Rev. Int. Contam. Ambient. *17* (3) 137-146, 2001

CAPTACIÓN DE MALATIÓN EN SEDIMENTOS ARTIFICIALES Y SU EFECTO TÓXICO SOBRE *Limnodrilus hoffmeisteri*

Laura MARTÍNEZ TABCHE, Marcela GALAR MARTÍNEZ, Elena OLVERA HERNÁNDEZ, Alejandro CHEHUE ROMERO, Eugenia LÓPEZ LÓPEZ y José Bernardo PROAL NÁJERA

Laboratorio de Toxicología Acuática, Departamento de Toxicología de Graduados de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México. Correo electrónico: ltabche@bios.encb.ipn.mx

(Recibido marzo 2000, aceptado abril 2001)

Palabras clave: *Limnodrilus hoffmeisteri*, malatión, sedimentos, bioconcentración, acetilcolinesterasa, lípidos, proteínas, lipoperoxidación

RESUMEN

El daño ocasionado por agentes xenobióticos sobre los ecosistemas acuáticos depende de su biodisponibilidad y persistencia así como de la capacidad de los organismos para acumularlos. En este estudio se evaluó la toxicidad y el factor de bioconcentración del malatión (MA) en *Limnodrilus hoffmeisteri* y en sedimento artificial con el propósito de demostrar la utilidad de este organismo como un posible candidato para estudios de biorremediación. Todos los análisis se realizaron en el sistema agua-sedimento artificial (arena, caolinita y materia orgánica) contaminado con el insecticida y llevado al equilibrio. Se determinó la CL_{50} del MA a 96 horas en el gusano. Para el estudio de toxicidad subletal y de biconcentración los tubificidos se intoxicaron con la décima parte de la concentración letal cincuenta ($CL_{50}/10$) del agroquímico, después de 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas. Éste se determinó en el sedimento y en el homogeneizado del hidrobionte por cromatografía de gases. En este mismo tejido se midieron los biomarcadores del daño: la actividad de la acetilcolinesterasa (AChA), el nivel de lipoperoxidación, la concentración de proteínas y de lípidos del gusano. Los resultados muestran que el sistema constituido por oligoquetos y sedimento presentan elevada capacidad de captación de MA, ya que sus vidas medias ($t_{1/2}$) fueron de 121 y 29 horas, respectivamente. El MA produjo efectos sobre la actividad de la AChA (96 % de inhibición), el grado de lipoperoxidación (incremento del 88.2 %), las proteínas (disminución hasta el 95%) y los lípidos (disminución hasta el 35.2 %), a un nivel de plaguicida que se considera como segura para productos agrícolas y alimentos; sin embargo, se puede notar que durante el período de intoxicación de 6 a 24 horas, la captación máxima del MA por el organismo es de 83 %. Se sugiere que la exposición del gusano al insecticida no sea mayor a este tiempo, ya que su capacidad para bioconcentrar tiende a descender. Por los resultados obtenidos se concluye que el *Limnodrilus hoffmeisteri* es un buen candidato para ser utilizado en procesos de biorremediación de sistemas acuáticos contaminados con MA.

Key words: *Limnodrilus hoffmeisteri*, malathion, sediments, bioconcentration, acethylcholinesterase, lipids, proteins, lipid peroxidation

ABSTRACT

The damage caused by xenobiotics on aquatic ecosystems depends on their biodisponibility and persistence as well as on the uptake capacity of the organisms. In this study the toxicity and bioconcentration factor of malathion (MA) spiked in artificial sediments of *Limnodrilus hoffmeisteri* were evaluated, in order to demonstrate the utility of this organism in biorremediation studies. All the studies were done in a water-artificial sediments system (sand, kaolinite and organic matter) contaminated with the insecticide. The lethal concentration fifty (LC_{50}) of MA at 96

hours was determined in the worm. For the sublethal toxicity and bioconcentration studies the tubifficids were intoxicated with $LC_{50}/10$ of the agrochemical. After 0, 6, 12, 24, 48, and 72 hours of exposure, the MA concentration was determined in sediment and worm by gas chromatography. In the organism also damaged biomarkers were measured: acetycholinesterase activity (AChA), lipid peroxidation level as well as protein and lipid concentration. The results showed that the system constituted by oligochaetes and sediment presented high MA uptake capacity due that its half lives ($t_{1/2}$) were of 121 and 29 hours respectively. MA had effect on AChA activity (96 % of inhibition), lipid peroxidation level (increase of 88.2 %), protein concentration (decrease until 95%) and lipids (decrease until 35.2 %), at pesticide levels considered safe for agricultural products and food. However, we could observe that during the 6-24 h exposure, the maximum uptake of MA by the organism was of 83 %. It is suggested that worm exposure to insecticide should not be longer than this time, since its bioconcentration capacity could be reduced. By the results obtained we conclude, that *Limnodrilus hoffmeisteri* is a good candidate to be used in biorremediation processes of aquatic systems polluted with MA.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del agua por plaguicidas usados en la agricultura es un problema de importancia mundial. En México existen algunos registros de campo sobre la contaminación por MA en los cuerpos de agua (Galar 1999). El transporte de este agente xenobiótico en el ambiente acuático dependerá de la capacidad del compuesto para adsorberse en material orgánico particulado, volatilizarse o bioacumularse en organismos acuáticos (Derosa y Stara 1988). Este insecticida se adsorbió considerablemente en los sedimentos de estanques con contenidos elevados de arcilla y limo. Asimismo, se predijo un coeficiente de adsorción en el suelo de 280 a partir de su solubilidad en agua, lo cual sugiere que el MA tiene un potencial moderado de adsorción en materia orgánica (Meyers *et al.* 1970). Debido a que este insecticida, inhibidor de la AChA de amplio espectro de acción, produce toxicidad muy baja en los mamíferos, se ha empleado en 27 estados de la República Mexicana (CNE 1988). Sin embargo, la vida media del MA es de 10.5 y 120 días a 20 °C a pH de 7.4 a 6.1, respectivamente, característica que contribuye a que este agente xenobiótico se acumule en los organismos bentónicos y en los sedimentos (Repetto *et al.* 1995).

El *Limnodrilus hoffmeisteri*, oligoqueto bentónico consumidor de organismos primarios (algas microscópicas e invertebrados, larvas de insectos, etc.), desempeña un papel fundamental en el ciclo del carbono, vive en todo tipo de hábitat dulceacuícola, es fuente de alimento de peces de ornato y en menor escala de otros organismos carnívoros como el langostino (Marian 1984), además puede ser un buen indicador de la contaminación (Fargasova 1996).

