



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Diferencias entre sexos en la mortalidad ocasionada por el insecticida Azadiractina sobre una especie zooplanctónica

Alumno: Noelia Medina Amezcua

Octubre, 2018



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Diferencias entre sexos
en la mortalidad
ocasionada por el
insecticida Azadiractina
sobre una especie
zooplanctónica**

Alumno: Noelia Medina Amezcua

Octubre, 2018

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. OBJETIVOS.....	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
4.1. Descripción de la especie objeto de estudio.....	6
4.2. Descripción del hábitat de origen y recolecta de muestras.....	7
4.3. Método de incubación.....	8
4.4. Análisis de datos.....	14
5. RESULTADOS.....	14
6. DISCUSIÓN.....	20
7. CONCLUSIONES.....	25
8. BIBLIOGRAFÍA.....	26

1. RESUMEN

La revolución agrícola y ganadera junto a las prácticas agrícolas han contribuido a la generación de diversos problemas ambientales, principalmente debido al uso de productos fitosanitarios para incrementar la producción. Todo esto lleva a la investigación de los posibles problemas que conllevan este tipo de práctica sobre las comunidades bióticas, concretamente sobre la fauna acuática.

De este modo, en este trabajo se pretende detectar posibles diferencias entre sexos en la mortalidad ocasionada por el insecticida Azadiractina sobre el copépodo *Arctodiaptomus salinus*. Para ello un total de 576 individuos con un ratio de sexos 1:1 y repartidos en 72 réplicas fueron expuestos a 5 concentraciones de dicho pesticida (0'025 mg/L, 0'04 mg/L, 0'05 mg/L, 0'07 mg/L y 0'1 mg/L) por debajo de la dosis letal para el 50% de la población (LC₅₀) durante 96 horas.

No ha habido diferencias significativas en la mortalidad entre machos y hembras en concentraciones inferiores a 0'1 mg/L.

Palabras clave: *Arctodiaptomus salinus*, fauna acuática, Azadiractina

ABSTRACT

The agricultural and livestock revolution and agricultural practice have contributed to the generation of environmental problems, mainly because of phytosanitary products to increase the production. All this leads to the investigation of several problems in the biotic communities, specifically the aquatic fauna.

This project intends to detect possible differences between sexes in the mortality caused by the insecticide Azadirachtin on the copepod *Arctodiaptomus salinus*. With a total of 576 individuals with a sex ratio of 1:1 and distributed in 72 replicates, they were exposed to 5 concentrations of this insecticide (0'025 mg/L, 0'04 mg/L, 0'05 mg/L, 0'07 mg/L and 0'1 mg/L) below the lethal dose for 50% of the population (LC₅₀) for 96 hours.

There have been no significant differences between males and females mortality at concentrations lower than 0'1 mg/L.

Keywords: *Arctodiaptomus salinus*, aquatic fauna, Azadirachtin

2. INTRODUCCIÓN

Ya por la década de los cincuenta surge el concepto de La Revolución Verde en Estados Unidos, cuando empezó a haber mayor rendimiento en la agricultura debido al uso de la tecnología e incremento de las extensiones del cultivo. Esta Revolución Verde se basaba en un uso excesivo de pesticidas y herbicidas, así como de distinta maquinaria. En los años noventa surgió otra Revolución Verde, la cual se basaba más en la ingeniería genética y la biotecnología, y comenzaron a producirse los organismos genéticamente modificados (OGM) por modificación del genoma.

La primera revolución verde tuvo un impacto en la agricultura por la puesta en práctica de nuevos métodos hasta entonces no utilizados, como los fertilizantes inorgánicos. Se empezó a producir más trigo y arroz, llegando así a extenderse por los distintos países estos métodos de cultivo. Pero no todo fueron resultados positivos, empezaron a surgir lo que serían los problemas de la actualidad. Hasta un 20% de los agrotóxicos utilizados se consumían en el Tercer Mundo, y las cantidades totales mundiales aumentaron. En Latinoamérica por ejemplo, los suelos empezaron a erosionarse y las plantas cada vez requerían más métodos artificiales. Se ha comprobado que el continuo uso de fertilizantes y agrotóxicos han ayudado a la erosión del suelo y esto conlleva una reducción de la actividad microbiana y de los organismos vivos, así como contaminación en lagos y ríos, y produciendo un crecimiento masivo de algas en zonas costeras.

Los insecticidas sintéticos acababan con las plagas que empezaron a surgir, pero algunas sufrieron mutaciones y causaron grandes daños en los cultivos, empezando a ser deficientes algunos agrotóxicos (Ceccon, 2008).

Durante años, los pesticidas han supuesto un avance en la agricultura, como protección y prevención en los cultivos frente a las plagas (Kumar *et al.*, 2012). Pero aparte de conllevar una contaminación en los suelos, el continuo uso de estos ha provocado una acumulación de residuos en los cultivos, llegando a ser perjudicial para la salud (Bag, 2000). Se han reportado casos de alrededor de 3 millones de personas afectadas y hasta 200,000 muertes cada año, así como en la década de los ochenta se reportaron 1 millón de intoxicaciones según informa el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los países con mayor exportación de plaguicidas son Estados Unidos, Japón

y Alemania entre otros, y alrededor del 30% de los plaguicidas no cumplen los requisitos mínimos de calidad al contener impurezas peligrosas para la salud humana y para el medio ambiente (Organización Mundial de la Salud, 1990).

