

EFFECTOS DEL ETIL PARATHION Y DDVP SOBRE LARVAS DE CENTOLLA *LITHODES ANTARCTICUS* JACQUINOT

Ruben J. LOMBARDO, Lucrecia FERRARI y Julio H. VINUESA *

SUMMARY: Effects of ethil-parathion and DDVP on centolla larvae *Lithodes antarcticus* Jacquinot.

The toxicity of two pesticides, ethil - parathion (DNTP) and DDVP, organophosphorous insecticides extensively used in commercial formulations, was evaluated. Standard short-term exposure (108 h) static toxicity bioassays were performed with southern king crab larvae (1 st. zoeae) obtained from ovigerous females of Beagle Channel (Ushuaia). Each 12 h lethal concentrations for the 50% of the individuals (LC 50) were estimated by Finney's formal probit analysis. Three speed computing methods were used furthermore, obtaining not unbiased estimates in case of asymmetrical tolerance distribution.

The data show that the two pesticides are acutely toxic at low concentrations. The 96 h of exposure LC50 are 33 $\mu\text{g/l}$ for DNTP and 3.6 mg/l for DDVP. The DNTP toxicity curve indicates that lethal threshold concentration is smaller than 33 $\mu\text{g/l}$. Apparently threshold for acute lethality were not found for DDVP.

Both drugs induced sublethal effects. There are: swimming and appendix inactivity, expansion of the posterior carapace area and rigid abdomen or continuously twisted.

INTRODUCCIÓN

Con este trabajo se inicia un programa de estudios referente a diversos aspectos de la contaminación marina en la zona austral del país, tanto en áreas "limpias" como crónicamente contaminadas. Se trata, en general, del análisis de los efectos tóxicos a corto y largo plazo de mezclas comerciales y compuestos particulares que afecten o puedan afectar a los organismos marinos de la región.

Contribución Científica n° 200 del Centro de Investigación de Biología Marina (CIBIMA), Hipólito Yrigoyen 3780, (1208). Buenos Aires, Argentina.

ECOSUR	Argentina	ISSN 0325 — 108X	v.9	n.18	pág. 141-151	setiembre 1982
--------	-----------	---------------------	-----	------	-----------------	-------------------

En la experiencia realizada se analiza la toxicidad, para las larvas de centolla, de dos insecticidas y acaricidas utilizados ampliamente en distintos compuestos comerciales del país: etil-parathion (DNTP) y DDVP.

El DNTP se utiliza para fumigar cultivos de cereales, hortalizas, frutales y flores, aplicándose de 100 a 400 g por hectárea. El DDVP es utilizado para el tratamiento de granos almacenados y en transporte, aplicándose de 10 a 40 g por hectárea (Cámara Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, 1981).

Como estos plaguicidas organofosforados no son persistentes, requieren ser aplicados varias veces para ser efectivos, lo que ocasiona bioacumulación de estos productos en los distintos niveles tróficos.

Para la experiencia se utilizaron larvas de centolla *Lithodes antarcticus* por dos motivos principales: el primero radica en la importancia de estos crustáceos decápodos para las pesquerías comerciales y su distribución en aguas costeras patagónico-fueguinas, el segundo se basa en la relativa facilidad de cultivarlas en condiciones experimentales. Es de considerar, además, que los organismos costeros están especialmente expuestos a los insecticidas, dada la tendencia de estos compuestos a difundir en los sistemas de drenaje y concentrarse en los estuarios (Butler, 1966).

La evaluación de la toxicidad se basó principalmente en estimar las concentraciones que resultaron letales para el 50% de los organismos (CL50), a diferentes períodos de exposición. Estas resultaron del orden de $\mu\text{g/l}$ (partes por billón o ppb) a mg/l (partes por millón o ppm).

