



## BIOCIDAS ORGANOFOSFORADOS

### INTRODUCCION

Desde que se tuvo evidencia de los desastrosos efectos sobre la fauna salvaje de los biocidas bioacumulables, se ha ido sustituyendo su uso por otros compuestos de vida más corta y que no experimentan el fenómeno de acumulación a través de las cadenas tróficas, como los carbamatos y organofosfatos. Estos compuestos, aunque poco persistentes, son a menudo mucho más tóxicos que los hidrocarburos clorados, y son susceptibles de provocar intoxicaciones agudas sobre organismos no objeto de los tratamientos. Su uso en el mundo aumenta de forma exponencial desde que entraron en servicio durante los años cincuenta y sesenta, y en el Estado Español se emplearon ya en 1987 más de 121.000 toneladas (AMA, 1988).

Los estudios de los efectos sobre los sistemas biológicos no han crecido parejos con el uso de los biocidas, y un número relativamente pequeño de trabajos han tratado la cuestión, de modo que aún queda mucho por conocer sobre los impactos directos e indirectos del uso de estas sustancias sobre los ecosistemas. Aunque se ha asumido que la poca persistencia los hace relativamente inocuos, se sabe en realidad muy poco sobre los derroteros que siguen después de ser liberados en el medio ambiente.

Los únicos efectos sobre poblaciones de vertebrados mínimamente documentados se refieren a aves. Los resultados difieren, debido a los múltiples regímenes de aplicación (tipo de pesticida, dosis, tamaño de gota, método de aplicación, número y tiempo de las aplicaciones, etc.) (Spray *et al.*, 1987), y también al uso de diversos métodos para medir el impacto (Peakall y Bart, 1983). Sin embargo, se han documentado efectos tan considerables como la reducción del 80% en el número de aves canoras que se alimentan en la parte superior del dosel forestal (Pearce y Peakall, 1977), y un buen número de trabajos documentan mortalidad directa (Busby *et al.*, 1990 ; Mitchell y Roberts 1984, etc.), efectos fisiológicos adversos (Busby *et al.*, 1983, 1987; Hamilton *et al.*, 1981, etc.), cambios en el comportamiento (Hunter *et al.*, 1984; Hunter y Whitman, 1985, etc.) o disminución del éxito reproductor (Busby *et al.*, 1990).

Se han llevado a cabo muy pocos estudios sobre mamíferos. En trabajos sobre las aplicaciones forestales de fenitrotión en Canadá se vió que aplicaciones menores de 413 g/Ha no tenían efectos detectables sobre los micromamíferos. A dosis de 1238 g/Ha la mortalidad de juveniles de *Sorex cinereus* alcanzaba el 100%. Bajo aplicaciones de 275 g/Ha la reproducción de estas musarañas quedaba suprimida, y si esta dosis se aplicaba repetidamente las poblaciones de micromamíferos se reducían ligeramente durante unos 5 años (Buckner, 1974 y Buckner *et al.*, 1977, en Crick, 1986).

Los efectos sobre quirópteros tan solo han sido considerados por los trabajos de Clark (1986) y Clark y Rattner (1987), que han estudiado la toxicidad del orteno y el metil-paratió en el laboratorio. Clark (1981,1986) considera altamente probable la implicación de los organofosforados en las mortandades masivas y declives poblacionales de las antaño enormes colonias de *Tadarida brasiliensis* del suroeste de los Estados Unidos, de lo cual hay evidencias indirectas. Ningún estudio de campo ha enfocado esta cuestión hasta el presente.

### ANTECEDENTES

Debido a que la búsqueda de aves directamente afectadas por las aplicaciones es poco productiva, por la dificultad de la localización de los cadáveres y su rápida desaparición a causa de su consumo por otros animales, los efectos de los biocidas sobre las comunidades de aves se han estudiado tradicionalmente mediante censos de las poblaciones antes y después de los tratamientos con biocidas. Para ello se han empleado toda la panoplia de métodos existentes (conteo de machos cantores, mapeo de territorios, estaciones de escucha, transectos, etc.) (Crick y Spray 1987, Busby *et al.*, 1983, etc.). Diversos problemas hacen a veces difícil la interpretación de los resultados. Por ejemplo, el biocida puede afectar los niveles de actividad de las aves, y con ello su detectabilidad para el observador, aún sin cambios reales en las abundancias, o bien provocar migraciones locales mediadas por el descenso en la abundancia de presas en las áreas pulverizadas.

Para un correcto control de estos problemas, el diseño de los experimentos debería incluir algún método de estima

del efecto biológico del tóxico sobre los animales estudiados.

En el caso de los compuestos organofosforados, el contenido corporal de residuos en los organismos expuestos parece una medida pobre de los efectos adversos del biocida, ya no existe una relación directa entre los niveles actuales y el estado fisiológico del individuo, que puede estar mediado por los niveles de exposición anteriores. Estos pesticidas actúan bloqueando la transmisión sináptica en la porción colinérgica del sistema nervioso (Fleming y Grue 1981); en dosis suficiente producen envenenamiento colinérgico. No son compuestos neurotóxicos, sino inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) (Hayes 1979). El proceso tiene lugar mediante la ocupación y fosforilación del centro alostérico de la enzima acetilcolinesterasa, con lo cual se impide o retrasa la desactivación de la acetilcolina y aparecen los efectos de descoordinación nerviosa (Stocker y Seager 1981). En este proceso participan el biocida y sus metabolitos (principalmente los primeros eslabones del proceso, en el caso del fenitrotión, el S-metil-fenitrotión y el fenitrooxon), exhibiendo estos últimos una afinidad mucho mayor por el enzima. Los sitios activos quedan ocupados de forma más o menos persistente, de modo que la inhibición enzimática tiene un efecto acumulativo, no relacionable con el contenido corporal de tóxicos en un momento dado. El tóxico se puede eliminar del organismo de forma relativamente rápida, mientras que persiste el efecto fisiológico (Hayes 1979). Tampoco se conoce los efectos que los residuos presentes en diferentes porciones del cuerpo pudieran tener sobre la fisiología general y la respuesta AChE, lo cual hace difícil la interpretación de las cifras de residuos (Busby, *et al.* 1983).

La depresión de la actividad de la AChE (AAChE) cerebral, en cambio, expresa una respuesta fisiológica adversa, y es una medida directa de la exposición al agente tóxico (Busby *et al.*, 1983). Se ha empleado bastante, y es ampliamente aceptado como método para medir la exposición de las aves a los insecticidas AChE-inhibidores (White *et al.* 1979; Zinkl *et al.*, 1979; Busby, Pearce y Garrity 1981; Zinkl *et al.* 1980, etc.). En los estudios de aves salvajes afectadas por pesticidas se acepta ampliamente la sugerencia de Ludke *et al.* (1975) de que un 20% de depresión en la AAChE indica exposición, y que un 50% es suficiente para diagnosticar causa de muerte.

En mamíferos también se ha empleado como medio para determinar la sensibilidad a los biocidas organofosforados en animales de laboratorio (Hayes 1983), pero hay muy pocos trabajos que hagan uso de ésta medida en mamíferos salvajes (tan solo se ha podido conseguir un trabajo, Zinkl *et al.* 1980, en donde se analiza también la actividad ChE en ardillas). En murciélagos, tan solo existen los trabajos de Clark (1986) y Clark y Rattner (1987), sobre los efectos tóxicos del orteno y el metilparatión sobre murciélagos (*Myotis lucifugus* y *Eptesicus fuscus*) en laboratorio, en los cuales se determina la actividad de la ChE.

Los murciélagos insectívoros que cazan insectos aéreos, como el *Pipistrellus pipistrellus* objeto del presente estudio, emiten constantemente sonidos de ecolocación de alta frecuencia en los vuelos de caza nocturnos (para la orientación y detección de presas), lo cual ofrece la posibilidad de estudiar la evolución de su actividad mediante sondeos con transductores de sonidos adecuados (detectores de ultrasonidos, ver por ejemplo, Fenton, 1988).

