CENTRO DE INVESTIGACION EN ALIMENTACION Y DESARROLLO, A.C.

PATRÓN DE USO DE PLAGUICIDAS E INHIBICIÓN DE ACETILCOLINESTERASA (AChE) EN GARZA GANADERA (Bubulcus ibis) DEL DELTA DEL RIO COLORADO, MEXICO

POR:

MIGUEL ÁNGEL VEGA CÁZARES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS

GUAYMAS, SONOHA FEBRERO DEL 2005

Los miembros de este comité designado para revisar la tesis *"Patrón de uso de plaguicidas e inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) en garza ganadera (Bubulcus ibis) del Delta del Río Colorado, México"* de Miguel Ángel Vega Cázares, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias:

Dra. Jacqueline García Hernández _____

Dra. Luz María García de la Parra _____

Dr. Miguel Betancourt Lozano _____

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, de la directora de la tesis.

Dr. Alfonso Gardea Béjar
Director general

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo que recibí a través de beca de manutención (172762) para cursar estudios de postgrado dentro de la Maestría en Ciencias del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Unidad Mazatlán (CIAD).

A la Dra. Jaqueline García Hernández del CIAD Unidad Guaymas asesora principal y por su valioso apoyo para lograr que se consolidara esta investigación a través del proyecto: "Inventario y caracterización de las descargas que afectan la salud de los ecosistemas del delta del Río Colorado". Proyecto CONACYT-SEMARNAT 2002-C01-0033.

Al Dr. Miguel Betancourt Lozano y la Dra. Luz María García de la Parra del CIAD Unidad Mazatlán, por el aporte realizado como asesores al presente trabajo.

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) por darme el espacio para seguir preparándome.

Al MC. Lázaro Cadena Cárdenas por el gran apoyo moral, técnico y logístico durante el desarrollo de esta investigación, especialmente durante la etapa de captura de *Bubulcus ibis*.

Al CESUES en San Luís Río Colorado, por facilitar las instalaciones para adaptar el laboratorio de campo en el Valle de San Luís Rió Colorado, Sonora.

A Martha María Villegas y Helena Olguín Acosta el resto del "Delta Team", gracias por su ayuda durante el montaje de la técnica para medir actividad de colinesterasa y durante la captura.

Un agradecimiento especial a Jorge Leyva Villa por su apoyo permanente como auxiliar de laboratorio y durante la captura de *Bubulcus ibis*, además de su valiosa compañía.

DEDICATORIAS

A mi Padre. Y aunque ya no estas aquí, el fruto de este esfuerzo también es para ti mama.

A Jesús Miguel. Ojala que algún día escribas tu propia historia y llegues aun más lejos del brazo de tu madre, a quien también debo parte de este logro. Gracias.

A José Luís y Jorge Albino, Amada, Leticia, Diana, Noelia, Socorrito, Ana Luisa y Martha; les dedico de todo corazón este trabajo ya que aun estando tan lejos siempre han sido un verdadero aliciente para seguir adelante.

A Dios. Gracias por permitirme llegar hasta este día.

CONTENIDO

Pagina

ÍNDICE DE TABLAS.....iv

ÍNDICE DE FIGURAS.....vi

RESUMEN.....viii

1. INTRODUCCIÓN.....1

1.1 El Delta del Río Colorado.....1

1.1.1 Ubicación geográfica.....1

1.1.2 Superficie.....1

1.1.3 Características generales.....1

1.2 Agroecosistemas del Delta del Río Colorado.....2

1.3 Impacto de la agricultura.....3

2 ANTECEDENTES.....6

2.1 Plaguicidas.....6

2.1.1 Definición.....6

2.1.2 Uso de plaguicidas en México y Delta del Río Colorado.....6

2.1.3 Plaguicidas y Ecosistemas del Delta del Río Colorado.....7

2.1.4 Insecticidas Organofosforados y Carbamatos.....10

2.2 Colinesterasas (ChE).....13

2.2.1 Función de AChE.....14

2.2.2 Variación de la actividad.....15

2.2.3 Inhibición de AChE.....17

2.2.4 Reactivación de Acetilcolinesterasa.....19

2.2.4.1 Hidrólisis espontánea.....19

2.2.4.2 Regeneración o síntesis de AChE.....20

2.2.4.3 Reactivación química.....21

2.2.5 Envejecimiento (aging).....22

3 HIPÓTESIS.....23

4 OBJETIVOS.....24

4.1. Objetivo General.....24

4.2. Objetivos Específicos.....24

5. MATERIALES Y MÉTODOS.....25

5.1. Localización del Área de estudio.....25

5.2. Muestreo.....25

5.3. Captura, conservación y transporte.....28

5.4. Medidas morfométricas.....29

5.5. Disección.....29

5.6. Homogenización.....33

5.7. Inhibición de Acetilcolinesterasa (AChE).....33

5.7.1. Reactivación Química 34

5.7.1.1. Fundamento.....34

5.7.1.2. Procedimiento 34

5.7.2. Medición de la Actividad de AChE.....35

5.7.2.1.Fundamento.....35

5.7.2.2.Procedimiento.....35

5.7.3. Cálculos.....36

5.7.3.1. Actividad de AChE.....36

5.7.3.2. Determinación de las muestras reactivables (% de inhibición).....37

5.8. Análisis estadístico.....38

6. RESULTADOS.....39

6.1. Actividad de Acetilcolinesterasa (AChE).....39

6.1.1. Variación espacio-temporal de la actividad de AChE.....42

6.2. Inhibición de Acetilcolinesterasa (AChE).....44

6.3. Medidas Morfométricas.....48

6.4. Uso de Plaguicidas.....50

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....50

7.1. Actividad de AChE.....50

7.2. Inhibición de AChE.....51

7.3. Uso de Plaguicidas.....53

8. CONCLUSIONES.....57

9. RECOMENDACIONES.....58

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....59

ANEXOS.....66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Pagina
1	Plaguicidas OP y CA usados actualmente en México y su toxicidad.....	9
2	Las cuatro principales categorías de compuestos orgánicos de fósforo (organofosforados).....	10
3	Actividad normal de AChE en cerebro de algunas especies de aves y mamíferos en (µmol ACh/min/g).....	16
4	Comparación de las LD_{50} de plaguicidas organofosforados en diferentes especies de aves carnívoras y omnívoras.....	17
5	Orden y cantidades de reactivos empleados para la reactivación usando 2-PAM.....	34
6	Orden y cantidades de reactivos empleados para la medición de actividad de AChE usando el método de Ellman.....	36
7	Media (X), desviación estándar (D.E.) y valores máximos y mínimos de Actividad (U/g) de AChE cerebral en *Bubulcus ibis* del Delta del Río Colorado.....	39
8	Media (X), desviación estándar (D.E.) y valores máximos y mínimos de porcentaje de inhibición de AChE cerebral en *Bubulcus ibis* del Delta del Río Colorado.....	45

9 Información sobre uso de insecticidas en trigo en el valle de Mexicali y San Luis R.C. durante la temporada 2003-2004.... 49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pagina
1	Fórmula general de los plaguicidas organofosforados.....	10
2	Las 4 principales categorías de los compuestos organofosforados.....	12
3	Liberación del neurotransmisor acetilcolina, ACh (A), captura de Ach por receptores colinérgicos (B), hidrólisis de ACh por acetilcolinesterasa, AChE (C), acumulación de ACh por inhibición de AChE (D).....	15
4	Interacción entre los plaguicidas organofosforados y la enzima AChE.....	18
5	Reactivación del sitio activo de AChE por 2-PAM. (A) ataque a la enzima fosforilada, (B) liberación del sitio activo.....	21
6	Localización del Delta del Río Colorado, México: Valle de Mexicali, B.C. y San Luis Río Colorado, Son., México.....	27
7	Disección, Paso 1.....	30
8	Disección, Paso 2.....	31
9	Disección, Paso 3.....	31
10	Disección, Paso 4.....	32
11	Disección, Paso 5.....	32

12 Georeferenciación de los resultados obtenidos para actividad de AChE cerebral de *Bubulcus ibis* 40

13 Correlación de actividad de AChE en *Bubulcus ibis* contra: a) días transcurridos a la captura y b) horas de forrajeo..... 41

14 Comparación de la actividad de AChE por mes (Feb=Febrero, Mar=Marzo, Abr=Abril)..... 42

15 Variación de la actividad de AChE por Sitios (N=Norte, C=Centro, S=sur) dentro de cada Mes de Muestreo. Las líneas representan grupos homogéneos entre sitios de muestreo para Febrero y Abril; "*" representan diferencias significativa entre meses en los distintos sitios..... 43

16 a) Proporción gral. de muestras inhibidas (I) y sin inhibición (NI) y b) % de muestras No reactivables (NR), Reactivables entre 5-20% y >20% en Febrero (F), Marzo (M) y Abril (A)..... 44

17 Georeferenciación de los resultados obtenidos para la inhibición de actividad de AChE cerebral de *Bubulcus ibis* en el Delta del Río Colorado..... 46

18 Correlación del porcentaje de inhibición de AChE en *Bubulcus ibis* contra: a) días transcurridos a la captura.y b) horas de forrajeo 47

RESUMEN

Se determinó Ia inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) cerebral en 56 garzas ganaderas (Bubulcus ibis) colectadas en 3 diferentes zonas del Delta del Río Colorado (Valles agrícolas de San Luís Río Colorado, Sonora y de Mexicali, Baja California, México); así como también se determinó el patrón de uso de plaguicidas aplicados sobre los cultivos asociados al Delta del Río Colorado. Las Garzas fueron capturadas durante los meses de Enero a Abril de 2004 forrajeando sobre campos de cultivo de trigo o alfalfa, empleando para su captura rifle y escopeta. La determinación de la inhibición de AChE se logró con reactivación química mediante la incubación de cada muestra con y sin piridina-2-aldoxima metacloruro (2-PAM), para luego ser analizadas por el Método de Ellman (1961) y medir la actividad postincubación de la enzima. De esta forma se logró reactivar 23.2% (13/56) de las muestras analizadas, de las cuales 2 %, del total presentaron arriba del 20% de inhibición de AChE, siendo la inhibición máxima encontrada de hasta 45.9%. Se logró determinar que el patrón de uso de los plaguicidas en el área estudiada, está basado principalmente en el empleo de organofosforados como el metamidofos y dimetoato, así como algunos piretroides como lambda-cialotrina y carbamatos como el pirimicarb.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El Delta del Río Colorado

La región del Delta del Rio Colorado es una zona de importancia para la migración y preservación de especies de interés o en peligro de extinción. Su descripción general tomada de CONABIO (2005) es la siguiente:

1.1.1 Ubicación geográfica

Coordenadas extremas: Latitud N: 31° 01' 12" a 32° 09' 36"
Longitud W: 113° 36' 36" a 115° 13' 12"
Entidades: Baja California, Sonora.
Municipios: Mexicali, Puerto Peñasco, San Luis Rio Colorado.
Localidades de referencia: Puerto Peñasco, Son.; San Felipe, BC; Golfo de Santa Clara, Son.; Nuevo Michoacán, Son.

1.1.2 Superficie

Superficie: 4,310 km^2
Valor para la conservación: 3 (mayor a 1,000 km^2)

1.1.3 Características generales

Región definida en función a su importancia faunística al poseer un alto valor para aves anidantes. El área forma parte de la reserva de la biosfera "Alto Golfo de California y Delta del Rio Colorado, decretada en 1993, por lo que el límite regional terrestre se ajusta al término de área nacional protegida. Los humedales del Delta del Rio Colorado son también considerados de importancia internacional especialmente por sus habitats para aves acuáticas (sitio Ramsar No. 814), según la convención relativa a este tipo de ecosistemas realizada en Ramsar, Irán en 1971. En esta región se encuentra un importante

número de especies cosmopolitas y endémicas del Golfo de California. Especies endémicas: de peces (*Catostomus insignis),* la totoaba (*Cynoscion macdonaldi),* el perrito del desierto *(Cyprinodon macularis), Gila intermedia,* la carpita cola redonda (*G. Robusta)*; de aves el palmoteador de yuma (*Rallus longirostris yumanensis).* Todas estas especies junto con las aves *Chamaea fasciata, Falco peregrinus, Haliaeetus leucocephalus, Parus inornatus, Passerculus sandwichensis rostratus, Sterna antillarum* y *Toxostoma redivivum redivivum* se encuentran amenazadas por pérdida de hábitat y contaminación. Especies extirpadas: de peces *Gila elegans, Ptychocheilus lucius, Rhinichthys osculus, Tiaroga cobitis, Xyrauchen texanus.* El delta del Río Colorado representa una zona de alta productividad y hábitat de gran importancia por ser zona de reproducción, desove y crianza de especies marinas" (CONABIO, 2005).

1.2 Agroecosistemas del Delta del Río Colorado

El Delta del Río Colorado alberga en su parte mexicana a los valles agrícolas de Mexicali, Baja California (BC) y San Luís Río Colorado en Sonora. Ambos valles comprenden una basta región agrícola irrigada por las aguas del Río Colorado, el cual sirve de límite territorial entre Baja California y Sonora, así como con los Estados Unidos de Norteamérica. La agricultura practicada en las casi 210 000 ha del distrito de riego, se caracteriza por ser altamente tecnificada y por el uso de grandes volúmenes de plaguicidas, siendo los cultivos principales trigo, algodón y alfalfa; además de algunos otros de menor importancia en cuanto a la superficie de siembra como son sorgo, maíz; hortalizas como el cebollín y espárrago (CNA, 2004).

1.3 Impacto de la agricultura

Bajo la suposición de que el empleo de plaguicidas aumentará la producción agrícola y, por ende, la producción de alimentos, estos compuestos se han utilizado ampliamente en el ámbito mundial y la situación no es distinta en el Distrito de Riego 014. Sin embargo, la problemática que ha generado el buen o mal uso de plaguicidas, está relacionada con incidentes como: intoxicaciones humanas, envenenamiento de peces, aves y mamíferos en general; adicionalmente a los efectos agudos de los plaguicidas, están aquellos asociados a intoxicaciones crónicas o efectos subletales (no producen intoxicación aguda) que inducen alteraciones en el comportamiento, supervivencia, capacidad reproductiva, y diferentes tipos de cáncer, por factores como la persistencia del plaguicida en el medio ambiente. (EPA, 1999; Bejarano, 2002; Uhart y Zaccagnini, 1999)

El patrón de uso de plaguicidas a nivel mundial se ha modificado hacia el empleo de compuestos menos persistentes (organoclorados), como es el caso de los plaguicidas organofosforados, carbamatos y piretroides, pero en comparación con los primeros, estos últimos presentan mayores efectos agudos. En la actualidad el patrón de uso de plaguicidas en los valles agrícolas del Delta del Río Colorado está basado en éstos últimos grupos de plaguicidas, aunque los tipos y volúmenes de aplicación se desconoce, hasta por las dependencias involucradas con su uso. Sin embargo, en estudios recientes (Moreno, 2001) se ha determinado que al menos 400,000 L de insecticidas son aplicados por ciclo agrícola en los principales cultivos del distrito de riego.

El impacto del uso de plaguicidas persistentes y otros agroquímicos sobre el ecosistema del delta, ha sido evaluado por algunos investigadores (Mora 1991; Mora y Anderson 1991 y 1995; Rojas, 1987 y García *et al.*, 2001), evidenciando la presencia de residuos de plaguicidas organoclorados en aves o sus huevos; elevadas concentraciones de metales como cobre o zinc en peces; además una buena proporción de la biota en los humedales asociados al delta, se encuentran contaminados por organoclorados o presentan elevados niveles de selenio. Sin embargo, a pesar de estos esfuerzos de investigación en el Delta del río Colorado, actualmente no existen reportes relacionados al impacto de los plaguicidas organofosforados y carbamatos.

Por lo anterior, en el presente estudio se planteó determinar el patrón de uso de plaguicidas y evaluar un aspecto del impacto de los plaguicidas organofosforados sobre la fauna de éste ecosistema, para lo cual se utilizaron los niveles de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en la garza ganadera (*Bubulcus ibis*), un ave residente del delta y hábitos alimenticios asociados a los cultivos agrícolas. Para ello se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones sobre la especie seleccionada:

1. No es una especie en riesgo. Mora (1997) contabilizó 2000 garzas arribando y partiendo en un solo garcerío con una población de 10 000 parejas. En la actualidad se tienen identificados por lo menos 3 sitios de agregación en el valle (observación personal).
2. Es una especie fácil de identificar: Los adultos miden cerca de 43.2 cm de largo, tienen una amplitud de ala de 94 cm y pesan entre 0.27 a .45 Kg. El

plumaje es generalmente blanco, aunque durante la época de reproducción las plumas se toman de color naranja tenue sobre la parte baja frontal del cuello, de la frente hacia la nuca y en la parte baja de la espalda. En aves que no están en reproducción, el pico, lores e iris son amarillos y las patas son verde oscuro (Telfair, 1983).

3. Sus hábitos alimenticios dependen mayormente del forrajeo sobre cultivos agrícolas en irrigación y su dieta se compone principalmente de insectos como saltamontes, grillos, arañas y otros (Telfair, 1983), aunque históricamente se le ha asociado con el ganado. En estudios realizados por Mora en 1997, en el Valle de Mexicali se encontró que durante el invierno la garza come más roedores que insectos, además que sus vuelos en búsqueda de alimento no son aleatorios, sino dirigidos a los campos agrícolas en irrigación.
4. En el Valle de Mexicali el ciclo reproductivo de la garza inicia con el fin de la primavera y comienzo del verano, justo cuando se incrementa la población de insectos, pero también la aplicación de insecticidas.