En estudios toxicológicos realizados anteriormente con larvas y adultos de crustáceos decápodos se experimentaron diversos compuestos utilizados como plaguicidas. Eisler (1969, 1972) experimentó los efectos de cinco insecticidas organofosforados, entre ellos el DDVP y metil-parathion, en ejemplares adultos de *Palaemonetes vulgaris*, *Crangon septemspinosa* y *Pagurus longicarpus* y también en peces y moluscos. Portman (1972) ensayó con parathion y otros organofosforados y organoclorados en adultos de *Crangon crangon*.

Ha sido escasa la atención dispensada a los estadios larvales de crustáceos, a pesar de ser, en general, más susceptibles que los adultos (Portmann, 1972). Epifanio (1971) estudió los efectos del dieldrin en larvas de dos especies comunes de brachiuros. En este grupo fueron experimentados otros insecticidas organoclorados: mirex (Bookhout y Monroe, 1975) y methoxichlor (Bookhout *et al.*, 1976); también algunos bifenilos policlorados (Vernberg *et al.*, 1977) y el malathion en el grupo de los organofosforados (Bookhout y Monroe, 1977).

MATERIAL Y MÉTODOS

El DDVP (0,0-dimetil-2,2 diclorovinilfosfato) fue obtenido de Laboratorios Agrivet (Buenos Aires), utilizándose como solución stock la disolución de 50 g de sustancia activa en 100 cm^3 del solvente y emulsionante con que se comercializa.

El DNTP (0,0-dietil-0-p-nitrofenilfosforotioato) se obtuvo de Laboratorio Melthius (Buenos Aires), utilizándose como solución stock la dilución de 100 g

de sustancia activa en 100 cm³ del solvente y emulsionante comercial.

De cada solución stock se prepararon soluciones de 1 g/l (una parte por ciento) con agua de mar de Bahía Ensenada (Ushuaia), con 32 ‰ de salinidad y filtrada a 0,2 µm. Con éstas se prepararon 400 ml de cada dilución correspondiente a las series de concentraciones analizadas, que se distribuyeron en los recipientes de las réplicas.

Las concentraciones seleccionadas de DDVP, en ppm, fueron las siguientes: 0,10; 0,32; 1; 3,2; 10 y 32. Las de DNTP, en ppb, fueron: 10; 18; 32; 56; 100; 180; 320; 560; 1 000 y 1 800. Ambas series contaron con controles de agua de mar y controles adicionales de los solventes, preparados mediante extracción del soluto a las soluciones de mayor concentración que abarcó cada serie, a fin de analizar la posible toxicidad de los solventes y emulsionantes con que se comercializan estos productos.

Para el procedimiento experimental se siguieron las recomendaciones sugeridas por "American Public Health Association" (1976) para bioensayos estáticos de toxicidad a corto plazo. Se introdujeron algunas ligeras modificaciones que se detallan donde corresponde.

En el Canal Beagle (Ushuaia) se colectaron hembras de centolla y se seleccionaron dos ovígeras con embriones a punto de eclosionar que se mantuvieron en un tanque de 150 l de agua de mar natural a 7° C y 32 ‰ de salinidad, con aireación, limpieza y remoción parcial del agua cada 12 h.

Del "pool" del desove de las dos hembras se seleccionaron aquellas zoeas eclosionadas durante la noche que presentaban mejores condiciones vitales a la mañana. Fueron controladas durante 12 h en recipientes de 1 l. Durante este lapso se aclimataron a las temperaturas experimentales.

Los recipientes con las réplicas de cada serie se ubicaron en bandejas con agua circulante a temperatura constante mediante baño refrigerado. Se mantuvo el fotoperíodo natural.

En ambos ensayos se asignaron aleatoriamente 40 larvas a cada concentración; la distribución de los recipientes de cada serie también fue al azar. La serie del DDVP se duplicó en recipientes de vidrio de 200 ml con 20 larvas cada uno, mantenidas a $8 \pm 0,5^\circ$ C. La serie del DNTP se cuadruplicó en recipientes de vidrio de 60 ml con 10 larvas cada uno, mantenidas a $10 \pm 0,5^\circ$ C.