## AREA DE ESTUDIO

En el Parque Natural de la Albufera (figura 6) podemos diferenciar cuatro unidades bien definidas:

- una laguna litoral, el Llac de l'Albufera, con una extensión de unas 2300 Ha y escasa profundidad (media de 75 cm). En las orillas del Lago y en los islotes o "matas" interiores crece vegetación palustre que sirve de refugio y lugar de anidamiento para gran número de aves;
- una restinga arenosa que separa la laguna del mar, con sistemas de dunas móviles, depresiones interdunares y dunas fijas sobre las que se desarrolla una maquia litoral mediterránea con un estrato arbóreo de pinos;
- la marjal, unas 14.000 Ha de terrenos dedicados al cultivo del arroz. Aparte del arrozal, en los bordes de caminos y de la extensa red de canales de esta zona, podemos encontrar la vegetación típicamente palustre que se encuentra en los alrededores de la Albufera; y
- la huerta, que rodea a la marjal, dedicada principalmente al cultivo de hortalizas y naranjos.

Además de estas unidades de vegetación, una superficie importante del área, una de las zonas con mayor densidad de población de la península, está cubierta por edificaciones y vías de comunicación.

**FIG. 6** Localización del área de estudio dentro del Parque Natural de la Albufera.

**FIG. 7** Usos del suelo, localización de los transectos y de las trampas de luz (\*) en el área de estudio. En números romanos aparecen las zonas del plan de tratamiento fitosanitario.

## PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Las 14.000 Ha de arrozal de la marjal de l'Albufera se someten a un tratamiento fitosanitario con medios aéreos con el propósito de combatir la plaga del *Chilo suppressalis*, un lepidóptero cuya larva barrena la caña del cereal, y cuyos daños potenciales son considerables.

El tratamiento se ha realizado históricamente de varias formas y con distintos productos, pero en la actualidad se emplea fundamentalmente fenitrotión (excepto en una pequeña zona considerada de alta sensibilidad, donde se aplica piridafentión, y una zona donde se está experimentando confusión sexual mediante feromonas).

El área de arrozal constituye un hábitat muy homogéneo de considerable extensión, estando formado tan solo por los campos de arroz, las vías de comunicación, los canales con algo de vegetación palustre en sus bordes, y las edificaciones humanas (casas de campo, motores, etc. ). La gran presión humana, la simplificación estructural del área, y la extrema abundancia de insectos de pequeño tamaño provoca la existencia de una comunidad muy simplificada de quirópteros, formada casi exclusivamente por *Pipistrellus pipistrellus*, un murciélago de tamaño muy pequeño, antropófilo, que se ha visto favorecido por las actuaciones humanas sobre el medio. La densidad de la especie en el área es enorme, habiendo colonias en casi todas las edificaciones de la marjal.

El área presenta indudables ventajas metodológicas: en primer lugar, el tratamiento se realiza concentrado en el tiempo y en unas fechas más o menos previsibles; en segundo lugar, la simplificación estructural del medio y la existencia de una extensa red de caminos elimina problemas de muestreo y facilita el diseño; en tercer lugar, la presencia de una sola especie elimina problemas de identificación; finalmente la alta densidad de colonias de cría facilita y permite la captura de un cierto número de ejemplares sin dañar las poblaciones.

### El biocida.

El fenitrotión (0,0-dimetil 0-(3-metil-4-nitrofenil) fosforotioato) es un insecticida organofosforado de contacto, de alta toxicidad para las larvas de lepidóptero, efectivo contra los barrenadores de la caña del arroz (como el objetivo de las fumigaciones en el arrozal, *Chilo suppressalis*) y un amplio espectro de otras plagas. La toxicidad (aguda) para mamíferos y peces se considera baja, al igual que su persistencia en el medio (CRICK 1986). En general se aplica desde el aire, exponiéndose al tóxico muchos organismos no objetivo.

### Características del tratamiento fitosanitario del año 1990.

Se utilizaron dos tipos diferentes de organofosforados: fenitrotión, en la mayoría del área, y piridafentión, de menor toxicidad, en una banda alrededor de el Lago de l'Albufera. La aplicación se realizó en todos los casos por medios aéreos con la técnica de ultrabajo volumen (ULV), utilizándose aviones de tratamiento Pippier Pawnee y Pippier Brave equipados con dos o tres atomizadores rotatorios compactos tipo Micronair-AU 3000 y AU 5000 por plano, que producen anchuras de pasada de 18 y 20 m, respectivamente. El tamaño de gota conseguido fue entre 100 y 150 micras de diámetro.

El preparado comercial de fenitrotión utilizado contenía un 60% (peso/volumen) de ingrediente activo, y se administró mezclado con agua a razón de 20 litros de caldo/Ha, que corresponde a 1.8 l/Ha de producto comercial y a 1080 g/Ha de biocida. El preparado comercial de piridafentión contenía un 60% (peso/volumen) de ingrediente activo; se administró mezclado con agua a razón de 5 litros de caldo/Ha, correspondiente a 1.5 l/Ha de producto y 900 g/Ha de biocida.

En la campaña de 1990 se hicieron dos pases. El primero de ellos se pulverizó un total de 5176 Ha del arrozal que se localiza junto a la zona hortícola (figura 8), ya que es en esta zona donde, en los rastrojos y matorrales, se concentran los efectivos que darán lugar a la primera generación de *Chilo suppressalis*. Se utilizaron 8800 litros de fenitrotión en las concentraciones ya comentadas. Las fechas elegidas para llevar a cabo esta primera pulverización fueron los días 26, 27 y 28 de junio.

El segundo pase, realizado los días comprendidos entre el 20 y el 24 de julio (ambos inclusive), se pulverizó la totalidad del arrozal (exceptuando unas 1300 Ha en las que se estaba experimentando una técnica de control biológico, confusión sexual mediante el uso de feromonas, figura 9), incluyendo el ya pulverizado en el primer pase. Un total de 25600 litros de fenitrotión y 475 litros de piridafentión fueron gastados a tal efecto. Es durante esta segunda aplicación cuando se realizó el presente estudio. En la figura 9 se representan las zonas pulverizadas cada día en el área de estudio.

Con el piridafentión se pulverizó una zona de protección, una franja de 300 Ha de extensión total alrededor del Lago.

Con el fenitrotión se pulverizaron 14233 Ha de arrozal.

En total, considerando los dos pases, se utilizaron 34400 litros de fenitrotión y 475 litros de piridafentión.

### **Hipótesis de Trabajo.**

La intensidad del tratamiento al que se somete el cultivo (1080 g/Ha) está muy por encima de las dosis (350-400 g/Ha) que diversos trabajos han demostrado producen efectos severos sobre las comunidades de aves forestales (Crick y Spray, 1987; Crick 1986; Busby *et al.*, 1983, etc.).

En la mayoría de los trabajos sobre poblaciones en condiciones naturales se detectan efectos máximos sobre la actividad AChE o ChE en el primer día tras la aplicación, frecuentemente seguidos por una recuperación progresiva (Hamilton *et al.*, 1981; Busby *et al.*, 1983, etc.) conforme los niveles de pesticida en el medio van recurriendo.

Dado el patrón general encontrado en la bibliografía, se supuso que el efecto sobre los murciélagos, de existir, sería máximo en los primeros días inmediatos al tratamiento. Dado también que en esta época se inicia la emancipación de los jóvenes, se decidió concentrar el estudio en 6 días consecutivos, tres antes de la aplicación, como control, y tres después, para evaluación de los efectos, de modo que el reclutamiento de nuevos individuos y los cambios de comportamiento en este periodo crítico intervinieran lo menos posible. Una muestra de murciélagos tomada unos 20 días después de la aplicación serviría para documentar la presumible recuperación desde los peores estados fisiológicos (medidos en AChE) alcanzados en los primeros días.

**FIG. 8** Area de tratamiento fitosanitario perimetral previo (zona puntuada) efectuado con Fenitrotión los días 26, 27 y 28 de junio

**FIG. 9** Desarrollo diario del plan de tratamiento con Fenitrotión en las zonas II, III y IV del área de estudio entre los días 20 y 24 de julio.

**1ª Hipótesis.** El pesticida causa mortalidad directa (intoxicación letal de los animales) o indirecta (envenenamiento subletal pero suficiente para causar pérdidas prolongadas de coordinación motora, y exposición a otras causas de muerte: insolación, predadores, etc.).

Predicciones:

- la actividad media en los transectos sometidos al tratamiento es menor en los periodos del postratamiento que en los del pretratamiento;
- los individuos capturados el día después del tratamiento contienen importantes cantidades de biocida en el cuerpo, y la AChE está considerablemente inhibida.