La presencia de grandes cantidades de diversas especies de oligoquetos acuáticos es indicadora de la contaminación del agua, siendo únicamente los tubifícidos tolerantes a la concentración alta de materia orgánica, insecticidas, herbicidas y fungicidas; este proceso se debe probablemente a su habilidad para sobrevivir en aguas con oxigenación baja o nula (Smith 1985, Doroskevich 1977). Por estas razones, es necesario investigar el potencial de estos organismos para utilizarse en la degradación o remoción de contaminantes ambientales.

Existen dos modelos para la biorremediación de xenobióticos mediante el uso de hidrobiontes: el estático y el dinámico. En ambos sistemas se pueden utilizar soportes de diferente composición, de tal forma que permita la viabilidad elevada y el crecimiento activo del organismo (Becker 1983). Para los oligoquetos, los sedimentos naturales o artificiales son opción para su mantenimiento.

Este tipo de sustrato que presenta propiedades de captación de contaminantes, está constituido por muchos compuestos orgánicos que cambian constantemente. Es un sistema muy heterogéneo que contiene componentes sólidos, líquidos y gaseosos. La fase sólida está en forma finamente dividida, con un área superficial muy grande. Su textura depende del tamaño de sus partículas: la arena tiene un diámetro de 2 a 0.02 mm, el limo varía entre 0.02 y 0.002 mm, la arcilla es menor de 0.002 mm. Este último integrante desempeña una función muy importante en la dinámica de los plaguicidas (Adams y Darby 1980).

Las propiedades fisicoquímicas de los sedimentos naturales de cuerpos de agua dulce y marina pueden variar mucho en sus características de adsorción y almacenamiento por lo tanto es posible utilizar sedimentos artificiales que cumplan con los mismos requisitos para acumular y retirar xenobióticos de efluentes contaminados. Sin embargo es necesario identificar un procedimiento estandarizado, en el cual se establezca tanto su capacidad de concentrar como las condiciones favorables de sobrevivencia de los organismos biorremediadores.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la biodisponibilidad, la bioconcentración y la toxicidad del MA sembrado en sedimentos artificiales sobre el gusano *Limnodrilus hoffmeisteri* con el propósito de utilizar a este organismo en procesos de biorremediación.

MÉTODOS

Preparación y caracterización del sedimento artificial.

Los sedimentos artificiales se prepararon de acuerdo con Burton *et al.* (1994). Su contenido de arena, caolinita y materia orgánica fue en proporción de 70:25:5, este sustrato se mezcló sin y con agua (1 mL de agua por cada gramo de sedimento). Se utilizó estiércol de vaca como fuente de carbono y nitrógeno. La muestra obtenida fue secada en una estufa a 80°C durante 24 h y tamizada a través de una malla de acero inoxidable de tamaño 0.02 mm. A esta mezcla se le determinó: pH (potenciómetro), textura (método de Bouyoucos), contenido de materia orgánica (método de Walkley y Black) y nitrógeno total (método de Kjeldahl) (Bohn *et al.* 1993).

Tiempo al equilibrio del MA en los sedimentos artificiales

Se formaron siete lotes de 10 g de sedimento seco y tamizado, que se mezclaron con las soluciones de prueba de MA. La emulsión concentrada del insecticida que se utilizó fue de Velsimex al 83.7 % de pureza. Las concentraciones nominales de las soluciones fueron: 1.0, 5.0, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L. Los sedimentos contaminados se agitaron mecánicamente. Después de 30, 45, 60, 120, 180, 240 y 300 minutos, todas las muestras se centrifugaron a 3,500 rpm durante 15 minutos, la concentración de MA fue determinada en el agua y en estos sustratos por cromatografía de gases. El MA rápidamente alcanzó el equilibrio (4 horas).

Toxicidad aguda del MA en *Limnodrilus hoffmeisteri*

Cultivo de los oligoquetos

Los organismos que fueron adquiridos en Hidalgo, Estado de México, se cultivaron en charolas provistas de sedimento artificial, que se mezcló con agua reconstituida (44 mg/L de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 123.25 mg/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$;62.5 mg/L de $NaHCO_3$ y 5.75 mg/L de KCl) (1:4). Los cultivos fueron mantenidos bajo condiciones óptimas de temperatura (20-23 °C), aireación constante, ciclos de luz-obscuridad de 16 y 8 horas y pH de 7.5 a 8.5. Todos los oligoquetos fueron alimentados con melaza 5% (p/v), previa fermentación aeróbica durante 48 horas.

Se formaron siete lotes con el sistema sedimento/agua, que se contaminaron con cinco concentraciones diferentes de MA comercial (0.0001,0.001, 0.01, 0.1, y 1.0 mg/kg), otro con acetona (disolvente del MA, 130 µL/100 ml) y el séptimo únicamente con agua reconstituida. Posteriormente se agitaron durante 4 horas con la finalidad de establecer el tiempo al equilibrio del insecticida. Diez gusanos (cuya longitud fue de 1.5 ± 0.5 cm de longitud) se colocaron en cada sistema y después de 96 horas se registraron los datos de mortalidad. Este mismo procedimiento se realizó para la toxicidad aguda del MA en agua, pero el sistema fue diferente, en este caso únicamente se intoxicaron directamente los tubifícidos con el plaguicida disuelto en agua reconstituida. Estas pruebas se realizaron en 5 ocasiones cada una. La determinación de la CL_{50} para el MA, se efectuó a través del método probit con un programa de software (DL50C S.B.I.-IRCT, Montepellier, 1987). El estudio de toxicidad aguda fue realizado para seleccionar la concentración de MA que se empleó en el estudio de toxicidad subletal.

Toxicidad subletal del MA

Para esta prueba se utilizó el sistema agua-sedimento (este último secado y tamizado) en proporción 4:1 respectivamente. De este sustrato se formaron doce lotes, que se contaminaron con 0 y 0.03 mg/kg de MA (CL_{50}/10 en 96 horas en el tubifícido), después de establecer el equilibrio (4 horas), se colocó 1.0 g de gusano (aproximadamente 900 organismos de 1.5 ± 0.5 cm de longitud), posteriormente se tomaron muestras de 0.5 g tanto de sedimento como de oligoquetos a los tiempos de 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas para cuantificar el MA por cromatografía de gases. Los 0.5 g restantes de organismos se homogeneizaron con 20 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4; esta suspensión se centrifugó a 12,500 rpm a –5 °C durante 15 min. Al sobrenadante se le determinó la actividad de AchA por el método de Hestrin (1949), la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976) y el grado de lipoperoxidación por el método de Hoving *et al.* (1992). En el paquete celular se cuantificó lípidos totales por el método de Postman y Ströes (1968).

