enzimática a una longitud de onda de 340 nm, expresando la actividad como nmol de S-(2,4-dinitrofenil) glutatión generados por minuto por miligramo de proteína y se utilizó un coeficiente de absorción de $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Al igual que la GST, la actividad de la CAT fue determinada en hígado, midiendo la disminución del H_2O_2 a 240 nm, mediante el método de Aebi (1984). Se utilizó una solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM pH 7, la actividad se expresó como U de peróxido generado por minuto por miligramo de proteína. La concentración de proteína (para los tres BM) se determinó mediante el método de Bradford (1976), a 595 nm y expresada como mg/ml. Para todos los análisis de biomarcadores y de proteína se determinó su actividad utilizando microplacas (Corning®) en un espectrofotómetro

(Thermo Scientific Multiskan Spectrum). Para el análisis de los tres biomarcadores todas las muestras se homogenizaron durante 20 s, utilizando un homogenizador (PRO Scientific 250®) con la solución amortiguadora específica para cada BM de acuerdo al método empleado.

Análisis estadísticos

En una primera instancia se verificó que se cumplieran los supuestos de normalidad, la homocedasticidad de varianzas y normalidad de los residuales. De acuerdo con esto, en caso de cumplir con los supuestos se crearon modelos lineales (LM), en caso de no cumplirlos se crearon modelos lineales generalizados (GLM). Posteriormente a través del modelo se realizaron análisis de varianza (ANOVA) anidados, en el que se tomó como variable de respuesta la actividad de cada BM y como variables predictoras la especie, el sexo, la localidad y la temporada climática. Posterior a esta prueba, no se tomaron en cuenta las variables que no influyeron en el análisis. Para todas las pruebas el nivel de significancia se consideró con un $\alpha \leq 0.05$ (Zar, 2010). Todos los análisis se realizaron utilizando el software R versión 3.2.4 (R Core Team, 2016) y con el paquete gmodels 2.16.2 para la generación de los LM (Warnes *et al.*, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Éxito de captura

Se capturaron un total de 88 individuos (50 en lluvias y 38 en secas). De *A. lituratus*, se capturaron 39 individuos (24 machos y 15 hembras) para la temporada de secas y 27 (22 machos y 5 hembras) para la temporada de lluvias, mientras que de *A. jamaicensis* 11 fueron colectados (7 machos y 4 hembras) durante la temporada de secas

y 11 (10 machos y 1 hembra) para la temporada de lluvias. El esfuerzo de captura fue de 504 hr/red, con 216 hr/red para la temporada seca y 288 hr/red para la temporada de lluvias. El éxito de captura total se estimó en 0.174 individuos/horas-red (Tabla 1).

Tabla 1. Éxito de captura y esfuerzo de captura para ambas temporadas climáticas en las zonas de estudio.

variables	temporada		
	secas	lluvias	total
Individuos capturados	50	38	88
Esfuerzo de muestreo (hr-red/noche)	216	288	504
Éxito de captura	0.23	0.13	0.174

Actividad de los Biomarcadores enzimáticos.

Después de analizar los BM en cada uno de los tejidos, se determinó la estadística descriptiva para cada uno de ellos entre cada temporada climática y entre localidades. (Tabla 2). Se generaron GLMs a partir de la actividad de los tres BM ya que no se cumplieron los supuestos de normalidad. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas entre especies (AChE, $F_{(1,83)} = 0.352$, $p > 0.05$; GST, $F_{(1,83)} = 2.89$, $p > 0.05$ y CAT, $F_{(1,83)} = 1.275$, $p > 0.05$), por lo que se determinó evaluar a los individuos como un solo género (*Artibeus*). Además, tampoco se consideró al sexo como variable, ya que no influyó en la varianza de los datos, debido a que tampoco se encontraron diferencias significativas en esta variable (AChE, $F_{(1,83)} = 0.936$, $p > 0.05$; GST, $F_{(1,84)} = 0.728$, $p > 0.05$ y CAT, $F_{(1,83)} = 1.967$, $p > 0.05$) (Tabla 3).

Tabla 2. Estadística descriptiva de la actividad de los biomarcadores por temporada climática, expresada como U/min/mg de proteína. de = desviación estándar; ee = error estándar; máx = valor máximo; min = valor mínimo.

		TEMPORADA					
		AChE					
	<i>n</i>	media	de	mediana	ee	máx	min
secas	49	47.01	17.48	46.1	2.5	99.39	16.4
lluvias	38	20.34	5.52	20.51	0.9	32.08	8.06
		GST					
secas	50	91.09	41.92	78.81	5.93	212.74	40.45
lluvias	38	78.72	51.08	73.35	8.29	236.8	13.36
		CAT					
secas	49	4.65	3.38	3.97	0.48	14.98	0.2
lluvias	38	7.19	7.7	3.88	1.25	29.54	0.43
		LOCALIDAD					
		AChE					
	<i>n</i>	media	de	mediana	ee	máx	min
Xnoh cruz	39	36.64	20.1	32.08	3.22	74.39	8.06
Bala'an k'aax	48	34.32	18.19	28.73	2.62	99.39	14.63
		GST					
Xnoh cruz	40	81.05	27.69	78.81	4.38	136.2	15.75
Bala'an k'aax	48	89.66	57.33	74.46	8.27	236.8	13.36
		CAT					
Xnoh cruz	40	4.05	4.66	2.12	0.74	22.67	0.43
Bala'an k'aax	47	7.22	6.29	5.2	0.92	29.54	0.20