Cada 12 h se efectuó el control del estado de las larvas, se contaron y retiraron los individuos muertos y se suministró alimento, excepto en la serie del DNTP durante los tres primeros días, que se efectuó cada 24 h. Se consideró como ejemplar muerto a aquél en el cual el corazón larval no latía. Se suministraron nauplii de *Artemia salina* recién eclosionadas de huevos de procedencia alemana.

La estimación de las CL50 a los períodos de exposición de 72, 84 y 96 h para el DNTP y 48, 72, 84, 96 y 108 h para el DDVP se realizó por un método de máxima verosimilitud: el análisis de probits de Finney (Finney, 1952). Éste se implementó con un programa de cómputo de las regresiones probit-repuesta/log-concentración, corrigiendo la repuesta (R) con la proporción de mortalidad en controles (C) como: $(R-C)/(1-C)$ (Davies, 1971). Se efectuaron las pruebas de validez estadística de las regresiones: independencia por pruebas

de "Student" y linealidad, como normalidad de la distribución de los log-tolerancias, mediante pruebas de Ji-cuadrado. Estas fueron efectuadas para utilizar el desvío normal en el cálculo de los intervalos de confianza del 95% de las CL50 según el teorema de Fieller (Finney, 1964).

Además de este análisis formal se probaron otros tres métodos de estimación de CL50 de uso difundido por su rapidez y simplicidad de cálculo, pero que presentan dependencia de la simetría de la distribución de tolerancias en el rango de concentraciones analizadas (Finney, 1964). Estos son: el de Spearman-Kärber (Kärber, 1931), el de Reed-Muench (Reed *et al.*, 1938) y el de Dragstedt-Behrens (Behrens, 1929).

RESULTADOS

La supervivencia a las diferentes concentraciones se muestra en la Fig. 1. Con el aumento de la concentración se nota una disminución del período de exposición necesario para alcanzar una mortalidad del 50%, así como aumento de la toxicidad, para ambos compuestos.

La supervivencia al solvente de DNTP es del mismo orden que la del control; esto permite descartar la toxicidad del mismo y analizar al producto como compuesto purificado. La extracción del solvente de DDVP sólo se pudo hacer en forma parcial.

En las larvas sometidas a 320 ppb de DNTP se observa una mortalidad superior a la de concentraciones mayores, debida a una muy elevada y repentina mortandad en uno de los recipientes de las réplicas, atribuible probablemente a la introducción accidental de líquido refrigerante (etilen-glicol 50%).

Las bajas mortalidades en los controles (menor al 3% para DNTP y de 7 a 15% para DDVP) indican que fueron buenas las condiciones vitales y ambientales de los organismos, sobre todo tratándose de larvas de crustáceos. No se observaron signos de "stress" ni canibalismo.

Las pendientes de las regresiones probit-repuesta/log-concentración, estimadas cada 12 h, se detallan en la tabla I. Todas las pruebas de significación de la regresión fueron significativas ($p < 0,05$) y todas las pruebas de linealidad arrojaron Ji-cuadrados no significativos. Al no detectarse contradicción a la hipótesis de normalidad de la distribución de los log-tolerancias, para el cálculo de los límites fiduciales del 95% de las CL50 se utilizó 1,96 como el desvío normal para una probabilidad de 0,05 en el teorema de Fieller (Finney, 1964).

Las CL50 estimadas con los respectivos intervalos de confianza para los dos métodos que permiten calcularlos figuran en la tabla I. En ésta se evidencia una toxicidad del DNTP comparativamente mayor que la del DDVP. Los intervalos obtenidos por el método de Spearman-Kärber son menores que por el método de Finney, lo que indica mayor precisión.