Para evaluar la actividad de AChA a 0.5 ml de sobrenadante se adicionaron 0.5 ml de amortiguador de tris base pH 7, 0.5 ml de acetilcolina estándar (ACH) (10 µmol/ml) y se incubó a 36 °C. Después de 30 min se añadieron 1.0 ml de hidroxilamina (2 M) y 0.5 ml de HCl 4 N y 0.5 ml de $FeCl_3$ y se leyó la absorbencia en un espectrofotómetro Varian DMS 90 a 540 nm. Estos datos se interpolaron en una curva tipo de ACH. Para la cuantificación de proteínas, se tomaron 25 µL de sobrenadante se ajustaron a 100 µL con agua desionizada, se adicionaron 2.5 mL de reactivo de Bradford (100 mg de azul de commassie, 50 ml de etanol al 95 % y 100 mL de H_3PO_4 y se ajustó a 1000 mL con agua desionizada) y después de 5 min todos los tubos se leyeron a 595 nm. Las lecturas fueron interpoladas en una curva tipo de albúmina sérica bovina al 1%. El grado de lipoperoxidación se evaluó en 0.5 ml del sobrenadante, al cual se le agregaron 2.0 ml de ácido tiobarbitúrico (0.127 g de ácido tiobarbi-túrico, 4.0 g de ácido tricloroacético y 0.165 ml de HCl concentrado en 25 ml de agua desionizada) y se colocó en baño maría a ebullición. Después de 30 min todos los tubos se enfriaron en baño de hielo durante 15 min y se centrifugaron a 2,500 rpm por 5 min para su posterior determinación de absorbencia a 532 rpm. Las densidades ópticas fueron

interpoladas en una curva tipo de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TEP) malondialdehído. Asímismo al paquete celular se le cuantificaron los lípidos totales adicionándole 2.5 mL de H_2SO_4, se calentó en agua a ebullición y se centrifugó a 3,500 rpm. Después de 10 min, a 50 µL del sobrenadante frío se le adicionaron 2.5 mL de reactivo de fosfovainillina (1.371 g de vainillina disuelta en 1000 mL de H_3PO_4). El complejo colorido se leyó a 540 nm, las absorbencias se interpolaron en la curva tipo de aceite de oliva.

Cuantificación del MA en sedimentos y tejido de *Limnodrilus hoffmeisteri*

Los 0.5 g de sedimento, o de gusano obtenidos de la prueba de toxicidad subletal, fueron homogeneizados con 40 g de sulfato de sodio anhidro en un mortero. A esta suspensión así como a las muestras de agua (obtenidas al tiempo cero y a las 72 horas) se les aplicó una mezcla de solventes hexano:cloruro de metileno en proporción 1:1 (grado cromatográfico) y se agitaron durante 30 min. La fase orgánica se limpió en columnas (15 cm de longitud por un centímetro de diámetro) empacadas con flurisil para cromatografía (lavado con agua desionizada y secado a 600 °C en una mufla durante 2 horas). Todos los extractos fueron evaporados a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno y reconstituidos con 0.5 mL de hexano (grado cromatográfico). El contenido de MA fue cuantificado en un cromatógrafo de gases Varian 3400, equipado con un detector termoiónico específico y una columna J&W Scientific DB-1 de 15 m de largo, 0.53 mm de diámetro interno y una capa de silicón de 1.5 µm de ancho usando helio como gas acarreador a 30 ml/min. La temperatura del inyector fue de 250 °C y la del detector de 160 °C. El programa de temperaturas utilizadas en las muestras fue: temperatura inicial de la columna 120°C con un tiempo de enfriamiento de 1 minuto, elevándose a 150 °C a 30 °/min durante 2.0 min, elevándose a 205 °C a 10 °C/min, elevándose a 240 °C a 2 °C/min con un tiempo de mantenimiento de 5 min (Gluckman *et al.* 1986, Farran *et al.* 1988, Stan 1989).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza de una sola vía con el fin de detectar diferencias significativas con respecto al tiempo cero mediante el paquete de Microsta (Ecosoft 1984) y las diferencias observadas entre las medias de cada grupo se compararon por el método de Duncan, considerando el valor $p<0.05$ como diferencia significativa.

RESULTADOS

Caracteristicas fisicoquímicas del sedimento artificial

El contenido de materia orgánica, carbono orgánico, nitrógeno total así como el pH y el tamaño de partícula del sedimento artificial presentaron características muy similares a los de un cuerpo de agua natural y a los recomendados para realizar pruebas de toxicidad (**Tabla I**). Es importante mencionar que este sustrato preparado en el laboratorio es parecido a los que se encuentran en la mayoría de los sedimentos contaminados donde proliferan organismos bentónicos, entre los que destacan los tubifícidos de la especie *Limnodrilus hoffmeisteri* y *Tubifex tubifex*, entre otros (Baudo *et al.* 1996). De acuerdo con el tamaño de partículas mayores a 0.02 mm de diámetro, la textura del mismo corresponde a arena fina.

TABLA I. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL SEDIMENTO ARTIFICIAL

Parámetro	
pH	7.3 ± 0.284
Materia orgánica (%)	3.82 ± 0.99
Carbón orgánico (%)	2.25 ± 0.88
Humedad (%)	40.68 ± 1.66
Nitrógeno total (%)	1.27 ± 0.215
Tamaño de partícula	Arena fina

Cada valor representa el promedio de 9 réplicas ± DE

Toxicidad aguda del MA

El valor de la CL_{50} al tiempo de exposición de 96 horas para el MA en *L. hoffmeisteri* en el sistema sedimento-agua fue 3.86 veces mayor que el valor obtenido en el sistema de agua reconstituida (**Tabla II**).