En el caso de la AChE, únicamente se encontraron diferencias significativas entre temporadas ($F_{(1,83)} = 80.86$, $p < 0.001$; Tabla 3). La actividad media registrada durante la temporada de secas fue de 47.01 ± 17.48 U/ min/mg de proteína, en tanto que para la temporada de lluvias fue de 20.34 ± 5.52 U/ min/mg de proteína, lo cual representa una inhibición de cerca de 57% (Tabla 2, Figuras 2a,d).

Para la GST no se encontraron diferencias significativas ni entre temporadas climáticas, ni entre localidades (Tabla 3). Cabe mencionar que los promedios de actividad

de este BM estuvieron entre los 78.72 ± 51.08 y 91 ± 41.92 U/min/mg de proteína, lo que representa muy poca variación a lo largo del periodo de estudio y entre los puntos de muestreo (Tabla 2, figuras 2b,e).

En la CAT únicamente se encontraron diferencias significativas entre localidades ($F_{(1,83)} = 7.27$, $p < 0.01$; Tabla 3). La actividad media de la CAT durante las lluvias fue de 7.19 ± 7.7 U/min/mg de proteína, la cual fue casi 35% más elevada en relación con la temporada de secas (4.65 ± 3.38 U/min/mg de proteína). En el caso de las localidades, se encontraron valores similares, para la ZPFFBK la actividad media de la CAT fue de 7.22 ± 6.29 U/min/mg de proteína, representando un aumento del 44% en relación con la comunidad agrícola de Xnoh cruz, la cual fue de 4.05 ± 4.66 U/min/mg de proteína (Tabla 2, figuras 2c, f).

Tabla 3. Análisis de varianza realizados a través de GLM para comparar diferencias en la actividad de BM entre especies, sexo, localidades y temporadas climáticas. gl= Grados de libertad; SM= Suma de cuadrados; CM= Cuadrado medios; F = valor estadístico de Fisher; p = probabilidad estadística; en negritas se ponen los valores significativos.

ANOVA						
		gl	SC	CM	F	p
AChE	especie	1	66	66	0.352	0.67
	sexo	1	176	176	0.936	0.49
	localidad	1	109	109	0.580	0.433
	temporada	1	15223	15126	80.86	< 0.001
	residuales	83	2813.4	33.9		
GST	especie	1	5939	5939	2.891	0.09
	sexo	1	1495	1495	0.728	0.40
	localidad	1	2052	1620	0.999	0.32
	temporada	1	6005	3593	2.923	0.09
	residuales	83	170493	2054		
CAT	especie	1	38.6	38.65	1.275	0.26
	sexo	1	59.6	59.63	1.967	0.16
	localidad	1	220.3	220.3	7.269	<0.01
	temporada	1	79.41	79.41	2.620	0.11
	residuales	82	2485	30.31		

Los modelos generados a partir de los LM mostraron que no hay diferencias en la actividad de los BM entre las dos especies del género *Artibeus* analizadas (*A. lituratus* y *A. jamaicensis*). Estas son dos de las tres especies que habitan la Península de Yucatán, particularmente en esta región cohabitan en los mismos hábitats, perchan en los mismos refugios, explotan los mismos nichos y pertenecen al mismo gremio alimenticio. De tal modo que, fueron capturados indistintamente en las mismas zonas (cerca de árboles frutales), siendo más abundantes los organismos de la especie *A. lituratus*, capturándolos en una proporción de casi 4:1 en relación a *A. jamaicensis*.

Al comparar la actividad de los BM entre sexos de los murciélagos analizados, no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, algunos trabajos reportan diferencias en el factor de bioacumulación de algunos COPs entre sexos los cuales podrían estar determinados por las etapas reproductivas (Valdespino y Sosa 2017). Asimismo, aunque varios trabajos reportan los impactos por exposición a plaguicidas sobre aspectos reproductivos en otros mamíferos, tales como disrupción endócrina o falla reproductiva (Berny 2007; Shore y Rattner 2001), el sexo no tuvo influencia en el análisis, por lo cual fue descartado como una variable a tomar en cuenta. Esto hace suponer que los periodos reproductivos y las etapas de cada uno de estos, particularmente en las hembras (preñez y lactancia), no influyen en la manera en que se expresan los BM analizados en los organismos.

