

Efectos de la exposición combinada de microplásticos y malatión en la mortalidad, bioacumulación y la histología branquial de la especie *Macrobrachium brasiliense*

9-5-2023

Seminario de Titulación III

Luis Efrén Armijos Sánchez

Contenido

1. Antecedentes	2
2. Planteamiento del problema a investigar:.....	3
3. Justificación de la investigación	3
4. Preguntas de investigación	4
5. Hipótesis.....	4
6. Objetivos de la investigación:	5
6.1 General.....	5
6.2. Específicos	5
7. Métodos.....	5
8. Cronograma de actividades (basado en el marco lógico)	7
9. Presupuesto	8
10. Referencias (Formato PLOS One).....	9

1. Antecedentes

La especie *Macrobrachium brasiliense* o también llamados camarones de río de la Amazonía, es una especie de amplia distribución geográfica, pudiendo encontrarse en gran parte de la amazonia en países como (Venezuela, Colombia, Guyana, Surinam, Guayana Francesa, Ecuador, Perú, Brasil) [1]. Su principal función es el transporte de energía y biomasa a través de la cadena alimenticia, además gracias a su dieta se le atribuye la limpieza de ríos, por lo tanto su presencia es un indicador de una buena calidad de agua[2]. Los hábitos alimenticios de esta especie son muy variados y depende tanto de la estación como de su estado en su ciclo de vida, por ello tienen una dieta omnívora que se basa principalmente en el consumo de insectos, materia orgánica, algas y arena[3].

Los estudios sobre la presencia de microplástico van ganando importancia global, esto se debe a que el consumo mundial de plástico está en constante incremento[4]. El microplástico suele definirse comúnmente como las partículas de plástico con un tamaño menor a los 5mm [5]. El microplástico o MP es producto de la degradación física y fotoquímica del plástico, por su abundancia este contaminante emergente ha penetrado en la mayor parte de los ecosistemas de todo el mundo[6]. Este contaminante está afectando de mayor manera los ecosistemas acuáticos, donde los macroinvertebrados y otras especies tienen una mayor vulnerabilidad, debido a la disponibilidad de este contaminante y a que puede estar asociado a sus modalidades de alimentación y su hábitat [7]. En la amazonia ecuatoriana se han realizado estudios sobre la presencia de MP en varios ríos, uno de estos es el río Tena, donde se ha logrado encontrar partículas de microplástico en los sedimentos y en muestras de agua del río, estos estudios también pudieron demostrar que una mayor concentración de microplástico estaba relacionada a los transectos del río que tenían un menor caudal y una menor velocidad del caudal [8].

El malatión o MAL, es uno de los plaguicidas más usados en todo el mundo, y tanto su uso como aplicación suelen carecer de supervisión técnica, por lo que este suele usarse más de lo que se recomienda, además por efectos de escorrentía este puede llegar a ríos lagunas y riachuelos afectando a especies no objetivo, por lo que las poblaciones de especies aledañas a cultivos con un amplio consumo de agroquímicos tienden a desaparecer. El malatión tiene un mecanismo de acción que consiste en la fosforilación de una enzima responsable de inhibir la acetilcolina el cual es un neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático, por ello los organismos afectados quedan paralizados, caen al suelo y mueren por inanición [9]. En altas dosis este contaminante puede resultar letal incluso para los humanos, sin embargo, a pesar de los efectos que causa se lo considera un contaminante moderadamente peligroso por la regulación ecuatoriana[10]

Existen otros estudios en los que se evalúa la supervivencia a la exposición combinada del microplástico y malatión, donde se encontró que en la especie *Minuca ecuadoriensis*, la cual al ser sometida a la exposición del tratamiento combinado tuvo una menor tasa de supervivencia[11]. Con el fin de identificar los daños en especies de agua

dulce que podría causar esta sinergia de contaminantes es necesario realizar más investigaciones.