**2ª Hipótesis.** El tóxico no produce ningún efecto directo sobre los individuos, sino que tan solo rebaja la disponibilidad de presas. La disponibilidad de presas puede bajar más allá de un mínimo que permita efectuar las capturas necesarias para cubrir las necesidades mínimas. Los animales pueden reaccionar ante este problema al menos de tres formas:

- a) Cambio de área de caza, movilizándose hasta lugares fuera del área de influencia del tratamiento (ej. Hunter y Witham 1985);

Predicciones:

- la captura de insectos en las trampas es menor en el postratamiento en las áreas tratadas, mientras que se mantiene en las áreas no tratadas;
- la actividad media es menor en los días del postratamiento en las áreas tratadas, y mayor en las zonas limítrofes no tratadas.
- b)** Alargamiento del periodo de alimentación (solo posible si se mantiene la viabilidad energética de la actividad: la disponibilidad de presas permite una ganancia energética que compensa la gastada por unidad de tiempo en el vuelo).

Predicciones:

- la captura de insectos en las trampas en las áreas tratadas es menor después del tratamiento;
- la actividad en el segundo periodo de muestreo en las zonas tratadas es mayor después del tratamiento;
- los animales que cazan en las áreas tratadas regresan a la colonia después del primer período de alimentación más tarde después del tratamiento.

-**c)** Si el área afectada es grande, de forma que a los animales, que en este momento están ligados al refugio donde están las crías, no les compensa el desplazamiento, y la caída en la abundancia de presas, por encima de una hora, sea tal que no compense el gasto energético del vuelo, puede ocurrir que los murciélagos, simplemente, coman menos.

Predicciones:

- la captura de insectos en las trampas de las áreas tratadas es menor después del tratamiento;
- la frecuencia de 'buzzes' de captura de presas es menor después del tratamiento en las áreas tratadas;
- los animales que se alimentan en las áreas tratadas regresan a la colonia con un peso de capturas inferior después del tratamiento.

**3ª Hipótesis.** Eltóxico tiene efectos subletales, que no llegan a afectar la capacidad de coordinación, pero pueden afectar la adecuación de los individuos a más largo plazo (producción de jóvenes, supervivencia invernal, etc.). En este caso nuestro diseño tan solo proporcionaría alguna información sobre posibles efectos.

Predicciones:

- los individuos capturados el día después del tratamiento contienen residuos de fenitrotión en el cuerpo;
- la AChE está inhibida, pero no a niveles cercanos a la letalidad.

## MATERIAL Y METODOS

### Trampeo de Insectos.

Se establecieron cuatro estaciones de muestreo en el arrozal, cuya situación se representa en la figura 7. Dos de ellas se dispusieron en el área que iba a ser sometida al tratamiento con fenitrotión el primer día (20/7/90). Otra en la zona que iba a ser tratada el segundo o tercer día. Y la restante, el control, se dispuso en la zona donde se estaba experimentando la utilización de feromonas y que, por tanto, no iba a ser tratada con ninguno de los insecticidas organofosforados (figura 9).

En las estaciones se colocaron, a una altura aproximada de 1 m sobre el arroz, trampas de luz con dos tubos fluorescentes verticales de 8 W y 12 V, uno de luz blanca y el otro de luz negra (ultravioleta), dispuestos entre cuatro placas perpendiculares de plástico rígido transparente. Debajo de las placas, un embudo de plástico dirigía las capturas a una bolsa de tejido (un diseño similar a las trampas Pennsylvania o Texas descritas en Southwood,

1971).

Las trampas de luz se conectaban automáticamente a las 19.45 hora solar, mediante la ayuda de un temporizador, y se desconectaban dos horas y media después (el primer día estuvieron funcionando durante tres horas y media, la primera de las cuales fue cuando aún había luz diurna). Los muestreos se llevaron a cabo durante seis noches (del 17 al 22 de julio, ambos inclusive), tres previas al tratamiento y otras tres durante su curso.

Los insectos capturados se introducían en un recipiente saturado con vapores de acetato de etilo para darles muerte. Después se separaban atendiendo a su orden taxonómico, tamaño y características morfológicas. En un principio se obtuvieron 38 grupos de artrópodos. De entre ellos se eligieron para los análisis de evolución numérica, aquellos que presentaron números apreciables durante todo el periodo de muestreo, descartándose los de presencia anecdótica. Resultaron los siguientes 10 grupos :

- Lepidópteros clase 1 (<10 mm);
- Lepidópteros clase 2 (10 mm - 15 mm);
- Lepidópteros clase 3 (15 mm - 20 mm);
- Homópteros (principalmente Cicadélidos, Fulgoroideos y Afidoideos, de 4 mm de longitud);
- Heterópteros Notonéctidos (5 mm);
- Dípteros Ciclorrafos (<10 mm);
- Dípteros Nematóceros (<10 mm);
- Coleópteros tipo 1 (6 mm);
- Coleópteros tipo 2 (2 mm); y
- Coleópteros tipo 3 (4 mm).

Para determinar los niveles de residuos de fenitrotión en las presas potenciales, se guardaron en nitrógeno líquido tres muestras de insectos, una de lepidópteros (insectos terrestres), otra de homópteros+dípteros (insectos terrestres, parte de ellos con larvas acuáticas, y la clase mayormente empleada por los murciélagos para alimentarse), y otra de coleópteros (insectos de imago acuático) capturados la noche del 17/7 (antes del tratamiento), y otras tres de idéntica composición de la noche del 20/7 (justo después de la aplicación del pesticida, para obtener una muestra de los insectos que iban a consumir los murciélagos que se iban a capturar la noche siguiente). En todos los casos, las muestras guardadas se obtuvieron de las trampas 1 y 2.

### **Actividad de los Murciélagos.**

Para estudiar los posibles cambios en la actividad de los murciélagos se emplearon estaciones de escucha de dos minutos de duración situadas a 200 m de distancia unas de otras, y dispuestas en series de 20 sobre un itinerario de 3800 m. Se emplearon puntos numerosos y de pequeña duración con el objeto de reducir la varianza, que suele ser alta, ya que los murciélagos se distribuyen de forma agrupada en el medio cuando cazan.

En cada punto el observador registraba en una cinta Sony HF90, con una grabadora Sony TCM-15, con el nivel de grabación fijado, los sonidos emitidos por el altavoz de un detector de ultrasonidos heterodino Uppsala D-90 (Pettersson Elektronik) sintonizado previamente a la frecuencia de mejor detección para las emisiones ultrasónicas de *Pipistrellus pipistrellus* en el área (entre 50 y 60 Khz) y con el volumen fijado. El micrófono del detector, alargado mediante un cable de 1 m de longitud, se mantenía a una altura de un metro y medio sobre el suelo. Cada recorrido fue muestreado todas las noches de estudio por el mismo observador con el mismo equipo de material.

Habitualmente el observador podía moverse de un punto al siguiente (en coche o en bicicleta) en un minuto, de forma que el recorrido entero se cubría en una hora.

Los recorridos se realizaron de forma simultánea en cuatro zonas (figuras 7, 8 y 9) repartidos de forma adecuada al

diseño experimental. El recorrido número 4 constituía el control que no se sometía al tratamiento con pesticidas, los recorridos 1 y 2 recibían el pesticida el primer día de tratamiento, en el cual el recorrido 3 servía para controlar la emigración a zonas adyacentes. El recorrido 3 recibía el pesticida entre los días 2 y 3 después de iniciado el tratamiento.

El primer día de muestreo se efectuaron tres recorridos, uno desde las 18.30 hasta las 19.30, otro desde las 19.45 hasta las 20.45, y otro desde las 21.00 hasta las 22.00 hora solar. En el primer periodo de muestreo se obtuvieron índices de actividad ínfimos, por lo cual se desestimó para las noches siguientes, en las cuales se realizó una primera pasada desde las 19.45 hs (la cual coincidía con el máximo de actividad), y una segunda a partir de las 21.00 hs (que servía para controlar el posible alargamiento del periodo de actividad).

Las grabaciones se revisaron en el laboratorio, dividiéndose las muestras de dos minutos de cada estación en 24 intervalos de 5 segundos, en cada uno de los cuales se registró la presencia o ausencia de emisiones de *P. pipistrellus*. Como índice de actividad se empleó el número de intervalos donde se escuchaba *P. pipistrellus* respecto al total de intervalos muestreados en cada punto (24 normalmente, salvo errores y accidentes), expresado en tanto por uno.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa Statgraphics. Se encontró una importante correlación negativa entre la actividad y la hora en la primera pasada (tabla abajo). Para eliminar la parte de la variación debida a la hora, se realizó para cada recorrido una regresión conjunta de todos los días para la primera pasada y, se extrajeron los residuos, cuyas medias para cada día se utilizaron para estudiar la evolución de la actividad. Aunque en la segunda pasada no se encontró relación entre hora y actividad (tabla abajo), también se calcularon las regresiones y emplearon los residuos, para obtener una escala en unidades similares a las de la primera pasada.