Temporadas climáticas

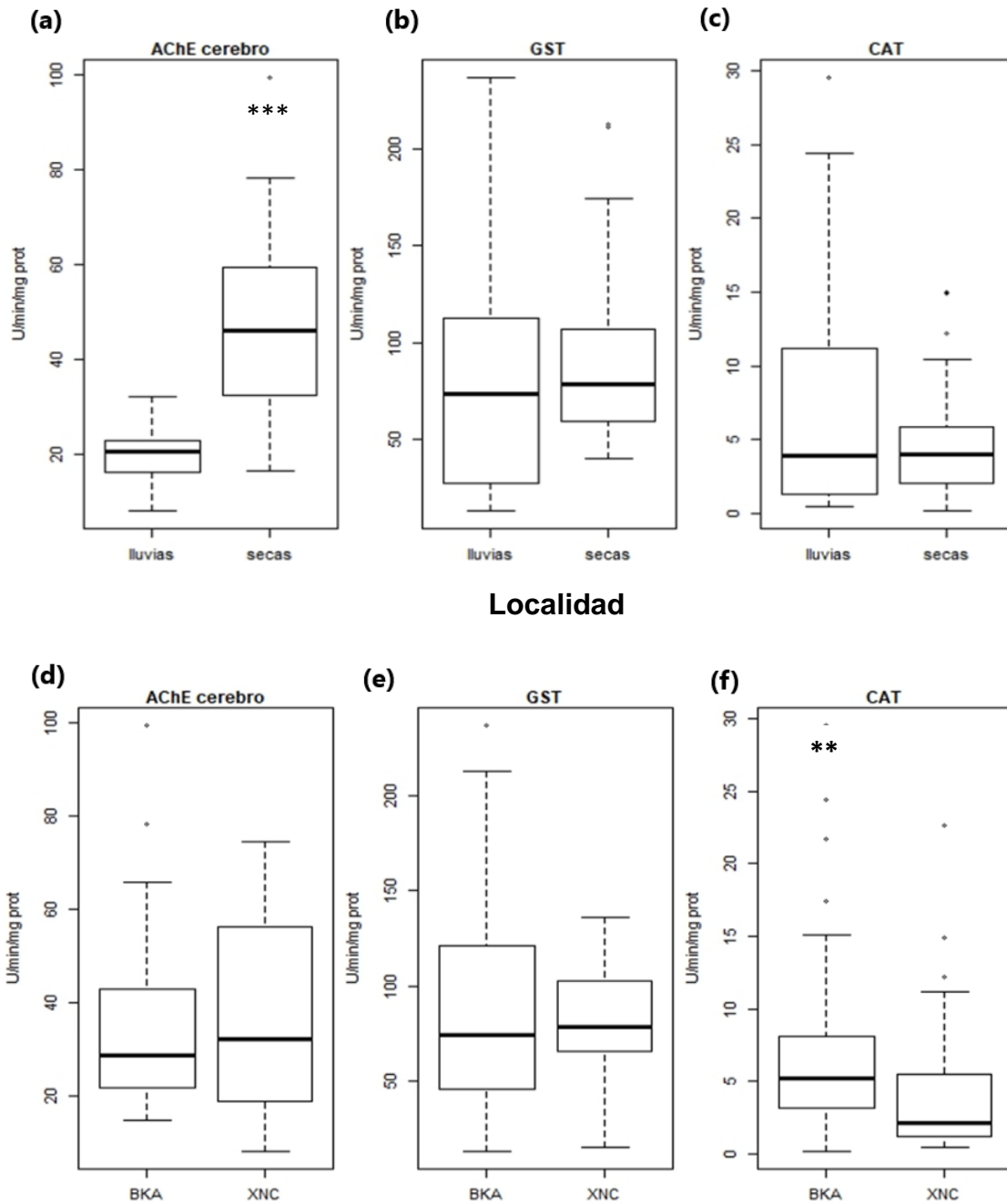


Figura 2. Actividad de los BM en tejidos de murciélagos. Los resultados están representados como las medianas, los cuartiles (caja), y las líneas de DE; las actividades son expresadas como U/minuto/mg de proteína. Comparación entre temporadas climáticas: (a) actividad de AChE; (b) actividad de GST; (c) actividad de CAT. Comparación entre localidades: (d) actividad de AChE, (e) actividad de GST (f) actividad de CAT; BKA= Zona de protección de Flora y Fauna de Bala'an k'aax; XNC= comunidad agrícola de Xnoh Cruz (** ≤ 0.01 ; *** ≤ 0.001).

La actividad de la AChE únicamente se vio alterada al realizar las comparaciones entre temporadas climáticas, en donde se registró una inhibición de actividad de más del 50% en la temporada de lluvias. Esto podría deberse a que durante la temporada de lluvias coincide con el desarrollo de cultivos de temporal (maíz, calabaza, frijol), en los cuales, a pesar de no utilizar un volumen elevado de plaguicidas, ocupan mayor extensión territorial en la región. Asimismo, durante la época de lluvias, los murciélagos se alimentan de frutos de árboles dentro de zonas de cultivo, en donde sirven como cercos vivos como el nance o bien en huertos de traspatio en las zonas urbanas como la guayaba (Flores-Martínez *et al.*, 1999). Por lo que al alimentarse de ellos ingieren diversos plaguicidas utilizados en estas zonas.