TABLA II. TOXICIDAD AGUDA DEL MALATIÓN SOBRE *L. hoffmeisteri* EN AGUA Y SEDIMENTO DURANTE 96 H DE EXPOSICIÓN

Sistema de prueba	CL_{50}	Límite de confianza (95%)
Agua (mg/L)	0.069	0.053 - 0.0918
Sedimento (mg/Kg)	0.269	0.140 - 0.5199

Cada valor representa el promedio de 5 réplicas ± DE

Toxicidad subletal del MA

La concentración de proteínas de los gusanos disminuyó en todos los tiempos de exposición al insecticida ($p<0.05$). La mayor diferencia se observó a las 24, 48 y 72 horas, ya que el decremento fue del 96.07, 92.36 y 85.11 %, respectivamente al compararlos con el lote

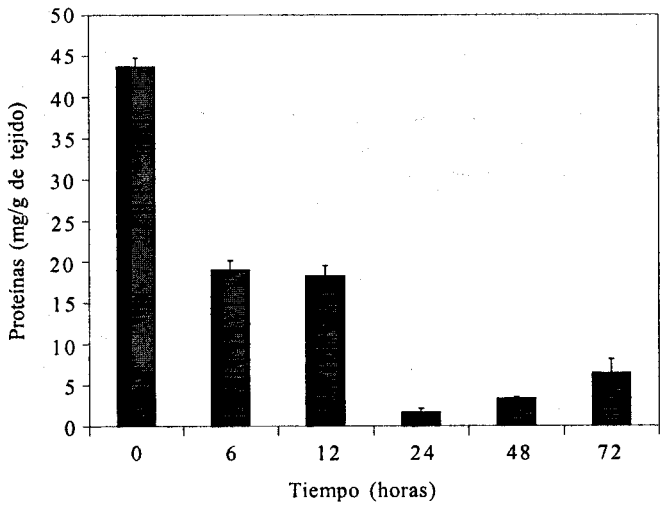

Fig 1. Efecto del malatión sobre el curso temporal de la concentración de proteínas del gusano *Limnodrilus hoffmeisteri* al exponerse a sedimentos artificiales contaminados con 0.03 mg/kg del insecticida

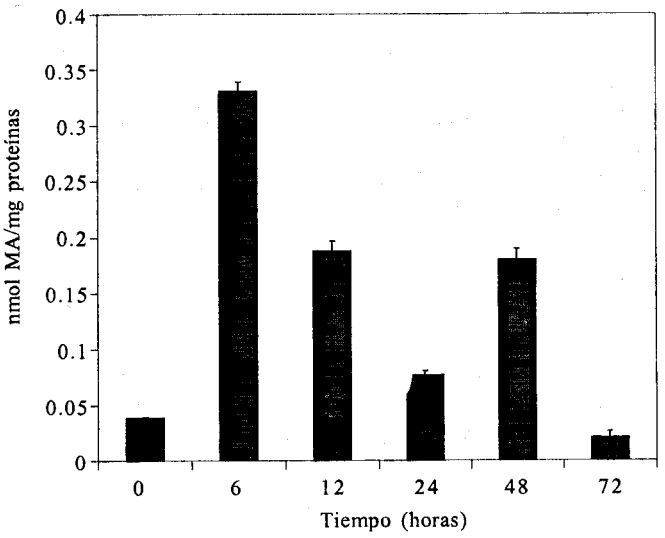

Fig. 3. Efecto del malatión sobre el curso temporal del grado de lipoperoxidación del gusano *Limnodrilus hoffmeisteri* al exponerse a sedimentos artificiales contaminados con 0.03 mg/kg del insecticida

testigo (**Fig. 1**). Con respecto a la AchA, también la actividad de esta enzima se inhibió en todos los tratamientos. Sin embargo, el efecto más importante se presentó a las 6 horas (**Fig. 2**). A este tiempo de exposición el grado de lipoperoxidación se incrementó hasta 88.21 % ($p<0.01$), pero el daño fue menor en 12, 24 y 48 h. El efecto provocado por el MA sobre la membrana a las 72 horas disminuyó hasta 53.84 % con respecto al testigo (**Fig. 3**). La concentración de lípidos disminuyó en todos los tiempos de exposición excepto a las 48 horas. En este lote se observó un incremento de 11.15 % (**Fig. 4**).

Curso temporal de la concentración del MA en el gusano y en sedimento artificial

La recuperación del MA en agua, sedimento y organismos mostró una eficiencia de 75 y 105 %, con un coeficiente de variación de 7 % a tiempo cero. La captación del MA por los gusanos expuestos al sistema

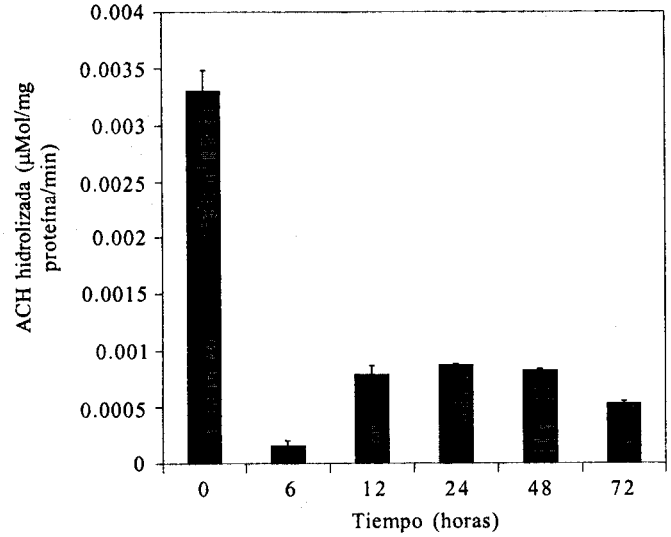

Fig. 2. Efecto del malatión sobre el curso temporal de la actividad de la AChA del gusano *Limnodrilus hoffmeisteri* al exponerse a sedimentos artificiales contaminados con 0.03 mg/kg del insecticida