El principal problema es su vida media larga, pudiendo persistir varios años en el suelo y el agua debido a que tan sólo el 10 por ciento llega a los organismos y el resto es depositado sobre estos medios (Ortiz-Hernández *et al.*, 2011). En los últimos años la demanda de agua ha sido mayor debido a la agricultura, y con ello se ha producido mayor contaminación por el uso continuo de pesticidas. Aunque es cierto que el uso de estos ha supuesto un incremento en la obtención de productos en los cultivos, hay que tener en cuenta sus efectos en animales y en el ser humano (Olea *et al.*, 1995). Se hace por tanto necesario ampliar nuestro conocimiento sobre qué contaminantes pueden afectar negativamente a los ecosistemas acuáticos. En este sentido, algunos autores han valorado aquellos contaminantes de los que se tienen suficientes datos para determinar el riesgo que tienen en el medio acuático (Martínez *et al.*, 2004).

Para poder hacer así estudios y valorar aquellos más perjudiciales, se han clasificado los pesticidas según las sustancias que contienen en fungicidas, insecticidas y biocidas (Gilden *et al.*, 2010). Encontramos también plaguicidas organoclorados, los cuales tienen efecto sobre el sistema hormonal, que tienen una duración de hasta 20 años en el suelo. Por sus graves efectos negativos sobre la salud, se ha dejado de usar en varios países (Martínez *et al.*, 2004).

La inhalación de pesticida o el contacto directo con éste en alimentos puede provocar el envenenamiento (Yadav *et al.*, 2015). Aunque los residuos se pueden eliminar por el cuerpo al metabolizarse, una acumulación de estos sí puede causar distintos efectos secundarios (Organización Mundial de la Salud, 1990). Esos efectos varían en función de la cantidad, eficacia, duración en el cuerpo...el metabolismo produce la solubilidad de estos en el agua, pero también puede producir más toxicidad en el cuerpo (como el carbosulfán), y también pueden no ser metabolizados y por lo tanto acumularse (Ntow *et al.*, 2008).

Alternativamente se empiezan a cambiar los pesticidas sintéticos por pesticidas botánicos, como los basados en aceites de plantas que siguen siendo muy eficientes contra las plagas de insectos (Chaudhary *et al.*, 2017). En plagas tanto agrícolas como forestales en la zona de Canadá empezaron a desarrollarse pesticidas a partir de plantas, como el utilizado en el presente trabajo, la Azadiractina que surge a raíz del árbol de Nim (Isman *et al.*, 1991; Helson *et al.*, 1999).

El árbol Nim (*Azadirachta indica*), perteneciente a la familia *Meliaceae*, se usa como biopesticida. Esta planta de forma general interfiere en la alimentación de los insectos, suprimiendo la sensación de alimentarse (Isman *et al.*, 1991). Con más de 200 variantes de aleloquímicos (Koul y Wahab, 2004), sus semillas contienen principalmente aceite de Nim con azadiractina (AZA), el cual le da esta capacidad insecticida al Nim (Isman *et al.*, 1991). En general las distintas partes de esta planta actúan como defensa frente a las plagas debido a todos sus componentes químicos, que purificados tienen una importancia terapéutica actuando como anticancerígenos (Paul *et al.*, 2011) y antimicrobianos (Raut *et al.*, 2014). Los insecticidas de Nim necesitan de una extracción e incremento de Azadiractina para su mayor efectividad. Para esta extracción se han usado métodos que emplean acetona, hexano y metanol (Koul y Wahab, 2004).

El aceite de Nim no es perjudicial para mamíferos o aves, y presenta actividad ovicida y larvicida, actuando contra mosquitos (Chaudhary *et al.* 2017). El problema surge con la aplicación del insecticida de Nim de forma aérea, afectando a las masas de agua de los alrededores y dañando a los seres vivos de estas. Así, diversos estudios de toxicidad han comprobado que en peces hay un mínimo riesgo (Zebitz, 1987; Wan *et al.*, 1996). Es por eso que en este experimento queremos comprobar esos posibles riesgos para nuestros organismos acuáticos de estudio.

El pesticida que surge así del árbol de Nim es la Azadiractina, un limonoide tetranortriterpeno que junto con otros triterpenoides de *A. indica*, como la salanina y nimbina, confieren la propiedad de bioinsecticida alterando el desarrollo y alimentación de los insectos (Chaudhary *et al.*, 2017). Se ha avanzado con estudios de campo con estas preparaciones comerciales de Nim, conociendo mejor la actividad sobre los organismos (Ley *et al.*, 1993). Este componente actúa también en el intestino de los insectos, provocando una disfunción en éste por la alteración de las hormonas y sistema fisiológico. Todos estos cambios son los que inhiben a las enzimas digestivas (Schmutterer, 1985). Es por ello, que el presente trabajo tiene como objetivo general profundizar en el conocimiento sobre los posibles efectos adversos de este compuesto sobre un crustáceo muy común en lagunas saladas de interior, el copépodo *Arctodiaptomus salinus*. Además, como objetivo específico se pretende detectar posibles diferencias entre sexos en su sensibilidad a este producto.

El estudio sobre los copépodos es interesante llevarlo a cabo ya que son de vital importancia en los ecosistemas acuáticos, ya que sus estadios larvarios y nauplius sirven como alimento para las larvas de los peces. De hecho, les garantiza que tengan un desarrollo y crecimiento óptimo, aparte de favorecer la prevención de diversas enfermedades y malformaciones. De hecho contienen un alto contenido en ácidos grasos y antioxidantes (Stottrup y Norsker, 1997; Payne y Rippingale, 2000). Sirven también como control de la malaria ya que se alimentan de las larvas de los mosquitos y también son consumidores de restos de petróleo en las “mareas negras” (Conover, 1971). Debido a todo esto, se ha fomentado la práctica de la larvicultura para la producción de especies de copépodos determinados como alimento para diversas especies de peces.