La actividad de la AChE en murciélagos en vida libre ha sido poco documentada. Sin embargo, en estudios realizados en condiciones de laboratorio se ha caracterizado su respuesta a exposiciones controladas, realizándose principalmente en murciélagos insectívoros. Por ejemplo Eidels *et al.*, (2016), midieron la actividad de la AChE en murciélagos insectívoros de la especie *Eptesicus fuscus*, después de la exposición oral a diferentes dosis. Registraron una actividad basal de AChE de 10.3 U/min/mg de proteína, la cual es hasta de 4 órdenes de magnitud menor a la registrada en el presente trabajo (murciélagos fruteros), lo que podría significar una diferencia en la asimilación de plaguicidas en función del gremio alimenticio. Asimismo, determinaron que la actividad de la AChE se alteró al cabo de 24 horas cuando se administró 3.7 µg/g de clorpirifos (OF). En este contexto, existen varios trabajos que caracterizan la inhibición de la AChE después de una exposición controlada a diversos plaguicidas (Clark y Rattner 1987; Clark 1986), o bien donde se le considera la causa de la muerte o declinación poblacional

(Clark, 1988; Eidels *et al.*, 2013), sin embargo, esos análisis son post mortem, además no se analizan entre sitios de aplicación y áreas de conservación o por temporadas climáticas en condiciones de vida libre.

La inhibición de la AChE para la temporada de lluvias sugiere la presencia de agentes anticolinérgicos para esta época. Sin embargo, la poca variación que se registró entre localidades, sugiere que la situación de riesgo no se da por una exposición puntual (espacial), sino por una exposición temporal. Es difícil realizar comparaciones a escala espacial (comparación de sitios), ya que los estudios a este nivel son limitados o inexistentes (Bayat *et al.*, 2014).

La exposición a diversos plaguicidas puede provocar la aparición de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las células, y su acumulación deriva en situaciones de estrés oxidativo. Cuando en el organismo ingresa un agente xenobiótico, derivado de la exposición, se activan diversos mecanismos de defensa (van der Oost *et al.*, 2003). Particularmente la GST, se involucra en las reacciones de la fase II del metabolismo de desintoxicación, biotransformando compuestos exógenos haciéndolos más hidrosolubles para facilitar su excreción (Oliveira *et al.*, 2017).

Los niveles de GST registrados en el presente trabajo se mantuvieron estables, sin diferencias significativas al ser comparados tanto entre temporadas climáticas como entre localidades, con medias de actividad oscilando entre 91 y 78 U/min/mg de proteína. Sin embargo, las medias de actividad estuvieron muy por encima (4 veces) de las registradas por Oliveira *et al.* (2017) e incluso más de 10 veces (Oliveira *et al.*, 2018), ambos estudios exponiendo murciélagos fruteros (*A. lituratus*) a OF y piretroides. En ambos trabajos registraron un aumento de actividad conforme aumentaban la dosis del

plaguicida. La elevada actividad registrada en nuestro trabajo (en comparación con los trabajos referidos) podría sugerir que el sistema de desintoxicación de los murciélagos capturados está constantemente activado. Sin embargo, se deben establecer valores base de actividad de estos animales en condiciones controladas o bien en lugares más alejados, para poder precisar si se encuentran en alguna situación de riesgo.

Con respecto a lo antes mencionado, cuando hay una situación de estrés oxidativo por exposición a plaguicidas, el organismo de los murciélagos activa también las defensas antioxidantes. En esta parte del proceso una de las enzimas involucradas es la CAT, la cual actúa transformando el H_2O_2 en oxígeno y agua (van der Oost *et al.*, 2003). En el presente trabajo, se encontraron diferencias significativas entre temporadas climáticas y entre localidades.

La actividad de la CAT durante la temporada de lluvias fue mayor en relación a la temporada de secas. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas. Al igual que en la AChE, esta alteración en esta temporada coincide con el desarrollo de los cultivos de temporal, por lo que se puede deducir que los agroquímicos utilizados están provocando situaciones de estrés en los murciélagos expuestos. A diferencia de otros mamíferos, los murciélagos poseen la habilidad de mantener bajos niveles de estrés oxidativo, ya que debido a sus ciclos de vida amplios, sus proteínas tienden a oxidarse menos, manteniendo una homeostasis celular más estable (Salmon *et al.*, 2009) por lo que pueden resistir más a la exposición a plaguicidas que otros grupos de animales. Además a partir de su dieta a base de frutos (muchos de ellos con alto contenido de antioxidantes) pueden hacer frente a situaciones de estrés oxidativo ya que fortalecen su sistema antioxidante (Schneeberger *et al.*, 2014).

Es de llamar la atención que la actividad de la CAT fue significativamente más elevada en los organismos capturados en la ZPFFBK, la cual es un área protegida. Se podría esperar que dicha actividad fuera más alta en los organismos de la comunidad agrícola de *Xnoh cruz*, dentro de la cual se encuentran amplias extensiones campos agrícolas y por lo tanto una exposición directa a plaguicidas. En este contexto, cuando hay una intensa producción de ERO en la célula se activan las defensas antioxidantes, para evitar un daño celular. Sin embargo, cuando hay una sobrecarga metabólica de las enzimas antioxidantes ocurre un agotamiento enzimático, lo cual compromete su síntesis (Oliveira *et al.*, 2017).