Estas características, sitúan a esta especie como un excelente bioindicador de exposición a los plaguicidas organofosforados inhibidores de la colinesterasa, los cuales se han venido utilizando ampliamente en los Valles agrícolas aledaños al Delta del Río Colorado.

2. ANTECEDENTES

2.1 Plaguicidas

2.1.1. Definición

De acuerdo con la definición oficial de la CICOPLAFEST (1998), "un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o interfieran con la producción agropecuaria y forestal". La legislación de los Estados Unidos de Norteamérica de acuerdo con Hayes y Laws (1991), utiliza el término "controlar" de la definición mexicana por "prevenir, destruir, repeler o mitigar", además incluye a las sustancias o mezclas usadas como reguladoras y también a defoliantes de plantas"

2.1.2. Uso de plaguicidas en México y Delta del Río Colorado

El uso de plaguicidas en México está regulado por la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST). La tabla 1 muestra la lista de plaguicidas organofosforados (OP) y carbamatos (CA), vigente por el Catalogo Oficial de Plaguicidas en México de ésta comisión. Sin embargo, existe muy poca información relacionada a los volúmenes y los tipos de plaguicidas que se aplican. De acuerdo con Bejarano (2002); los insecticidas de mayor consumo para 1999, en datos proporcionados por la industria de los plaguicidas fueron paratión metílico, metamidofos, clorpirifos, endosulfan y carbofuran (4580 tons).

En el caso particular del valle de Mexicali B.C., los plaguicidas OP y CA que más se han utilizado desde hace 30 años son: monocrotofos, azinfos metílico, malation, paration metílico, paration etílico y el carbarilo. (Moreno, 2001). En datos de Bejarano (2002), 37 de los plaguicidas que aún se utilizan en México, incluidos los mencionados arriba, han sido prohibidos en países como los de la Unión Europea.

2.1.3 Plaguicidas y Ecosistemas del Delta del Río Colorado.

Estudios para evaluar el impacto del uso de agroquímicos en la zona del delta han sido conducidos por Mora (1991), quien determinó que el éxito de anidación de la garza ganadera (*Bubulcus ibis*) es de solo el 80%, detectando también la presencia de plaguicidas organoclorados en todas las muestras de huevo analizadas a una concentración media de 3.2 ppm (DDE). Sin embargo no encontró correlación significativa entre la concentración de organoclorados y el espesor del cascarón de los huevos. La presencia de organoclorados en otras especies del Valle de Mexicali, Valle de Culiacán, Sinaloa, y Valle del Yaqui en Sonora, también ha sido documentada por Mora y Anderson (1991), quienes detectaron organoclorados en las 8 especies de aves investigadas, a concentraciones desde 0.05 ppm para *Zenaida macroura*, hasta 5.05 ppm para *Phalacrocorax auritus*; encontrándose las más altas concentraciones en el Valle de Mexicali.

De manera similar, estudios evaluando la contaminación por metales han evidenciado un impacto sobre diversas especies de aves, peces y biota del Delta del Colorado. Por ejemplo, Rojas (1987) determinó en *Tilapia mossambica* y *Cyprinus carpio* la presencia de metales traza como el zinc y cobre, encontrando niveles hasta 10 veces más altos que

los reportados para las especies de peces de agua dulce en otros valles agrícolas. Asimismo, Mora y Anderson (1995) reportaron altas concentraciones de selenio (5.1 ppm) en *Phalacrocorax auritus*, así como elevados niveles de boro (4.3-28.5 ppm) para *Zenaida macroura*. En un estudio más reciente, García *et al.* (2001) determinaron que las concentraciones de selenio en sedimento y biota del delta del río Colorado fueron de 0.6 a 5 ppm y de 0.5 a 18.3 ppm respectivamente; y que 23% de las muestras estudiadas rebasaron el umbral considerado tóxico para las especies de biota seleccionadas.

Tabla 1. Plaguicidas OP y CA usados actualmente en México y su toxicidad.

Insecticida	OP	CA	DL_{50} Oral (Rata) mg/kg *	HD_5 (Dosis de riesgo para aves) (50%) **
Acefate	X		1030	18.52
Aldicarb		X	1.0	0.43
Azametifos	X		1180	3.98
Azinfos metilico	X		4.0	2.28
Bendiocarb		X	40	0.72
Carbarilo		X	246	30.05
Carbofurano		X	8.0	0.31
Clorfenvinfos	X		10	2.73
Clorhidrato de Formetanato		X	15-26	8.77
Clorpirifos etil	X		96	3.76
Clorpirifos metil	X		1000-3700	25.32
Coumafos	X		96	0.69
Diazinon	X		1250	0.59
Diclorvos	X		50	5.18
Dimetoato	X		235	5.78
Disulfoton	X		2.0	0.81
Etion	X		21	1.06
Fenitrotion	X		250	3.37
Fenoxicarb		X	>10.000	ND
Fention	X		250	0.87
Fentoato	X		440	23.17
Fonofos	X		8.0-17.5	3.86
Forato	X		2.0-4.0	0.34
Fosfamidon	X		17-30	1.08
Fosmet	X		147-316	1.24
Foxim	X		2000	1.71
Isazofos	X		40-60	0.51
Isofenfos	X		20	0.44
Malation	X		5500	139.1
Metamidofos	X		21	1.70
Metidation	X		44	3.53
Metomilo	X		17	8.46
Mevinfos	X		3.0-12	0.70
Monocrotofos	X		8.0-23	0.42
Naled	X		92	1.72
Ometoato	X		25	4.14
Oxamil		X	5.4	0.78
Oxidemeton metil	X		50	13.96
Oxido de fenbutatin	X		2631	ND
Paration metilico	X		6.0	2.13
Pirimicarb		X	147	6.78
Pirimifos metil	X		>2000	13.51
Profenofos	X		358	ND
Propoxur		X	50	1.31
Sulprofos	X		200	6.85
Tebupirimfos	X		1.8	2.36
Temefos	X		4204	8.68
Terbufos	X		1.3	0.16
Tetraclorvinfos	X		2000	25.32
Thiodicarb		X	166	234.96
Triazofos	X		57-59	1.68
Triclorfon	X		250	13.36
Vamidotion	X		100	3.72

* DL_{50} = Dosis letal media (CICOPLAFEST, 1998); ND = no determinada

** HD_5 = Dosis de riesgo calculado como el porcentil 5 de la distribución de especies de aves (Mineau, 2001)

2.1.4. Insecticidas Organofosforados y Carbamatos

Los plaguicidas organofosforados, o compuestos orgánicos de fósforo, comparten una estructura química común (Figura 1), pero difieren mucho en cuanto a la composición química de sus grupos "R" sustituyentes, en consecuencia también en sus propiedades físicas y farmacológicas. De acuerdo con su fórmula general

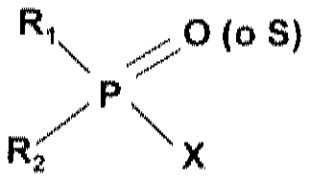


Figura 1. Fórmula general de los plaguicidas organofosforados

Donde "X" es el grupo saliente que define la clasificación de los organofosforados y los grupos "R" pueden ser los grupos dimetoxi, etoxi, etc., tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Las cuatro principales categorías de compuestos orgánicos de fósforo (organofosforados)

Categoría	Grupo saliente "X"	Toxicidad
I. Fosforilcolinas	Nitrógeno cuaternario sustituido	Muy alta
II. Fluorofosfatos	Flúor (F)	Alta
III. Cianofosfatos o con halógenos	CN, OCN, SCN y halógenos diferentes de F	Intermedia
IV. Plaguicidas	Alquilo; oxialquilo; tioalquilo; arilo o hetero- cíclico; oxiarilo; tioarilo, o análogos; nitrógeno; o grupos fosforil disubstituidos.	Entre categoría I y II.

Tomado de Gallow y Lawryk, 1991

Los compuestos denominados fosforilcolinas son poderosos inhibidores de colinesterasas, sino también son colinérgicos directos (compiten directamente con acetilcolina por el receptor colinérgico), por lo cual están considerados como los

compuestos sintéticos más tóxicos que se conocen. Menos tóxicos que las fosforilcolinas, los fluorofosfatos no dejan de ser altamente tóxicos, propiedad que junto a su gran volatilidad ha sido aprovechada para su uso como gases de guerra y muy pocos compuestos de esta categoría han sido empleados como plaguicidas (p. ej. mipafox y dimefox). Por otro lado, los organofosforados que contienen alguna combinación de cianuro o halógenos diferentes al flúor, presentan una toxicidad intermedia entre la toxicidad de los fluorofosfatos y la categoría 4 (plaguicidas). En esta última categoría, el grupo saliente "X" se conecta a los enlaces P-O o P-S y, en algunos compuestos a P-N o P-C. El grupo "X" en este caso puede ser un grupo alcoxi, alquiltio, ariloxi, ariltio o un análogo heterocíclico. La mayoría de estos compuestos son usados como plaguicidas y presentan toxicidades similares o menores a la de los gases nerviosos (p.ej. sarín), mientras una gran parte de estos organofosforados presentan los grupos dimetoxi o dietoxi (R_1 o R_2) y son empleados como insecticidas o acaricidas (Gallo y Lawryk, 1991). La figura 2 presenta algunos ejemplos clásicos de las 4 principales categorías de compuestos organofosforados.

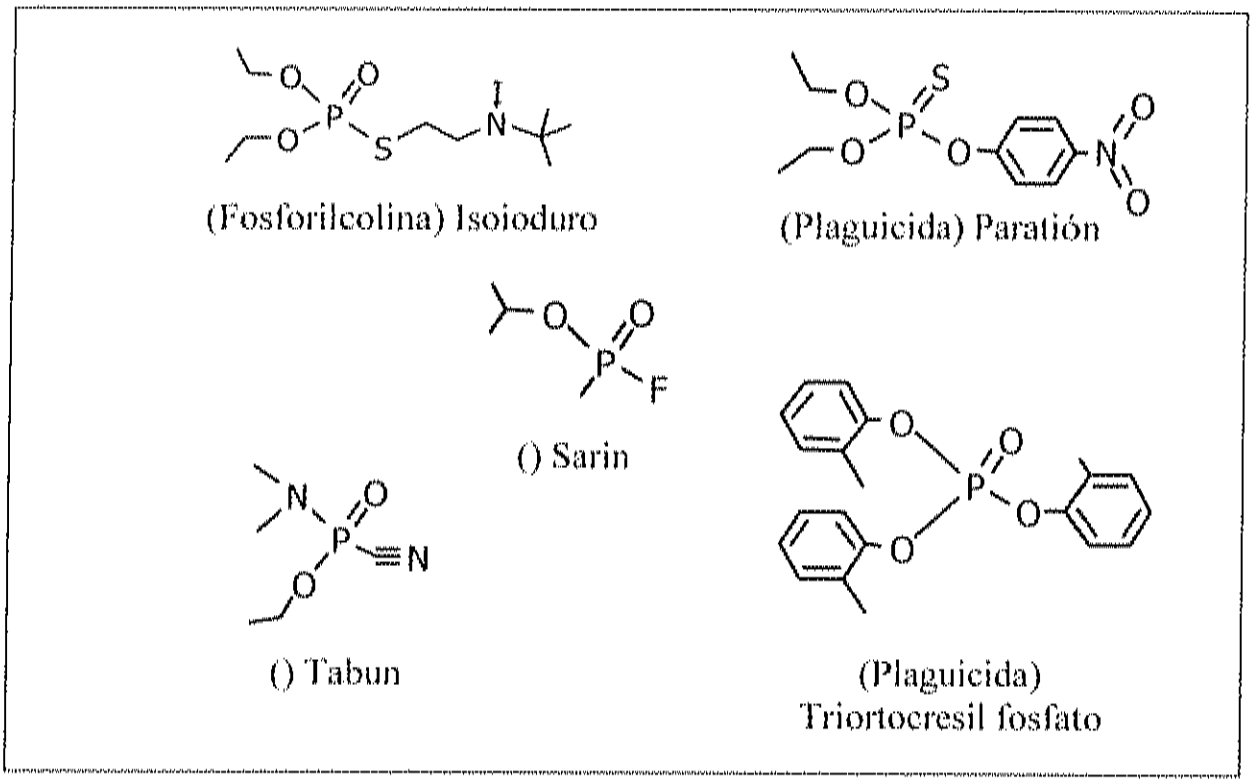
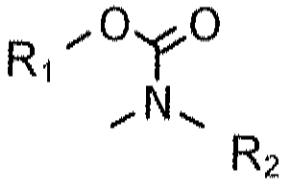


Figura 2. Ejemplos de las 4 principales categorías de los compuestos organofosforados

Los carbamatos usados como insecticidas tienen la siguiente estructura común:



Donde R1 es un alcohol, oxima o un grupo fenol, y R2 es hidrógeno o un grupo metilo. Estos compuestos también son inhibidores de colinesterasa, tanto en insectos como en mamíferos.

2.2 Colinesterasas (ChE)

Se denominan así las enzimas que son capaces de hidrolizar ésteres de colina, como acetilcolina (acetilcolinesterasa, AChE), butirilcolina (butirilcolinesterasa, BChE) y propionilcolina (Propionil colinesterasa, PChE). Estas enzimas pertenecen a un grupo mayor de enzimas denominadas esterasas de las cuales se derivan. Las colinesterasas son B-esterasas (serina-hidrolasas que son inhibidas por OP) y, además de ellas, se incluyen en este grupo las carboxilesterasas y las esterasas neurotóxicas, pero sólo las B-esterasas son inhibidas por plaguicidas organofosforados (Thompson, 1999).

La enzima AChE se encuentra en el tejido nervioso (principalmente cerebro de vertebrados como las aves) de la mayoría de las especies y tiene una alta especificidad por su sustrato acetilcolina, encontrándose además en plasma y células rojas de la sangre donde su papel es desconocido. Mientras que la función de BChE, para algunos autores como Mineau (2002) representa una primera línea de defensa contra inhibidores de ChE, para otros investigadores como Walker y Thompson, (1999) su papel es desconocido, además de que puede hidrolizar otros sustratos diferentes de butirilcolina (p.ej. acetilcolina); ambas colinesterasas se caracterizan por tener tanto un sitio aniónico, como un sitio activo o esterático; los cuales durante la catálisis de los ésteres de colina se unen a ambos sitios en la enzima

2.2.1 Función de AChE

Según Hooper (2002), durante el establecimiento de un impulso nervioso o sinapsis

nerviosa, un mensajero químico o neurotransmisor es liberado viajando desde la célula pre-sináptica a una post-sináptica. Acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor en estas uniones denominadas colinérgicas, presentes en el sistema nervioso central, periférico y las uniones neuromusculares. La mayor parte de los procesos fisiológicos son afectados por la acción de acetilcolina. Cuando este neurotransmisor es liberado en las uniones colinérgicas por la célula pre-sináptica, estimula a un receptor celular post-sináptico (Figura 3A y 3B). El funcionamiento normal en la sinapsis nerviosa requiere que ACh sea removida una vez que ha realizado su función (Figura 3C). Esto es efectuado por la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Si ACh no es removida (debido a inhibición por organofosforados o carbamatos) se acumula en el espacio sináptico (Figura 3D) produciendo una sobre-estimulación del receptor celular, ya sea en el ámbito de células nerviosas o fibras musculares. Esta sobre-estimulación inicial impide la repolarización de las membranas y, por lo tanto, la transmisión de nuevos impulsos nerviosos (García, 1995).