Recorrido Pasada C. Correlación GL F Prob.

1 1 -0.44 118 28.49 0.000

1 2 0.02 117 0.03 0.867

2 1 -0.59 101 54.69 0.000

2 2 -0.18 97 3.20 0.077

3 1 -0.51 117 41.69 0.000

3 2 -0.15 118 2.59 0.110

4 1 -0.34 91 12.23 0.001

4 2 -0.15 80 1.78 0.187

Las medias de los residuos de cada recorrido y pasada se compararon mediante un análisis de varianza y los grupos homogéneos se determinaron mediante el test a posteriori de Scheffe.

### **Captura de Murciélagos.**

Se capturaron murciélagos vivos con el doble objeto de determinar los niveles de pesticida que adquirirían tras las aplicaciones y conocer el efecto fisiológico que estas tomas producían (mediante la determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa cerebral).

La mayor parte de las capturas se efectuaron en una colonia situada en una casa en las proximidades del transecto 1 (en la figura 9, el triángulo A), dentro del área tratada con fenitrotión. Los adultos correspondientes a la última muestra no pudieron obtenerse en este lugar, y se capturaron en otra colonia (en la figura 9, el triángulo B), también situada dentro del área tratada. Todas las capturas se efectuaron mediante redes japonesas durante el periodo de actividad de los animales, bien a la salida, bien cuando volvían a la colonia. Con efecto de calcular la ingesta diaria mínima de alimento (considerando que tan solo tenían un periodo de actividad), se determinó la edad y se anotaron las horas de captura y el peso (con un dinamómetro de precisión 0.1 g Pesola) de todos los individuos capturados y no solo de los que se guardaron para los análisis. También se tomó rutinariamente la medida de longitud del

antebrazo con un calibre de precisión. Los individuos capturados y guardados para el análisis el día 21/7 se volvieron a pesar 12 horas después de la captura, cuando ya habían vaciado todo el tubo digestivo, inmediatamente antes de sacrificarlos. Después se extrajeron los cerebros, que se guardaron en recipientes individuales sumergidos en nitrógeno líquido a la espera del análisis de la AChE. Los cuerpos también se conservaron en nitrógeno líquido hasta su preparación para los análisis químicos.

Se capturaron un total de 44 *P. pipistrellus*, distribuidos de la siguiente forma:

- 15 individuos, 10 adultos y 5 jóvenes del año, recogidos dos días antes de que se efectuase la pulverización con fenitrotión (18/7/90). Estos constituirían la muestra para la determinación del patrón del nivel de actividad acetilcolinesterasa, y el control previo de la presencia de residuos de fenitrotión en los cuerpos;
- 15 individuos, 10 adultos y 5 jóvenes del año, capturados un día después del tratamiento (21/7/90), 24 horas después de haber ingerido, y después de haber digerido y asimilado insectos presuntamente contaminados;
- 14 individuos, 8 adultos y 6 jóvenes del año, 21 días después del tratamiento (10/8/90).

La distribución de sexos y edades se especifica en la tabla siguiente:

Fecha	Machos	Hembras
	jóvenes	adultos
18.7	3	1 2 9
21.7	1 1 4	9
10.8	3	3 8
Total	7 2 9	26

### **Análisis químicos del contenido en residuos de fenitrotión.**

De los murciélagos capturados en las diferentes fechas se escogieron los siguientes para el análisis químico:

De los de antes de la aplicación del biocida (18/7) se seleccionaron dos muestras, una formada por tres individuos jóvenes, y otra de tres hembras adultas, para tener niveles de pesticida de control (por si la aplicación perimetral previa había dejado algún tipo de residuo) previas al tratamiento. Los individuos de cada muestra se homogeneizaron juntos y enteros (sin el cerebro, que se empleó para el análisis de AChE), para obtener niveles de pesticida en cuerpo totales.

De la muestra inmediatamente posterior al tratamiento (21/7) se escogieron 5 jóvenes y 6 hembras adultas, en ambos casos con valores de AChE en serie, de modo que se pudiera estudiar la posible relación entre el contenido inicial de agente tóxico en cuerpo y la AChE. Para cada animal se separó la piel y las alas por un lado, y la carcasa más las vísceras por otro, con idea de obtener información sobre las posibles vías de adquisición del pesticida. Ambas porciones se analizaron de forma individual para cada ejemplar. La piel y la carcasa se pesaron por separado con una precisión de décimas de gramo, para calcular el contenido total en residuos de cada individuo, y así poder comparar con los datos de los conjuntos de los días 17/7 y 10/8.

De los ejemplares capturados 21 días después del tratamiento (10/8) se seleccionaron dos muestras, una de tres individuos jóvenes y otra de tres hembras adultas, con las cuales se procedió del mismo modo que en las del día 18/7.

Los análisis del contenido en fenitrotión se llevaron a cabo mediante cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo y confirmados por cromatografía de gases con detector de captura de electrones según el siguiente procedimiento:

Para cada muestra se pesó 0.5 g de tejido, que se trituró con sulfato sódico anhidro y arena de mar lavada. El triturado se sometió a extracción continua con mezcla de benceno-hexano. Los extractos obtenidos fueron

purificados con Florisil 80-100 mallas y analizados en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5860 provisto de un integrador HP 3392 A y un inyector automático HP 7673 A. Se empleó una columna CP-Sil 8 CB (fenilmetilsilicona). La temperatura inicial se mantuvo a 80 °C durante 1.2 min. La rampa se efectuó a 30 °C/min hasta 175 °C, 2.5 °C/min hasta 225 °C y 10 °C/min hasta 300 °C, temperatura que se mantiene durante 2 min. El gas portador fue H<sub>2</sub> a un flujo de 30 mil/min. Como gas auxiliar se empleó N<sub>2</sub>. La cuantificación del fenitrotión en las muestras se realizó mediante una curva de calibrado construida con patrones puros extraídos en las mismas condiciones.

En total se llevaron a cabo 26 análisis químicos de murciélagos y 6 de insectos.

### **Actividad Acetilcolinesterasa Cerebral AChE.**

Los animales capturados para la determinación de la AChE cerebral fueron sacrificados dentro de las doce horas siguientes a su captura. Inmediatamente se procedió a la extracción de los cerebros, que se conservaron en recipientes individuales sumergidos en nitrógeno líquido hasta su análisis en el laboratorio.

Los cerebros de todos los animales se analizaron individualmente, empleándose los de la nuestra previa al tratamiento (18/7) como patrón frente al que comparar las AChE de los demás.

Para el análisis, los cerebros se homogeneizaron uno a uno con tampón fosfato 0.1 M pH 8.0, en proporción 1:50 (peso/volumen). Después se filtró el homogeneizado y se centrifugó en cámara fría a 2000 rpm durante 10 min. La actividad de la colinesterasa se determinó en el sobrenadante en nanomoles/mg de proteína/min. mediante el método colorimétrico de Ellman *et al.* (1961).

En total se efectuaron 44 análisis.

### **Tratamiento de los Datos y Análisis Estadísticos.**

Se construyeron las matrices de datos en la hoja de cálculo Quattro. Los análisis estadísticos (Regresión simple y Análisis de la varianza) se efectuaron con el programa Statgraphics, y las representaciones gráficas con el Harvard Graphics.

## **RESULTADOS**

### **Presas.**

Como se puede observar en las figuras 10 a 19, cualquier posible efecto del pesticida sobre la abundancia de los distintos grupos quedaría oscurecida por las tremendas fluctuaciones, aparentemente normales, de las capturas de los distintos grupos, posiblemente mediadas por cambios en la actividad y en la respuesta a las trampas con el cambio de factores ambientales. Estas fluctuaciones son mucho más aparentes en los grupos con imagos acuáticos (coleópteros y notonéctidos) y menores en los lepidópteros. Los grupos de lepidópteros son los únicos para los cuales a partir de la aplicación del biocida se observa un comportamiento diferente entre el control y los tratamientos, en los cuales el número de capturas de las clases 2 y 3 disminuyen, mientras que aumentan o se mantienen en el control.