Por todo ello, es de vital importancia el cuidado de los ecosistemas acuáticos, siendo los humedales uno de los ecosistemas más amenazados. Su importancia como purificadores de agua y como controles de inundaciones los convierte en un ecosistema vital en el medio ambiente (Ramsar Convention Secretariat, 2010).

Como se ha comentado, las prácticas agrícolas con el uso de agroquímicos ha sido perjudicial para los cultivos, y la escorrentía ha jugado un papel negativo para los ecosistemas acuáticos debido al arrastre de esos contaminantes, provocando la degradación de los humedales. La continua contaminación debido al exceso de sedimentos y sustancias contaminantes provoca la desaparición de los humedales. Los estanques por ejemplo han sufrido una desaparición de más del 50% en países europeos. Esto supone un gran problema para la biodiversidad, ya que albergan gran variedad de especies que están en peligro de extinción, tanto anfibios como plantas, así como invertebrados (European Pond Conservation Network, 2008).

Actualmente se realizan diversos estudios en humedales y ríos de Jaén debido a que alberga hasta el 25% de los olivares en España, siendo la mayor productora de aceite de oliva del mundo. En un estudio analizaron los contaminantes en la cuenca del río Guadalquivir, ya que es una zona muy afectada por pesticidas para el control de plagas en los olivos. Se encontraron restos de distintos herbicidas, incluso de un organoclorado a pesar de que está prohibido su uso a nivel mundial, como ya se ha comentado anteriormente (Robles-Molina *et al.*, 2014). Esto podría ser una representación de cómo se encuentran los ecosistemas acuáticos en nuestra región.

Por ello son necesarios los estudios sobre los efectos de los pesticidas y los problemas que presentan respecto a la biodiversidad. En concreto, el estudio del zooplancton (principalmente braquiópodo y copépodo) es de vital interés para la conservación de los humedales, porque sirven como especies clave para valorar esos daños producidos por el hombre y cómo actuar en consecuencia para la conservación (Gilbert *et al.*, 2014).

3. OBJETIVOS

El objetivo que queremos llevar acabo es detectar posibles diferencias entre sexos respecto a la mortalidad de *Arctodiaptomus salinus* por el uso del pesticida Azadiractina.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Descripción de la especie

La especie de estudio es *Arctodiaptomus salinus* (clase Maxillopoda), un copépodo de aguas salinas que habita en las zonas de África, Europa y Asia, tanto en lagos endorreicos como humedales (Anufrieva y Shadrin, 2013; Comín *et al.*, 1983; Krupa *et al.*, 2008; Samraoui, 2002). Los lagos en los que se encuentran son de sulfato o con predominancia de iones parecidos al agua de mar en función de que sean lagos continentales o marinos, respectivamente (Shadrin y Anufrieva, 2013; Belmonte *et al.*, 2012, Senicheva *et al.*, 2008). Principalmente en los copépodos puede distinguirse su sexo debido a su tamaño (Bayly, 1978; Geddes y Cole, 1981; Shadrin y Solokhina, 1991), el cuál varía también en función del hábitat que habitan (Anufrieva y Shadrin, 2013; Rokneddine, 2004) así como de los efectos ambientales (Anufrieva y Shadrin, 2015; Deevey, 1948).

Mayormente son herbívoros, desplazándose con sus patas torácicas y ayudándose de sus apéndices bucales y antenas. Se alimentan por filtración de algas y pequeñas partículas, pero no está determinada la cantidad que suelen ingerir diariamente. También puede variar con la temperatura y la luz, que al ser mayores aumenta la cantidad ingerida (Fernández, 2015).

Tras un mes se origina la puesta según la cantidad de alimento, y de 10-15 días maduran. El estadio de nauplius tarda alrededor de 13 días hasta llegar a copepodito. Una vez alcanzada la madurez y tras la reproducción, no pueden volver a mudar (Fernández, 2015).

Respecto a la longevidad de los copépodos, aquellos de aguas frías tienen mayor tiempo de vida pero menos número de puestas. Las hembras pueden llegar al año mientras que los machos no alcanzan tanto tiempo. Pero los de aguas cálidas apenas pueden llegar a dos meses de vida (Fernández, 2015).

Sobre al sex ratio, hay mayor abundancia de machos que de hembras en la Laguna Honda (Jiménez-Melero *et al.*, 2007). Esto ocurre en varias especies (como los del orden *Harpacticoida*), y algunos estudios han sugerido la transmisión del sexo por el padre, lo que explicaría esa mayor proporción de individuos machos (Voordouw *et al.*, 2005).

4.2. Descripción del hábitat de origen y recolecta de muestras

Los individuos de *A. salinus* utilizados en los experimentos ecotoxicológicos descritos en la presente memoria fueron capturados en la Laguna Honda (latitud: 37° 35' 55,34"N, longitud: 4° 8' 35,21"W), laguna hipersalina que se encuentra situada entre las Cordilleras Béticas y la depresión del Guadalquivir (Andalucía, España). Con una profundidad máxima de 3,16 m y una superficie de cuenca de 9 ha. (Castro *et al.*, 2003), su nivel de agua es muy variable, pudiendo desaparecer en verano debido a periodos de sequía o permanecer durante años (Jiménez *et al.*, 2012). En época de baja inundación disminuye la concentración de calcio por debajo del 5% (Consejería de Medio Ambiente, 2004).

Tiene una predominancia de cloruro sódico y salino (Castro, 2004) y sus suelos se componen fundamentalmente de arcillas, margas y yesos, formándose en su entorno formaciones carbonatadas por escorrentía. Las continuas variaciones de su volumen de agua a lo largo del año provocan que sus aguas pasen de concentraciones hiposalinas a hipersalinas, durante los meses más cálidos. En estos periodos de estiaje la concentración iónica es superior (Consejería de Medio Ambiente, 2005).