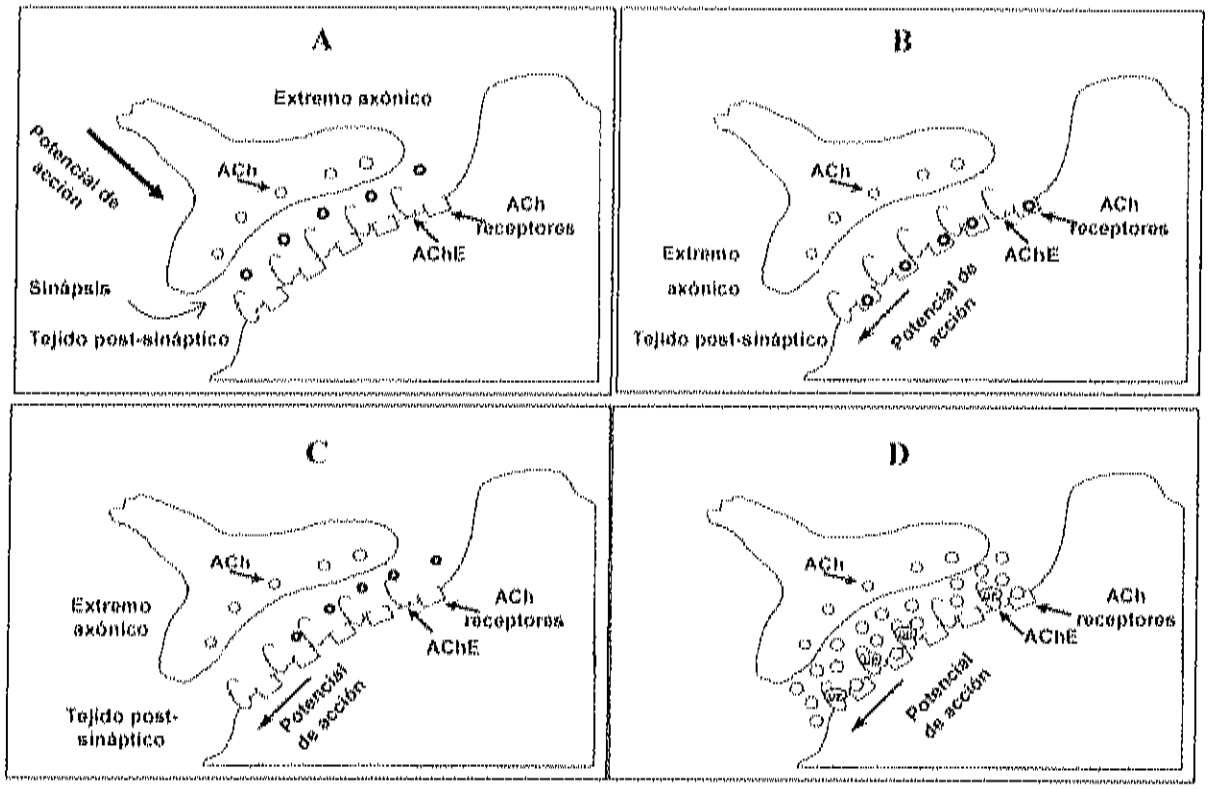


Figura 3. Liberación del neurotransmisor acetilcolina, ACh (A), captura de Ach por receptores colinérgicos (B), hidrólisis de Ach por acetilcolinesterasa, AChE (C), acumulación de Ach por inhibición de AChE (D). (Hooper, 2002)

2.2.2 Variación de la actividad

En aves la actividad de ChE normalmente comprende la suma de las actividades de las enzimas: acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa. En la mayoría de las especies de aves se ha observado que la butirilcolinesterasa del plasma sanguíneo hidroliza del 62 al 100% del sustrato acetilcolina (Thompson, 1993)

La variación de la actividad de ChE entre aves y mamíferos es difícil de predecir, aun cuando se trate de especies de aves o mamíferos estrechamente relacionadas (tabla 3). El intervalo de valores es 2 veces más alto en aves que en mamíferos. La variabilidad

interespecífica e intraespecífica en actividad de ChE hace necesario la determinación de valores normales para vigilar la correcta evaluación de exposición ambiental o confirmar envenenamientos por organofosforados o carbamatos (Blakley y Yole, 2002; Thompson, 1993). La variabilidad interespecífica de ChE ha sido estudiada por diversos investigadores (Thompson, 1993; fossi et al, 1996) quienes han evidenciado diferencias con respecto a distintas aves, encontrando, por ejemplo, que especies carnívoras son más susceptibles a plaguicidas organofosforados (Menores LD_{50}) que especies omnívoras (Tabla 4). Aunado a lo anterior, se pueden presentar variaciones de tipo estacional, diurna y en función del estado reproductivo o edad de cada especie (Thompson, 1999)

Tabla 3. Actividad normal de AChE en cerebro de algunas especies de aves y mamíferos en (µmol ACh/min/g)

Especie	Actividad (media±DE)
Mamíferos salvajes:	
Canis latrans	2.71±0.49
Odocoileus virginianus	10.60±3.25
Antilocapra americana	3.68
Mus musculus	7.28
Vulpes vulpes	2.65
Aves:	
Aquila crysaetos	13.37±0.90
Falco columbarius	20.27±2.87
Speotyto cunicularia	10.71±0.93
Passer domesticus	22.75±1.49
Larux pipixcan	29.61±3.98
Columbina species	26.8
Mamíferos domésticos:	
Cerdo	2.72±1.24
Perro	3.21±1.60
Gato	7.30±2.51
Vaca	2.47±0.76
Caballo	2.31±0.57

Tomado de Blakley y Yole, 2002

Tabla 4. Comparación de las LD_{50} de plaguicidas organofosforados en diferentes especies de aves carnívoras y omnívoras.

Plaguicida	Carnívoros		Omnívoros	
	Especies	LD_{50} (mg/kg)	Especies	LD_{50} (mg/kg)
Fosacetim	Águila real	2.5-5	Patos	24
			Faisan	161
			Godorniz	322
Monocrotofos	Águila real	0.19	Pato	4.8
			Faisan	2.8
			Estornino	3.3
			Gorrión doméstico	1.5
Paratión metil	Kestrel Americano	3.1	Pato	6.6-10
			Estornino	7.5
			Pájaro Negro ala roja	10-23.7
			Faisán	8.2
Fention	Halcón gorrión	1.3	Estornino	5.3
			Gorrión doméstico	5.6
	Kestrel Americano	1-1.3	Pájaro Negro ala roja	1.8
			Paloma	2.3

Hudson, 1984; Smith, 1987 y Schafer, 1983; citados en Thompson, 1993

2.2.3 Inhibición de AChE

Los plaguicidas organofosforados y carbamatos son sustratos suicidas para las colinesterasas. La inhibición de la enzima ocurre como resultado de la fosforilación o carbamilación (Figura 4) de una parte del aminoácido sérina en el sitio activo (Walker y Thompson, 1991), produciéndose O,O-dialquil fosfoserina, lo cual incapacita a la enzima para realizar la hidrólisis de los ésteres de colina (Kennedy, 1991).

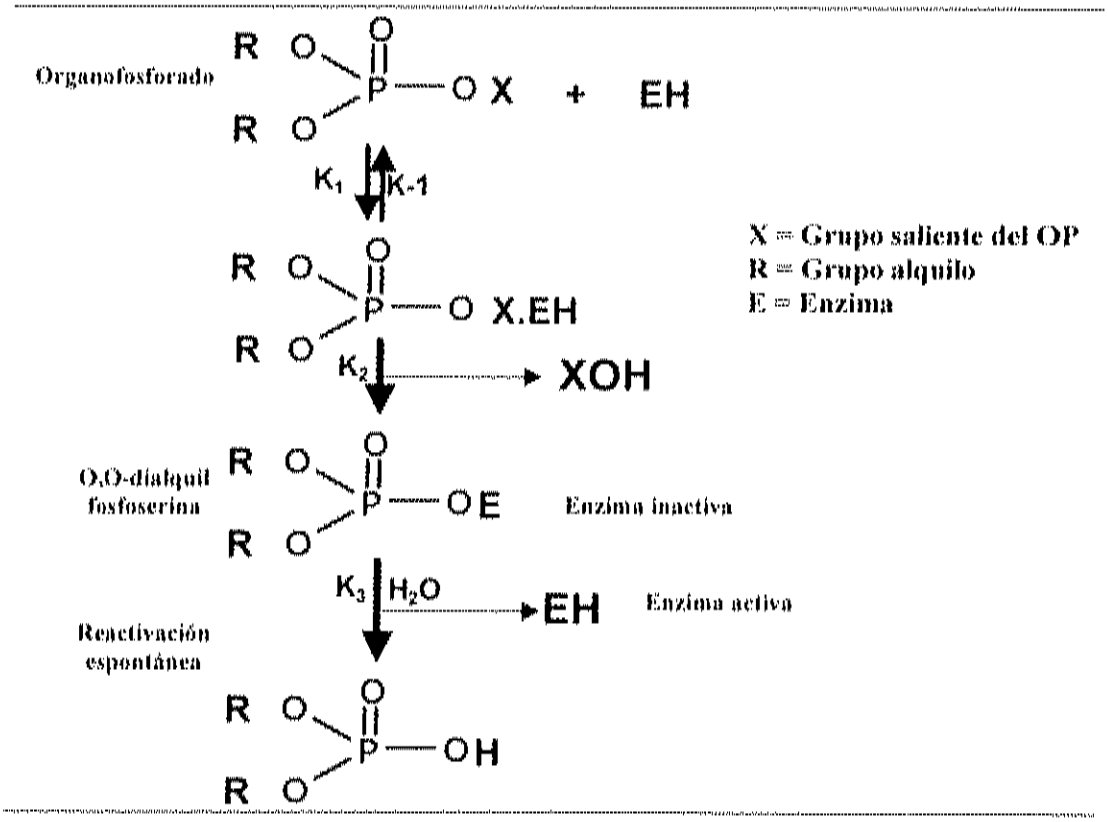


Figura 4. Interación entre los plaguicidas organofosforados y la enzima acetilcolinesterasa (Walker y Thompson, 1991)

Según Hooper (2002) las colinesterasas del plasma son inhibidas antes que las del cerebro y, en comparación, puede recuperarse rápidamente; por lo que una inhibición importante en el ámbito de plasma sanguíneo es indicativa de una probable inhibición de ChE cerebral. Se ha sugerido que actividades menores a dos desviaciones estándar (20%) de la actividad media de un grupo control son indicativo de exposición, mientras que actividades menores a 50% resultan en envenenamiento por inhbidores de ChE (Grue et al. 1991). De acuerdo con Mineau y Tucker (2002), la principal diferencia en la inhibición de AChE por organofosforados y carbamatos es que, en los primeros, el enlace formado es muy fuerte y casi permanente, de tal manera que la recuperación de la

actividad depende de la síntesis de nueva enzima; en cambio, con los carbamatos, éste enlace es muy débil y puede romperse fácilmente por hidrólisis, favoreciendo una recuperación mucho más rápida en comparación con los organofosforados.

2.2.4 Reactivación de Acetilcolinesterasa

Además de la hidrólisis espontánea, la reactivación de la enzima inhibida puede ocurrir, por dos mecanismos adicionales: la regeneración o síntesis de más enzima y el uso de agentes químicos. Cabe mencionar que estos mecanismos son efectivos de acuerdo con la especie y el tipo de plaguicida, además depende si la enzima presenta estado de envejecimiento, lo cual ocurre por desalquilación (hidrólisis de uno de los sustituyentes del organofosforado) de la enzima fosforilada, situación que hace imposible la recuperación de la actividad por alguno de los mecanismos mencionados. (Gallo y Lawryk, 1991)

2.2.4.1. <u>Hidrólisis espontánea</u>. La enzima fosforilada o inhibida, al igual que la AChE acetilada (por acetilcolina), son ésteres y pueden ser hidrolizadas por agentes nucleofílicos, incluida el agua. La tasa a la cual la AChE fosforilada se reactiva por acción del agua es extremadamente baja en comparación con la AChE combinada con acetato y cuando la inhibición es por isopropil fosfato la tasa es esencialmente cero (Gallo y Lawryk, 1991). Este mecanismo se puede dar en cuestión de horas para los carbamatos, mientras que puede llevar días para los organofosforados (Hooper, 2002). Esto origina que la enzima pueda ser reactivada mediante la dilución para el caso de los carbamatos y puede emplearse para diferenciar una inhibición entre ambos grupos de

plaguicidas (Martin et al. 1981). Este procedimiento de diferenciación consiste en medir la actividad de colinesterasa a una alícuota de la muestra inmediatamente después de su dilución (control mantenido a 0°C), al mismo tiempo que otra alícuota es incubada por un periodo determinado bajo condiciones de temperatura óptimas; la reactivación por hidrólisis espontánea resultará en una diferencia en las actividades de ambas alícuotas (Hunt y Hooper, 1993)

2.2.4.2 Regeneración o síntesis de AChE. Cuando la AChE ha sido inhibida de forma irreversible, la recuperación de la actividad depende exclusivamente del reemplazo de la enzima mediante la síntesis de nueva AChE. De acuerdo con Gallo y Lawryc (1991), existen 2 fases en la recuperación de la actividad de la enzima: una recuperación inicial que es rápida y parcial, seguida por una recuperación gradual y lenta hacia la actividad normal. La regeneración en el cerebro ocurre a partir de las células preexistentes y depende de la tasa de regeneración de nueva enzima; mientras que en los eritrocitos depende de la tasa de formación de nuevas células rojas. El proceso de recuperación de la actividad es distinto dependiendo de la especie, aun cuando se trata del mismo plaguicida. Por ejemplo, como el caso de diclorvos en la rata, la recuperación de la actividad depende de la reactivación espontánea, mientras que en humanos depende exclusivamente de la síntesis de nueva enzima.

2.2.4.3 Reactivación química. A diferencia de la hidrólisis espontánea este mecanismo de reactivación emplea un compuesto químico fuertemente nucleofílico, capaz de desplazar al plaguicida de la enzima inhibida debido a su mayor afinidad por éste (Figura

5). Tal compuesto es llamado metaioduro o metacloruro de piridina 2-aldoxima (2-PAM por sus siglas en ingles). El oxígeno fuertemente electronegativo de la molécula de 2-PAM ataca el enlace AChE-OP para formar un compuesto conjugado 2-PAM/OP, el cual deja libre el sitio activo restaurando la actividad de la AChE (Hooper, 2002; Gallo y Lawryk, 1991; Hunt y Hooper, 1993).

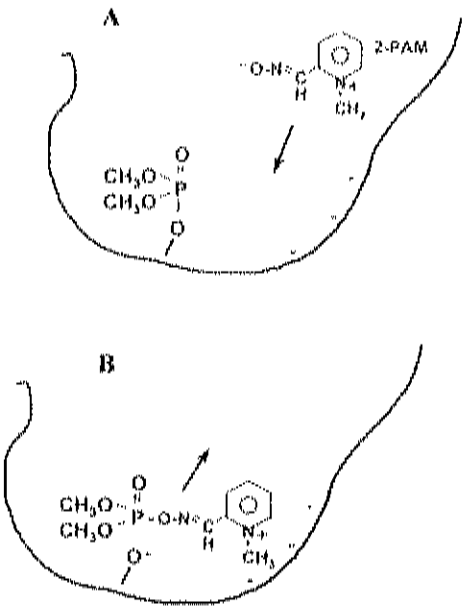


Figura 5. Reactivación del sitio activo de AChE por 2-PAM. (A) ataque a la enzima fosforilada, (B) liberación del sitio activo (Hooper, 2002)

La técnica para determinar el nivel de reactivación consiste en comparar las actividades de ChE obtenidas a partir de una muestra incubada en presencia y ausencia del agente reactivador (2-PAM), utilizando el incremento en la actividad posterior a la incubación para medir la reactivación de la enzima, y, por lo tanto, los niveles de exposición a

plaguicidas organofosforados. Sin embargo, la tasa de reactivación de ChE inhibida puede decrecer conforme se presenta el fenómeno de envejecimiento ("aging"), especialmente por los organofosforados con grupos dimetil (Fairbrother, 1991). Aun cuando el envejecimiento imponga ciertas limitaciones a la reactivación, esta técnica de diagnóstico es potencialmente útil cuando no se dispone de organismos control no expuestos o se dificulta obtenerlos (Stanley, 1993). La incubación con 2-PAM no reactiva significativamente ChE's inhibidas por carbamatos (Thompson, 1999).

2.2.5 Envejecimiento (aging)

Bajo ciertas condiciones, uno de los grupos alquilo de la O,O-dialquil fosfoserina puede sufrir desalquilación espontánea, produciéndose O-alquilfosfoserina. Este proceso es conocido como reacción de envejecimiento o "aging" por su forma en inglés. Cuando esto ocurre la enzima queda permanentemente inhibida y, a diferencia de la forma no envejecida, esta no puede ser reactivada por 2-PAM o por reactivación espontánea. Las tasas de envejecimiento dependen de los grupos alquilo conectados al organofosforado y se incrementan en el orden siguiente: grupos dietilo $<$ diisopropilo $\geq$ dimetilo $<$ isopropilo-metilo. (Gallow y Lawryk, 1991).

3. HIPÓTESIS

Es probable que la garza ganadera (*Bubulcus ibis*) al forrajear sobre campos de cultivos agrícolas del Delta del Río Colorado esté expuesta indirectamente a plaguicidas inhibidores de colinesterasa y por lo tanto, que presente niveles de inhibición de AChE cerebral mayores que 20 %.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la probable exposición a plaguicidas anticolinérgicos mediante la medición de la inhibición de AChE cerebral de la garza ganadera (*Bubulcus ibis*) forrajeando en cultivos agrícolas del Delta del Río Colorado.

4.2. Objetivos Específicos

- Determinar los principales tipos de plaguicidas aplicados en los cultivos empleados por la garza ganadera (*Bubulcus ibis*) para forrajear.
- Medir la inhibición de AChE cerebral de la garza ganadera (*Bubulcus ibis*) mediante reactivación de la enzima inhibida
- Identificar las zonas de mayor riesgo por exposición a plaguicidas organofosforados para las aves de acuerdo a los resultados de inhibición de AChE cerebral de la garza ganadera (*Bubulcus ibis*)

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización del Área de Estudio

El Delta del Río Colorado se encuentra localizado en el noroeste de la republica mexicana (Figura 6) y sirve de límite territorial entre los estados de Sonora y Baja California en el Este y Oeste respectivamente donde se encuentran situados los Valles agrícolas de Mexicali, B.C. y San Luis Río Colorado, Son. El Río Colorado desemboca hacia el Sur en el Alto Golfo de California y su cauce cruza la frontera mexicana con los Estados Unidos en la parte Norte de ambos valles agrícolas. El área seleccionada para este trabajo se dividió en 3 sitios denominados Norte (N), Centro (C) y Sur (S) como se puede ver en la figura 6, estuvieron localizados a lo largo del corredor ripario, "N" en el Valle de San Luis Río Colorado, Son. (32°40'62'' y 114°88'20''), mientras que "C" y "S" en el Valle de Mexicali, B.C. en las coordenadas de latitud norte y longitud oeste de 32°31'16'' y 115°04'35'', y 32°29'32'' y 115°15'82'', respectivamente.