### **Actividad de Murciélagos.**

En el primer periodo de muestreo se aprecia (figuras 20 y 21) un incremento relativo del índice de actividad en el transecto control (4), mientras que en las zonas tratadas 1 y 2 el índice se mantiene más o menos estable. En el transecto 3 (de tratamiento) se aprecia un ligero descenso a partir de la fecha de la aplicación del biocida.

En cuanto al segundo periodo de muestreo, en el control (4) se aprecia un comportamiento básicamente similar al del primer período. Lo mismo sucede con los transectos 1 y 2 con respecto a sus respectivos primeros periodos. En el transecto 3 se aprecia un aumento relativo de la actividad después de la aplicación del pesticida.

Estos resultados contradicen las predicciones construidas sobre las hipótesis primera y segunda. En principio, con nuestros datos no se puede decir que la aplicación del pesticida haya tenido influencia inmediata (en el muy corto

plazo para el cual se diseñó el estudio) alguna sobre el número de murciélagos, ni sobre sus patrones de actividad espacio-temporal.

En cuanto a los cambios en la actividad de los transectos 4 (control) y 3, se pueden buscar explicaciones a posteriori más o menos enrevesadas, que conducirían al planteamiento de un nuevo trabajo, ya que el diseño del presente no contempló su posibilidad. En primer lugar, el aumento de la actividad en el control tras la aplicación del pesticida en las otras áreas puede deberse a que el efecto sobre la fauna de presas sea a un nivel geográfico más amplio, y que los individuos realmente se dispersen mayores distancias de las previstas (la distancia entre el área de control y los tratamientos es menor que la distancia máxima de campeo, unos 5 Km, que se ha calculado para algunas colonias de *Pipistrellus pipistrellus* (Racey y Swift, 1985, por ejemplo).

Las diferencias entre los tres transectos del área tratada pueden tener que ver con la situación más centrada del transecto 3. En este sí se observan algunos de los comportamientos previstos en las predicciones (disminución significativa de la actividad en el primer periodo, aumento significativo en el segundo). La zona donde se sitúan los transectos 1 y 2 está mucho más cerca del borde del área tratada y posiblemente estos, están sometidos a un influjo global de pesticida menor, y pueden recibir también insectos de las áreas periféricas. Con respecto a esto último, en los grupos de lepidópteros (15-20 mm), homópteros, braquíceros, notonéctidos y coleópteros (2 mm) se observa una recuperación en las capturas de las trampas 1 y 2 el día 22/7.

**FIG. 10.-** Evolución del número de lepidópteros <10 mm. capturados en cada una de las trampas. La flecha indica el día en que, la zona colindante a la trampa, fue pulverizada con fenitrotión.

**FIG. 11.-** Evolución del número de lepidópteros, con tamaño comprendido entre 10 y 15mm. capturados en cada una de las trampas. La flecha indica el día en que, la zona colindante a la trampa, fue pulverizada con fenitrotión.

**FIG. 12.-** Evolución del número de lepidópteros (entre 15 y 20mm.) capturados en cada una de las trampas. La flecha indica el día en que, la zona colindante a la trampa, fue pulverizada con fenitrotión.

**FIG. 13.-** Evolución del número de coleópteros de 6 mm. capturados en cada una de las trampas. La flecha indica el día en que, la zona colindante a la trampa, fue pulverizada con fenitrotión.

**FIG. 14.-** Evolución del número de coleópteros de 2mm. capturados en cada una de las trampas. La flecha indica el día en que, la zona colindante a la trampa, fue pulverizada con fenitrotión.

**FIG. 15.-** Evolución del número de coleópteros de 4 mm. capturados en cada una de las trampas. La flecha indica el día en que, la zona colindante a la trampa, fue pulverizada con fenitrotión.

**FIG. 16.-** Evolución del número de dípteros ciclorrafos capturados en cada una de las trampas. La flecha indica el día en que, la zona colindante a la trampa, fue pulverizada con fenitrotión.

**FIG. 17.-** Evolución del número de dípteros nematóceros (<10 mm.) capturados en cada una de las trampas. La flecha indica el día en que, la zona colindante a la trampa, fue pulverizada con fenitrotión.

**FIG. 18.-** Evolución del número de hemípteros homópteros (4mm.) capturados en cada una de las trampas. La flecha indica el día en que, la zona colindante a la trampa, fue pulverizada con fenitrotión.

**FIG. 19.-** Evolución del número de hemípteros notonéctidos (5 mm.) capturados en cada una de las trampas. La flecha indica el día en que, la zona colindante a la trampa, fue pulverizada con fenitrotión.

**FIG. 20.-** Evolución de las medias de los residuos del modelo de regresión ACTIVIDAD (tanto por uno de intervalos donde se escuchan murciélagos)-HORA correspondiente al primer recorrido de cada transecto realizado durante los distintos días de muestreo. Se marcan los intervalos de confianza del 95% para cada media. Transecto n° 1:  $F=1.978$ , g.l.=118,  $p=0.087$ ; T. n° 2:  $F=2.125$ , g.l.=101,  $P=0.068$ ; T. n° 3:  $F=1.764$ , g.l.=117,  $P=0.126$ ; T. n° 4:  $F=11.184$ , g.l.=91,  $P=0.0000$ . Los grupos homogéneos son encuadrados por líneas horizontales dispuestas en diferentes niveles (test de Scheffe) . La flecha indica el día en que la zona que incluye cada transecto fue pulverizada con fenitrotión.

**FIG. 21.-** Evolución de las medias de los residuos del modelo de regresión ACTIVIDAD (tanto por uno de intervalos donde se escuchan murciélagos)-HORA correspondiente al segundo recorrido de cada transecto realizado

durante los distintos días de muestreo. Se marcan los intervalos de confianza del 95% para cada media. Transecto n° 1:  $F=0.475$ ,  $g.l.=117$ ,  $p=0.794$ ; T. n° 2:  $F=0.430$ ,  $g.l.=97$ ,  $P=0.826$ ; T. n° 3:  $F=4.298$ ,  $g.l.=118$ ,  $P=0.001$ ; T. n° 4:  $F=5.058$ ,  $g.l.=80$ ,  $P=0.001$ . Los grupos homogéneos son encuadrados por líneas horizontales dispuestas en diferentes niveles (test de Scheffe) . La flecha indica el día en que la zona que incluye cada transecto fue pulverizada con fenitrotión.

### **Horario de Retorno a la Colonia y Peso de Capturas.**

Los horarios de entrada a la colonia antes y después del tratamiento no se pueden comparar porque no se hizo trabajo de campo dirigido a ello. Sin embargo, los datos de horario de captura y peso de los animales sugieren algunas ideas.

Al comparar la representación de los animales capturados antes (día 18/7) y después del tratamiento (día 21/7), observamos, además de la mayor concentración de las hembras adultas en la primera muestra (debida tan sólo a sesgo de captura), que todos se ajustan a un patrón general, correspondiente a la ingestión y digestión de las presas, respecto a la relación peso-hora de captura. Los animales capturados al principio, cuando están saliendo de la colonia presentan pesos mínimos; conforme avanza el tiempo se capturan hembras adultas de mayor peso hasta alcanzar un máximo, a partir del cual el peso de los individuos disminuye con la hora de captura. Esta disminución se podría deber a la diferente eficiencia relativa en la captura de presas de los individuos, junto a que los individuos menos eficientes emplearan más tiempo para conseguir un mínimo de alimento. Sin embargo, dada la superabundancia de alimento en la zona, creemos que el efecto tiene que ver con la excreción parcial del alimento ingerido en los individuos que se capturan más tarde, los cuales retrasan su entrada a la colonia bien por que cazan en zonas más alejadas, descansan en refugios alternativos, o se asustan de nuestra presencia con las artes de trampeo. En consonancia con este patrón, está la relación de las diferencias entre el peso a la hora de captura y 12 horas después (cuando los animales ya han excretado todo el contenido del tubo digestivo) de las hembras capturadas el día 21/7.

El peso de los individuos juveniles se mantiene, en cambio, estable durante todo el tiempo de estudio. Este dato de que los jóvenes aún no se alimentan por sí solos tiene interés para la interpretación de las vías de acceso al biocida.