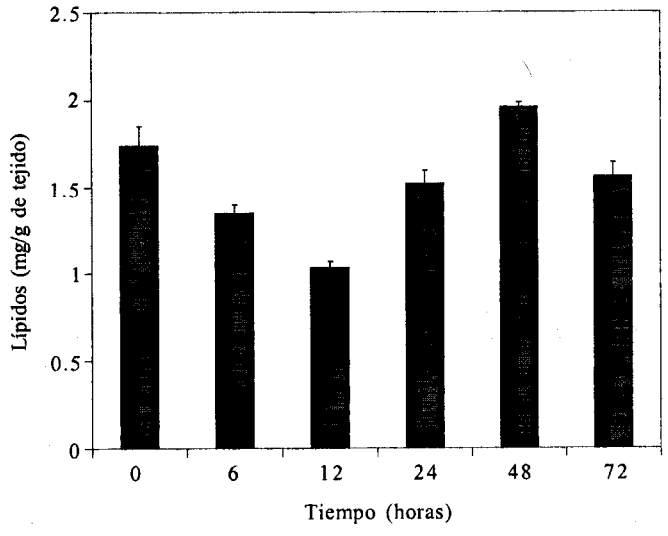

Fig. 4. Efecto del malatión sobre el curso temporal de la concentración de lípidos del gusano *Limnodrilus hoffmeisteri* sembrado en sedimentos artificiales contaminados con 0.03 mg/kg del insecticida

agua-sedimentos con 0.03 mg/kg de MA fue rápido (6 h), alcanzando su máxima concentración a las 24 horas (83.3 %). Inmediatamente después el nivel del agroquímico en tejido decreció en forma significativa, sin embargo, éste no desaparece totalmente del tubifícido, ya que a las 72 horas (tiempo que duró el estudio) se encontró 0.019 mg/kg de tejido húmedo de insecticida (que representa el 76 % de la máxima concentración captada) (**Fig. 5**). Con respecto al sedimento, el MA tiende a disminuir con el tiempo, pero la perdida del xenobiótico de este sustrato no fue total a las 72 horas (0.0049 mg /L, representando el 16.41 % del total). Es importante observar que en los primeros tiempos de exposición, conforme decrece la cantidad de MA en este sustrato en el gusano se incrementó (**Fig. 5**). La concentración final de MA presente en el agua a las 72 horas fue de 0.0013 mg/L.

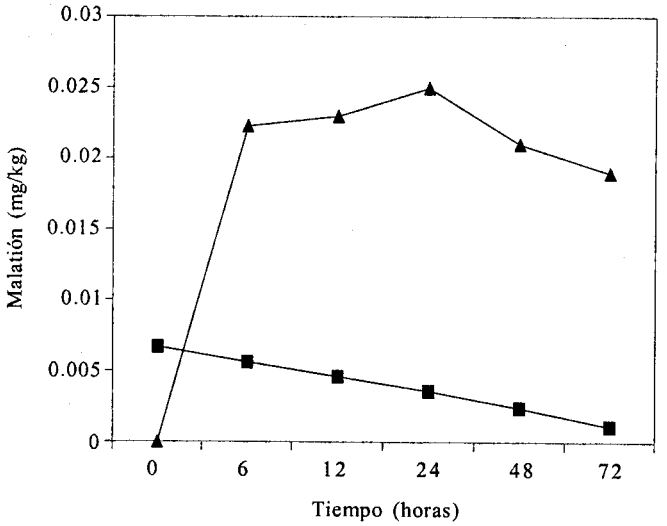

Fig. 5. Curso temporal del malatión en tejido húmedo de *Limnodrilus hoffmeisteri* (▲) y sedimentos artificiales contaminados con 0.03 mg/kg del insecticida (■)

Factor de bioconcentración (FBC) y vida media ($t_{1/2}$) del MA en *L. hoffmeisteri*

La bioconcentración de un compuesto en un organismo acuático es el resultado del equilibrio entre la captación y la eliminación de un agente tóxico en los sistemas agua-sedimento-organismo; por lo tanto el FBC parcial para cada tiempo se expresó como el cociente de la concentración de MA en el oligoqueto (Cg) / concentración de MA en sedimentos (Cs) alcanzado en un tiempo determinado. En este estudio se observó que este parámetro se incrementó conforme transcurrió el tiempo de exposición (**Tabla III**).

Para la determinación de la concentración del MA en el organismo, se utilizó un modelo monocompartamental ajustándose a una cinética de primer orden con la siguiente ecuación: $C = X_o e^{-kelt}$

donde:

C = Concentración del MA en el organismo en un tiempo determinado.

kel = Constante de eliminación

t = Tiempo en horas

La $t_{1/2}$ del MA en el organismo se calculó de la ecuación:

$$t_{1/2} = \ln (2) / kel$$

Para la concentración del MA en el sedimento también se utilizó una cinética de primer orden: $Cs = X_o e^{-kpt}$

donde:

Cs = Concentración del MA en el sedimento en un tiempo determinado

kp = Constante de pérdida del MA

t = tiempo en horas

La $t_{1/2}$ del MA en el sedimento se calculó de la ecuación:

$$t_{1/2} = \ln (2)/ kp$$

La $t_{1/2}$ del MA en los gusanos fue 4.02 veces mayor que en el sedimento (**Tabla III**), lo que explica porque el FBC se incrementó conforme transcurrió el tiempo de exposición.

TABLA III. FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN Y VIDA MEDIA DEL MALATIÓN EN *L. hoffmeisteri* EXPUESTO AL SEDIMENTO CONTAMINADO CON 0.03 mg/kg DE INSECTICIDA

Tiempo de exposición (h)	*Factor de bioconcentración parcial
0	0
6	3.964 ± 0.475
12	5.106 ± 0.562
24	6.756 ± 0.516
48	8.888 ± 0.853
72	17.272 ± 0.922
$t_{1/2}$ en sedimento	29 h
$t_{1/2}$ en gusano	121 h

* FBC = concentración de malatión en el gusano/ concentración de malatión en el sedimento; cada valor representa el promedio de 6 réplicas ± DE

DISCUSIÓN

El uso de sedimentos de referencia en bioensayos con hidrobiontes es recomendado para evaluar la toxicidad relativa de un xenobiótico, ya que impedirá que otro tipo de factores pueda antagonizar o potenciar el efecto de

un contaminante o en su caso permitirá establecer las variables que pueden interaccionar con su biodisponibilidad y por consiguiente con su toxodinamia (Burton 1992). Sin embargo este tipo de sustratos deberán cumplir con ciertas características: sedimentos limpios, es decir contener concentraciones muy bajas o ningún contaminante, tamaño de partícula y cantidad de materia orgánica muy parecidas a las que se encuentran en cuerpos de agua natural (Dave y Nilsson 1996). En este estudio, estas tres propiedades fisicoquímicas del sistema de intoxicación son muy similares a las que se presentan en otros ecosistemas acuáticos (Baudo *et al.* 1996). Además Timur (1996) informa que en los tubifícidos el desarrollo y la reproducción en medios ricos en carbono orgánico son óptimos, dicho componente está en abundancia en el sedimento artificial.