Cabe mencionar la que los niveles de actividad de la CAT registrados en el presente trabajo, estuvieron por arriba de los reportados en el trabajo realizado por Oliveira *et al.* (2017), quienes reportan una actividad media que oscila entre 0.8 y 0.4 U/min/mg de proteína, de organismos control y expuestos a endosulfán respectivamente. Esta actividad es hasta 8 veces menor a la registrada en el presente trabajo (entre 4 y 7 U/min/mg de proteína). Por el contrario, Oliveira *et al.* (2018) reportan una actividad media más cercana a los valores que registramos en este estudio (entre 2 y 5 U/min/mg de proteína), después de una exposición controlada de un insecticida piretroide.

Con anterioridad se ha considerado a los murciélagos como un bioindicador poco adecuado para evidenciar efectos subletales de plaguicidas a partir de su exposición (Clark, 1988). Asimismo, particularmente en murciélagos se eligen a los insectívoros por encima de los frugívoros, ya que por su dieta es más fácil incorporar los plaguicidas (Bayat *et al.*, 2014). Sin embargo, los resultados recabados en el presente trabajo demuestran que son apropiados para poder elucidar efectos tanto a nivel espacial como

temporal. Su alto metabolismo hace necesario que los análisis referentes al efecto de la exposición se hagan con cierta rapidez. Asimismo, se pudo constatar la influencia de las prácticas agrícolas (a nivel temporal) sobre la homeostasis enzimática de los organismos. La poca diferencia en cuanto a la actividad de los biomarcadores entre localidades, hace necesario establecer comparaciones con organismos más aislados de la zona de influencia de plaguicidas, ya que estos podrían estar recorriendo ambas zonas durante la misma noche, dada la proximidad de las zonas de muestreo (20 kms aproximadamente).

Es necesario resaltar la importancia de los estudios con biomarcadores, los cuales caractericen los efectos subletales de la exposición a plaguicidas. Si bien anteriormente se han atribuido muertes y declinaciones poblaciones de quirópteros a los plaguicidas (Geluso *et al.* 1976; Clawson y Clark Jr 1989; Clark Jr. 2001; Eidels *et al.* 2007). Estas se hacen a partir de evidencias indirectas o midiendo contaminantes en cadáveres. Tales situaciones se pueden prevenir estableciendo situaciones de riesgo y los biomarcadores ofrecen una alternativa práctica para este propósito.

CONCLUSIONES

Esta investigación es la primera que se realiza en México en donde se evalúan los efectos subletales espacio-temporales de los plaguicidas en murciélagos en condiciones de vida silvestre. Se concluye que los plaguicidas ejercen influencia sobre la actividad de los BM modulada por las temporadas climáticas y los cultivos que se desarrollan en cada una de las temporadas. Al no encontrar diferencias entre localidades en AChE y GST, se sugiere realizar comparaciones con organismos capturados en sitios más alejados. Asimismo, se demuestra que los murciélagos fruteros son un bioindicador adecuado para evaluar

efectos subletales dada su sensibilidad en los BM analizados. Finalmente, se recomienda realizar estudios complementarios, agregando otro tipo de variables que coadyuven a establecer la situación de riesgo para la fauna que habita en esta zona de tanta relevancia ecológica.

LITERATURA CITADA

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105, 121–126.

Alleva, E., Francia, N., Pandolfi, M., De Marinis, A.M., Chiarotti, F., Santucci, D., 2006. Organochlorine and Heavy-Metal Contaminants in Wild Mammals and Birds of Urbino-Pesaro Province, Italy: An Analytic Overview for Potential Bioindicators. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 123–134.

Amaral, T.S., Carvalho, T.F., Silva, M.C., Goulart, L.S., Barros, M.S., Picanço, M.C., Neves, C.A., Freitas, M.B., 2012. Metabolic and Histopathological Alterations in the Fruit-Eating Bat *Artibeus lituratus* Induced by the Organophosphorous Pesticide Fenthion. *Acta Chiropterologica* 14, 225–232.

Bayat, S., Geiser, F., Kristiansen, P., Wilson, S.C., 2014. Organic contaminants in bats: Trends and new issues. *Environment International* 63, 40–52.

Bennett, B.S., Thies, M.L., 2007. Organochlorine Pesticide Residues in Guano of Brazilian Free-tailed Bats, *Tadarida brasiliensis* Saint-Hilaire, from East Texas. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78, 191–194.