En principio parece que no hay diferencias en la cantidad de alimento ingerido antes y después del tratamiento. De hecho, al comparar entre ambos días los pesos medios de las hembras adultas, que entran desde las 21.00 a las 25.00 hora solar, no se encuentran diferencias significativas ( $F=0.225$ ,  $p=0.645$ ).

18/7 2 1/7

Peso medio 5.81 5.71

n 9 19

Error St. 0.193 0.114

Con los datos de pesos a la salida y a la entrada (21.00-23.00 solar) se puede hacer una estima de la ingesta diaria de alimento (poco fiable, ciertamente, porque solo contamos con datos de un día, el 21/7, y de pocos individuos) , que nos servirá para hacernos una idea de la posible ingesta diaria de biocida:

6.0 g. - 4.8 g.=1.2 g.

(n=9) (n=4)

Peso medio entrada Peso medio salida Ingesta

El punto se ha situado en la gráfica de la figura 23 (esta cifra frente a la media aritmética de las horas de captura de las 9 hembras).

### **Análisis Químicos (contenido en fenitrotión).**

- Insectos (tabla 21).

En ninguna de las muestras de insectos correspondientes al pretratamiento se detectaron residuos de fenitrotión. En todas las muestras correspondientes a la noche posterior al tratamiento aparecieron residuos del pesticida, con valores muy diferentes entre los distintos grupos. Parece ser que los insectos acuáticos o con larvas acuáticas (el grupo entero de coleópteros y muchos de los dípteros) estarían menos expuestos a la adquisición directa del tóxico que los insectos diurnos. Estos lo deben absorber principalmente mediante deposición directa durante la aplicación y el contacto con superficies sobre las que se ha depositado el fenitrotión. Otra posible justificación, no excluyente con la anterior, es la fuerte variación de la relación superficie/volumen de los distintos grupos de insectos considerados. En los lepidópteros esta relación es máxima debido al tamaño de sus alas, mientras que en los coleópteros acuáticos, de aspecto redondeado, es mínima.

**Tabla 21. Residuos de fenitrotión en las muestras de insectos. Los contenidos se dan en microgramos/gramo de muestra.**

Grupo	18/7	20/7
Coleópteros	ND	1.876
Homópteros+Dípteros	ND	6.698
Lepidópteros	ND	11.010

Un análisis somero de muestras de excrementos de *Pipistrellus*, indicó que su alimento consistía principalmente en insectos pequeños de cuerpo blando, los que integrarían la clase de homópteros+dípteros, algunos coleópteros muy pequeños, y escasos lepidópteros. A partir de estos resultados y de la ingesta diaria calculada anteriormente se puede estimar una dosis de fenitrotión de  $6.698 \text{ microg./g} * 1.2 \text{ g/día} = 8.0376 \text{ microg./día}$ , lo cual corresponde a una dosis dietaria de  $1.664 \text{ mg/Kg/día}$  (para un peso medio de las hembras de 4.83 g, n=4).

#### - Quirópteros (tabla 22).

En las muestras agrupadas de individuos jóvenes y adultos previas al tratamiento no se detectó presencia de fenitrotión.

En las correspondientes al día después del tratamiento, se detectó una cantidad importante de biocida, mucho mayor en las pieles que en las carcasa+vísceras. El contenido presente en la carcasa+vísceras estaba fuertemente correlacionado con el encontrado en la piel ( $r=0.92$ ,  $p=0.00006$ ,  $R^2=84.53$ ).

Los jóvenes exhibieron valores superiores en el contenido de fenitrotión en la piel, tanto cuando se consideró el individuo con valores anómalamente altos de contenido de residuos como de AChE (tabla 22) como cuando se eliminó, aunque en ningún caso las diferencias fueron significativas ( $p=0.129$ , sin el "anómalo"). La media de los contenidos totales de fenitrotión en el cuerpo también es mayor en los individuos jóvenes, aunque de forma no significativa ( $p=0.314$ ).

En las muestras agrupadas de individuos jóvenes y adultos capturados 21 días después del tratamiento se encontraron niveles de fenitrotión totales considerables, y mayores que los hallados en las muestras inmediatas al tratamiento. El contenido de la muestra correspondiente a los individuos jóvenes resultó notablemente mayor que el de la de los adultos (tabla 22).

#### Actividad Acetilcolinesterasa (AChE) .

En las muestras correspondientes al día inmediato al tratamiento (figuras 25 y 26) tan sólo apareció un individuo (6.7% de la muestra) con la AChE deprimida en al menos un 20% (OF.20, AChE=24.31). Ninguna de las muestras presentó depresión de la actividad por encima del 50% (Tabla 23). La media de la AChE resultó incluso superior a la de patrón del día de pretratamiento, aunque la diferencia no resultó significativa ( $F=0.187$ , 29 gdl,  $p=0.673$ ). No se encontraron diferencias entre jóvenes y adultos en la AChE en la muestra patrón ( $F=0.542$ , 29 gdl,  $p=0.520$ ) ni en la inmediatamente posterior al tratamiento ( $F=0.616$ , 29 gdl,  $p=0.456$ ).

En las muestras tomadas 21 días después de la aplicación del pesticida aparecieron 5 individuos con depresión en la AChE por encima del 20% (35.7% de la muestra), y ninguno por encima del 50% (Tabla 23). La media de la actividad resultó significativamente diferente (e inferior) de la patrón ( $F=17.076$ , 28 gdl,  $p=0.000$ ), y de la muestra

inmediata al postratamiento ( $F=12.988$ , 28 gdl,  $p=0.001$ ). Tampoco en este caso se encontraron diferencias significativas en la AChE entre individuos jóvenes y adultos ( $F=0.098$ , 28 gdl,  $p=0.763$ ).

### Relación Contenido Residuos Fenitrotión-AChE.

Se encontró correlación negativa (en el análisis se eliminó como anómalo el individuo adulto con un contenido en fenitrotión y AChE mucho más altos que los demás) entre el nivel de actividad de acetilcolinesterasa cerebral y los contenidos de pesticida en piel ( $r=-0.684$ ,  $p=0.029$ ,  $R^2=46.75\%$ ; figura 27) y total ( $r=-0.652$ ,  $p=0.041$ ,  $R^2=42.49\%$ ; figura 28). Por el contrario, el contenido de fenitrotión en las muestras de carcasa + vísceras no está correlacionado con la actividad colinesterasa ( $r=-0.427$ ,  $p=0.473$ ,  $R^2=18.23\%$ ).

Los valores de contenido de fenitrotión de las muestras del día 10/8, representados frente a los promedios de la AChE de los individuos de cada grupo en la gráfica de la figura 28, concuerdan con el patrón general observado en las muestras del día 21.

**Tabla 22. Residuos de fenitrotión encontrados en los análisis químicos.** Se da la Actividad de la Acetilcolinesterasa (AChE) en **nanomoles/miligramos proteína/minuto**, y los contenidos de fenitrotión en piel (FePiel), carcasa+vísceras (FeCar) y total (FeTot) en **partes por millón** (microgramos/gramo). Las fechas a las que corresponden las muestras se dan entre paréntesis. Las del pretratamiento (19/7) y las del día 10/8 están constituidas por un grupo de individuos que se analizaron conjuntamente, y cuyos códigos se indican entre paréntesis (en estos casos, la AChE presentada es la media aritmética de las de los individuos constituyentes de la muestra). La abreviatura ND significa que no se detectó el biocida en la muestra al nivel fijado. El individuo con valores fuera del patrón general de AChE y contenido en residuos de fenitrotión (OF.24) se indica con \*\*\*.

Código	Ache	FePiel	FeCar	FeTot
Pool Juv. (19/7)				
(OF.1+OF.5+OF.9)	29.72	--	--	ND
Pool Ad. (19/7)				
(OF.6+OF.11+				
OF.14+OF.15)	29.87	--	--	ND
Juv. (21/7) OF.18	27.37	1.49	0.59	0.81
OF.19	30.96	1.55	0.61	0.85
OF.23	26.48	1.78	0.52	0.83
OF.28	25.39	0.79	ND	0.30
OF.30	37.27	0.58	ND	0.15
Conjunto Juv.	29.49	1.24	0.34	0.59
Ad. (21/7) OF.16	28.59	1.04	0.26	0.43
OF.20	24.31	1.35	0.77	0.92
OF.21	30.66	0.59	ND	0.13
*** O F.24	42.35	2.46	0.88	1.21
OF.27	32.24	0.66	ND	0.15
OF.29	34.75	0.58	ND	0.13
Conjunto Ad.	32.15	1.11	0.32	0.50
Idem, Sin OF. 24	30.11	0.84	0.21	0.35
Total (21/7)	30.94	1.17	0.33	0.54
Pool Juv. (10/8)				

(OF.101+OF.102+ OF. 109)	26.33	--	--	1.05
Pool Ad. (10/8)				
(OF.100+OF.105+ OF.112)	24.94	--	--	0.63

**FIG. 25.-** Evolución de los niveles medios de actividad de la AChE cerebral (nmol/mg/min) en *P. pipipistrellus*. Se marcan los niveles de confianza del 95% en cada media.