En la Fig. 2 se evidencia la influencia de la asimetría en los tres métodos de cálculos simples, destacándose una tendencia general a la subestimación respecto a las estimaciones de Finney) en presencia de asimetría positiva y sobreestimación cuando la asimetría es de tipo negativo.

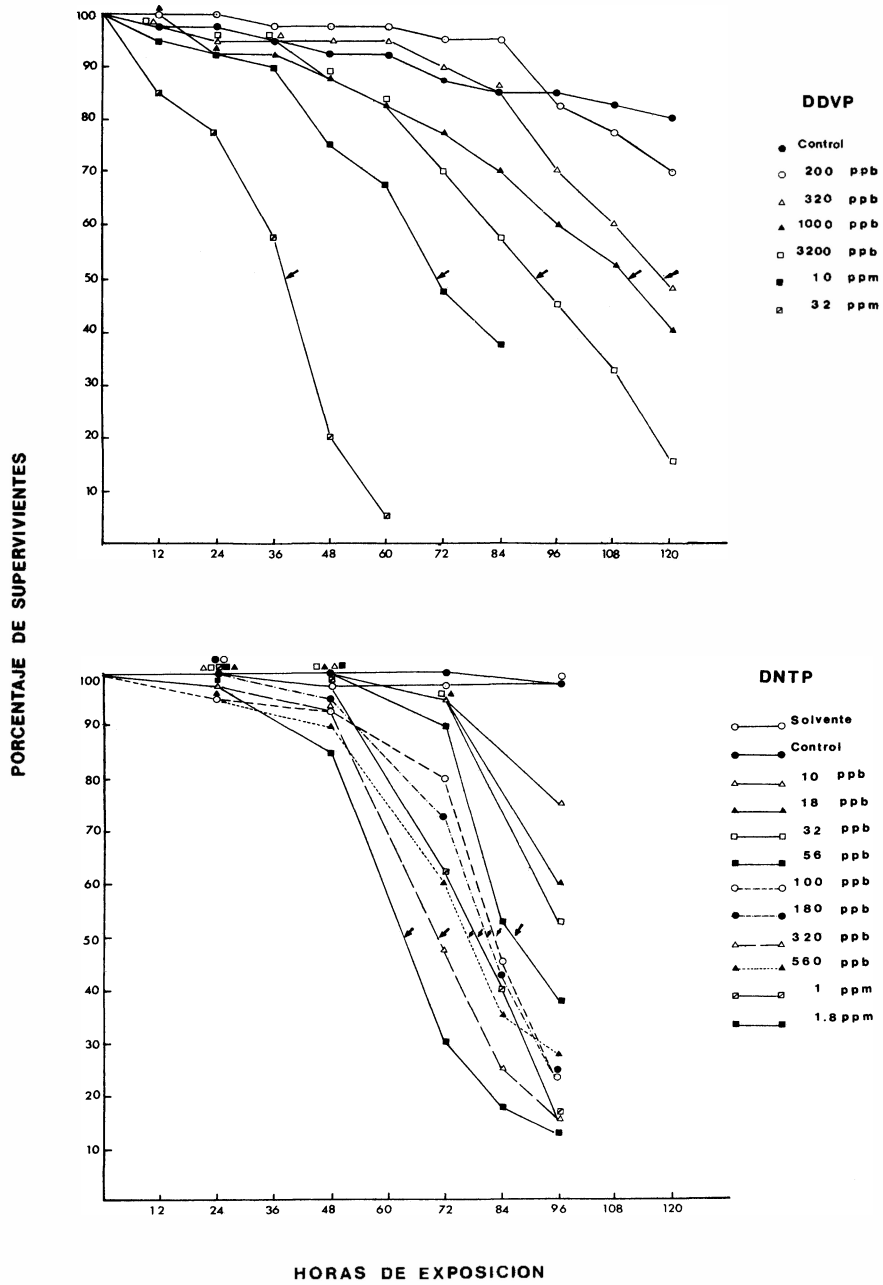


TABLA I

hs	FINNEY (PROBIT)						SPEARMAN - KÄRBER			REED-MUENCH CL50	DRAGSTEDT BEHRENS CL50
	PENDIENTE	CL50	LI	LS	CL50	LI	LS	LI	LS		
48	3.091	18 217	14 152	23 452	17 995	14 165	22 861	18 456	18 060		
72	0.987	10 065	4 410	22 969	8 175	6 374	10 485	8 660	9 229		
84	1.347	7 191	3 970	13 026	6 310	4 796	8 301	4 384	6 777		
96	0.993	3 601	1 310	9 896	2 201	1 672	2 898	2 078	2 420		
108	1.089	1 808	895	3 653	1 651	1 225	2 225	1 821	1 760		
72	1.093	858	563	1 308	512	410	639	633	541		
84	0.499	75	24	231	211	168	265	203	205		
96	0.766	33	20	55	60	47	77	58	57		

Pendientes de las regresiones probit - repuesta /log-concentración. CL50 estimadas a diferentes periodos de exposición, por cuatro métodos. Límites fiduciales del 95%: LI: limite inferior, LS: limite superior.