2. Planteamiento del problema a investigar

El incremento consumo del plástico en los últimos años ha aumentado de manera exponencial, dado su déficit de reciclaje y su degradación, ha producido una acumulación de este en el ambiente[12]. El microplástico suele acumularse principalmente en las playas y en las orillas de los ríos; por su tamaño este se ha vuelto un gran problema a nivel de ecosistemas, debido a su fácil ingreso a la cadena trófica y su paso a través de ella[13] Los microplásticos podrían absorber contaminantes químicos, enriqueciéndolos en su superficie y por lo tanto acumulándolos en el ambiente [5]. En la amazonia la frontera agrícola está en constante expansión, el avance de los monocultivos esta afectando directamente los ecosistemas terrestres y de forma indirecta a los ecosistemas acuáticos[14]. La introducción de nuevas especies para el monocultivo ha provocado una mayor susceptibilidad en la producción agrícola de la amazonia, por ello los granjeros amazónicos se ven en la necesidad de promover el uso de los pesticidas [15]. El género *Macrobrachium* es de suma importancia por su amplia distribución en los ríos amazónicos, este cumple con un roll de principal importancia ocupando un lugar intermedio en la cadena trófica.

3. Justificación de la investigación

El MP se ha vuelto un contaminante de importancia mundial. En la amazonia este puede encontrarse en varios afluentes del rio Amazonas[16]. Una vez el MP está dentro de los organismos acuáticos, reduce la capacidad de alimentarse, la habilidad reproductiva y eventualmente inhibe el crecimiento, por ello se lo considera una amenaza, la cual puede afectar varios servicios ecosistémicos proporcionados por la fauna acuática, además el microplástico puede biomagnificarse, por lo que en el tiempo podría llegar a afectar a los seres humanos causando daños aún desconocidos [17]. Por otro lado, los pesticidas organofosforados son ampliamente usados tanto para fines agronómicos y no agronómicos por ello su liberación al ambiente es continua y perjudicial. Actualmente aún se investiga los efectos del malatión en lo que se los vincula con la aparición de tumores cancerígenos. *Macrobrachium brasiliense* es un macroinvertebrado amazónico de gran importancia y una amplia distribución a lo largo de los cuerpos de agua de la cuenca del rio amazonas, este suele vivir bajo la vegetación riverañña y bajo la materia orgánica [18]. Es necesario identificar la vulnerabilidad de las especies amazónicas ante distintos contaminantes, esto con el fin de tomar acciones en la regulación y uso de agroquímicos.

4. Preguntas de investigación

¿Cuáles son los efectos de la exposición combinada de microplásticos y malatión en la mortalidad de los camarones de agua dulce *Macrobrachium brasiliense*?

¿Cómo se ven afectadas las branquias de los camarones de agua dulce *Macrobrachium brasiliense* expuestos a microplásticos y malatión en combinación?

¿Cuánto microplástico se bioacumula en los distintos órganos de los camarones de agua dulce *Macrobrachium brasiliense*?

5. Hipótesis

H1a: La exposición combinada de microplásticos y malatión aumentará significativamente la mortalidad de los camarones de agua dulce *Macrobrachium brasiliense* en comparación con los grupos expuestos solo a uno de los contaminantes o al grupo de control.

H0a: La exposición combinada de microplásticos y malatión no tendrá un efecto significativo en la mortalidad de los camarones de agua dulce *Macrobrachium brasiliense* en comparación con los grupos expuestos solo a uno de los contaminantes o al grupo de control.

H1b: Los camarones de agua dulce *Macrobrachium brasiliense* expuestos a microplásticos y malatión en combinación tendrán una mayor cantidad de daños en las branquias en comparación con los grupos expuestos solo a uno de los contaminantes o al grupo de control.

H0b: Los camarones de agua dulce *Macrobrachium brasiliense* expuestos a microplásticos y malatión en combinación no tendrán una mayor cantidad de daños en las branquias en comparación con los grupos expuestos solo a uno de los contaminantes o al grupo de control.

H1c: La bioacumulación de microplásticos y malatión será significativamente mayor en los tejidos de los camarones de agua dulce *Macrobrachium brasiliense* expuestos a la combinación de contaminantes en comparación con los grupos expuestos solo a uno de los contaminantes o al grupo de control.

H0c: La bioacumulación de microplásticos y malatión no será significativamente mayor en los tejidos de los camarones de agua dulce *Macrobrachium brasiliense* expuestos a la combinación de contaminantes en comparación con los grupos expuestos solo a uno de los contaminantes o al grupo de control.

6. Objetivos de la investigación

6.1 General

Evaluar los efectos de la exposición combinada de microplásticos y malatión en la mortalidad, la bioacumulación y la histología branquial de *Macrobrachium brasiliense*.