5.2. Muestreo

El muestreo se realizó durante los meses de enero a abril del 2004. Se capturaron 56 garzas ganaderas (*Bubulcus ibis*) forrajeando sobre cultivos presentes en los sitios seleccionados, específicamente sobre trigo y alfalfa. Durante el muestreo se colectaron datos relacionados con:

a) Fecha y hora de captura

b) Cultivo donde se capturaron.- Información adicional sobre los tipos de cultivos del valle de Mexicali, se obtuvo mediante la cédula de cultivos del Campo Experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias sede en Mexicali. (INIFAP, 1998)

c) Coordenadas geográficas del lugar de captura.

d) Datos sobre aplicación de plaguicidas, cuando estuvieron disponibles.- Por lo general estos datos fueron difíciles de obtener al momento del muestreo, así que se optó por obtener ésta información a partir de entrevistas a empresas aerofumigadoras (anexo 3).

Las coordenadas geográficas tomadas mediante un sistema de posicionamiento global (GPS por siglas en ingles) se emplearon para georeferenciar los resultados de inhibición o actividad de AChE a un sistema de información geográfica del Delta del Río Colorado.

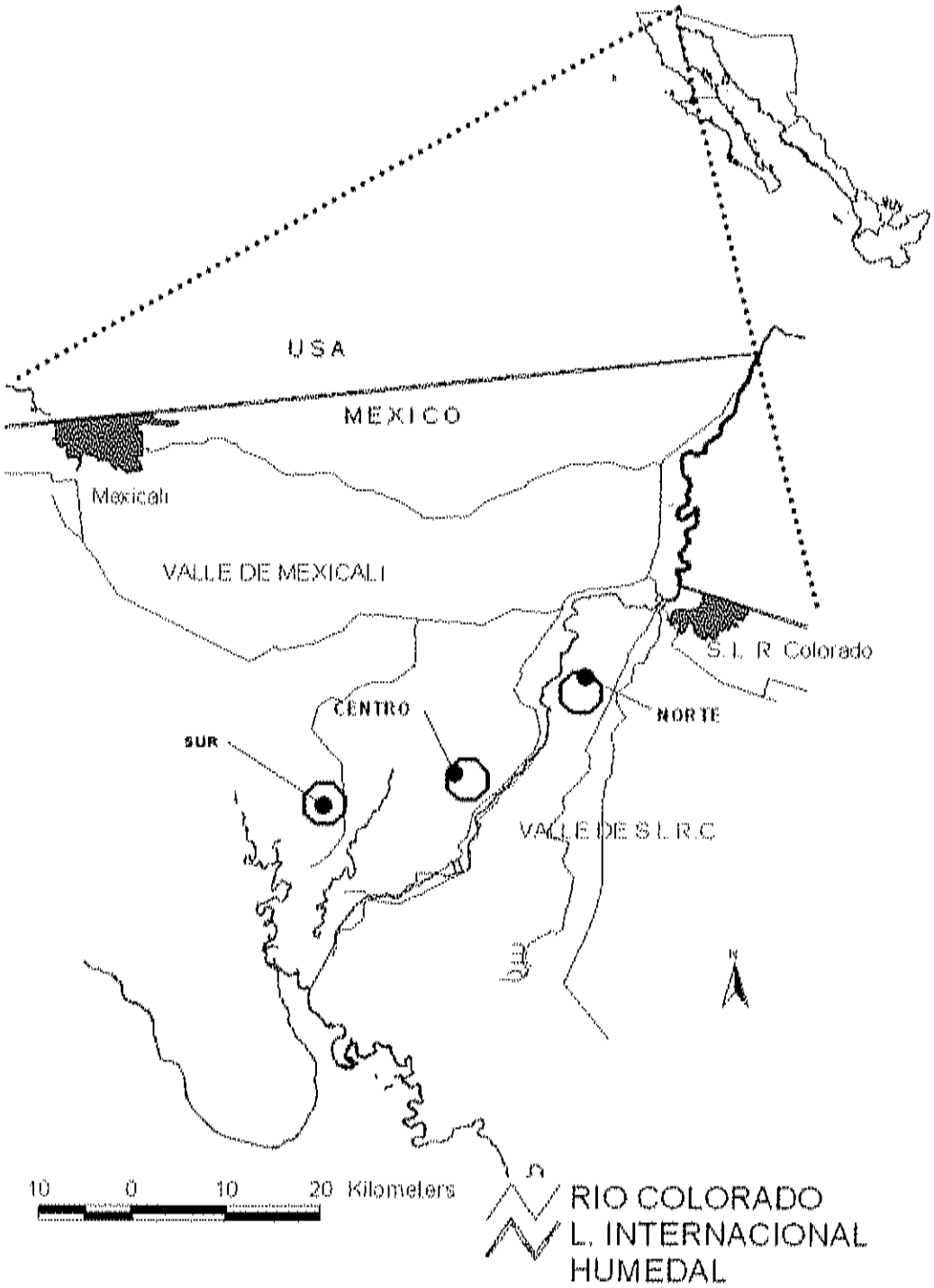


Figura 6. Localización del Delta del Río Colorado, México: Valle de Mexicali, B.C. y San Luis Río Colorado, Son., México.

5.3. Captura, conservación y transporte

La captura de la garza ganadera fue autorizada mediante el oficio NÚM/SGPA/DGVS/08841 (vigente del 30 de octubre de 2003 al 31 octubre del 2004), otorgado por la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental dependiente de la Dirección General de Vida Silvestre de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

Para la captura se probaron redes de Niebla de 12m x 3m x 0.12m, de largo, altura y tamaño de malla, respectivamente. Desafortunadamente el éxito en la captura fue muy bajo (1-2 aves x día), así que dicho método sólo se utilizó en el mes de enero de 2004. Posteriormente se utilizó un Rifle de postas calibre 5.5 mm (Mod. RM100, Mendoza, México) para los muestreos de Febrero y Marzo. Posteriormente, en abril se utilizó una escopeta suministrada por un cazador aficionado del Valle de Mexicali BC.

Una vez capturadas, las garzas fueron inmediatamente colocadas en un contenedor de cartón en atmósfera de dióxido de carbono suministrado por extinguidores de fuego comerciales, lo cual permitió enfriarlas y, por otro lado, eliminar el oxígeno para sacrificarlas lo más rápido posible. Acto seguido, los organismos se colocaron en bolsas selladas ("zip-lock") de 30 x 30cm debidamente etiquetadas con la nomenclatura día/mes/año-número (fecha y un número consecutivo), para luego transportarlas al laboratorio de campo en hieleras con hielo seco (dióxido de carbono congelado) para su análisis posterior.

5.4. Medidas morfométricas.

Previo a la disección, se registraron algunas medidas morfométricas para determinar relaciones con actividad o inhibición de AChE: longitud total, del tarso y ala, peso total y contenido de grasa. Adicionalmente se identificó el sexo del ave. Las medidas de longitud y peso se realizaron de acuerdo con Proctor y Lynch (1993); mientras que el sexo y contenido de grasa, de acuerdo con lo estipulado en el manual de monitoreo de productividad y supervivencia de aves (MAPS, 2003).

5.5. Disección

Una vez en el laboratorio las muestras fueron procesadas inmediatamente tomándoles en primer lugar el peso corporal para luego ser disectadas sobre hielo y obtener el cerebro según los procedimientos recomendados por Uhart y Zaccagnini (1999), el cual se describe a continuación:

a) Usando bisturí cortar la piel alrededor del cuello (Figura 7a).
b) Usando pinzas fórceps jalar la piel del cuello por sobre la cabeza, como dando vuelta a una media, dejar el cráneo descubierto.

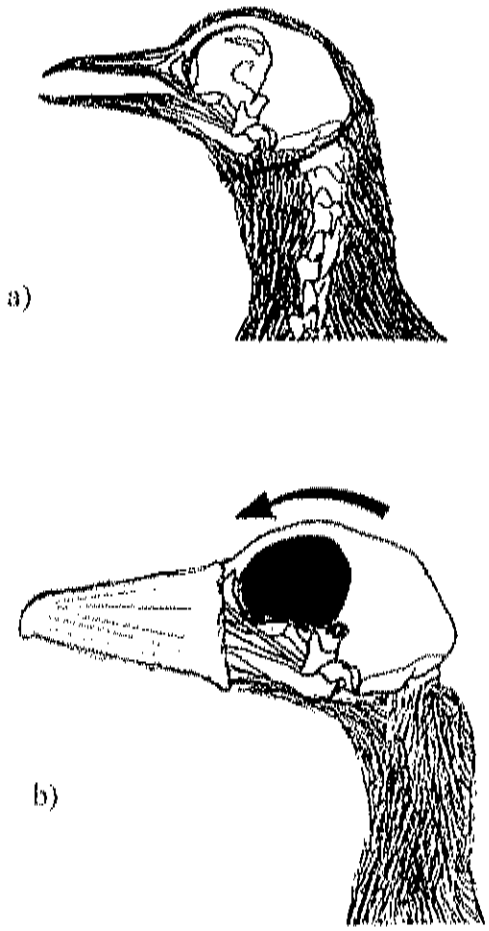


Figura 7 a) y b) Disección, paso 1

c) Con tijeras cortar el nervio óptico por detrás de cada ojo (Figura 8).

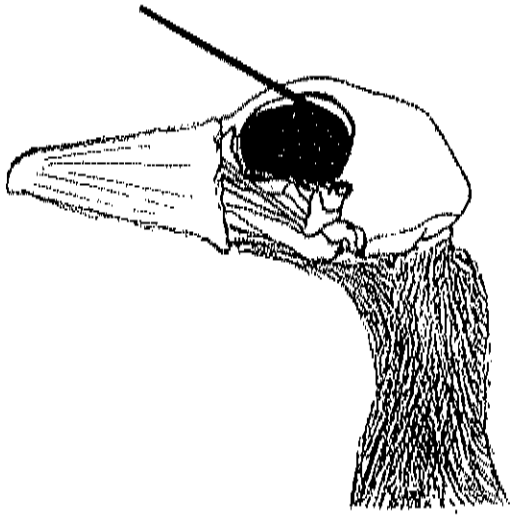


Figura 8. Disección, paso 2

d) Usando tijeras con punta realizar una incisión sobre el cráneo justo en el centro de ambos ojos (Fig. 9).

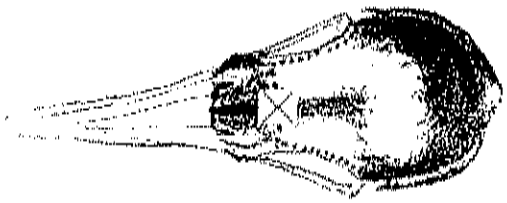


Figura 9. Disección, paso 3

e) Cortar el cráneo a partir de esta incisión en dirección hacia y sobre los orificios oculares, rodeándolos hasta los oídos y parte superior del cuello (posterior del

cráneo) para regresar al sitio de la incisión. Siempre dirigir las tijeras en dirección paralela al cráneo, cuidando de no dañar el cerebro (Figura 10).

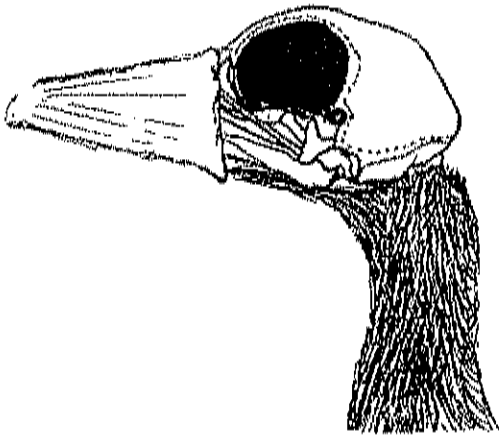


Figura 10. Disección, paso 4

f) Remover la tapa craneana

g) Completar la remoción del cerebro realizando cortes del quiasma óptico y la médula oblonga (Figura 11).

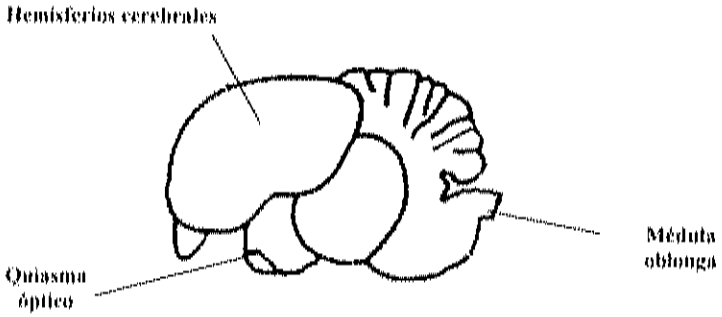


Figura 11. Disección, paso 5

El cerebro se colectó en tubos de ensayo de polipropileno de 15 mL, se procedió a dividirlo y pesarlo para emplear solamente el hemisferio derecho para los análisis de actividad y reactivación de AChE.

5.6. Homogenización

La totalidad del hemisferio cerebral derecho de cada garza fue pasado a un tubo de ensayo de 15 mL y homogenizado en frío con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 a una proporción de peso:volumen de 1:4 (Hooper, 1993), para ello se utilizó un homogenizador Ultra-turrex T-25 a 6500 revoluciones por minuto (rpm) por un tiempo de un minuto. Posteriormente el homogenizado de cerebro fue centrifugado a 3800 rpm por 10 min. en frío. El sobrenadante fue pasado a tubos de ensayo de 7 mL y se mantuvo en baño de hielo hasta ser empleado en el procedimiento de medición de actividad y reactivación de AChE.

5.7. Inhibición de Acetilcolinesterasa (AChE)

La inhibición de la AChE cerebral de la garza ganadera fue determinada por reactivación química de la enzima inhibida, incubando cada muestra con y sin un agente reactivador, piridina-2-aldoxima metacloruro (2.PAM), durante un periodo de tiempo (Hooper, 2000). Posterior a la incubación se midió la actividad de la enzima con y sin 2-PAM (Ellman, 1961). Una muestra se consideró reactivable si la parte tratada con 2-PAM presentó un incremento en actividad mayor al 5% por encima de aquella sin el 2-PAM.

5.7.1. Reactivación Química

5.7.1.1. Fundamento. La reactivación química se basa en la mayor atracción del agente 2-PAM por el plaguicida organofosforado, el cual se encuentra unido a la enzima en su sitio activo como resultado de una exposición previa. El 2-PAM por su naturaleza nucleofílica rompe el enlace formado entre enzima y plaguicida, formándose un conjugado 2-PAM/organofosforado regenerando el sitio activo de la enzima (Hooper, 2003). La proporción de enzima reactivada es calculada como en 5.7.3.

5.7.1.2. Procedimiento. Por cada muestra se etiquetaron 3 tubos de ensayo desechables con los siguientes títulos: "prep", "+" y "-". El primero sirvió para determinar actividad de AChE, mientras que "+" y "-" son la muestra con y sin 2-PAM respectivamente. Adicionalmente por cada incubación se preparó un tubo etiquetado como blanco de 2-PAM. Se llevó a cabo la dilución final (1:10) de la muestra con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en frío. Posteriormente se añadieron muestra y reactivos según orden y cantidades (modificadas para un volumen de 1 ml) especificadas en la tabla 5:

Tabla 5. Orden y cantidades de reactivos empleados para la reactivación usando 2-PAM

Reactivo	TUBO			
	prep	+	-	blanco (2-PAM)
Agua Bidestilada	20 µL		20µL	
2-PAM		20µL		20µL
Muestra (Enzima)	1000µL	1000µL	1000µL	
Solución amortiguadora fosfatos pH 7.4				1000µL

Una vez agregados los reactivos como se indica en la tabla 5, se procedió a incubarlos por un período de 30 minutos en baño de agua a una temperatura de 25°C, con excepción del tubo identificado como "PREP" que se incubó en baño de hielo. Después del período de incubación las muestras (4 tubos) se colocaron en hielo hasta medir la actividad de AChE.

5.7.2. Medición de la Actividad de AChE

5.7.2.1. Fundamento. La AChE hidroliza al sustrato sintético acetiltiocolina (ATCh) a acetil más tiocolina. La tiocolina liberada ataca al reactivo cromógeno DTNB (ácido 5,5-ditio, bis-2-nitrobenzoico) enlazando a una porción de la molécula para formar el 5-tio-2-nitrobenzoato, el cual tiene una absorbancia máxima a 412 nm; la actividad consiste en determinar la tasa de incremento en absorbancia en función del tiempo, el cual es convertido a unidades de actividad (Ellman, 1961).

5.7.2.2. Procedimiento. Al término del período de incubación cada muestra (120 µL) fue tratada como se describe en la tabla 6, ajustando el volumen de reacción a 1 mL, en celdas de reacción rectangulares de 2 mL.

Tabla 6. Orden y cantidades de reactivos empleados para la medición de actividad de AChE usando el método de Ellman

Reactivo	Cada Tubo	
	Actividad AChE	Blanco de Reacción
Solución amortiguadora fosfatos pH 8	680 µl.	800 µl.
DTNB	80 µl.	80 µl.
Sustrato	120 µl.	120 µl.
Muestra (Enzima)	120 µl.	0

Una vez adicionados los reactivos, se midió la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro La Motte NX2950 a 414 nm, previa lectura del blanco de reacción. Para cada muestra se registraron lecturas de absorbancias cada 30 segundos durante 4 minutos.