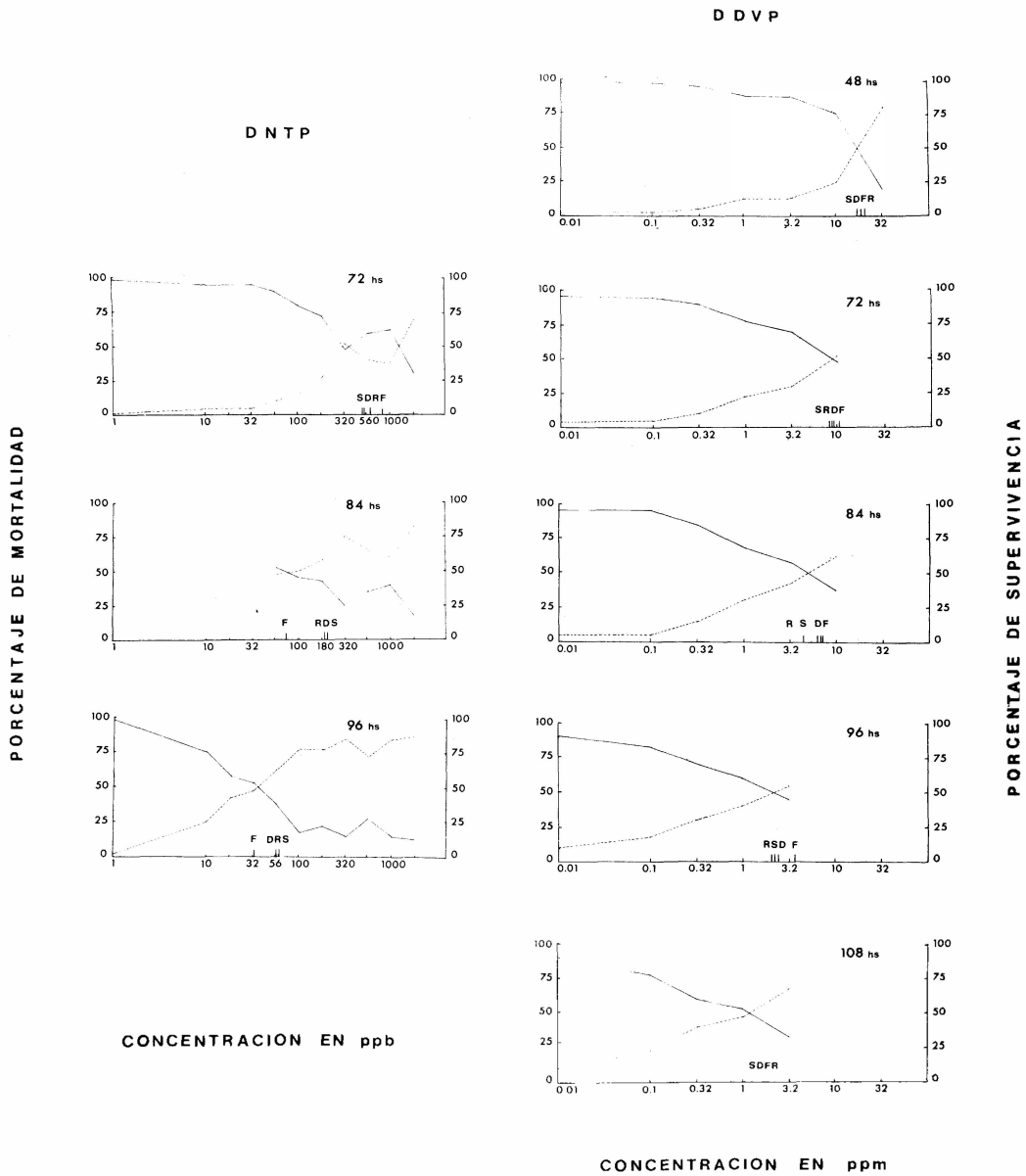


Fig. 2. Mortalidad y supervivencia a cada concentración, en diferentes periodos de exposición. Las flechas indican las CL50 estimadas según Finney (F), Spearman (S), Reed (R) y Dragstedt (D).

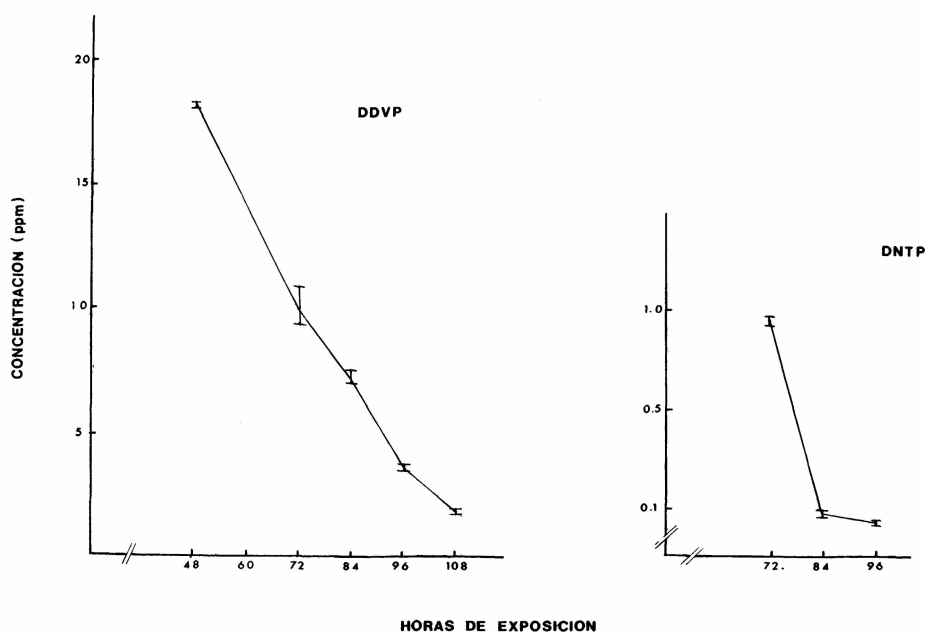


Fig. 3. Curvas de toxicidad: Variación de las CL50 con el período de exposición. Se indican los desvíos estándar correspondientes.

Las curvas de toxicidad se presentan en la Fig. 3; se aprecia aquí una toxicidad más aguda del DNTP que del DDVP. La curva del DNTP se aproxima mucho a una asíntota del tiempo de exposición, indicando un umbral para letalidad aguda (un nivel letal incipiente al cual el 50% de la población podría vivir por tiempo indefinido) a concentraciones menores de 33 ppb. Este podría determinarse mediante ensayos de largos períodos de exposición. Durante esta experiencia, no se encontró un umbral aparente para el DDVP.