**FIG. 26.-** Niveles medios de actividad de la AChE cerebral (nmol/mg/min) determinados en individuos jóvenes y adultos de *P. pipistrellus*. Se marcan los niveles de confianza del 95% para cada media.

**Tabla 23. Valores de Actividad Acetilcolinesterasa cerebral (AChE) para las muestras patrón (18/7), inmediatamente posterior al tratamiento (21/7), y 21 días después de éste (10/8).** Se da el código de identificación de los individuos, la edad (3=juvenil, 4=adulto) y la AChE en **nanomoles/miligramos de proteína/minuto**. También se muestran los valores medios para los grupos de jóvenes y adultos, y totales, con sus errores estándar (ES).

Muestra 18/7			Muestra 21/7			Muestra 10/8		
Código Edad AChE			Código Edad AChE			Código Edad AChE		
OF.01	3	30.45	OF. 18	3	27.37	OF.101	3	28.37
OF.03	3	26.19	OF.19	3	30.96	OF.102	3	27.01
OF.05	3	29.04	OF.23	3	26.48	OF.104	3	25.55
OF.07	3	34.66	OF.28	3	25.39	OF.106	3	29.04
OF.09	3	26.66	OF.30	3	37.27	OF.108	3	22.98
						OF.109	3	23.62
Media Juv.		29.40			29.49			26.10
(ES)		(1.53)			(2.16)			(1.01)
OF.02	4	34.70	OF.16	4	28.59	OF.100	4	23.10
OF.04	4	29.78	OF.17	4	28.98	OF.103	4	26.46
OF.06	4	29.22	OF.20	4	24.31	OF.105	4	25.09
OF.08	4	35.95	OF.21	4	30.66	OF.107	4	29.01
OF.10	4	32.72	OF.22	4	32.80	OF.110	4	24.10
OF.11	4	27.29	OF.24	4	42.35	OF.111	4	22.98
OF.12	4	26.12	OF.25	4	30.74	OF.112	4	26.63
OF.13	4	27.55	OF.26	4	29.96	OF.113	4	28.20
OF.14	4	32.82	OF.27	4	32.24			
OF.15	4	30.13	OF.29	4	34.75			
Media Ad.		30.63			31.54			25.70
(ES)		(1.04)			(0.55)			(0.80)
Total		30.22			30.86			25.86
		(ES)		(0.84)			(1.21)	
(0.61)								

**FIG. 27.-** Actividad de la AChE cerebral (nmol/mg/min) frente al contenido de fenitrotión (ppm) encontrado en la piel. Para estimar la recta no se ha considerado el *P. pipistrellus* adulto capturado el 21.7.90. ( $r=-0.684$ ,  $p=0.029$ ,  $R^2=46.75\%$ ).

**FIG. 28.-** Actividad de la AChE cerebral (nmol/mg/min) frente al contenido total de fenitrotión (ppm) . Se diferencian los jóvenes (juv) de los adultos (ad) , así como la fecha en que fueron capturados. Para estimar la recta de regresión no se ha considerado el *P. pipistrellus* adulto capturado el 21.7.90. ( $r=-0.652$ ,  $p=0.041$ ,  $R^2=42.49\%$ ).

## DISCUSION

Los resultados obtenidos de las capturas de insectos y de la actividad de los murciélagos, no indican ningún efecto a corto plazo tras la aplicación del pesticida. La información obtenida en el trabajo indica posibles diferencias básicas entre las vías y modos de acceso al pesticida en murciélagos y los casos documentados en la bibliografía para aves. El diseño experimental se basó en los datos conocidos para aves, resultando el periodo de muestreo demasiado corto para detectar de una forma clara los efectos reales.

En primer lugar, diversos trabajos (Hunter *et al.*, 1984, Hunter y Whitman, 1985; Suttman y Barret, 1979) han mostrado que la depresión en la abundancia y/o biomasa de artrópodos en áreas tratadas con otros pesticidas organofosforados y carbamatos puede retrasarse desde uno a varios días después de las aplicaciones. En todo caso, en una serie temporal tan corta como la nuestra es imposible discriminar el posible efecto del biocida de las tremendas fluctuaciones diarias naturales de las capturas.

Busby *et al.* (1983) señalaron la existencia de dos tipos diferentes de respuesta (grado de inhibición de la Actividad ChE) en aves canoras salvajes frente a diferentes dosis de aplicación de fenitrotión. Con altas dosis, las aves estudiadas mostraban una rápida depresión de la actividad de la ChE directamente correlacionada con el contenido corporal de residuos, y una lenta recuperación correlacionada con el tiempo pasado desde la aplicación. Ante dosis menores, observaron una respuesta crónica con un aumento de inhibición de la ChE con el tiempo, y sin correlación con el contenido corporal de residuos. Busby *et al.* (1983) sugieren que la respuesta crónica es función de la exposición a los metabolitos vía ingestión y contacto en el tiempo, y del aumento de la formación de fenitrooxon como resultado de la inducción de la función mixta de la oxidasa, mientras que la respuesta aguda resulta de la exposición a altas dosis vía inhalación, penetración dérmica e ingestión del compuesto primario en el momento de la aplicación.

El grado de inhibición de la AChE o de la ChE experimentada por un animal, y su evolución temporal, es función de la exposición. Esta es una medida compuesta dependiente de la dosis de aplicación del pesticida, el contenido corporal de residuos, las vías de dispersión en el medio y la persistencia del compuesto y el tiempo transcurrido desde el primer contacto.

Un ave diurna insectívora accede al pesticida por vía dérmica mediante el tóxico que se deposita sobre la superficie corporal durante la aplicación y el que recoge por contacto con superficies previamente expuestas; por vía respiratoria, a través del pesticida suspendido en el aire; y por vía oral, mediante la ingestión de artrópodos con dosis letales (muertos) y/o subletales, y la toma de agua contaminada.

Un murciélago insectívoro fisurícola permanece en un refugio más o menos protegido cuando se efectúa el tratamiento, por lo cual el acceso al pesticida por vía dérmica directa y respiratoria se ve, cuanto menos, notablemente reducido, y más cuando, como en este caso, la pulverización tiene lugar por la mañana temprano y el pesticida tiene tiempo de sedimentarse en el suelo. Cuando caza no se posa sobre superficies (en el caso de un cazador aéreo, como *P. pipistrellus*) , por lo cual el acceso vía contacto no existe. Como caza insectos voladores (cazador aéreo), las presas contaminadas accesibles se limitan a aquellas que hallan adquirido dosis subletales que les permitan la actividad voladora. Aunque beben de la lámina superficial de masas de agua más o menos abiertas y quietas, donde es probable que el biocida se deposite en un primer momento, al ser éste más denso que el agua (1.31 a 20 °C, Hayes 1979), y solo moderadamente hidrofóbico (Mitchell y Roberts 1984), lo más probable es que se vaya al fondo, a no ser que sea muy afin a los solventes o materias de soporte con que se administra, y que éstas sí que sean hidrófobas y menos densas que el agua.

Los murciélagos capturados el día después del tratamiento no presentaban, aparentemente, inhibición de la AChE, pero la correlación negativa encontrada entre los niveles de AChE y contenidos totales y en piel de fenitrotión indica que algo estaba ocurriendo. Algunos trabajos han documentado un incremento inicial, durante los primeros

días, en la AChE, en sujetos expuestos por primera vez a un compuesto organofosforado, quizás relacionado con una adaptación a la primera exposición (Sanz *et al.*, 1990). Los niveles AChE significativamente inferiores y la mayor cantidad de residuos de fenitrotión en los cuerpos 21 días después de la aplicación indica que se estaba dando algún fenómeno de acumulación individual e intoxicación de tipo crónico de muy larga duración de la cual no conocemos ninguna referencia bibliográfica. La ausencia de datos intermedios de presencia de pesticida en presas y murciélagos, así como de niveles de AChE impide reconstruir la evolución del proceso.