Las comunidades planctónicas que habitan en él están adaptadas a una alta variabilidad interanual y estacional, tanto en sus variables bióticas como abióticas (Guerrero y Castro, 1997; López-González *et al.*, 1998).

Entre la vegetación destacada que encontramos en esta zona hay principalmente olivares. La laguna se encuentra rodeada por un monocultivo de olivar (*Olea europaea*) que llega casi hasta la cubeta. La escasa vegetación litoral que se conserva en la laguna está constituida por tarajes (*Tamarix canariensis*) y carrizo (*Phragmites australis*). Las prácticas agrícolas de su cuenca pueden suponer un problema ambiental debido a la erosión que ocasiona la falta de cubierta vegetal, favoreciendo así su colmatación y la entrada de fertilizantes químicos (Consejería de Medio Ambiente, 2005).



Mapa de la zona de la Laguna Honda (Google Maps)

El día 17 de enero de 2018, con ayuda de una red de plancton se recolectaron ejemplares de *Arctodiaptomus salinus* que fueron inmediatamente transportados a la Universidad de Jaén en varios envases de plásticos para evitar mortandad por hacinamiento. Una vez en el Humedal Experimental de la Universidad de Jaén, los individuos fueron acomodados en un mesocosmos de 90x60 cm que fue llenado con agua procedente de la laguna Honda. El mesocosmos se encontraba al aire libre bajo condiciones naturales de luz y temperatura.

4.3. Método de incubación

Se llenaron dos acuarios con capacidad de 18 litros con agua mineral cada uno de la marca Neval (Análisis químico en mg/L: residuo seco a 180°C: 594, bicarbonatos: 243,

sulfatos: 122, cloruros: 147, sodio: 91'8, calcio: 56'9, magnesio: 44'3). Se usaron botellas de 8L y cada una de ellas se llevó hasta conductividad 17 mS/cm, medido con una sonda de conductividad. Para ello se utilizó sal marina y un medio de *Chlamydomonas reinhardtii* (Figura 1) ya preparado del año anterior para mantener lo más parecido posible las condiciones naturales en las que se encontraban en la laguna. Este medio resultó idóneo en TFGs realizados anteriormente (García, 2017; Barroso, 2017) ya que las *Chlamydomonas reinhardtii* como medio nutritivo es adecuado al favorecer el éxito de reproducción y producir mayores nidadas (Jiménez *et al.*, 2012). Las algas se diluyeron con un medio preparado de cuatro soluciones (ver tabla 1) para su crecimiento.

Solución	Micronutrientes
A	KNO ₃ , Na ₂ PO ₄ H
B	MgSO ₄ 7 H ₂ O
C	CaCl ₂ 2 H ₂ O
D	C ₆ H ₅ FeO ₇ 5H ₂ O, Cl ₂ Co 6H ₂ O, SO ₄ Cu 5H ₂ O, Cr ₂ O ₃ , MnCl ₂ 4H ₂ O, Na ₂ Mo ₄ 2H ₂ O, SeO ₂ , EDTA

Tabla 1. Medio de cultivo para *Chlamydomonas reinhardtii*



Figura 1. Medio de *Chlamydomonas*

Los acuarios permanecieron en una cámara de cultivo a temperatura 21'5°C y con un fotoperiodo de 12h horas de luz y 12h de oscuridad. Se extrajeron algunos copépodos del mesocosmos y se llevaron a los dos acuarios en la cámara de cultivo para su aclimatación antes de la realización de los experimentos (Figura 2).

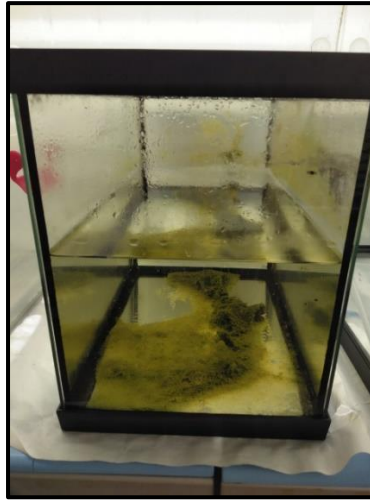


Figura 2. Acuario con A. salinus en la cámara de cultivo

Puesto que los machos y hembras se diferencian a partir de la quinta etapa del ciclo de vida de los copépodos (C5), se cogieron en estado adulto para su mejor diferenciación. Las hembras ovígeras se ven a simple vista con sus oviductos llenos de huevos (Figura 3.a), a diferencia de las no ovígeras (Figura 3.b). Los machos destacan por tener un pequeño engrosamiento en una de sus anténulas (Figura 4).