6.2. Específicos

Determinar la mortalidad de los camarones de agua dulce *Macrobrachium brasiliense* expuestos a microplásticos y malatión en combinación y compararla con los grupos expuestos solo a uno de los contaminantes o al grupo de control.

Analizar los efectos de la exposición combinada de microplásticos y malatión en la histología branquial de *Macrobrachium brasiliense* y compararla con los grupos expuestos solo a uno de los contaminantes o al grupo de control.

Cuantificar la bioacumulación de microplásticos y malatión en los tejidos de los camarones de agua dulce *Macrobrachium brasiliense* expuestos a la combinación de contaminantes y compararla con los grupos expuestos solo a uno de los contaminantes o al grupo de control.

7. Métodos

Metodología para la recolección

Los individuos de la especie *Macrobrachium brasiliense* serán recolectados en riachuelos poco profundos con abundante materia vegetal y donde no haya actividad antrópica aguas arriba. La recolección se llevará a cabo mediante el uso de redes manuales, las cuales se pasarán cerca de la vegetación riverena sumergida en el riachuelo. Los camarones recolectados serán transportados en cajas plásticas que contendrán agua del río y vegetación del lugar. Una vez en el laboratorio, los camarones serán aclimatados durante 48 horas en peceras antes de ser medidos y separados según el tratamiento correspondiente.

Metodología experimental

Para este proyecto se plantea realizar 4 tratamientos: el de control (agua Milli-Q), malatión (agua Milli-Q y MAL 61 $\mu\text{g L}^{-1}$), MP (MP 25 mg L^{-1}) y finalmente MAL + MP (25 mg L^{-1}) las concentraciones de malatión usadas en este experimento son el lc_{50} obtenido por [19] en la especie *Macrobrachium nipponense* la cual es una especie de camarón de agua dulce. El tamaño de la muestra será de 80 individuos divididos en 16 unidades

experimentales, habrá 5 individuos por unidad experimental y tres réplicas por tratamiento. Las unidades experimentales son recipientes de vidrio los cuales tendrán unas dimensiones de 12.5 cm de altura y 7.32 cm de diámetro. Cada una de estas unidades estará conectada a motores de aire o aireadores que funcionarán durante todo el experimento. Los camarones estarán en una exposición aguda durante 96 horas, estos serán alimentados cada 48 horas y se les cambiara el agua cada 48 horas. Se utilizará los individuos adultos que tengan un tamaño superior a los 3 cm y finalmente se llevará un riguroso control en la temperatura, esto con el fin de mantener las condiciones lo más estandarizadas posible.

Metodología de cuantificación

En las 96 horas del experimento se realizará un monitoreo diario, con el fin de ver la cantidad de individuos vivos por cada tratamiento. Después del experimento se procederá a crio anestesiar en hielo picado a los camarones durante 10 minutos, para después diseccionar a los sujetos de prueba usando un kit de disección y un estereoscopio, con esto se pretende obtener los distintos órganos internos de los camarones, por ello se separarán tejidos musculares, hepatopáncreas, estomago, branquias y el tracto intestinal. Se procederá a colocar los distintos órganos en tubos de ensayo plásticos, etiquetados con la nomenclatura del órgano, el tratamiento y la réplica. La digestión química de los órganos extraídos se realizará siguiendo la metodología de [11] utilizando H₂O₂ (30%, 200 mL/5 g de tejido) en una incubadora de oscilación a 60 C a 100 rpm durante 48 h–72 h. A continuación, la solución se mantendrá a una temperatura ambiente (25°C) durante 48 h, después se realizará la filtración al vacío, en la que se pretende colocar los tejidos ya disueltos en filtros colocados en bombas de vacío. Los filtros se almacenarán en placas de Petri, que se etiquetaran de forma en la que sepamos de que órgano y de que tratamiento proviene. Se realizará un protocolo para evitar la contaminación cruzada de MP de fondo durante el tratamiento de la muestra y los pasos analíticos. Todos los materiales de laboratorio se enjuagarán primero con agua Milli-Q y luego con etanol antes de su uso. Los filtros se analizarán visualmente y el MP detectado será contabilizado. Los filtros se analizarán usando un estereomicroscopio Amscope con 40x de aumento. Una vez contabilizadas las partículas de microplástico bioacumulado en los órganos, se procederá a realizar una base de datos, en la que se contabilizara el número de partículas de microplástico que se encontró en cada órgano. En esta también base de datos también se, especificara el número de individuos supervivientes por cada tratamiento y día en el que se realizó el experimento. Para el análisis estadístico se utilizará el programa Rstudio con el fin de obtener curvas de bioacumulación de microplástico por cada órgano extraído y graficas de la probabilidad de supervivencia de la especie por cada tratamiento.