Las pruebas de toxicidad en sistemas acuáticos utilizan especies muy sensibles a los contaminantes, sin embargo en este estudio se empleó un tubifícido, organismo de distribución cosmopolita que vive en todo tipo de agua dulce. La abundancia de estos invertebrados en sitios con sedimento muy fino puede explicarse por el alto contenido de nutrimentos, por la habilidad que tienen para cavar y para alimentarse con partículas pequeñas. La presencia de grandes cantidades de diversas especies de oligoquetos acuáticos es indicadora de la contaminación del agua (Doroskevich 1977, Smith 1985). *L. hoffmeisteri* es un organismo que tolera niveles altos de xenobióticos, esta propiedad puede ser utilizada para limpiar cuerpos de agua contaminada, pero para emplearlo para estos fines es necesario realizar estudios de toxocinética. Este trabajo se inició con la prueba de toxicidad aguda del MA en agua y en el sistema sedimento-agua. Ambos valores de la CL_{50} (0.0698 mg/L y 0.269 mg/Kg) son diferentes a los reportados para crustáceos e insectos acuáticos (1 a 50 mg/L) (Johnson y Finley 1980), lo que demuestra que en estudios de impacto ambiental es importante considerar la variabilidad individual, la especie, el sexo y la edad, entre otros. Un aspecto importante de estos resultados fue que el valor de la CL_{50} del insecticida disuelto en el agua fue menor que en el sedimento. Probablemente porque el xenobiótico está adsorbido y absorbido a los componentes de este último sustrato (principalmente en la materia orgánica) y por lo tanto su disponibilidad está disminuida. Derosa y Stara (1988) demostraron que la adsorción del MA fue mayor en el humus que en la arcilla.

Una vez determinada la CL_{50}–96 horas del MA en el gusano, se seleccionó la concentración que se utilizaría en el estudio de toxicidad subletal, la cual incluyó efectos del plaguicida sobre parámetros bioquímicos del organismo expuesto a diferentes tiempos. Considerando que las proteínas participan en diversos procesos biológicos, en este estudio se evaluó el efecto del MA sobre estas biomoléculas del oligoqueto. La concentración de este insecticida disminuyó en los tubifícidos en todos los tiempos de exposición. Begun y Vijayaraghavan (1996), observaron un comportamiento similar en el tejido del hígado de *Clarias batrachus* al intoxicarlo con dimetoato (plaguicida organofosforado). Estos autores consideraron que probablemente este xenobiótico inhibió la síntesis de ácidos nucleicos.

Los lípidos son considerados como un parámetro bioquímico para evaluar la respuesta tóxica producida por plaguicidas en organismos acuáticos (Geyer *et al.* 1994). En este estudio, los niveles de éstos en los gusanos a casi todos los tiempos de exposición disminuyeron, sin embargo a las 48 horas se observó un incremento. Con respecto al primer evento, resultados semejantes fueron obtenidos por Sujatha *et al.* (1995) en almejas expuestas al metil-paratión (insecticida organofosforado), este autor consideró que un incremento en la demanda de energía está asociada con el estrés producido por el agente tóxico, lo cual puede reducir la reserva energética de lípidos. Con relación al aumento en este parámetro bioquímico, estos mismos autores, sugieren que estos compuestos interactúan con la bicapa lipídica de la membrana, lo que ocasiona la movilización de cadenas hidrocarbonadas y con ello la adehesión lipídica.

Entre los xenobióticos que se han reportado como agentes que incrementan la peroxidación lipídica de membranas biológicas están los metabolitos de los insecticidas organofosforados (Parkinson 1995), los resultados que se obtuvieron en este estudio confirman lo anterior. En todos los tiempos de exposición se incrementó la producción de malondialdehído (indicador de la peroxidación lipídica), excepto a 72 horas, ya que este efecto disminuyó de manera importante con respecto al testigo. La lipoperoxidación es un proceso que genera radicales libres, que se encuentran implicados en una variedad de procesos patológicos (Valenzuela *et al.* 1983). Es posible, que durante la biotransformación del MA a su metabolito tóxico maloxón mediante enzimas microsómicas, se generen estos grupos reactivos (Parkinson 1995), lo que puede explicar el incremento en la oxidación de las membranas del gusano. Con respecto a la disminución del efecto, probablemente se desencadenan procesos de desintoxicación de los radicales libres. Pölös *et al.* (1988) postulan, que estas moléculas son desactivadas por enzimas como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la ascorbato peroxidasa. Shaaltiel *et al.* (1988) encontraron que plantas como *Conyza bonariensis* y *Lolium perenne* son capaces de utilizar este mecanismo como protección hacia el herbicida paraquat, dióxido de azufre y ozono. Probablemente este sistema enzimático esté presente en el oligoqueto y se active al ser éste expuesto al MA.

Los agroquímicos con propiedades anticolinérgicas son de importancia ecológica para los diferentes organismos

acuáticos, porque aún cuando en muchos de ellos su sistema nervioso no esté bien desarrollado, presentan el complejo acetilcolina-acetilcolinesterasa, que al estar expuesto a compuestos organofosforados puede ser inhibido y por lo tanto actividades como movimiento, alimentación, reproducción, entre otras, serán afectadas. En este estudio se demostró que el MA inhibió la actividad de la AchA del oligoqueto en todos los tiempos de exposición en forma significativa. Estos resultados concuerdan con diferentes estudios que han empleado peces (Coppagge y Matthews 1974, Panth y Singh 1983, Ahammand-Sahid y Ramana 1980, Martínez-Tabche *et al.* 1994). En todos estos trabajos se intoxicaron los animales con diversos insecticidas organofosforados.

Es importante mencionar que aún cuando la concentración del insecticida disminuyó en el tubifícido en 25 % del máximo captado, la enzima no se recuperó. Estos resultados corroboran lo mencionado por Repetto *et al.* (1995), quienes establecen que la unión de la AChA con los compuestos organofosforados es irreversible, ya que la actividad enzimática no se recupera ni aún cuando se elimine al inhibidor.

El determinar la captación y la pérdida de un xenobiótico por un hidrobionte y del sedimento permite estimar parámetros toxocinéticos, que pueden emplearse para establecer la $t_{½}$ del mismo y procesos como la bioconcentración. El comportamiento del MA en los sedimentos artificiales muestra una pérdida del insecticida con respecto al tiempo, en tanto en el organismo se incrementó su contenido hasta las 24 horas. Probablemente ambos procesos sean de tipo exponencial, ya que la pérdida y la ganancia del xenobiótico en los sedimentos y en los gusanos no es proporcional. Estos resultados podrían explicar porque el metil-paratión (insecticida organofosforado) y su metabolito son bioconcentrados en el pez *Gyrardinichthys multiradiatus* que habita la presa Ignacio Ramírez (De la Vega *et al.* 1997).