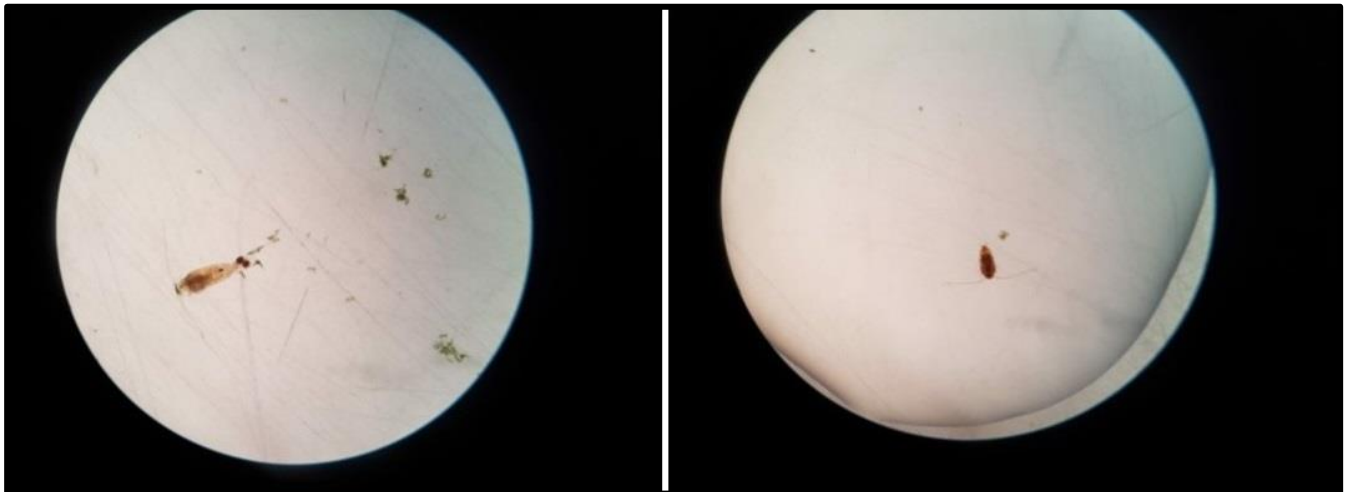


Figura 3. Respectivamente: a) Hembras ovígeras con huevos. b) Hembras no ovígeras



Figura 4. Ejemplar de Arctodiaptomus salinus macho

Con ayuda de un pequeño filtro, los individuos eran extraídos de los acuarios. Se dejaron en un vaso de precipitado con medio de agua y algas, y se fueron separando los machos de las hembras mediante la observación por lupa. Se clasificaron por el sexo en distintos vasos de cristal. Los vasos de cristal tienen capacidad de 60 ml de los que se llenaron 40 ml del medio preparado de agua mineral con sal marina y algas *ad libitum*. Se prepararon 6 réplicas para cada sexo, con 8 individuos por vaso. Cuidadosamente con ayuda de pipetas Pasteur se fueron colocando los machos y hembras en los distintos vasos de cristal. Para evitar una evaporación excesiva que provoque un incremento no deseado de la salinidad, los vasos se taparon con parafina a la que se les hizo pequeños agujeros. A continuación se colocaron en una bandeja para dejarlos en la cámara de cultivo para su incubación (Figura 5).



Figura 5. Vasos con *Arctodiaptomus salinus* separados por sexo

En total se prepararon 6x2 tratamientos, es decir, para cada sexo se prepararon un control y 5 concentraciones del pesticida Azadiractina 3,2% p/v ($0'025\text{mg L}^{-1}$, $0'04\text{mg L}^{-1}$, $0'05\text{mg L}^{-1}$, $0'07\text{mg L}^{-1}$, $0'1\text{mg L}^{-1}$) desde el 20 de marzo hasta el 22 de junio de 2018 (Figura 6).

Se fue tomando nota cada 24h de la mortalidad de los individuos hasta llegadas las 96h. Tras las 48h se añadía 1'5 ml de algas con una pipeta Pasteur como alimento a cada vaso para garantizar las condiciones *ad libitum*. Por razones técnicas es inviable realizar todos los experimentos a la vez. Así, tras realizar el control en el periodo del 20 marzo-13 abril, se procedió a hacer las distintas concentraciones del pesticida desde el 17 de abril hasta el 22 de junio.



Figura 6. Insecticida de azadiractina

Para el uso del pesticida se usó una campana extractora y las medidas preventivas adecuadas, como el uso de gafas protectoras y guantes. Para preparar cada concentración partíamos del pesticida Tokai de la marca Kenogard con 3,2% p/v de azadiractina pura. Una vez sabido las cantidades a echar para 0'5L, se usó un vaso de precipitado de 0'6L y se echó el medio de agua con sal marina y algas, con un agitador se mezcló el medio y se puso en la campana extractora. Para asegurar una adecuada homogeneización del pesticida en el medio, el preparado se estuvo agitando continuamente durante 30 minutos y se tapó el vaso de precipitado con parafina, tras este tiempo se fue echando en cada vaso 0'40 ml del medio total y se dejó reposar durante 10 minutos (Figura 7). A continuación se fueron introduciendo los machos y hembras en sus respectivos vasos y se taparon con parafina para incubarlos en la cámara de cultivo.



Figura 7. Campana extractora con el medio con azadiractina

4.4. Análisis de datos

Con los datos recogidos del experimento durante ese periodo de meses, se ha realizado un análisis estadístico basado en las curvas de supervivencia con el estimador de Kaplan-Meier para las distintas concentraciones usadas. Este método nos analiza dos grupos en función del tiempo y supervivencia para cada individuo; estimado en 1 si está vivo y 0 si ha fallecido (Kleinbaum y Klein, 2005). Así, se han ido comparando todas las concentraciones para hembras y para machos para comprobar las posibles diferencias respecto a la supervivencia. Para ello se ha utilizado el programa *Past 3.21*. Junto con las respectivas gráficas, se recogían los datos sobre el test de Wilcoxon y la P valor sobre la supervivencia para la comparación de medias y comprobar las posibles diferencias significativas que se pueden dar entre las concentraciones. Los estudios estadísticos se realizaron de forma independiente para hembras y machos, y finalmente comparando las mismas concentraciones de los dos sexos para comprobar si se cumple nuestra hipótesis.

5. RESULTADOS

En este estudio se han recolectado un total de 576 individuos de *Arctodiaptomus salinus*, con un ratio de sexos 1:1, repartidos en 72 réplicas.