5.7.3. Cálculos

5.7.3.1. <u>Actividad de AChE</u>. Para cada muestra se obtuvo el incremento en absorbancia o tasa de absorbancia mediante una regresión lineal simple entre tiempo y lecturas de absorbancia. Posteriormente se transformó esta tasa a unidades de actividad de la siguiente manera:

$$U/g = \frac{\Delta A}{a * b} * \frac{VE * 10^6}{VM} * D$$

Donde:

U = Unidades de actividad por gramo de cerebro equivalentes a µmoles/min/g.

ΔA = Tasa o incremento de absorbancia en unidades de A/min.

"a" = Coeficiente de extinción molar para la molécula de TNB (5-tio-2-nitrobenzoato) tiene un valor específico de 13600 $(cm*M)^{-1}$.

"b" = Espesor de celda del espectrofotómetro (1 cm).

VE = Volumen del ensayo (L).

VM = Volumen de muestra (mL).

D = Factor de dilución (1/44)

5.7.3.2. <u>Determinación de las muestras reactivables (% de inhibición)</u>. Se comparó la actividad post-incubación de los tubos ("+" con 2-PAM y "-" sin 2-PAM) para determinar diferencias estadísticamente significativas. Para cada muestra primero se corrigió la actividad obtenida en los tubos tratados con 2-PAM restándole el blanco de 2-PAM, luego se les sustrajo la actividad obtenida en los tubos incubados sin 2-PAM. La diferencia obtenida se convirtió a porcentaje de reactivación de actividad de AChE cerebral (% de inhibición) de la siguiente manera:

$$\%INHIBICION = \frac{U_+ - U_-}{U_-} x100$$

Donde:

U_+ = Actividad post-incubación de tubos con 2-PAM

U_- = Actividad post-incubación de tubos sin 2-PAM

Cuando la diferencia en actividad del tubo incubado con 2-PAM fue mayor que 5% por arriba del tubo sin 2-PAM (Prueba "t" de Student de una cola, $\alpha = 0.05$), la muestra se consideró reactivable o inhibida.

5.9. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Kolmogorov para probar normalidad de los datos. Dado que no pasaron la prueba de normalidad se realizaron transformaciónes logarítmicas de los resultados de actividad de AChE. A partir de estos datos se efectuaron correlaciones de Pearson para establecer relaciones entre los datos transformados y las medidas morfométricas, el transcurso del ciclo de cultivo de trigo y valores de actividad e inhibición de AChE, horas de muestreo y actividad o inhibición; además se empleó el análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías para comparar los resultados de actividad o inhibición entre meses de muestreo o meses y sitios de muestreo. Para todos estos procedimientos se utilizó el programa SIGMA STAT versión 3.0.

5.9. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Kolmogorov para probar normalidad de los datos. Dado que no pasaron la prueba de normalidad se realizaron transformaciónes logarítmicas de los resultados de actividad de AChE. A partir de estos datos se efectuaron correlaciones de Pearson para establecer relaciones entre los datos transformados y las medidas morfométricas, el transcurso del ciclo de cultivo de trigo y valores de actividad e inhibición de AChE, horas de muestreo y actividad o inhibición; además se empleó el análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías para comparar los resultados de actividad o inhibición entre meses de muestreo o meses y sitios de muestreo. Para todos estos procedimientos se utilizó el programa SIGMA STAT versión 3.0.

6. RESULTADOS

6.1. Actividad de Acetilcolinesterasa (AChE)

En la Tabla 7 se muestra la media de la actividad de AChE cerebral obtenida por mes en los diferentes sitios de muestreo (Los datos generales se muestran en el anexo 1). Se observa que la mayor actividad de AChE se presentó durante el mes de febrero en la parte central del área de estudio. En la figura 12 se presentan los valores de actividad de AChE con los sitios de muestreo georeferenciados (anexo 2) en el Valle de Mexicali B.C. y Valle de San Luis Río Colorado, Sonora.

Tabla 7. Media (X), desviación estándar (D.E.) y valores máximos y mínimos de Actividad (U/g) de AChE cerebral en *Bubulcus ibis* del Delta del Río Colorado.

PUNTOS DE MUESTREO		AChE (U/g)			
		ENERO-04	FEBRERO-04	MARZO-04	ABRIL-04
NORTE	X	nm	3.46	3.91	2.40
	D.E.	nm	0.46	1.20	0.41
	MAX	nm	4.13	6.02	3.23
	MIN	nm	2.86	3.11	1.81
	n	nm	5	6.00	10.00
CENTRO	X	2.67	3.45	nm	2.75
	D.E.	0.21	0.66	nm	0.90
	MAX	2.82	4.59	nm	3.81
	MIN	2.53	2.55	nm	1.66
	n	2.00	8.00	nm	6.00
SUR	X	2.34	5.18	nm	2.77
	D.E.	0.00	1.60	nm	0.71
	MAX	2.34	8.30	nm	3.92
	MIN	2.34	3.50	nm	1.73
	n	1.00	10.00	nm	9.00

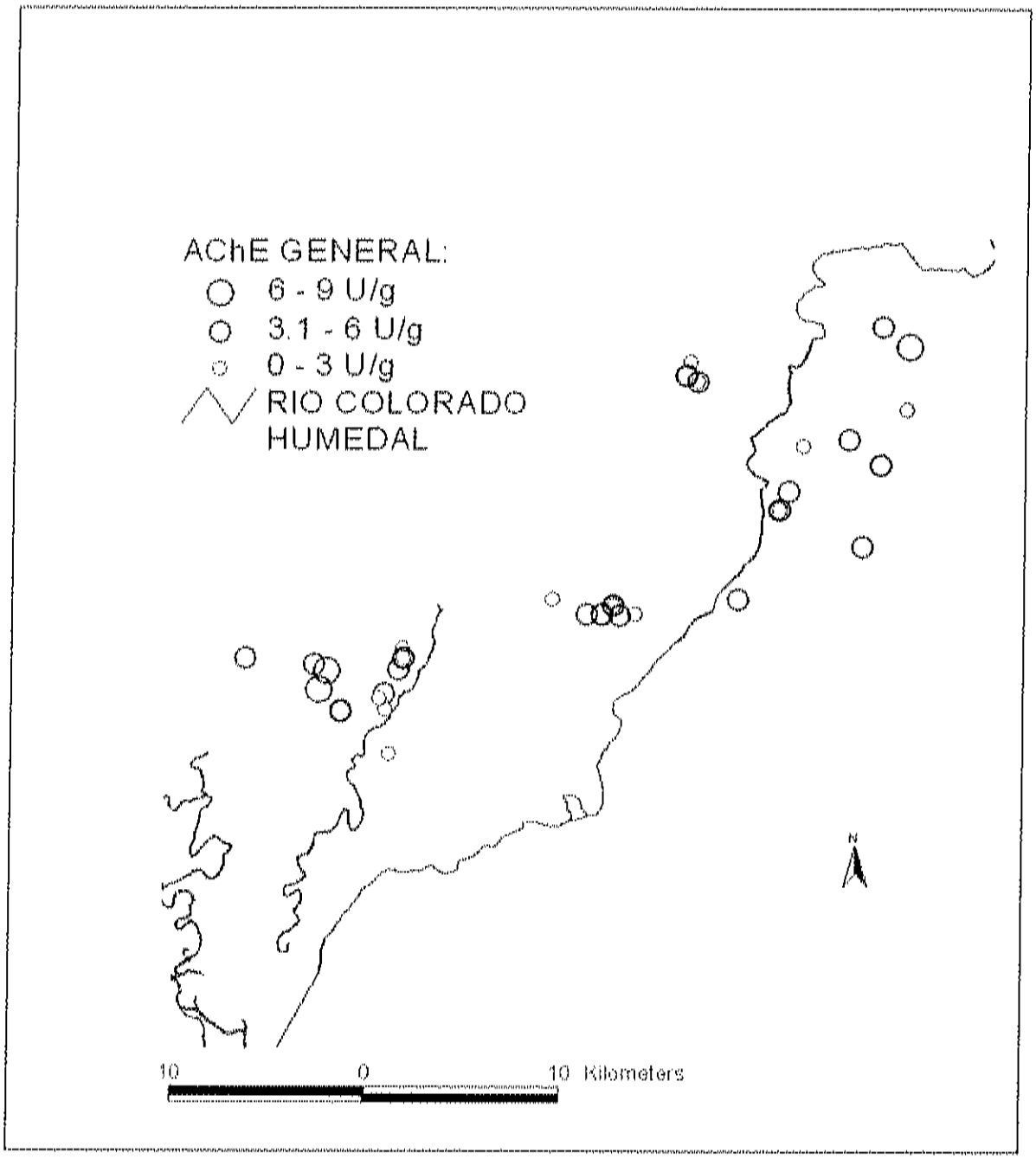


Figura 12. Georeferenciación de los resultados obtenidos para actividad de AChE cerebral de *Bubulcus ibis* en el Delta del Río Colorado

En la figura 13 se aprecia el comportamiento de la actividad de AChE, estableciendo (para el análisis) el inicio del cultivo a partir del primero de Enero del 2004, así como el inicio del forrajeo a partir de las 6 de la mañana. Se determinó el coeficiente de correlación de Pearson (r, P, n) para observar si el cambio en la actividad estaba relacionado con la hora de muestreo y si existía incremento o disminución de la actividad conforme avanzaba el ciclo de cultivo de trigo.

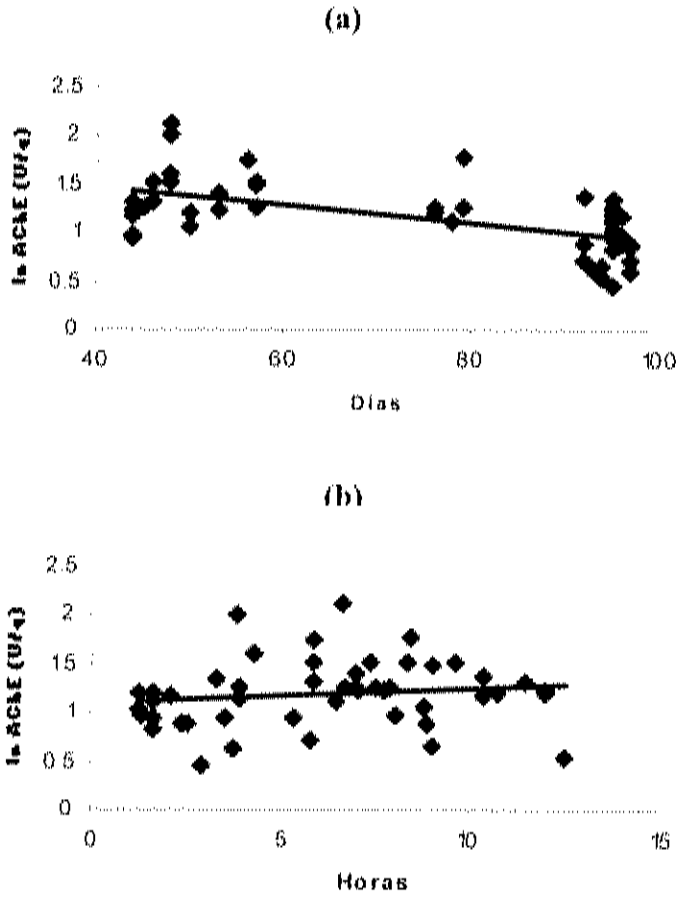


Figura 13. Correlación de actividad de AChE en *Bubulcus ibis* contra: a) días transcurridos a la captura y b) horas de forrajeo.

Los resultados de estas correlaciones mostraron que existe una baja relación ($r = 0.28$, $P < 0.04$, $n = 53$) entre horas de forrajeo y actividad de AChE (Figura 13b) cuando se analizan todos los datos. Cuando se comparan días contra actividad de AChE, se observa una disminución significativa ($r = -0.59$, $P < 0.001$, $n = 53$) de la actividad de AChE en la garza ganadera conforme transcurrió el ciclo de cultivo de trigo(Figura 13a).

6.1.1 Variación espacio-temporal de la actividad de AChE

Al comparar los resultados de actividad de AChE agrupados por mes de muestreo mediante análisis de varianza de una vía, se obtuvieron diferencias significativas (Figura 14) entre los meses de Febrero y Abril ($P < 0.001$); esto coincide con las correlaciones efectuadas reflejando una disminución en la actividad de AChE que va desde 4.2 U/g en febrero, hasta 2.62 U/g en Abril casi al final del ciclo agrícola del trigo.

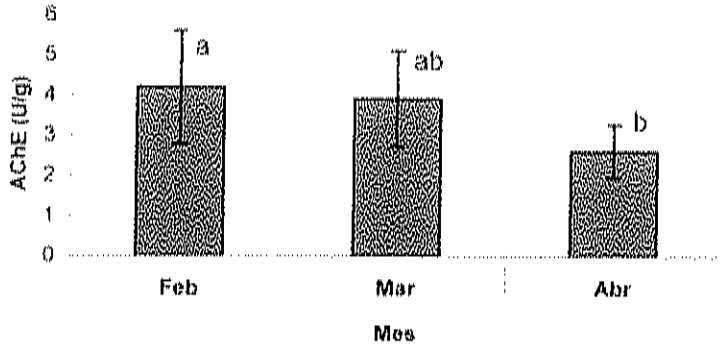


Figura 14. Comparación de la actividad de AChE por mes (Feb=Febrero, Mar=Marzo, Abr=Abril).

También se realizó ANOVA de dos vías para comparar el efecto de los diferentes sitios y los meses de muestreo sobre la actividad de AChE, encontrando que el mes de muestreo

tiene un efecto mayor que los diferentes sitios ($P<0.001$ y $P< 0.01$ respectivamente) y que existe una interacción significativa entre ambos factores a un nivel de $P< 0.05$.

Se realizó la prueba de Tukey para comparar las diferencias entre los diferentes grupos. La comparación de los diferentes sitios de muestreo para el mes de febrero arrojó diferencias significativas entre garzas muestreadas en el Sur (5.18U/g) comparadas a las del Centro ($P < 0.001$) y Norte ($P < 0.01$) (3.44 y 3.45 U/g respectivamente), lo cual no ocurre con las colectadas en los sitios Centro y Norte durante este mismo mes; igual sucede para los diferentes sitios durante el mes de Abril (Figura 15). No se realizaron análisis para los meses de enero y marzo debido a que no se contó con datos para todos los sitios de muestreo.

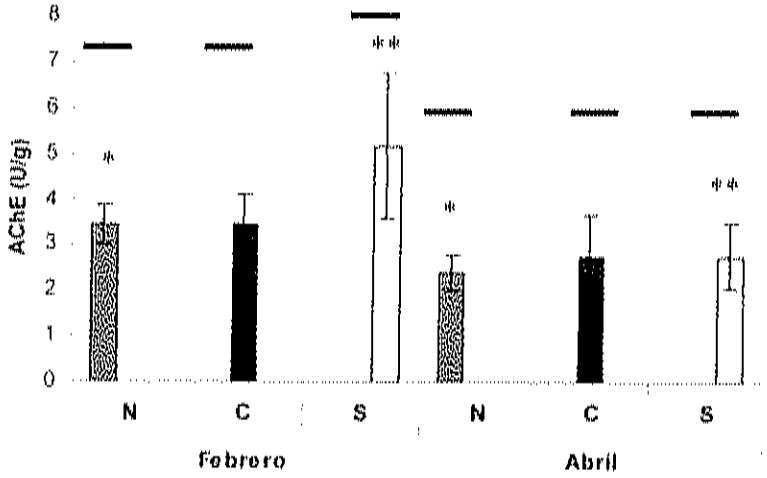


Figura 15. Variación de la actividad de AChE por Sitios (N=Norte, C=Centro, S=sur) dentro de cada Mes de Muestreo. Las líneas representan grupos homogéneos entre sitios de muestreo para Febrero y Abril; "*" representan diferencias significativas entre meses en los distintos sitios.

Respecto a los contrastes de la actividad de AChE por meses en los diferentes sitios (Figura 15), se puede ver que las garzas muestreadas en el Norte presentan una diferencia

apenas significativa ($P < 0.05$) de Febrero (3.45 U/g) a Abril (2.40 U/g), contrastando con la diferencia significativa ($P < 0.001$) presentada en el Sur (Abril 5.17 y Febrero 2.77U/g), lo cual en ambos casos implica una disminución en la actividad de AChE, aspecto que no ocurre para el sitio Centro que se mantuvo sin cambios en estos meses ($P > 0.05$).

6.2. Inhibición de Acetilcolinesterasa (AChE)

Un 23.2 % (13) del total de muestras de garzas ganaderas (*Bubulcus ibis*) analizadas(56) fueron susceptibles de reactivación, de las cuales un 2 % (del total) presentaron 20% o más de inhibición arriba del considerado como indicador de exposición a plaguicidas organofosforados o carbamatos; el resto presentó algún grado de inhibición entre 5 y 20% (Figura 16a,b).