Con gran probabilidad, los murciélagos acceden al pesticida tan solo a través de la ingestión de presas contaminadas. Las mayores cantidades halladas en los jóvenes del año, que aún no se alimentan por sí solos, indicaría que probablemente acceden al tóxico a través de la leche materna (en los lípidos lácteos). Los insectos capturados la noche tras la aplicación contenían un rango de 1.9 a 11.0 mg/Kg. Algunos trabajos han documentado la rápida caída del contenido de biocidas organofosforados en insectos con el tiempo tras la aplicación (Powell, 1984), con lo cual podemos esperar que estas sean las dosis máximas recibidas. Es de suponer que el contenido en la presas irá descendiendo con el tiempo, pero no tenemos ninguna medida de su evolución. Sin embargo, la escasa información bibliográfica se refiere a aplicaciones de menor intensidad, y en nuestro caso el comportamiento puede ser bastante diferente (según los regímenes de pulverización, como han señalado otros autores: Crick, 1986; Crick y Spray 1986).

No existen patrones para estimar el significado biológico de la dosis estimada (1.664 mg/Kg/día) que podían estar ingiriendo los murciélagos. Tan solo sabemos que las cifras están seguramente lejos de los márgenes de letalidad directa por envenenamiento. Sin embargo, podrían estar dentro del suficiente para causar efectos subletales considerables.

Trabajos de laboratorio han mostrado que las ratas hembra que habían recibido dosis orales de unos 1.5 mg/Kg/día de fenitrotión, experimentaban un descenso de la actividad ChE cerebral y en hematíes, pero no mostraban ningún cuadro de intoxicación. Los ratones a los que se suministraron dosis de 12.8 mg/Kg/día desarrollaban síntomas de intoxicación en una semana, y al final de un periodo de 20 días tenían la actividad ChE cerebral, en hematíes y en plasma reducidas al 45, 26 y 5% de lo normal. Ratones alimentados con dieta contaminada entre 10 y 100 ppm, correspondiente a una dosis en mg/Kg/día a la que podían estar ingiriendo los murciélagos del estudio, mostraban también inhibición pero a un menor nivel. Un nivel dietario de 1 ppm (=0.128 mg/Kg/día), producía más bien un incremento significativo de la actividad cerebral y plasmática del enzima (Hayes 1979).

Los trabajos de Clark (1981, 1986) y Clark y Rattner (1987) han mostrado la relativa resistencia de un par de especies de quirópteros frente a los ratones a la muerte bajo el efecto de pesticidas organofosforados, pero también una más lenta recuperación de la coordinación nerviosa y muscular tras la exposición. En condiciones naturales, los efectos de descoordinación pueden equivaler a la muerte, ya que el animal puede quedar expuesto a predadores oportunistas a sobrecalentamiento por exposición a la luz solar. Efectos relativamente ligeros sobre la coordinación nerviosa pueden causar efectos subletales de gran importancia en estos animales que requieren de un sofisticado equipo sensorial y motor para capturar a sus presas. Una merma importante en la eficacia de la caza puede depauperar las condiciones físicas de los animales, y si el efecto es de larga duración, como parecen indicar los resultados del estudio, aumentar la mortalidad de la población. En la época que se aplica el tratamiento las hembras están atendiendo a los jóvenes en desarrollo, y los efectos subletales podrían afectar al comportamiento maternal. Ya se ha visto que es posible que los jóvenes reciban el pesticida vía leche materna, y que acumulan mayores cantidades que las madres. Se desconocen los posibles efectos sobre el crecimiento, el desarrollo del sistema nervioso y el aprendizaje en murciélagos, aunque en algunas aves se ha demostrado que los insecticidas organofosforados inhiben el crecimiento de los pollos, y que éstos son también más sensibles que los adultos a bajas exposiciones (Powell y Gray, 1980; Grue *et al.*, 1982).

Los niveles de pesticida considerablemente mayores a los 21 días de la aplicación, contradicen los datos encontrados en la bibliografía (Busby *et al.*, 1983), que verifican descensos relativamente rápidos de los niveles del pesticida, y podrían apuntar una respuesta diferente entre aves y murciélagos. Dada la rápida degradación del fenitrotión libre en el medio (Crick 1986), parece haber un efecto de bioacumulación (individual, no en las cadenas tróficas), al menos a corto plazo. La mayor concentración encontrada en la piel frente a la carcasa, combinado con la poca probabilidad de acceso al pesticida por vía dérmica (sobre todo en los jóvenes, que vuelan poco tiempo, y que presentan mayor concentración aún que los adultos) apunta al posible almacenamiento temporal de este producto lipófilo en las grasas corporales (que en esta época de alta actividad metabólica se presentan mayormente en piel). En la grasa se puede producir un efecto de protección frente a los principales agentes degradadores (Crick 1986; Mitchell y Roberts 1984). Esta acción, unida a la inhibición de los procesos metabólicos de eliminación causados por la exposición crónica, facilita la persistencia y por consiguiente, una posible mayor incidencia de efectos fisiológicos adversos. Esta idea se sustenta en el hecho de que la vida media del fenitrotión en el cuerpo es

notablemente mayor después de 10 dosis de 30 mg/kg/día que tras una simple dosis de 300 mg/Kg (Hayes 1979).

## CONCLUSIONES

Aunque los objetivos pretendidos en el proyecto no se han cumplido en su totalidad, lo cual se puede considerar lógico al tratarse de un estudio pionero en un campo sobre el cual se carecía de información básica, se ha obtenido información muy interesante que pone de manifiesto que los murciélagos pueden verse afectados por los tratamientos fitosanitarios de uso común de forma más severa de lo que se pensaba. Los resultados abren toda una serie de interrogantes cuya respuesta habrá de abordarse en futuros estudios. El trabajo ha revelado que:

- El tratamiento con fenitrotión tiene efectos fisiológicos, al menos subletales y de magnitud desconocida, sobre los murciélagos del parque natural.
- Con los métodos aplicados no se han podido detectar efectos a corto plazo sobre la actividad de *Pipistrellu pipistrellus* en el área de estudio, ni sobre la abundancia de insectos.
- En los murciélagos se ha detectado una respuesta diferente a la exposición al biocida de la que otros estudios han documentado para aves, posiblemente mediada por diferencias en las vías de adquisición y en la respuesta fisiológica al tóxico.
- Los niveles crecientes en el tiempo, tanto en el contenido en residuos químicos como en depresión de la AACHe en los murciélagos indican la posible existencia de intoxicaciones de tipo crónico y acumulación corporal del biocida, hasta ahora no documentado en vertebrados terrestres. La exposición crónica durante un periodo relativamente largo al biocida (al menos de tres semanas), en un momento crítico del ciclo biológico puede tener efectos biológicos adversos de consideración, los cuales serían de máximo interés analizar.

## RECOMENDACIONES

Los efectos de los biocidas de uso más común y extendido (carbamatos, organofosforados, inhibidores de quitina como el Dimilín o Diflubenzuron, etc.), de los cuales se vierten todos los años miles de toneladas sobre los sistemas agrarios y forestales, se conocen de forma muy limitada. Muchas veces tan solo se conocen datos de toxicidades relativas de los productos en los laboratorios, y no el impacto sobre los ecosistemas reales en donde se vierten.

En este estudio primerizo se ha detectado la posible existencia de efectos negativos sobre una especie de murciélago que es capaz de vivir en entornos humanizados con altos niveles de contaminantes (sistemas urbanos e industriales, cultivos agrícolas intensivos, etc.), a los que puede ser particularmente resistente o adaptable. Otras especies de quirópteros con problemas agudos de conservación en Europa pueden resultar más sensibles a estos productos.

Son necesarios muchos más estudios que permitan conocer los efectos reales de estos productos, empezando por los de uso más común y extendido, y aquellos que se emplean sobre áreas forestales de alto valor biológico. Nunca se deberían emplear productos cuyos últimos efectos se desconocen sobre áreas que albergan especies o sistemas biológicos especialmente valiosos, escasos o amenazados.

Nos permitimos recomendar al organismo receptor de este informe que fomente este tipo de estudios, así como la investigación en métodos de protección de las producciones vegetales menos agresivas con el medio ambiente, como la lucha biológica y el empleo de feromonas.