Machos y hembras fueron expuestos por separado a distintas concentraciones de Azadiractina durante 4 días. La supervivencia de los individuos fue modelada con curvas de supervivencia construidas con el estimador de Kaplan-Meier. Dichas curvas fueron comparadas dos a dos con el test X^2 de Wilcoxon para detectar diferencias en la supervivencia tanto a distintas concentraciones como entre sexos.

La figura 1 y la tabla 1 comparan la supervivencia de las hembras a distintas concentraciones de Azadiractina. Como se puede observar en las gráficas (figura 1) y en el posterior análisis post-hoc (tabla 1) no existe un patrón claro en el efecto del pesticida, esto es, este afecta a la supervivencia en las concentraciones intermedias pero no en las más bajas ni en las más altas. Podemos ver que en la concentración de 0'04 mg/L alrededor del 60% de las hembras ha sobrevivido tras 96 horas de exposición al tóxico mientras que en el control la supervivencia en ese momento es

del 90%. La otra concentración que también ha tenido un efecto significativo es 0'05 mg/L, donde la supervivencia es de alrededor del 70% tras llegar a las 96h. En las concentraciones 0'025 mg/L, 0'07 mg/L, 0'1 mg/L y el control la supervivencia ha sido de entre el 90-85% tras la finalización del experimento.

Wilcoxon- X^2 P	Control	0,025mg/L	0,04 mg/L	0,05 mg/L	0,07 mg/L	0,1 mg/L
Control		0,0131	21,259	9,0539	2,7184	0,6625
0,025 mg/L	0,9086		19,939	8,0898	2,2524	0,4547
0,04 mg/L	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$		3,6873	9,9142	15,469
0,05 mg/L	0,0026	0,0044	0,0548		1,8134	4,9238
0,07 mg/L	0,0992	0,1334	0,0016	0,1781		0,7375
0,1 mg/L	0,4156	0,5000	$\leq 0,0001$	0,0264	0,3904	

Tabla 1. Valores de P y de la X^2 según un test de Wilcoxon que compara la supervivencia de las hembras a distintas concentraciones de Azadiractina. Las diferencias significativas son indicadas en rojo.

control

0,025mg/L

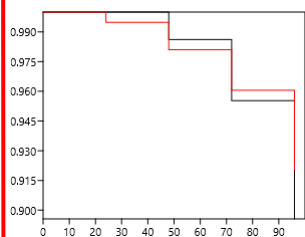
0,04 mg/L

0,05 mg/L

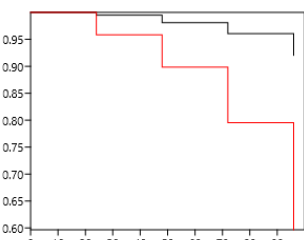
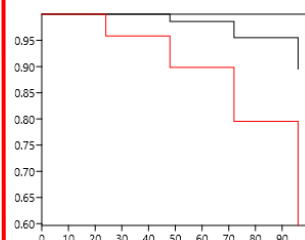
0,07 mg/L

Tiempo

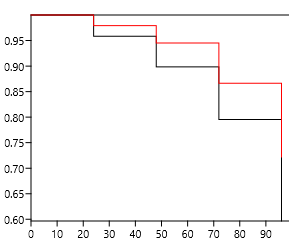
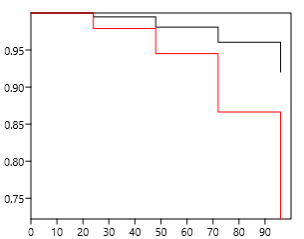
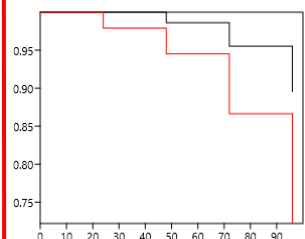
0,025 mg/L



0,04 mg/L



0,05 mg/L



0,07 mg/L

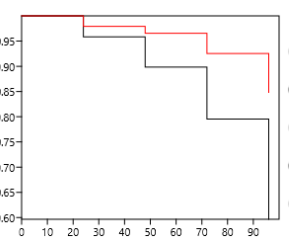
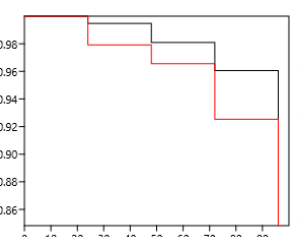
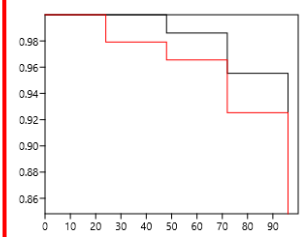
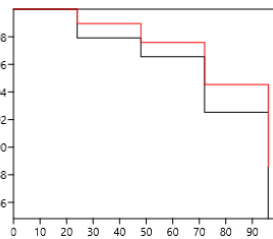
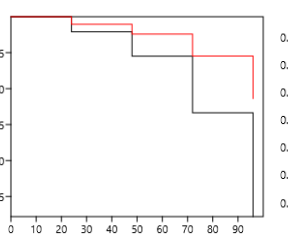
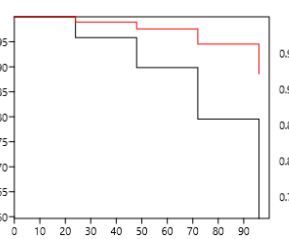
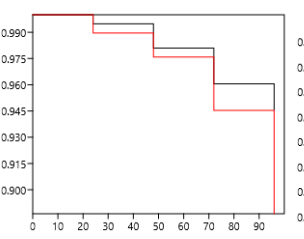
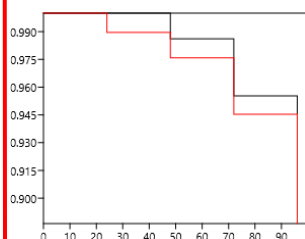


Figura 1. Curvas de supervivencia de las hembras de *A. salinus* a distintas concentraciones de Azadiractina calculadas con el estimador de Kaplan-Meier

Probabilidad supervivencia

0,1 mg/L



Para los machos se realizaron también curvas de supervivencia con el estimador de Kaplan-Meier para las distintas concentraciones (ver figura 2).