Se destacan algunas respuestas fisiológicas y morfológicas que permiten establecer criterios de subletalidad.

La muerte, tomada como cese de los latidos del corazón larval, en general va acompañada de una serie de procesos muy rápidos, entre los cuales se destacan la concentración de pigmentos y una posible coagulación de los fluidos corporales que le otorgan a la larva una pérdida de su transparencia normal, quedando el cuerpo blanquecino y opaco.

Las larvas de esta especie muestran hábitos bentónicos en el cultivo de laboratorio, permaneciendo a menudo quietas en el fondo del recipiente, con frecuentes movimientos de apéndices bucales y pereiópodos. Se han reconocido distintos síntomas anormales que indican los posibles efectos de los plaguicidas utilizados; estos son:

- a) Inactividad general (no hay natación).
- b) El movimiento de apéndices (pereiópodos, maxilas y maxilipedios) se halla muy reducido.
- c) El abdomen se torna rígido, o bien adquiere un torcimiento casi continuo.
- d) El caparazón se expande adquiriendo aspecto globoso, en la zona de las espinas póstero-laterales o en toda la región posterior.

DISCUSIÓN

Los resultados indican que el DNTP es marcadamente tóxico para las larvas de centolla a concentraciones de pocas ppb. El DDVP también muestra elevada toxicidad a escasas ppm.

La sensibilidad de las larvas de centolla no resultó ser marcadamente mayor que la de otros crustáceos decápodos estudiados. La toxicidad del DDVP para las especies de decápodos estudiadas por Eisler (1969, 1972) fue estimada mediante 96 h-CL50 que oscilaron entre 4 y 45 ppm; para el metil-parathion encontró 96 h-CL50 de 2 a 3 ppm. Portmann (1972) estimó las 48 h-CL50 entre 3,3 y 10 ppb de parathion para las especies de decápodos que estudió.

Si bien encontramos una letalidad más aguda del DNTP que del DDVP, ambos insecticidas produjeron efectos subletales hasta en las menores concentraciones estudiadas, que fueron detectados desde los primeros controles periódicos.

Se supone que habría una subestimación de las CL50 por tratarse de bioensayos estáticos, considerando que en estas condiciones habría una disminución en el tiempo de las concentraciones del tóxico en cada recipiente, debida a la absorción por los individuos y adsorción en las paredes de vidrio. La magnitud de la subestimación podría evaluarse con ensayos de flujo constante.

Las diferencias de estimación de las CL50 entre el método de Finney y los otros tres no son de gran magnitud, pero la dependencia de la simetría del rango de dosis que éstos evidenciaron introduce un sesgo en las estimaciones. Para evitarla, el diseño experimental requiere un amplio conocimiento previo sobre la toxicidad de las drogas en los organismos estudiados y extensos rangos de concentración. Esto no ocurre con el método de Finney, cuya versatilidad de diseño permite aplicarlo sin introducir sesgo aún cuando el conocimiento específico previo sea prácticamente nulo, o cuando accidentes experimentales modifiquen la simetría del diseño original en cuanto al número de individuos asignados a cada concentración, e incluso, según Finney (1964), al espaciamento entre éstas. El mayor costo relativo en el análisis de datos se compensa por una economía de diseño experimental, pero las ventajas fundamentales respecto de los otros métodos radican en que permite efectuar pruebas de validez estadística y que sus estimaciones gozan de las propiedades de los estimadores de máxima verosimilitud.

RESUMEN

Se evaluó la toxicidad de los plaguicidas etil-parathion (DNTP) y DDVP, insecticidas organofosforados ampliamente utilizados en compuestos comerciales del país. Fueron experimentados sus efectos en larvas de centolla (primer zoea), obtenidas de hembras ovigeras del Canal Beagle (Ushuaia), mediante bioensayos estáticos de toxicidad a corto plazo de exposición (108 h), utilizando procedimientos estandar.