Berny, P., 2007. Pesticides and the intoxication of wild animals. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy* 30, 93–100. doi:10.1111/j.1365-2885.2007.00836.x

- Bonnineau, C., Moeller, A., Barata, C., Bonet, B., Proia, L., Sans-Piché, F., Schmitt-jansen, M., Guasch, H., Segner, H.,** 2012. Advances in the Multibiomarker approach for risk assessment in aquatic ecosystems, en: Emerging and Priority Pollutants in Rivers. pp. 147–179.
- Bradford, M.M.,** 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 72, 248–254.
- Clark, D.R.,** 1988. HOW SENSITIVE ARE BATS TO INSECTICIDES? Wildlife society bulletin 16, 399–403.
- Clark, D.R.,** 1986. Toxicity of methyl parathion to bats: Mortality and coordination loss. Environmental Toxicology and Chemistry 5, 191–195.
- Clark, D.R., Rattner, B.A.,** 1987. Orthene® toxicity to little brown bats (*Myotis lucifugus*): Acetylcholinesterase inhibition, coordination loss, and mortality. Environmental Toxicology and Chemistry 6, 705–708.
- Clark Jr., D.R.,** 2001. DDT and the Decline of Free-Tailed Bats (*Tadarida brasiliensis*) at Carlsbad Cavern, New Mexico. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 40, 537–543.
- Clark Jr., D.R., Shore, R.F.,** 2001. Chiroptera, en: Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), Ecotoxicology of Wild Mammals. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, pp. 159–214.

- Clawson, R.L., Clark Jr, D.R.**, 1989. Pesticide contamination of endangered gray bats and their food base in Boone County, Missouri, 1982. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 42, 431–7.
- Çokuğraş, A.N.**, 2003. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turkish Journal of Biochemistry -Turk J Biochem]* 28, 54–61.
- Eidels, R.R., John O. Whitaker, J., Lydy, M.J., Sparks, D.W.**, 2013. Screening of insecticides in bats from Indiana. *Proceedings of the Indiana Academy of Science* 121, 133–143.
- Eidels, R.R., Sparks, D.W., Whitaker, J.O., Sprague, C.A.**, 2016. Sub-lethal Effects of Chlorpyrifos on Big Brown Bats (*Eptesicus fuscus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 71, 322–335.
- Eidels, R.R., Whitaker Jr, J.O., Sparks, D.W.**, 2007. Insecticide residues in bats and guano from Indiana. *Proceedings of the Indiana Academy of Science* 116, 50–57.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.J., Featherstone, R.M.**, 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88–95.
- Flores-Martínez, J.J., Ortega, J., Ibarra-Manríquez, Y.G.**, 1999. EL HÁBITO ALIMENTARIO DEL MURCIÉLAGO ZAPOTERO (*Artibeus jamaicensis*) EN YUCATÁN. *Revista Mexicana de Mastozoología* 4, 22–39.
- Geluso, K.N., Altenbach, J.S., Wilson, D.E.**, 1976. Bat Mortality : Pesticide Poisoning and Migratory Stress. *Science* 194, 184–186.

- Guilhermino, L., Lopes, M.C., Carvalho, A.P., Soared, A.M.V.M.,** 1996. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia Magna*. *Chemosphere* 32, 727–738.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B.,** 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* 249, 7130–7139.
- Jones, G., Jacobs, D., Kunz, T., Willig, M., Racey, P.,** 2009. Carpe noctem: the importance of bats as bioindicators. *Endangered Species Research* 8, 93–115.
- Köhler, H.-R., Triebkorn, R.,** 2013. Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? *Science* 341, 759–765.
- Limón-Pacheco, J., Gonsebatt, M.E.,** 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674, 137–147.
- NOM-033-ZOO-,** 1995. Norma Oficial Mexicana 033 Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. *Diario Oficial de la Federación, Mexico*.
- Oliveira, J.M., Brinati, A., Lima Miranda, L.D., Barbosa Morais, D., Cola Zanuncio, J., Gonçalves, R.V., Gouveia Peluzio, M. do C., Bontempo Freitas, M.,** 2017. Exposure to the insecticide endosulfan induces liver morphology alterations and oxidative stress in fruit-eating bats (*Artibeus lituratus*). *International Journal of Experimental Pathology* 98, 17–25.

- Oliveira, J.M., Fontes Losano, N., Silva Condessa, S., Pereira de Freitas, R.M., Almeida Cardoso, S., Bontempo Freitas, M., Licursi de Oliveira, L., 2018.** Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissues of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148, 684–692. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.11.024
- Paoletti, M.G., 1999.** Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74, 1–18.
- Park, K.J., 2015.** Mitigating the impacts of agriculture on biodiversity: bats and their potential role as bioindicators. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde* 80, 191–204.
- Peakall, D.B., McBee, K., 2001.** Biomarkers for Contaminant Exposure and Effects in Mammals, en: Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), *Ecotoxicology of Wild Mammals*. John Wiley & Sons Ltd., pp. 551–576.
- R Core Team, 2016.** R: A language and environment for statistical computing [WWW Document]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.r-project.org/>
- Regoli, F., Giuliani, M.E., 2014.** Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research* 93, 106–117.
- SAGARPA, 2015.** Avance e producción agrícola con tecnificación del riego en Quintana Roo. Chetumal, Quintana Roo.