La $t_{½}$ calculada del MA en sedimentos fue de 29 horas, dato similar a las 22 h reportadas por Walker (1978). Se puede proponer que la permanencia de este agroquímico es corto si se compara con el DDT (25 años) (Repetto *et al.* 1995), pero es necesario considerar que la entrada del organofosforado casi es constante en este tipo de embalses, por lo que su permanencia podría ser más larga. Su $t_{½}$ en el organismo fue superior a la del sedimento (4.17 veces), estos resultados sugieren que el gusano puede retirar cantidades importantes de este plaguicida del agua contaminada.

Otro comportamiento que es necesario analizar es la pérdida del MA en el agua al final del experimento, ya que la suma de las tres concentraciones de este insecticida en los 3 sustratos (agua, sedimento gusanos) fue del 90.66 %; probablemente este efecto se debe a la degradación microbiana. Matsumara y Boush (1966) informaron que las bacterias (*Pseudomonas* sp) y los hongos (*Trichoderma viride*) del suelo participan en la biotransformación de este insecticida. Posiblemente a este tiempo se han desarrollado diferentes microorganismos capaces de contribuir a la descomposición del agroquímico, ya que el sedimento con alto contenido de materia orgánica y el ambiente externo pueden favorecer el crecimiento de estos organismos (Paris *et al.* 1981).

El FBC es un parámetro indicador de la captación del tóxon por parte del organismo (Reppeto *et al.* 1995). En este estudio el valor del FBC se incrementó con el tiempo de exposición, siendo más significativo a las 72 horas (17.272). Esto indica que el insecticida presenta un carácter intermedio de bioconcentración según lo establecido por Geyer *et al.* (1994) y por lo tanto este oligoqueto puede ser utilizado en procesos de biorremediación, ya sea en pozos, en lagunas, etc.

Los métodos de tratamiento de aguas residuales incluyen sistemas de aplicación como estanques, lagunas o pantanos. Este tipo de procesos implica el manejo de suelos así como de organismos acuáticos (bacterias y macrofitas) con ciertas características de degradación o de almacenamiento de xenobióticos (Henry 1999). Los valores de FBC y de $t_{1/2}$ (tanto en sedimento como en gusano) obtenidos en este trabajo, demostraron que ambos sustratos cumplen con esta última cualidad, por lo que se sugiere usarlos en este tipo de reactores. Sin embargo, será necesario realizar otros estudios para establecer bajo que circunstancias éstos pueden limpiar un efluente contaminado con MA.

El emplear a este gusano acuático para producir un efluente líquido aceptable o la minimización de residuos peligrosos serían algunas de las ventajas que proporcionaría en los procesos de tratamiento de agua contaminada con MA. Sin embargo, es necesario considerar la aclimatación del hidrobionte a ciertos materiales orgánicos tóxicos que pueden interferir en su desarrollo así como la concentración tóxica excesiva del xenobiótico que se requiere retirar.

La capacidad de absorción y acumulación de una sustancia en un sistema constituido por componentes abiótico y biótico depende de su concentración y su efecto tóxico. Por lo tanto para estudios de biorremediación es necesario determinar la máxima cantidad almacenada así como la toxicidad extrema que toleran los organismos limpiadores. En este estudio, como se discutió anteriormente, diferentes tiempos de exposición del gusano al MA le producen efectos sobre la actividad de la AChA, membranas, lípidos y proteínas, a un nivel de plaguicida que se considera como seguro para productos agrícolas y alimentos (0.1 a 2.0 mg/kg) (Derosa y Stara 1988). Sin embargo, se puede observar que durante el período de 6 a 24 horas la captación máxima del MA por el oligoqueto fue de 83 % lo que significa que aún cuando estos procesos bioquímicos no están funcionando en forma óptima,

el organismo es capaz de mantener su homeostasis y seguir vivo y por tanto acumular el agroquímico. Esta hipótesis sugiere que la exposición al MA no sea mayor a este tiempo, pero será necesario llevar a cabo otro tipo de estudios con este sistema para establecer las condiciones óptimas de biorremoción de contaminantes, en el que se incluirá cómo influyen el tamaño y la etapa de desarrollo del organismo.

Por los resultados obtenidos de la toxicidad subletal y de los FBC se puede concluir que el sistema constituido por sedimentos artificiales y oligoquetos, puede ser empleado como un método de remoción de residuos peligrosos.

REFERENCIAS

Adams D. D. y Darby D.A. (1980). A dilution-mixing model for dredged sediments in freshwater systems. En: *Contaminants and sediments.Fate and transport, case studies, modeling, toxicity* (R.A. Baker, Ed.) Ann Arbor Science, Michigan, Vol. 1, pp. 373-392.

Ahammand-Sahid I. y Ramana Rao K.V. (1980). Correlation between subacute toxicity of malathion and acetylcholinesterase inhibition in the tissues of the teleost *Tilapia mosambica*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. *24*, 717-726

Baudo R., Ross P. y Guzzella L. (1996). Liming as a remedial action for an industrially polluted lake (Lake Orta, Northern Italy) En: *Development and progress in sediment quality assessment: rationale, challenges, techniques and strategies*. (M. Munawar y G. Dave, Eds.). SPB Academic Publishing, The Netherlands, pp. 177-193.

Becker E.W. (1983). Limitations of heavy metals removal from waste water by means of algae. Water Res. *17*, 459-466.

Begum G. y Vijayaraghavan S. (1996). Alterations in protein metabolism of muscle tissue in the fish *Clarias batrachus* (L. y NN.) by commercial grade deimethoate. Bull. Environ. Contam. Toxicol. *57*, 223-228.

Bohn B., McNeal L. y O'Connor G. A. (1993). *Química del Suelo*. LIMUSA. México, 2a. ed., 80 p.

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem. 72*, 248-254.

Burton G.A. (1992). Assesing the toxicity of freshwater sediments. Environ Toxicol. Chem. *10*, 1585-1627.

Burton G.A. Jr., Ankley G., Ingersoll C. y Norberg-King T. (1994). Progress in standardization of sediment toxicity test in the USA. First International Symposium on Sediment Quality Assessment Rationale, Challenges and Strategies, August 22-25, Goterburg, Sweden.