Se estimaron las concentraciones letales para el 50% de los organismos (CL 50) cada 12 h, utilizándose el método formal de análisis de probits de Finney. Fueron utilizados otros tres métodos por su rapidez de cálculo, pero que evidenciaron sesgo de las estimaciones en caso de asimetría de la distribución de tolerancias.

Ambos compuestos resultaron ser altamente tóxicos a bajas concentraciones, obteniéndose como CL50 a las 96 h de exposición 33 $\mu\text{g/l}$ de DNTP y 3,6 mg/l de DDVP. La curva de toxicidad del DNTP indica un umbral para letalidad aguda de menos de 33 $\mu\text{g/l}$; para el DDVP no se encontró un umbral aparente.

Los efectos subletales destacados son: inactividad natatoria y apendicular, rigidez o torcimiento continuo del abdomen y expansión de la región posterior del caparazón.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Lic. Andrés N. Rubio, Laboratorios Agrivet, por su colaboración en la adquisición de los productos analizados.

BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. 1976. Standard methods for the examination of water and wastewater. 14th. ed. Amer. Public Health Assoc., Washington, D.C. 1193 pp.
- BEHRENS, B. 1929. Zur Auswertung der Digitalisblätter im Freshversuch. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 140: 237 - 256.
- BOOKHOUT, C.G. and COSTLOW, J.D. Jr. 1975. Effects of mirex on the larval development of the blue crab. *Water Air Soil Poll.*, 4: 113 - 126.
- BOOKHOUT, C.G., COSTLOW, J.D. Jr and MONROE, R. 1976. Effects of methoxychlor on larval development of mud crab and blue crab. *Water Air Soil Poll.*, 5: 349 - 365.

- BOOKHOUT, C.G. and MONROE, R.T. 1977. Effects of malathion on the development of crabs. En: Physiological responses of marine biota to pollutants (J. Vernberg *et al.*, ed.). Academic Press, N.Y. pp. 3 - 19.
- BUTLER, P.A. 1966. The problem of pesticides in estuaries. *Trans. Amer. Fish. Soc. Suppl. to 95* (4): 110 - 115.
- Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. 1981. Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, Buenos Aires, 290 pp.
- DAVIES, R.G. 1971. Computer programming in quantitative biology. Academic Press, N.Y. 492 pp.
- EISLER, R. 1969. Acute toxicities of insecticides to marine decapod crustaceans. *Crustaceana*, 16: 302 - 310.
- 1972. Pesticide induced stress profiles. En: Marine Pollution and sea life. FAO (publish) pp. 229 - 233.
- EPIFANIO, C.E. 1971. Effects of dieldrin in seawater on the development of two species of crab larvae, *Leptodius floridanus* and *Panopeus herbstii*. *Marine Biology*, 11: 356 - 362.
- FINNEY, D.J. 1952. Probit Analysis: A statistical treatment of the sigmoid response curve. 2nd. ed. Cambridge Univ. Press, London.
- 1964. Statistical methods in biological assay. 2nd. ed. Charles Griffin, London. 668 pp.
- KÄRBER, G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 162: 480 - 487.
- PORTMANN, J.E. 1972. Results of acute toxicity tests with marine organisms, using a standard method. En: Marine pollution and sea life. FAO (publish) pp. 212 - 217.
- REED, L.J. and MUENCH, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent. end points. *American Journal of Hygiene*, 27: 493 - 497.
- VERNBERG, F.J., GURAM, M.S. and SAVORY, A. 1977. Survival of larval and adult fiddler crabs exposed to Aroclor 1016 and 1254 at different temperature - salinity combinations. En: Physiological responses of marine biota to pollutants (Vernberg *et al.*, ed.). Academic Press, N.Y. pp. 37 - 50.