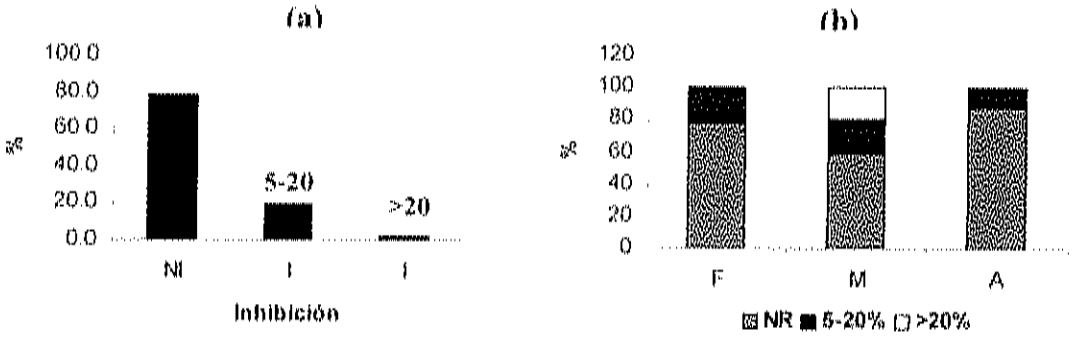


Figura 16. a) Proporción general de muestras inhibidas (I) y sin inhibición (NI) y b) Porcentajes de muestras No reactivables (NR), Reactivables entre 5-20% y >20% en Febrero (F), Marzo (M) y Abril (A).

En la Tabla 8, se muestra la media del porcentaje de inhibición de AChE cerebral obtenidos por mes y sitios de muestreo (Los datos generales se muestran en el anexo 1). Se observa que la mayor inhibición se presentó en la parte Norte durante el mes de Marzo. En la figura 17 se presentan los resultados de inhibición de AChE con los sitios de muestreo georeferenciados (anexo 2) en el Valle de Mexicali B.C. y Valle de San Luis Río Colorado, Sonora.

Tabla 8. Media (X), desviación estándar (D.E.) y valores máximos y mínimos de porcentaje de inhibición de AChE cerebral en la garza ganadera del Delta del Río Colorado.

PUNTOS DE MUESTREO		INHIBICIÓN DE AChE (%)			
		ENERO-04	FEBRERO-04	MARZO-04	ABRIL-04
NORTE	X	nm	0.00	28.44	6.91
	D.E.	nm	0.00	24.71	0.00
	MAX	nm	0.00	45.91	6.91
	MIN	nm	0.00	10.96	6.91
	n	nm	0	2.00	1.00
CENTRO	X	18.69	13.60	nm	15.02
	D.E.	0.00	6.49	nm	0.00
	MAX	18.69	22.83	nm	15.02
	MIN	18.69	8.05	nm	15.02
	n	1.00	4.00	nm	1.00
SUR	X	7.78	13.50	nm	12.81
	D.E.	0.00	2.95	nm	0.00
	MAX	7.78	15.59	nm	12.81
	MIN	7.78	11.41	nm	12.81
	n	1.00	2.00	nm	1.00

AChE = Actividad de Acetilcolinesterasa,
n = Tamaño de muestra, MAX = Valor máximo, MIN = Valor mínimo
nm = no muestreado

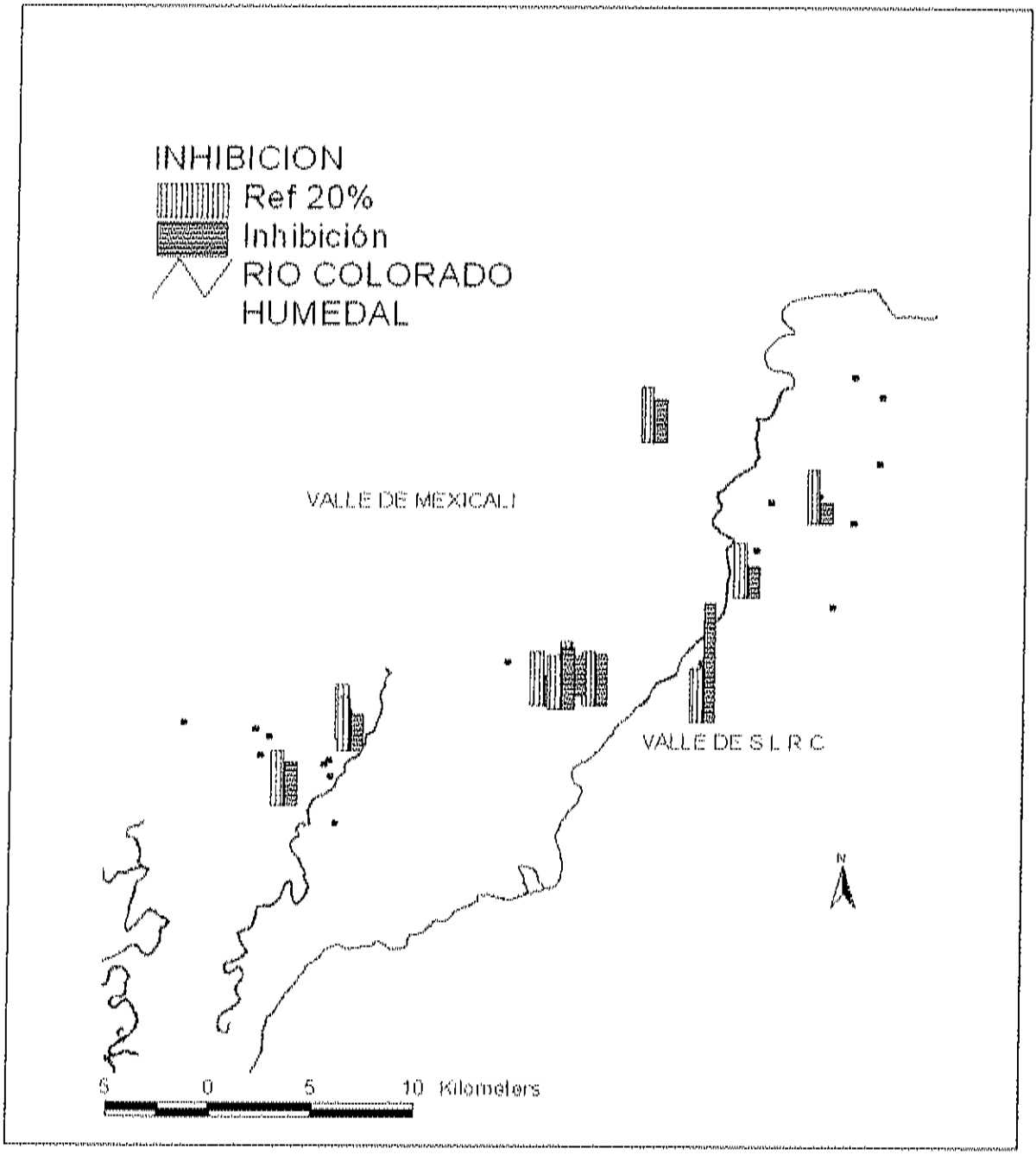


Figura 17. Georeferenciación de los resultados obtenidos para la inhibición de actividad de AChE cerebral de *Bubulcus ibis* en el Delta del Río Colorado.

En la figura 18 se aprecia el comportamiento de la inhibición de AChE, estableciendo (para el análisis) el inicio del cultivo a partir del primero de Enero del 2004, así como el inicio del forrajeo a partir de las 6 de la mañana. Se determinó el coeficiente de correlación de Pearson (r, P, n). no encontrándose (Figura 18a, b) correlación con el factor tiempo o curso del ciclo agrícola (r = 0.06, P = 0.84, n = 11), ni entre horas de forrajeo (r = 0.04, P = 0.88, n = 11). No se encontró correlación entre actividad e inhibición de AChE (r = 0.001, p = 0.99, n = 11)

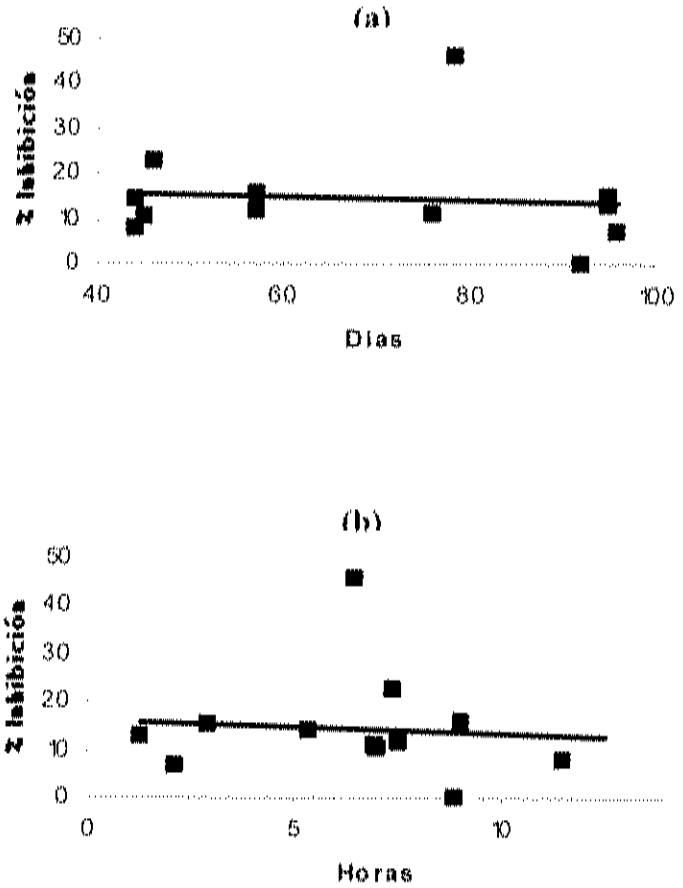


Figura 18. Correlación del porcentaje de inhibición de AChE en la garza ganadera (*Bubulcus ibis*) contra: a) días transcurridos a la captura.y b) horas de forrajeo

6.3. Medidas Morfométricas

Los resultados generales de las medidas efectuadas peso, sexo, etc., se presentan en el anexo 1. Se llevaron a cabo correlaciones entre las medidas morfométricas y los resultados de inhibición y actividad de AChE. Al respecto sobresale la disminución moderada pero significativa de la actividad conforme se incrementa la longevidad de la garza ganadera, medida como longitud de tarso ($r = -0.42$, $p = 0.001$, $n = 52$); ninguna de las otras medidas se correlacionaron en forma significativa con esta variable y tampoco con los resultados de inhibición. Se planteó la regresión logística para relacionar sexos y actividad, pero no se encontró relación ($p = 0.63$).

6.4. Uso de Plaguicidas

Como resultado de entrevistas realizadas en 8 de 14 empresas dedicadas a la fumigación agrícola y distribuidas en ambos valles agrícolas, se logró recabar los datos mostrados en la tabla 9, donde se observa que entre los insecticidas más utilizados durante la temporada de trigo 2003-2004 se encuentra el metamidofos, seguido por el dimetoato y lambda cialotrina, los dos primeros organofosforados y el tercero un piretroide. Además también se usaron en menor proporción Paratión Metil, Monocrotofos, Acefate, Pirimicarb y Malatión entre otros. La mayoría de las aplicaciones se realizaron para combatir la plaga denominada "Pulgón", la cual se presentó aproximadamente entre el 15 de febrero y 15 de marzo, tanto en cultivos de trigo como alfalfa; sin embargo, según la fecha proporcionada por dos de las empresas fumigadoras el inicio de aplicaciones se dio

a partir de finales de Diciembre del 2003 concluyendo el 31 de Marzo del 2004. Lo último debido a que una gran proporción de los agricultores aplican los insecticidas combinados con la primera aplicación de Herbicidas anticipándose al brote de las plagas de Insectos.

Tabla 9. Información sobre uso de insecticidas en trigo en el valle de Mexicali y San Luis R.C. durante la temporada 2003-2004.
Tierra total cultivable: 208,000 ha
Extensión de cultivo de trigo: 102,000 (50% del total)
Hectáreas de trigo fumigadas: 30,000 (30% del área cultivada con trigo)

Insecticida	**Dosis* Litros/ha**	**Total aplicado Litros**	**Notas**
Metamidofos	1-1.5	34,895-52,342	Se utilizó en un 59.2% de la extensión fumigada. Es un plaguicida no autorizado para este cultivo**
Dimetoato	0.75-1	8,020-10,693	Se aplicó en un 18% de la zona fumigada, plaguicida no autorizado para este cultivo
Lambda cyalotrina	0.2-0.3	1,447-2,170	El nombre común es KARATE, se aplicó en un 12.3% de la extensión fumigada. Plaguicida autorizado para este cultivo
Paratión metil	1-1	1,444	Se aplicó en un 2.4% de la zona fumigada. Plaguicida autorizado para este cultivo
Acefate	0.75-1	633-844	El nombre común es ORTENE, se aplicó en un 1.4% de la zona fumigada, plaguicida no autorizado para este cultivo
Monocrotofos	0.5-1.5	675-2,026	El nombre común es AZODRIN, se aplicó en un 2.3% de la zona fumigada, plaguicida no autorizado para este cultivo
Pirimicarb	0.3-0.5	270-450	El nombre común es PIRIMOR 50, se aplicó en un 1.5% de la zona fumigada, plaguicida autorizado para este cultivo
Triazofos	0.6-2.0	45-150	El nombre común es HOSTATION, se aplicó en un 0.1 % de la zona fumigada, plaguicida no autorizado para este cultivo
Malatión	0.5-0.75	300-450	Se aplicó en un 1 % de la zona fumigada, plaguicida no autorizado para este cultivo
Dimetoato-Malatión		450-621	Nombre común de esta mezcla es AFFLIX que se aplicó a un 0.8 % de la zona fumigada, plaguicidas no autorizados para este cultivo
Dimetoato-Paratión metil		562-675	Se aplicó en un 0.8 % de la zona fumigada, plaguicidas no autorizados para este cultivo
TOTAL		**48,741-71,865**	

*Se utilizó la guía de plaguicidas autorizados de uso agrícola para sacar la dosis por ingrediente activo (Dirección de Sanidad Vegetal, 1998).
** CICOPLAFEST, 1998

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.2. Actividad de AChE

Como lo muestran los resultados, se observó una disminución significativa de la actividad de AChE cerebral conforme avanzó el ciclo de cultivo de trigo, es decir, que las garzas muestreadas al comienzo del estudio (febrero) presentaron un promedio mayor de actividad que las tomadas al final en abril; situación que se refleja en las correlaciones efectuadas entre los datos obtenidos de actividad y los días a la toma de la muestra, así como también los resultados del análisis de varianza efectuados para evaluar variación entre meses. En los análisis de correlación se excluyeron los resultados del mes de enero debido a que estas muestras no fueron analizadas inmediatamente después de la colecta y a que sólo se capturaron 3 individuos, evitando el efecto del mayor tiempo de almacenamiento de estas muestras sobre la baja actividad de AChE obtenida en enero.

De las medidas morfométricas tomadas, la longitud del tarso se correlacionó negativamente con la actividad de AChE, sugiriendo que la actividad de las garzas disminuyó ligeramente con el incremento en la edad o longevidad de ésta ave. Lo anterior no concuerda con la información de la revisión efectuada por Thompson (1999), quien señala que para la mayoría de las especies de aves, los niveles de actividad de AChE cerebral (o del plasma) tienden a incrementarse varias veces desde la anidación hasta valores estables en la edad adulta. Resultados similares son los obtenidos por Wolfe et al., (1998) al evaluar la dependencia de la edad sobre la toxicidad de plaguicidas

organofosforados (diazinón y terbufos) en *Sturnus vulgaris* y *Agelaius phoeniceus*, quienes concluyeron que tanto la actividad de la ChE del cerebro y plasma se incrementaba con la edad de las especies estudiadas.

Es posible que la disminución en la actividad de AChE pudiera deberse a que conforme avanzó el ciclo de cultivo se utilizaron mayores cantidades de plaguicidas, aumentando la exposición de la garza y dando lugar a la reacción de envejecimiento que se presenta con el tiempo entre los organofosforados y la enzima. Esto explicaría los valores bajos de actividad obtenidos en las muestras en el mes de abril, lo que de ser cierto, también daría lugar a una subestimación de los resultados de inhibición, dada la posibilidad de que parte de la enzima estuviera envejecida o inhibida de forma permanente por algún plaguicida. En este sentido es importante señalar que los plaguicidas organofosforados de mayor uso, según los resultados obtenidos en este estudio, como son metamidofos, dimetoato, paratión metil, acefate, monocrotofos y malatión pertenecen al grupo de plaguicidas que tienen mayor tasa de envejecimiento y por lo tanto son menos propensos a reactivación (Fairbrother et al., 1991; Gallo y Lawryk, 1991; Martin et al., 1981).

7.2. Inhibición de AChE

Poco más del 20 por ciento de las garzas muestreadas fueron susceptibles de reactivación, lo cual indica que al menos presentaron un 5% o mayor inhibición de la enzima acetilcolinesterasa cerebral, éste resultado coincide con el obtenido por Parsons y otros

(2000), quienes determinaron que un 12.8% de los sueros de garzas ganaderas anidando en ecosistemas agrícolas de USA presentaron inhibición por organofosforados. Éste porcentaje significa que una elevada proporción de las garzas muestreadas entre enero y abril, probablemente estuvieron expuestas a los plaguicidas organofosforados usados en los cultivos de trigo o alfalfa del delta del Río Colorado. De ésta proporción sólo dos garzas mostraron una inhibición superior al 20%, niveles que han sido empleados como indicadores de exposición a plaguicidas organofosforados o carbamatos (Mineau, 2002; Grue et al., 1991). Asumiendo que el procedimiento de reactivación con 2-PAM solo reactiva ChE cerebral inhibida por organofosforados, estos resultados no contemplan la posible inhibición por carbamatos debido a que no se efectuó reactivación mediante hidrólisis espontánea.

La inhibición más alta se encontró (45%) en la parte centro del área de estudio correspondiente al mes de marzo. Es probable que tales niveles se deban a que a finales de febrero y principios de marzo se intensificaron las aplicaciones de insecticidas, debido a la presencia de la plaga denominada "pulgón" tanto en los cultivos de trigo como de alfalfa.