Comisión Nacional de Ecología (CNE) (1988). Informe General de Ecología, México, D.F., pp. 178-180.

Coppage D.L. y Matthews E. (1974). Short-term effects of organophosphate pesticides on cholinesterase of estuarine fishes and pink shimp. Bull Environ. Contam. Toxicol. *11*, 223-231

Dave G y Nilsson E. (1996). Sediment storage: a critical factor in sediment quality assessments. En: *Development and progress in sediment quality assessment: rationale, challenges, techniques and strategies*. (M. Munawar y G. Dave, Eds.) SPB Academic Publishing, The Netherlands, pp. 153-163

De la Vega S. M., Martínez-Tabche L. y Macías C.G. (1997). Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of freshwater community in Ignacio Ramírez dam in México. Ecotoxicol. Environ. Saf. *38*, 53-62.

Derosa Ch. y Stara J. (1988) . Malatión: efectos sobre la salud y el ambiente, EPA, OPS, OMS, CPEHS, México, pp. 1-4.

Doroshkevich V. (1977). Ecological features of tubificidae raised in effluent. Lin Publishing House, Frunze, pp. 17-19.

Fargasova A. (1996). Toxicity of metals on *Daphnia magna* and *Tubifex tubifex*. Ecotoxicol. Environ. Saf. *27*, 27-33

Farran A., De Pablo J. y Barceló D. (1988). Identification of organophosphorous insectides and their hydrolysis product by liquid chromatography in combination with UV and thermospray spectrometric detection. J. Chromatogr. *455*, 163-172.

Galar Martínez M. (1999). Efecto tóxico del malatión en sedimentos de la presa Ignacio Ramírez sobre el caracol *Stagnicola* sp. Tesis de Maestría, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Intituto Politécnico Nacional, 59 p.

Geyer H.J., Shceunert I., Brüggemann R., Matthies M., Steinberg E.W., Zitko V., Kettrup A. y Garrison W. (1994). The relevance of aquatic organisms lipid content to the toxicity of lipophilic chemicals: toxicity of lindane of different fish species. Ecotoxicol. Environ. Saf. *28*, 53-70.

Gluckman J.C., Barceló D., De Jong G.J., Frei R.W., Maris F.A. y Brinman U.A. (1986). Improved design and application of an on-line thermoionic detector for narrow-bere liquid chromatography. J. Chromatogr. *367*, 35-44.

Henry G.J. (1999). Contaminación del agua. En: *Ingeniería Ambiental*. (G.J. Henry y G.W. Heinke, Eds.) , Prentice Hall, México, 2a. ed., pp. 421-491

Hestrin S. (1949). Reaction of acetylcholinesterase and other carboxilic acid derivatives with hidroxylamine and its analytical application. J. Biol. Chem. *180*, 249-261

Hoving E.B., Laing C., Rutgr H.M. Teggeler M., Van Doormal J.J. y Muskiet A.J. (1992). Optimized determination of malondialdehyde in plasma lipid extracts using 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid: influence of detection method and relations with lipids and fatty acids in plasma from healthy adults. Clin. Chem. *208*, 63-67.

Johnson W.W. y Finley M.T. (1980). *Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates: summaries of toxicity test conduced at columbus national fisheries research laboratory*, 1965-1978. USDI, Fish Wildlife Ser., Resource Publ., Washington, D.C., p.137.

Marian M.P. (1984). Cultive and harvesting techniques fot *Tubifex tubifex*. Aquaculture *42*, 225-236

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

Matsumara F. y Boush G.M. (1966). Malathion degradation by *Trichoderma viride* and a *Pseudomonas* sp. Science *153*, 278.

Meyers N.L., Aeahlrichs J.L. y White J.L. (1970). Adsorption of insecticides on pond sediment and watershed. Soil. Proc. Indiana Academic. Sci. *79*, 432-437.

Panth C.J. y Singh T. (1983). Induced method metabolic dysfunction by carbamate and organophosphorus compounds in a fish, *Puntius conchonius*. Pest. Biochem. Physiol. *20*, 294-298.

Paris D.F., Steen W.C., Baughman G.L. y Barnett J.T. (1981). Second order model to predict microbial degradation of organic compounds in natural waters. Appl. Environ. Microbiol. *41*, 603-609.

Parkinson A. (1995). Biotransformation of xenobiotics. En: *Cassarrett and Doull's toxicology: the basic sciences of poisons* (C.D. Klaassen, M.O. Amdur y J. Doull, Eds). McGraw-Hill, Nueva York, p. 142.

Pölös E., Mikulas J., Szigeti Z., Matkovics B., Hay D., Párducz A. y Lehoczki E. (1988). Paraquat and atrazine co-resistence in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. Pest. Biochem. Physiol. *30*, 142-154.

Postma T. y Stroes J.A. (1968). Lipid screening in clinical chemistry. Biochem. Soc. Transact. *22*, 569-578.

Repetto M., Martínez. D. y Sanz P. (1995). Actualización de la toxicología de los plaguicidas. En: *Toxicología avanzada* (M. Repetto, Ed.), Díaz de Santos, España, pp. 574-576.

Shaaltiel Y., Glazer A., Bocion P.F. y Gressel J. (1988). Cross tolerance to herbicidal and environmental oxidants of plant biotypes tolerant to paraquat, sulfur deoxide and ozone. Pest. Biochem. Physiol. *31*, 13-23.

Smith E. M. (1985). Tubificid worms: important organism in aquatic ecosistems. Amer. Biol. Tech. *17*, 412-415.

Stan H.J. (1989). Application of capillary gas chromatography with mass selective detector to pesticide analysis. J. Chromatogr. *467*, 85-98.

Sujatha C.H., Nai S.M. y Chacko J. (1995). Lipid levels of the clam. Environ. Toxicol. Water. Qual. *10*, 231-235.

Timur G. (1996). Tubificid culture. Turkish J. Zool. *20*, 325-338.

Valenzuela A., Fernández V. y Videla L. (1983). Hepatic and biliary levels of glutatione and lipid peroxides following iron overload in the rat; effect of simultaneous ethanol administration. Toxicol. Appl. Pharmacol. *70*, 87-95.

Walker W.W.(1978). Insecticide persistence in natural sea water as affected by salinity, temperature, and sterility. ORD, US EPA, EPA-600/378-044, p. 25.