A la vista de dicha gráfica, se ve un claro descenso en la población para la concentración de 0,05 mg/L tras pasadas las 48h.

Respecto a los machos, también se realizó una tabla con la P valor y el test X^2 de Wilcoxon (ver tabla 2).

En este caso volvemos a encontrarnos con diferencias en las concentraciones de 0,04 mg/L y 0,05 mg/L (señaladas en rojo), siendo el mismo caso que en las hembras. Esto nos puede decir que no hay un efecto claro del pesticida al no ir aumentando la mortalidad conforme hemos aumentado las concentraciones (0,07 mg/L y 0,1 mg/L).

Wilcoxon- X^2 P	Control	0,025mg/L	0,04 mg/L	0,05 mg/L	0,07 mg/L	0,1 mg/L
Control		1,4907	13,775	39,139	3,7537	0,0375
0,025 mg/L	0,2221		7,644	30,494	0,7227	1,2414
0,04 mg/L	0,0002	0,0056		9,3792	3,6742	13,242
0,05 mg/L	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$	0,0021		22,908	38,478
0,07 mg/L	0,0526	0,3952	0,0552	$\leq 0,0001$		3,4127
0,1 mg/L	0,8463	0,2652	0,0002	$\leq 0,0001$	0,0646	

Tabla 2. Valores de P y de la X^2 según un test de Wilcoxon que analiza la supervivencia de los machos a distintas concentraciones de Azadiractina. Las diferencias significativas son indicadas en rojo.

control

0,025mg/L

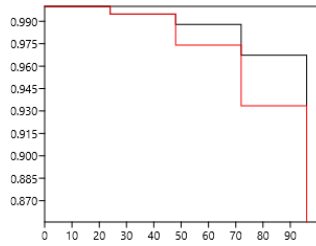
0,04 mg/L

0,05 mg/L

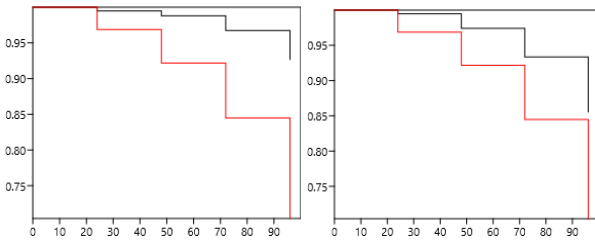
0,07 mg/L

Tiempo

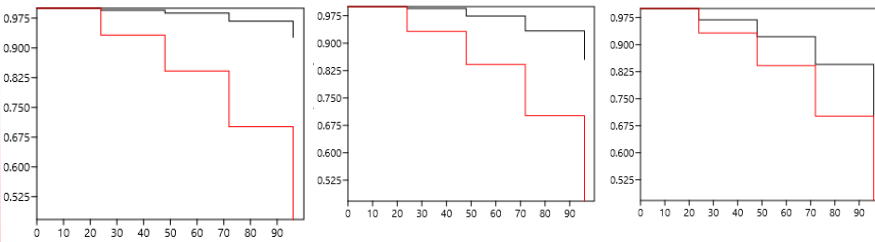
0,025 mg/L



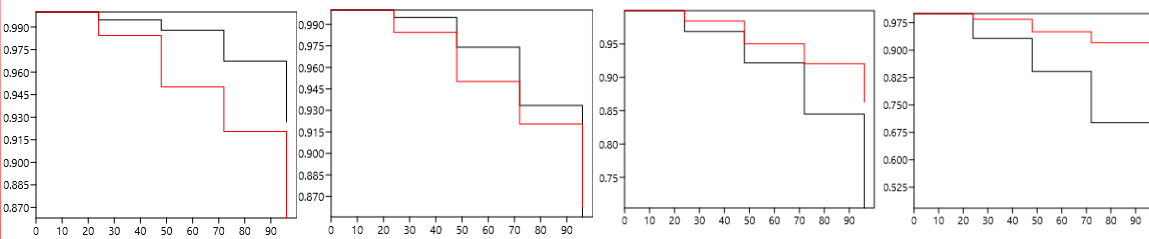
0,04 mg/L



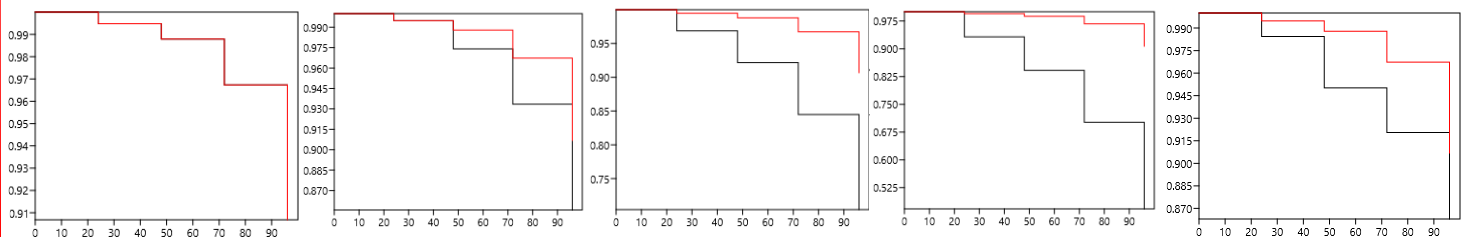
0,05 mg/L



0,07 mg/L



0,1 mg/L



Probabilidad supervivencia

Figura 2. Curvas de supervivencia de los machos de *A. salinus* a distintas concentraciones de Azadiractina calculadas con el estimador de Kaplan-Meier

Tras comparar los resultados de hembras y machos independientemente, se pasa a observar las posibles diferencias significativas que puede haber entre sexos.