Aún cuando el análisis de varianza efectuado no muestra diferencias entre meses de muestreo, la proporción de garzas con inhibición de AChE disminuyó en el mes de abril. Esta disminución puede deberse a que durante éste mes la mayoría de las muestras se colectaron en el transcurso de la mañana, resultando en un menor tiempo de forrajeo de las garzas y por lo tanto a una menor probabilidad de exposición. Lo anterior obedeció al aumento en la eficacia del método de captura empleado. Otro factor involucrado pudo ser

la reacción de envejecimiento que se presenta entre la AChE y los organofosforados, ésta reacción produce la inhibición permanente de la enzima y el 2-PAM no puede regenerar su actividad (Hooper, 2002; Stanley, 1993).

Es posible que las garzas que presentaron inhibición de AChE cerebral, hubiesen presentado niveles de inhibición de ChE plasmática de mayor consideración, debido a que se ha encontrado (Parsons et al., 2000, McInnes et al., 1996) que se requieren niveles de exposición elevados para inhibir la AChE cerebral, en comparación con aquellos requeridos para la ChE del plasma.

Es probable que otras aves de hábitos similares a la garza ganadera, residentes o migratorias, presenten diferentes grados de inhibición de AChE cerebral, aunque como ha sido demostrado por diferentes investigadores (Mineau et al., 2001; Burgess et al., 1999) dependerá de la sensitividad de tales especies a los plaguicidas organofosforados o carbamatos empleados en el Delta del Río Colorado.

7.3. Uso de Plaguicidas

De los plaguicidas empleados durante el período de muestreo sobresale el uso del organofosforado metamidofos, el cual según la tabla 8 se aplicó en la mayor parte de la superficie del cultivo de trigo, seguido por el también organofosforado dimetoato y el piretroide lambda cialotrina. Es posible que el empleo de estos organofosforados haya adquirido importancia hacia mediados del ciclo en febrero y marzo, dado que de acuerdo a las entrevistas realizadas a los responsables de las empresas fumigadoras, fue cuando se presentaron las mayores infestaciones del insecto denominado "pulgón"; situación que

obligó a realizar hasta 2 aplicaciones adicionales al cultivo de trigo, llegándose a tener hasta 3 aplicaciones en algunas parcelas tanto del cultivo de trigo como de alfalfa.

El orden en el uso de los plaguicidas de acuerdo con las observaciones realizadas estuvo inclinado al empleo del carbamato pirimicarb, llegándose a aplicar de manera preventiva durante el primer riego (a finales de diciembre del 2003 y los primeros días de enero de 2004). En algunos casos el piretroide lambda cialotrina también se llegó a usar de manera preventiva, pero las mayores aplicaciones de éste insecticida también ocurrieron durante el período fuerte de infestación. Ésta práctica, de acuerdo con las observaciones realizadas resultó ser de uso generalizado, es decir, una buena parte de los agricultores realizan aplicaciones sin existir la presencia de la plaga, lo cual hace que la garza ganadera y otras aves forrajeando sobre el trigo estén sometidas a un mayor riesgo de exposición probablemente innecesario.

Respecto al volumen de insecticidas aplicado (aproximadamente entre 48,000-70,000 litros) el resultado que se obtuvo posiblemente subestime las cantidades reales aplicadas, debido a que la información se colectó sólo a partir de empresas aerofumigadoras, despreciando la parte de aplicaciones efectuadas por otros medios terrestres como lo es el uso de bombas manuales (mochila) y/o tractor. También cabe mencionar que no fue posible entrevistar a cuando menos 5 de las 14 empresas aerofumigadoras, lo que posiblemente aumentaría el volumen total de aplicaciones. Considerando lo anterior y según los datos proporcionados por el Distrito de Riego 014, Río Colorado dependiente de la Comisión Nacional del Agua, hasta el 30 de abril del 2004 se llevaban regadas 89 382 ha de trigo de las 102,000 programadas para el ciclo 2003-2004. Esto adquiere

relevancia si se toman en cuenta los pocos datos existentes sobre uso de plaguicidas en el distrito de riego, como son los reportados por Moreno (2002) quien asume que para ciclos agrícolas con alta infestación de plagas, por lo menos se aplica un litro de insecticida por hectárea, tal es el caso del ciclo triguero 1999-2000 en donde éste investigador reporta un volumen de 90817 litros de insecticidas aplicados a la misma cantidad de hectáreas. Situación similar se reporta en datos proporcionados por el Distrito de Desarrollo Rural 002, Río Colorado (SAGARPA, 2003) para ese mismo ciclo donde el 96% (87658 ha) de la superficie sembrada necesitó de algún insecticida y al menos una aplicación, sin embargo la calidad de esta información con respecto a las dosis, los tipos de insecticida y sus proporciones no es conocida.

Es claro que el patrón de uso de plaguicidas en el Delta del Río Colorado ha cambiado y se ha mantenido en el empleo de los compuestos organofosforados en mayor proporción, seguido por los carbamatos y piretroides. Sin embargo se debe considerar que éste estudio se enfocó al patrón de plaguicidas usados en el cultivo de trigo por lo que en estudios posteriores se deberá tomar en cuenta al algodón y la alfalfa, los otros dos cultivos tradicionales preponderantes en el Delta del Río Colorado. Ninguna de las empresas encuestadas aportó información sobre uso de los organoclorados todavía en uso autorizados por la CICOPLAFEST. Lo anterior se puede observar si se compara el patrón de uso de 1971 al actual, tan sólo ese año se aplicaron 233,770 Kg. del insecticida organoclorado DDT de 439,751 Kg. de los insecticidas totales aplicados, que en combinación con endosulfan representó el 97% del total en ese ciclo solamente para algodón (57,570 ha), para 1972 el patrón fue casi igual en datos reportados por Álvarez-

Borrego y otros (1973). La diferencia en ambos patrones estriba en la fuente de los datos, mientras en 1971 y 1972 las aplicaciones eran supervisadas por la actual SAGARPA, ahora no existe supervisión directa y por lo tanto los datos deben ser obtenidos a partir de mecanismos como los usados en este estudio, con el inconveniente de que sólo se obtienen estimaciones sobre el tipo y magnitud de las aplicaciones reales. Un aspecto importante para mantener un inventario actualizado en éste sentido, es la posibilidad del empleo de modelos de predicción de inhibición de colinesterasa en aves, en función del tipo y dosis de organofosforados y/o carbamatos aplicados, evitando el análisis destructivo que por lo general suele realizarse al evaluar exposición a estos plaguicidas (Corson et al., 1996); o estimar la probabilidad de mortalidad (Mineau, 2002).

8. CONCLUSIONES

Se evaluó la exposición a plaguicidas organofosforados en función de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa cerebral en la garza ganadera (*Bubulcus ibis*) forrajeando en cultivos de trigo del Delta del Río Colorado, encontrándose que en 23.2% de ellas se presentó al menos un 5% de inhibición o más aplicando el método de reactivación con 2-PAM.

Es probable que la reacción de envejecimiento mejor conocida por su nombre en ingles como "aging", sea un factor determinante en la disminución de la actividad de AChE observada en la garza ganadera conforme avanzó el ciclo del cultivo de trigo. Situación que pudiera estar relacionada con los organofosforados aplicados al cultivo de trigo, ya que el metamidofos, dimetoato, paratión metil, monocrotofos y malatión, pertenecen al grupo de organofosforados con grupos substituyentes dimetilo que son más propensos a la reacción de envejecimiento.

No fue posible establecer zonas de mayor o menor riesgo de exposición, según las comparaciones efectuadas y dado los pocos datos de inhibición obtenidos, además de que las garzas realizan vuelos alimenticios de hasta 35 Km.

Se logró determinar que el patrón de uso de plaguicidas en trigo en el Delta del Río Colorado, está mayormente orientado al empleo de plaguicidas organofosforados

(principalmente metamidofos y dimetoato), piretroides (lambda cialotrina) y carbamatos (pirimicarb).

La reactivación quimica *"in situ"* de la enzima acetilcolinesterasa cerebral resultó ser de gran utilidad, debido a la incapacidad de contar con un grupo de garzas control ya que el único sitio de anidación detectado, así como los dos sitios de agregación encontrados, estuvieron ubicados en sitios con campos agrícolas adyacentes; el reactivo 2-PAM permitió usar cada muestra como su propio control al incubarla simultáneamente con y sin el reactivo bajo las mismas condiciones.

9. RECOMENDACIONES

Es posible que otras aves residentes o migratorias presenten un riesgo de exposición similar al encontrado para la garza ganadera, por lo que en un futuro, serán necesarios otros estudios que incluyan a un mayor número de especies y determinar cual de ellas son más sensitivas a los tipos de plaguicidas empleados en el Delta del Río Colorado.

Los resultados de inhibición y actividad fueron georeferenciados a un sistema de información geográfica del Delta del Río Colorado, en estudios futuros es recomendable ampliar el área de estudio para poder diferenciar posibles variaciones espaciales.

Mayores estudios son necesarios para determinar el patrón de uso de plaguicidas en el resto de cultivos de importancia (forrajeo de aves) como son algodón, alfalfa y hortalizas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez-Borrego, S., Nishikawa-Kinomura, K.A. y Flores_Muñoz, G. 1973. Reporte preliminar a la Dirección de Acuacultura de la Secretaría de Recursos Hidráulicos, de la segunda etapa del estudio químico sobre la contaminación por insecticidas en la desembocadura del Río Colorado. Unidad de Ciencias Marinas-Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California. p-22-23.

Baron, R. L. 1991. Handbook of Pesticide Toxicology. "Carbamate insecticides", Editado por Wayland J. Hayes Jr y Edward R. Laws Jr. Academic Press Inc., Vol.3, cap. 17, p- 1125-1189.

Blakley, B.R. y Yole, M.J. 2002. Species differences in normal brain cholinesterase activities of animals and birds. Veterinary and Human Toxicology, 44:129-132.

Burgess, N.M., Hunt, K.A., Bishop, K., y Weseloh (Chip), D.V. 1999. Cholinesterase inhibition in tree swallows (*Tachycineta bicolor*) eastern bluebirds (*Sialia sialis*) exposed to organophosphorus insecticides in apple orchards in Ontario, Canada. Environmental Toxicology and Chemistry, 18:708-716.

CICOPLAFEST. 1998. Catalogo Oficial de Plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST) Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y pesca; Secretaria de Comercio y Fomento Industrial; Secretaría de

Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural; Secretaría de Salud. México, D.F.

Comisión Nacional del Agua. 2004. Superficie física, expedida y regada (has.) año agrícola 2003-2004, Jefatura de Operación del Distrito de Riego 014, Río Colorado. Avance al 23 de abril de 2004.

Corson, M.S., Mora, M.A., Grant, W.E. 1998. Simulating cholinesterase inhibition in birds caused by dietary insecticide exposure. Ecological Modeling. 105, 299-323.Corson et al., 1996

DeSante, D.F., Burton, K.M., Velez, P., y Froehlich D. 2003. Instructions for the establishment and operation of constant-effort bird-banding stations as part of the Monitoring Avian Productivity and Survivorship (MAPS) Program of The Institute for Bird Populations. p-41-43.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology. 7, 88-95

Fairbrother, A., Marden, B.T., Bennett, J.K., y Hooper, M.J. 1991. Chemicals in agriculture, Vol. 2: Cholinesterase inhibiting pesticides: Their impact on wildlife and the environment. Editado por Pierre Mineau., ELSEVIER. Cap. 3: "Methods used in determination cholinesterase activity"., p-37-73.

Fossi, M.C., Lari, L., y Casini, S. 1996. Interspecies variation of "B" esterases in birds: The influence of size and feeding habits. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 31:525-532.

Gallo, M.A. y Lawryk, N.J. Baron, R. L. 1991. Handbook of pesticide toxicology. "Organic phosphorus pesticide", Editado por Wayland J. Hayes Jr y Edward R. Laws Jr. Academic Press Inc., Vol.3, cap. 16, p-917-1124.

Garcia-Hernández, J., King, K.A., Velasco, A.L., Shumilin, E., Mora, M.A. y Glenn, E.P. 2001. Selenium, selected inorganic elements, and organochlorine pesticides in bottom material and biota from the Colorado River Delta. Journal of arid Environments, 49:65-89.

García-Sacristán, A., Castejón-Montijano, F., De la Cruz-Palomino, L.F., González-gallego, J., Murillo-López de Silanes, M.D. Salido-Ruiz, G.1995. Fisiología Veterinaria. "Transmisión Sináptica, Unión neuromuscular"; Cap. 5, p-66-78.

Grue, C.E., Hart, A.D.M., y Mineau, P. 1991. Biological consequences of depressed brain cholinesterase activity in wildlife. En Mineau, P. ed. Cholinesterase inhibiting pesticides: Their impact on wildlife and the environment. Chemicals in agriculture-Vol. 2. Elsevier, Amsterdan, p-128-151.

Hinojosa-Huerta, O., DeStefano, S. y Shaw, W.W. 2001. Distribution and abundance of the Yuma Clapper Rail (*Rallus longirostris yumanensis*) in the Colorado River Delta, México.

Hooper, M.J. 2000. SOP BC-2-04-01: Ellman cholinesterase activity determination. The Institute of environmental and human health (TIEHH), Texas Tech University Health Sciences Center. p-1-9.

Hooper, M.J. 2000. SOP BC-2-06-01: 2-PAM reactivation of organophosphate-inhibited cholinesterase in a tissue sample. The Institute of environmental and human health (TIEHH), Texas Tech University Health Sciences Center, p-1-4.

Hooper, M.J. 2003. Biomarker Analysis. Presentación durante el curso: "Plaguicidas y Vida silvestre". IRET/Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Hunt, K.A. y Hooper, M.J. 1993. Development and optimization of reactivation techniques for carbamate-inhibited brain and plasma cholinesterase in birds and mammals. Analytical Biochemistry, 212:335-343.

Kennedy, S.W. 1991. The mechanism of organophosphate inhibition of cholinesterase proposal for a new approach to measuring inhibition. En Mineau P. ed. Cholinesterase inhibiting pesticides: Their impact on wildlife and the environment. Chemicals in agriculture-Vol. 2. Elsevier, Amsterdan, pp-36-73.

Martin, A., Norman, G., Stanley, P.I., y Westlake, G.E. 1981. Use of reactivation techniques for the differential diagnosis of organophosphorus and carbamate pesticide poisoning in birds. Bulletin of Environmental Contaminants and Toxicology. 26:775-780.

McInnes, P. F., Andersen, D.E., Hoff, D.J., Hooper, M.J., y Kinkel, L.L. 1996. Monitoring exposure of nestlings songbirds to agricultural application of an organophosphorus insecticide using cholinesterase activity. Environmental Toxicology and Chemistry, 15:554-552.

Mineau, P. 2002. Estimating of probability of bird mortality form pesticides sprays on the field study record. Environmental Toxicology and Chemistry, 21:1497–1506.

Mineau, P. y Tucker, K.R. 2002. Improving detection of pesticide poisoning in birds. Journal of Wildlife Rehabilitation. 25:4-13.

Mineau, P., Baril. A., Collins, B.T., Duffe, J., Joerman, G., y Luttik, R. 2001. Pesticide acute toxicity reference values for birds. Reviews of Environmental Contaminants Toxicology, 170:13-14.

Mora, M.A. (1991) Organochlorines and breeding success in cattle egrets from the Mexicali Valley, Baja California, México. Colonial Waterbirds, 14:127-132.

Mora, M.A. y Anderson, D.W. (1995). Selenium, borom, and heavy metals in birds from Mexicali Valley, Baja California, Mexico. Bulletin of Environmental Contaminants Toxicology, 54:198-206.

Mora, M.A. y Anderson, D.W. 1991. Seasonal and geographical variation of organochlorines residues in birds from Northwest Mexico. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 21:541-548.

Mora, M.A.1997. Feeding flights of cattle egrets nesting in an agricultural ecosystem. The Southwestern Naturalist, 42:52-58.

Moreno M., J.A. 2001. Desarrollo agrícola y uso de agroquimicos n el Valle de Mexicali. Simposio México-estados Unidos sobre el Delta del Río Colorado.

Parsons, K.C., Matz, A.C., Hooper, M.J., y Pokras, M.A. 2000. Monitoring wading bird exposure to agricultural chemical using serum cholinesterase activity. Environmental toxicology and Chemistry, 5:1317-1323.

Proctor, N.S. y Lynch, P.J. 1993. Manual of Ornithology: avian structure & function. "Measuring and weighing birds", Cap.10, p-294-295.

Rojas-Reynosa, V.M. 1987. Tesis: Metales traza en peces *Tilapia mossambica* y *Cyprinus carpio* del Valle de Mexicali, B.C. Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C., México.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2004. Serie histórica (1993-2003) de algodonero y trigo (1993-2003), Distrito de Desarrollo Rural 002, Río Colorado.

Soler-Rodriguez, F., Miguez-Santiyan, M.P. y Reja-Sanchez, A. 1998. Recovery of brain acetylcholinesterase and plasma cholinesterase activities in quail (*Coturnix coturnix*) after chlorpyrifos administration and effect of pralidoxime treatment. Environmental Toxicology and Chemistry. 17:1835-1839.

Stansley, W. 1993. Field results using cholinesterase reactivation techniques to diagnose acute anticholinesterase poisoning in birds and fish. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 25:315-321.