Metodología para el análisis histológico de las branquias

El procedimiento utilizado en este estudio para analizar los efectos del microplástico en las branquias de *Macrobrachium brasiliense* consistirá en los siguientes pasos tomados de la investigación de [20]. Primero, se sumergieran las branquias en una solución fijadora durante 36 horas para permitir la fijación de las estructuras celulares y prevenir la

degradación del tejido durante los pasos siguientes. Luego, se deshidratarán las branquias en una serie de soluciones deshidratantes de etanol en concentraciones crecientes (70%, 80%, 95% y 100%) durante 2 horas cada una. La deshidratación elimina el agua y prepara el tejido para su inclusión en parafina.

Después, se sumergieran las branquias en xileno durante al menos 2 horas para eliminar el etanol y preparar el tejido para la inclusión en parafina. A continuación, se colocarán las branquias en un molde para inclusión en parafina y se cubrieran con parafina fundida, que luego se dejara enfriar y solidificar. La inclusión en parafina permitirá la manipulación y corte del tejido en secciones finas para su análisis microscópico.

Las secciones de la muestra se cortarán con un microtomo de 5-7 μm de espesor y se colocarán en portaobjetos de vidrio. Luego, se colocarán los portaobjetos en xileno durante unos minutos para eliminar la parafina y permitir la exposición de las estructuras celulares y tisulares para su análisis microscópico. A continuación, se sumergieran los portaobjetos en una serie de soluciones de etanol en concentraciones decrecientes (100%, 95%, 80% y 70%) durante unos minutos cada una para restaurar el agua a los tejidos previamente deshidratados.

Finalmente, se realizará la tinción con Haematoxylin y Eosin para proporcionar contraste y mejorar la visibilidad de las estructuras celulares y tisulares. Después de la tinción, se montarán y se cubrirán con un cubreobjetos para proteger la muestra y permitir su visualización bajo el microscopio.

8. Cronograma de actividades

Cronograma de actividades	2022-2023						
Objetivos / Actividades	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun
Revisión bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x
Recolección de individuos			x				
Determinar en que magnitud se verá afectada la supervivencia de la especie <i>Macrobrachium brasiliense</i> , expuesta al tratamiento de MP y malatión							x
Experimentación			x				
Disección de muestras			x	x			
Comparar la supervivencia de los individuos expuestos a los tratamientos : (Malatión, Microplástico y Malatión + MP)							
Análisis estadístico de mortalidad					x	x	x
Cuantificar la cantidad de partículas de microplástico acumuladas en los distintos órganos de los individuos de <i>Macrobrachium brasiliense</i>							
Cuantificación de microplástico				x	x		

9. Presupuesto referencial

Presupuesto	Unidades	Costo	Subtotal
Redes	2	10	20
Cuaderno	1	2.5	2.5
Unidades experimentales	8	2.5	20
Aireadores	5	15	75
Comida para camarones	1	3	3
Alcohol 96%	1	10	10
Balanza analítica	1	200	200
Kit de diseccion	1	30	30
Estereo-microscopio	1	500	500
Bomba de vacio	1	250	250
Papeles filtro	80	6	480
Cajas petri	80	2	160
Tubos de polipropileno	80	1	80
Mandil	1	15	15
Guantes	10	1	10
Tanques de agua	3	15	45
TOTAL			1900.5