Salmon, A.B., Leonard, S., Masamsetti, V., Pierce, A., Podlutzky, A.J., Podlutzkaya, N., Richardson, A., Austad, S.N., Chaudhuri, A.R., 2009. The long lifespan of two bat species is correlated with resistance to protein oxidation and enhanced protein homeostasis. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 2317–26.

Schneeberger, K., Czirják, G.Á., Voigt, C.C., 2014. Frugivory is associated with low measures of plasma oxidative stress and high antioxidant concentration in free-ranging bats. *Naturwissenschaften* 101, 285–290.

SEMARNAT, 2007. Programa de conservación y manejo Área de protección de flora y fauna Bala'an K'aax, 1a ed. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, México, D. F.

Senthilkumar, K., Kannan, K., Subramanian, A., Tanabe, S., 2001. Accumulation of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in sediments, aquatic organisms, birds, bird eggs and bat collected from South India. *Environmental Science and Pollution Research* 8, 35–47.

Shore, R.F., Doubent, P.E.T., 1994. Predicting Ecotoxicological Impacts of Environmental Contaminants on Terrestrial Small Mammals. *Reviews of environmental contamination and toxicology* 134, 49–89.

Shore, R.F., Rattner, B.A., 2001. *Ecotoxicology of Wild Mammals*, 1a ed, Ecological and Environmental Toxicology Series. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England.

Valdespino, C., Sosa, V.J., 2017. Effect of landscape tree cover, sex and season on the bioaccumulation of persistent organochlorine pesticides in fruit bats of riparian corridors in eastern Mexico. *Chemosphere* 175, 373–382.

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57–149.

Warnes, G.R., Bolker, B., Lumley, T., Johnson, R.C., 2005. Various R Programming Tools for Model Fitting, Intramural Research Program, of the NIH, National Cancer Institute, Center for Cancer Research. R package.

Zar, J.H., 2010. *Biostatistical Analysis*, 5th ed. ed. Prentice Hall.

Capítulo 5.
Conclusiones generales

Conclusiones

Esta tesis es el primer trabajo que documenta la presencia de plaguicidas en el suelo de la zona maya de Quintana Roo. También es el primero en evaluar los efectos de los plaguicidas presentes en esta región sobre los organismos expuestos en vida libre a través de biomarcadores enzimáticos. El objetivo principal fue el evaluar el efecto de los plaguicidas usados en las zonas agrícolas en la zona maya de Quintana Roo, sobre la fauna que se encuentra expuesta de manera accidental. Dicho propósito se cumplió de acuerdo a la evaluación de especies bioindicadoras de toxicidad, tanto en campo como en bioensayos en condiciones controladas.

Es importante mencionar que según datos del SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) en el municipio de José María Morelos las áreas destinadas a la agricultura (riego y temporal) pasaron de 18,456 Ha en 2012 a 21,816 Ha en el 2016, un aumento del 15 % en cuatro años. Este crecimiento acerca estos puntos focales de utilización de agroquímicos a zonas forestales y de conservación.

De acuerdo a lo anterior, en comparación con otros trabajos realizados en México, en el presente trabajo se registraron bajas concentraciones de plaguicidas OC en los suelos agrícolas muestreados. Asimismo es de llamar la atención el registro de plaguicidas OC prohibidos (DDT, heptacloro, dieldrín o endrín), en el APFFBK. A este respecto, si bien las concentraciones son bajas, la presencia cerca de zonas urbanas, cuerpos de agua y áreas forestales, representan una situación de riesgo ambiental y de salud humana. Particularmente se necesita incentivar la implementación de prácticas agrícolas ecológicamente sustentables (utilización de compostaje, fertilizantes orgánicos y manejo ecológico de plagas) para evitar un uso excesivo de plaguicidas y su

consiguiente migración a las zonas colindantes. Debido a que se registraron diversos plaguicidas depositados en el suelos muestreado en el Área de Protección de Flora y Fauna de Bala'an K'aax (APFFBK), tales como α -HCH, aldrín, DDT, DDD, Clordano y heptacloro, hace evidente el riesgo de que la fauna silvestre está expuesta.

Respecto a la caracterización de la toxicidad, los biomarcadores (BM) analizados en las lombrices de tierra (bioindicador) mostraron que los suelos con mayor efecto tóxico fueron aquellos con mayor actividad agrícola con tecnificación de riego, como los de sandía y papaya. Estos cultivos utilizan una amplia gama de plaguicidas de forma sistemática para el éxito de sus cultivos y están ubicados a pocos metros de zonas forestales particularmente en la comunidad de Xnoh cruz. Aunque no fueron detectados plaguicidas OF o carbamatos, la actividad de la Acetilcolinesterasa (AChE) se encontró inhibida en los individuos expuestos a los suelos con mayor actividad agrícola tecnificada, lo que refleja presencia de agentes anticolinérgicos que no fueron detectados. A partir de los resultados obtenidos, de las concentraciones de plaguicidas y la actividad de los BM, se puede inferir una toxicidad moderada de los suelos agrícolas de la región, ya que los BM de estrés oxidativo (Catalasa) y detoxificación (Glutathion-S-transferasa), no se sobreexpresaron en ningún cultivo analizado. Asimismo, no se correlacionaron con los OC detectados, posiblemente por la baja concentración de los plaguicidas en el suelo, además de que posiblemente también existen otros plaguicidas y compuestos que alteren la respuesta de la catalasa (CAT) y de la glutatión S-transferasa (GST).