Telfair II, R.C. 1983. Studies in natural resources: The cattle egret: a Texas focus and world view. "Distinguishing characteristics, food habits and reproduction", Cap. 1-6, p-9-49.

Thompson, H.M. 1993. Avian serum esterases: species and temporal variations and their possible consequences. Chemical-Biological Interactions, 87:329-38.

Thompson, H.M. 1999. Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. Ecotoxicology, 8:369-384.

Uhart, M. y Zaccagnini, M.E. 1999. Procedimiento operativo estandarizado No. 10: Técnicas de extracción y conservación de sangre. Manual de Procedimientos Operativos estandarizados de campo para documentar incidentes de mortandad de fauna silvestre en agroecosistemas. p.87-91

Walker, C.H. y Thompson, H.M. 1991. Phylogenetic distribution of cholinesterase and related esterases. En Mineau, P. ed. Cholinesterase inhibiting pesticides: Their impact on wildlife and the environment. Chemicals in agriculture-Vol. 2. Elsevier, Amsterdan, p-3-19.

Wolfe, M.F. y Kendall, R.J. 1998. Age-dependent toxicity of diazinon and terbufos in European starlings (*Sturnus vulgaris*) and red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). Environmental Toxicology and Chemistry, 17:1300-1312.

ANEXOS

ANEXO 1. Resultados generales de actividad e inhibición de AChE, descripción, localización y medidas morfométricas de garza ganadera muestreada de enero a abril de 2004 en el Delta del Río Colorado, México.

Fecha muestreo	No. Muestra	Sitio de muestreo	Cultivo	Hora	N	W	S	P (g)	LT (cm)	LA (cm)	LTA (cm)	G	PC (g)	AChE U/g	INH %
20-Jan-04	200104-1	Sur	trigo	12:51	32.2985	115.159	1	200	47	25	7	2	1.97	2.34	7.78
22-Jan-04	220104-1	Centro	trigo	14:30	32.312	115.032	2	300	47.5	25	8	3	1.86	2.53	18.69
22-Jan-04	220104-2	Centro	trigo	16:00	32.312	115.032	1	266	46	23.5	7.5	2	2.19	2.82	
13-Feb-04	130204-1	Centro	trigo	11:20	32.3167	115.044	1	250	47	24	7.31	1	2.22	2.55	13.96
13-Feb-04	130204-2	Centro	trigo	14:00	32.3167	115.044	2	279	43	23.2	6.8	1	1.90	2.62	
13-Feb-04	130204-3	Centro	trigo	16:20	32.3167	115.044	1	347	43	23.2	6.8	3	2.18	3.24	
13-Feb-04	130204-4	Centro	trigo	17:30	32.3167	115.044	2	308	45	25.4	6.3	2	2.43	3.77	8.05
13-Feb-04	130204-5	Centro	trigo	18:00	32.3121	115.04	2	309	41	23.4	7.1	3	1.95	3.45	
14-Feb-04	140204-6	Centro	trigo	13:03	32.3126	115.059	1	241	48	24.5	7.5	2	2.17	3.58	10.36
16-Feb-04	160204-7	Centro	trigo	11:50	32.3124	115.05	2	303	46	24.5	7.5	2	1.99	3.77	
16-Feb-04	160204-8	Centro	trigo	13:23	32.3124	115.05	NM	304	48	24.1	6.6	2	2.25	4.59	22.83
18-Feb-04	180204-1	Sur	trigo	10:16	32.2769	115.169	1	310	47	24.75	6.35	3	2.46	4.93	
18-Feb-04	180204-2	Sur	trigo	11:50	32.2913	115.207	1	364	44	25.8	6.6	3	2.29	4.57	
18-Feb-04	180204-3	Sur	trigo	12:35	32.2882	115.2	1	365	47	25.25	6.8	3	2.12	8.30	
18-Feb-04	180204-4	Sur	trigo	15:35	32.2882	115.161	1	305	46	24.1	6.5	3	2.22	4.53	
18-Feb-04	180204-m	Sur	trigo	9:51	32.2795	115.205	NM	NM	NM	NM	NM	NM	2.34	7.55	
20-Feb-04	200204-1	Norte	trigo	14:47	32.3902	114.939	1	335	49	23.9	6.9	3	2.04	2.86	
20-Feb-04	200204-2	Norte	trigo	16:42	32.3688	114.947	1	309	48	23.85	7.5	3	2.16	3.37	
23-Feb-04	230204-1	Norte	trigo	13:03	32.3804	114.896	1	290	46	24	6.3	3	2.11	4.13	
23-Feb-04	230204-2	Norte	trigo	13:05	32.3804	114.896	1	275	49	24.5	7	1	2.20	3.45	
23-Feb-04	230204-3	Norte	trigo	13:45	32.4236	114.907	2	261	44	23.6	6.6	1	2.12	3.47	
26-Feb-04	260204-1	Sur	trigo	11:52	32.2692	115.193	2	299	41	22.4	6.4	2	2.01	5.78	

ANEXO 1 (Continuación). Resultados generales de actividad e inhibición de AChE, descripción, localización y medidas morfométricas de garza ganadera muestreada de enero a abril de 2004 en el Delta del Río Colorado, México.

Fecha muestreo	No. Muestra	Sitio de muestreo	Cultivo	Hora	N	W	S	P (g)	LT (cm)	LA (cm)	LTA (cm)	G	PC (g)	AChE U/g	INH %
27-Feb-04	270204-1	Sur	trigo	13:29	32.2692	115.193	2	325	47	26	8.5	1	2.30	3.50	11.41
27-Feb-04	270204-2	Sur	trigo	13:52	32.2692	115.193	1	356	48.5	26.5	8.5	2	2.24	3.52	
27-Feb-04	270204-3	Sur	trigo	14:21	32.2692	115.193	2	303	47	25.5	7.5	1	2.43	4.63	
27-Feb-04	270204-4	Sur	trigo	14:58	32.2692	115.193	1	359	49.5	27	8.5	1	2.28	4.48	15.59
17-Mar-04	170304-1	Norte	alfalfa	12:57	32.3598	114.952	1	408	50	26	8.5	3	2.29	3.55	10.96
17-Mar-04	170304-2	Norte	alfalfa	18:00	32.3598	114.952	2	346	47	25	7.5	3	2.02	3.31	
19-Mar-04	190304-1	Norte	alfalfa	12:27	32.3783	114.974	2	368	48	24.5	8	3	2.14	3.11	45.91
20-Mar-04	200304-1	Norte	alfalfa	12:41	32.4455	114.894	NM	298	44.6	25.3	7.4	2	2.08	3.57	
20-Mar-04	200304-2	Norte	alfalfa	14:23	32.436	114.88	1	442	42	25.2	8.5	3	2.33	6.02	
2-Apr-04	020404-1	Sur	alfalfa	11:48	32.2693	115.169	2	380	42.5	25	9	1	2.21	2.06	
2-Apr-04	020404-2	Sur	alfalfa	14:50	332.249	115.167	2	389	45.4	25.9	8	3	2.38	2.40	
2-Apr-04	020404-3	Sur	alfalfa	16:20	32.2949	115.244	2	351	43.8	24.3	7.8	2	2.40	3.92	
3-Apr-04	030404-1	Centro	alfalfa	9:45	32.3202	115.077	2	310	44.5	24.7	8	2	1.97	1.88	
4-Apr-04	040404-1	Norte	Garcerio	15:00	32.4062	114.882	1	335	51	26.9	7.4	3	1.94	1.94	
4-Apr-04	040404-2	Sur	Garcerio	18:30	32.275	115.172	1	401	44.3	27	8	3	1.84	1.73	
5-Apr-04	050404-1	Sur	Garcerio	7:15	32.2932	115.158	1	313	49.5	25.4	7.6	1	2.29	3.37	
5-Apr-04	050404-2	Sur	Garcerio	7:25	32.2932	115.158	1	352	52.5	26	8.4	2	1.80	2.80	12.81
5-Apr-04	050404-3	Sur	Garcerio	7:40	32.2932	115.158	1	334	40.5	26	8	NM	2.20	3.06	
5-Apr-04	050404-4	Sur	Garcerio	7:40	32.2932	115.158	1	374	50.5	26	8	3	2.07	2.29	
5-Apr-04	050404-5	Sur	Garcerio	7:40	32.2932	115.158	1	342	47	26	8	NM	2.02	3.33	
5-Apr-04	050404-6	Centro	alfalfa	8:57	32.4304	115	1	411	47	25.5	8	3	2.27	1.56	15.02
5-Apr-04	050404-7	Centro	alfalfa	9:20	32.4211	114.996	2	322	48	25.5	8	2	2.14	3.81	

ANEXO 1 (Continuación). Resultados generales de actividad e inhibición de AChE, descripción, localización y medidas morfométricas de garza ganadera muestreada de enero a abril de 2004 en el Delta del Río Colorado, México.

Fecha muestreo	No. Muestra	Sitio de muestreo	Cultivo	Hora	N	W	S	P (g)	LT (cm)	LA (cm)	LTA (cm)	G	PC (g)	AChE U/g	INH %
5-Apr-04	050404-8	Centro	alfalfa	9:32	32.4211	114.996	2	359	48	25	7.8	3	2.39	2.62	
5-Apr-04	050404-9	Centro	alfalfa	9:53	32.4243	115.003	1	331	48	25.3	8	2	2.20	3.51	
5-Apr-04	050404-10	Centro	alfalfa	9:53	32.4243	115.003	2	388	49	25	8	2	2.14	3.15	
6-Apr-04	060404-1	Centro	alfalfa	7:20	32.3598	114.952	2	342	47	24.1	7.4	2	2.23	2.67	
6-Apr-04	060404-2	Centro	alfalfa	7:40	32.3598	114.952	1	409	47	24.1	7.4	1	2.40	2.60	
6-Apr-04	060404-3	Centro	alfalfa	8:24	32.3598	114.952	2	326	49	24.5	7.5	2	2.31	2.40	
6-Apr-04	060404-4	Centro	alfalfa	8:07	32.3598	114.952	1	348	49.5	26	7.8	1	2.27	2.45	
6-Apr-04	060404-5	Centro	alfalfa	8:07	32.3925	114.914	1	389	42.5	26	7.9	1	2.33	3.23	6.91
7-Apr-04	070404-1	Norte	Garcerio	5:30	32.4063	114.882	1	343	50	24.9	8.5	1	2.23	2.47	
7-Apr-04	070404-2	Norte	Garcerio	5:30	32.4063	114.882	2	379	49	26	8.4	2	2.14	2.05	
7-Apr-04	070404-3	Norte	Garcerio	5:30	32.4063	114.882	1	393	53	26	8.5	NM	2.40	1.81	
7-Apr-04	070404-4	Norte	Garcerio	5:30	32.4063	114.882	2	302	49	24.5	7.4	1	2.02	2.38	

N y W = Coordenadas geográficas; S = Sexo; G = Grasa; P = Peso; LT = Longitud total; LA = Longitud ala; LTA = Longitud tarzo; PC = Peso cerebro; AChE = Actividad acetilcolinesterasa (U/g)
INH = % inhibición AChE; NM = No medido

ANEXO 2. Coordenadas en UTM para georenferenciación de actividad e inhibición de AChE

No. Muestra	UTM-X	UTM-Y	AChE U/g	Inhibición %
200104-1	673332.90	3575008.95	2.34	7.78
220104-1	685252.76	3576722.47	2.53	18.69
220104-2	685252.76	3576722.47	2.82	
130204-1	684170.80	3577222.84	2.55	13.96
130204-2	684170.80	3577222.84	2.62	
130204-3	684170.80	3577222.84	3.24	
130204-4	684170.80	3577222.84	3.77	8.05
130204-5	684516.30	3576716.74	3.45	
140204-6	682760.28	3576735.79	3.58	10.36
160204-7	683589.22	3576730.88	3.77	
160204-8	683589.22	3576730.88	4.59	22.83
180204-1	672443.43	3572597.07	4.93	
180204-2	668803.47	3574139.23	4.57	
180204-3	669503.39	3573802.72	8.30	
180204-4	673131.14	3573866.49	4.53	
180204-man	669064.58	3572834.95	7.55	
200204-1	693861.49	3585554.91	2.86	
200204-2	693151.56	3583168.66	3.37	
230204-1	697896.33	3584545.34	4.13	
230204-2	697896.33	3584545.34	3.45	
230204-3	696936.27	3580308.98	3.47	
260204-1	670216.11	3571703.12	5.78	
270204-1	670216.11	3571703.12	3.50	11.41
270204-2	670216.11	3571703.12	3.52	
270204-3	670216.11	3571703.12	4.63	
270204-4	670216.11	3571703.12	4.48	15.59
170304-1	692690.70	3582163.77	3.55	10.96
170304-2	692690.70	3582163.77	3.31	
190304-1	690559.90	3577516.95	3.11	45.91
200304-1	697937.62	3591764.03	3.57	
200304-2	699282.18	3590746.82	6.02	
020404-1	672474.71	3571758.06	2.06	
020404-2	672712.68	3569466.41	2.40	
020404-3	665303.15	3574473.89	3.92	
030404-1	681038.95	3577552.11	1.88	
040404-1	699183.16	3587438.15	1.94	
040404-2	672175.66	3572387.33	1.73	
050404-1	673417.28	3574429.25	3.37	

ANEXO 2. Coordenadas en UTM para georenferenciación de actividad e inhibición de AChE

No. Muestra	UTM-X	UTM-Y	AChE U/g	Inhibición %
050404-2	673417.28	3574429.25	2.80	12.81
050404-3	673417.28	3574429.25	3.06	
050404-4	673417.28	3574429.25	2.29	
050404-5	673417.28	3574429.25	3.33	
050404-6	688047.80	3589900.07	1.56	15.02
050404-7	688408.41	3588879.73	3.81	
050404-8	688408.41	3588879.73	2.62	
050404-9	687816.87	3589220.26	3.51	
050404-10	687816.87	3589220.26	3.15	
060404-1	692690.70	3582163.77	2.67	
060404-2	692690.70	3582163.77	2.60	
060404-3	692690.70	3582163.77	2.40	
060404-4	692690.70	3582163.77	2.45	
060404-5	696231.02	3585859.32	3.23	6.91
070404-1	699183.12	3587440.37	2.47	
070404-2	699183.12	3587440.37	2.05	
070404-3	699183.12	3587440.37	1.81	
070404-4	699183.12	3587440.37	2.38	

UTM = Sistema de coordenadas "Universal Transversa Mercator"

Anexo 3. Formato de entrevista para recabar información sobre uso de plaguicidas

CENTRO DE INVESTIGACION EN ALIMENTACION Y DESARROLLO
CIAD-MANEJO AMBIENTAL

Entrevista dirigida a Empresas Fumigadoras del Delta del Río Colorado:

Nombre de la empresa:_____

_____

Número de entrevista: _____

1. ¿Qué insecticidas aplicó esta temporada para el trigo?	**2. ¿Dosis/ha? Primera aplicación = A Segunda aplicación = B (L o Kg. de IA./HA)**		**3. ¿superficie en ha (o aprox.) fumigadas con cada producto)**
Nombre del producto	**A**	**B**	**HA.**
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7			
8			
9			
10			

4. ¿Qué método de aplicación empleó? Si utilizó varios ¿Porcentaje?
   AEREO_____%
   TERRESTRE_____%
   OTRO_____%

5. ¿Fechas aproximadas o exactas de la primera y última Fumigación?
   PRIMERA_____
   ULTIMA_____

¡¡GRACIAS POR SU COLABORACIÓN!!.

LA INFORMACION PROPORCIONADA SOLO SERÁ EMPLEADA PARA FINES DE ESTE PROYECTO Y TENDRÁ CARÁCTER CONFIDENCIAL.

ANEXO 4. Preparación de materiales, reactivos y equipo

A) Reactivos

1. Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, preparada a partir de una solución de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 0.1 M (6.8045 g de KH_2PO_4 en 500 mL de agua bidestilada) y una solución de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) 0.1M (8.72 g de K_2HPO_4 en 500 mL de agua bidestilada). La solución de K_2HPO_4 se adiciona a la de KH_2PO_4 hasta alcanzar el pH de 7.4.
2. Solución 5.1 x 10^{-3} M de 2-PAM (piridina-2-aldoxima metacloruro). 0.044g de 2-PAM se disuelven en 50 mL de agua bidestilada, mantener entre 0-5°C. Preparar justo antes del análisis.
3. Solución amortiguadora pH 8.0. Preparada como en el punto 1, la solución de K_2HPO_4 se adiciona a la de KH_2PO_4 hasta alcanzar el pH de 8.0.
4. Solución 4.04 x 10^{-3} de DTNB (ácido 5,5-ditio, bis-2-nitrobenzoico). 0.040 g de DTNB se disuelven en 25 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4.
5. Solución 8.33 x 10^{-3} de ioduro de acetiltiocolina (ATCh). 0.06025 g de ATCh se disuelven en 25 mL de agua bidestilada.
6. Agua bidestilada

B) Materiales y Equipos

1. Homogenizador Ultra-turrex T-25
2. Micropipeta Pipet-lite R-CMB 2000 mL
3. Vasos de precipitado 300 mL marca PYREX

4. Tubos de ensayo de polipropileno 7 y 15 mL.
5. Espectrofotómetro La Motte NX2950
6. Celdas rectangulares de 2 mL y 1 cm de espesor
7. Micropípetas Pipet-lite R-CMB 20, 200 y 2000 mL
8. Centrífuga de campo.