10. Referencias bibliográficas

1. Pimentel FR, Magalhães C. Palaemonidae, Euryrhynchidae, and Sergestidae (Crustacea: Decapoda): Records of native species from the states of Amapá and Pará, Brazil, with maps of geographic distribution. *Check List*. 2014;10: 1300–1315. doi:10.15560/10.6.1300
2. Garcia Guerrero MU, Becerril Morales F, Vega Villasante F, Espinosa Chuarand L. Los langostinos del genero *Macrobrachium* con importancia economica y pesquera en America Latina: conocimiento actual, rol ecologico y conservacion. *Lat Am J Aquat Res*. 2013;41: 651–675. doi:10.3856/vol41-issue4-fulltext-3
3. Melo MS de, Nakagaki JM. Evaluation of the feeding habits of *Macrobrachium brasiliense* (Heller, 1862) in the Curral de Arame stream (Dourados/Mato Grosso Do Sul, Brazil). *Nauplius*. 2013;21: 25–33. doi:10.1590/s0104-64972013000100004
4. Martius C. Density, humidity, and nitrogen content of dominant wood species of floodplain forests (vfirzea) in Amazonia. *Holz als Roh-und Werkst*. Springer-Verlag; 1992.
5. Chen H. Synergistic effects of Microplastic and Glyphosate on Soil Microbial Activities in Chinese Loess Soil. 2016.
6. Quirós-Rodríguez JA, Nisperuza-Pérez C, Yepes-Escobar J. Los microplásticos, una amenaza desconocida para los ecosistemas marinos de Colombia: perspectivas y desafíos a enfrentar. *Gestión y Ambient*. 2021;24: 91615. doi:10.15446/ga.v24n1.91615

7. Girardin B, Fiechter E. *Ética Del agua*. Ginebra: Globethics; 2021.
8. Lucas-Solis O, Moulatlet GM, Guamangallo J, Yacelga N, Villegas L, Galarza E, et al. Preliminary Assessment of Plastic Litter and Microplastic Contamination in Freshwater Depositional Areas: The Case Study of Puerto Misahualli, Ecuadorian Amazonia. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2021;107: 45–51. doi:10.1007/s00128-021-03138-2
9. Machado R. Severe damages caused by Malathion exposure in *Colossoma macropomum*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020;205. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111340
10. National A. Review of the Formaldehyde Assessment in the National Toxicology Program 12th Report on Carcinogens. 2014. doi:10.17226/18948
11. Villegas L, Cabrera M, Moulatlet GM, Capparelli M. The synergistic effect of microplastic and malathion exposure on fiddler crab *Minuca ecuadoriensis* microplastic bioaccumulation and survival. *Mar Pollut Bull*. 2022;175. doi:10.1016/j.marpolbul.2022.113336
12. Bollaín Pastor C, Vicente Agulló D. Presencia de Microplásticos en Aguas y su Potencial Impacto en la Salud Pública. *Rev Esp Salud Publica*. 2019;93: 1–10. Recuperado: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272019000100012
13. Andrady AL. Microplastics in the marine environment. *Mar Pollut Bull*. 2011;62: 1596–1605. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.05.030
14. Simon MF, Garagorry FL. The expansion of agriculture in the Brazilian Amazon. *Environ Conserv*. 2005;32: 203–212. doi:10.1017/S0376892905002201
15. Rico A, Waichman A V., Geber-Corrêa R, Van Den Brink PJ. Effects of malathion and carbendazim on Amazonian freshwater organisms: Comparison of tropical and temperate species sensitivity distributions. *Ecotoxicology*. 2011;20: 625–634. doi:10.1007/s10646-011-0601-9
16. Gerolin CR, Pupim FN, Sawakuchi AO, Grohmann CH, Labuto G, Semensatto D. Microplastics in sediments from Amazon rivers, Brazil. *Sci Total Environ*. 2020;749. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141604
17. Hartmann NB, Rist S, Bodin J, Jensen LHS, Schmidt SN, Mayer P, et al. Microplastics as vectors for environmental contaminants: Exploring sorption, desorption, and transfer to biota. *Integr Environ Assess Manag*. 2017;13: 488–493. doi:10.1002/ieam.1904
18. Vásquez E, Chujandama M, Davila C, Alcantara F. CARACTERIZACIÓN DEL HÁBITAT DEL CAMARÓN *Macrobrachium brasiliense* EN AMBIENTES ACUÁTICOS DE LA CARRETERA IQUITOS - NAUTA. *Folia Amaz*. 2006;10: 57. doi:10.24841/fa.v10i1-2.214
19. Gorni G. Acute toxicity of malathion to the freshwater prawn *Macrobrachium brasiliense*. *Ecotoxicol Environ Contam*. 2015;11.
20. Almeida DSM. Histopathological evaluation of two *Blennius* fishes exposed to microplastics via feeding. 2017; 46.