A nivel de suelo, los ratones se encuentran expuestos de manera natural a los plaguicidas depositados en él. Los ratones (*Mus musculus*) capturados en la comunidad de Xnoh cruz, mostraron una bioacumulación de plaguicidas persistentes en su tejido hepático,

estos animales se encuentran expuestos principalmente a través de la ingesta ya que se alimentan dentro de los campos de cultivo. Los plaguicidas más detectados en los organismos fueron aquellos de la familia de los drines (aldrín, endrín, endrín aldehído, endrín cetona y dieldrín). En tanto que los que tuvieron mayor concentración fueron los derivados del DDT y heptacloro, todos usados como insecticidas. Las concentraciones encontradas en estos organismos están por debajo de los umbrales de toxicidad determinados en condiciones controladas con roedores y en investigaciones en vida libre.

Se registró mayor concentración de plaguicidas en el tejido hepático para la temporada de secas en relación a la temporada de lluvias, posiblemente debido a que durante las lluvias, los plaguicidas se lixivian y se precipitan a aguas profundas. Sin embargo, el análisis de BM muestra mayor toxicidad para la estación lluviosa, la AChE, se encuentra inhibida tanto en cerebro como en músculo. En tanto que la GST se encuentra sobre expresada en la misma estación. No obstante, no se correlacionaron con ningún plaguicida detectado, por lo que este efecto tóxico puede deberse a otros agentes anticolinérgicos y estresantes que no fueron evaluados o detectados como OF o hidrocarburos aromáticos policíclicos. En este sentido, se observa que la temporalidad tiene una influencia en como los plaguicidas se distribuyen, depositan y afectan a los organismos expuestos.

El análisis de los BM en murciélagos se realizó a escala tanto espacial (campo agrícola y zona forestal de conservación), como temporal (temporadas climáticas). En este contexto, espacialmente únicamente se encontraron diferencias significativas al evaluar la CAT (mayor en el área de conservación); la AChE y la GST no variaron. Este resultado sugiere que la heterogeneidad del paisaje (zona agrícola-área forestal) no influye en la

expresión de estos BM. Asimismo, puede representar que los plaguicidas usados en los campos agrícolas están migrando a las zonas naturales cercanas, homogenizando la reacción de los BM. A escala temporal, únicamente se encontraron diferencias en la AChE, la cual se encontró inhibida para la temporada de lluvias. Este resultado sugiere la presencia de compuestos anticolinérgicos en el ambiente para esta temporada, la cual coincide con el desarrollo de los cultivos de temporal en la región. Por lo tanto, se puede concluir que los plaguicidas ejercen una influencia sobre la actividad de los BM de los murciélagos, modulada por las temporadas climáticas y por los cultivos desarrollados durante esta temporada.

Al cabo del trabajo y con los resultados obtenidos se pueden destacar tres conclusiones generales:

- Las concentraciones de plaguicidas organoclorados registrados en los suelos y organismos analizados no representan una situación de riesgo a corto plazo, ya que fueron muy bajas respecto a las reportadas en otros trabajos en condiciones similares realizados en el país.
- Respecto a los BM se observó que su funcionamiento no se ve afectado de forma significativa en los organismos evaluados. Sin embargo, la toxicidad si se encuentra modulada por la temporalidad (lluvias-secas), la cual puede hacer biodisponibles diversos compuestos tóxicos, particularmente en el caso de la AChE se puede apreciar una influencia de agente anticolinérgicos para la temporada de lluvias, ya que tanto en ratones como en murciélagos se presentó una inhibición para esta temporada.

- Los tres bioindicadores evaluados fueron eficientes y cumplieron con los objetivos del estudio, fueron sensibles y reaccionaron a los estímulos y presiones del ambiente. Particularmente los murciélagos fruteros mostraron sensibilidad y variaciones en la expresión entre temporadas y localidades, estos organismos han sido considerados poco sensibles en otros trabajos con BM.

Finalmente se recomienda:

- Realizar más trabajos en la región en los cuales se analicen otros tipos de contaminantes que puedan estar afectando a los organismos expuestos. Asimismo, evaluar la toxicidad del ambiente con una batería de BM más amplia, así como con análisis genéticos para evaluar el efecto adverso a otros niveles más allá del bioquímico.
- Realizar comparaciones de diversas especies en ambientes más alejados, para asegurar el aislamiento de las zonas de influencia de plaguicidas, por ejemplo, en la Reserva de la Biósfera de Calakmul (RBC).
- Es necesario realizar estudios ecológicos en el APFFBK, ya que representa un espacio de conservación, el cual sirve como refugio para diversas especies importantes en la región, además forma un corredor biológico con la RBC. Esta área natural está poco estudiada y se desconocen los riesgos ambientales que pueda estar enfrentando.