Para ello se han comparado las curvas de Kaplan-Meier de machos y hembras con el test X^2 de Wilcoxon (ver figura 3 y tabla 3).

Podemos observar que en las concentraciones de 0,04 mg/L y 0,05 mg/L la supervivencia tras las 96h ha sido alrededor del 60% en hembras y del 50% en machos, respectivamente. En el resto de concentraciones y el control la supervivencia no ha variado más del 90-85% tras las 96h (figura 3).

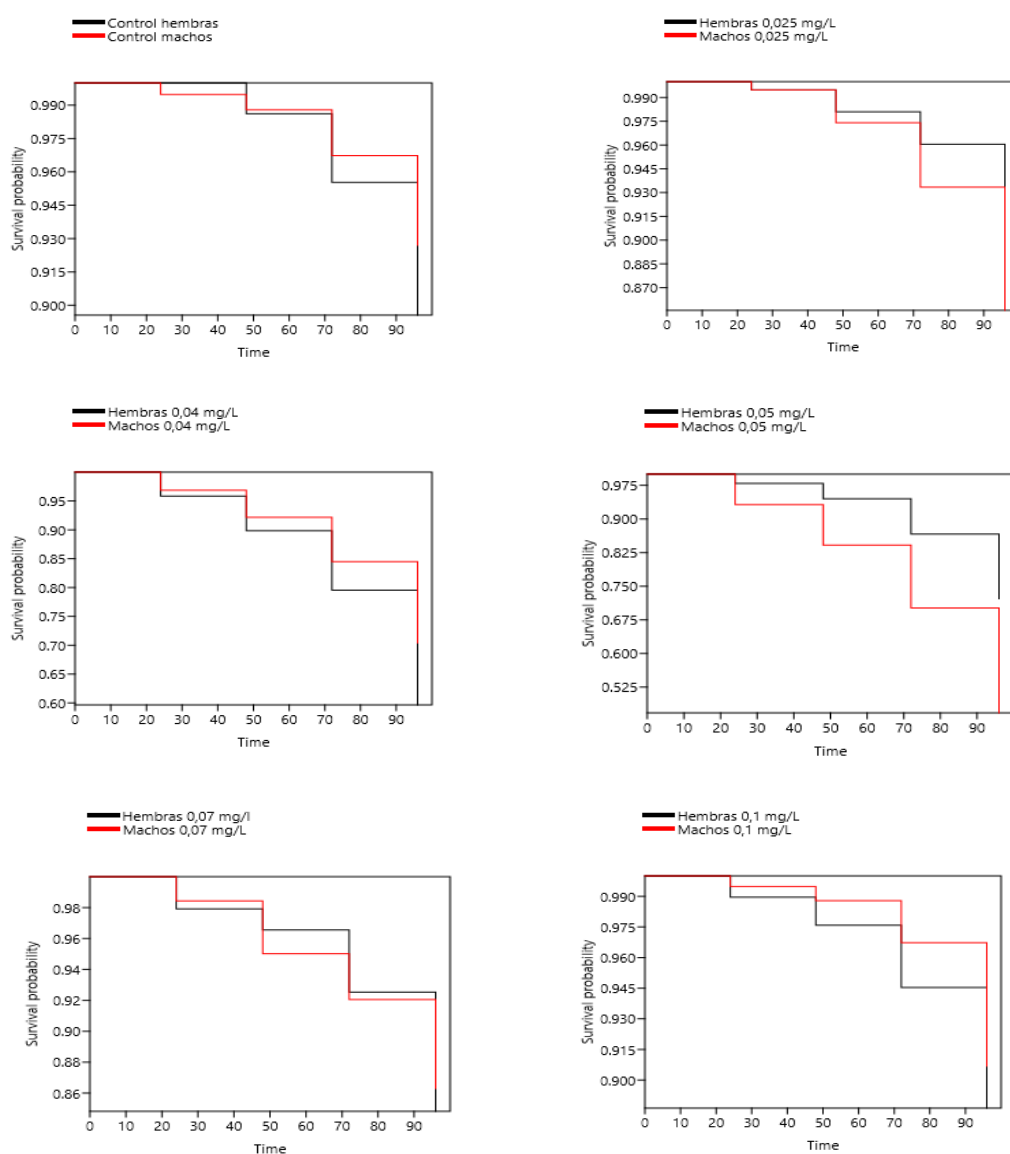


Figura 3. Curvas de supervivencia comparando machos y hembras de *A. salinus* a distintas concentraciones de Azadiractina calculadas con el estimador de Kaplan-Meier

A la vista de los resultados, en ausencia de pesticida no hay diferencias en la supervivencia entre machos y hembras. Es curioso que sólo se vea efecto en la concentración de 0,05 mg/L de nuevo (ver tabla 3).

Por lo que podemos afirmar que nuestra hipótesis de partida no se ha cumplido, esto es, no hay diferencias entre sexos en la mortalidad cuando son expuestos a concentraciones de Azadiractina comprendidas entre 0,025 mg/L y 0,1 mg/L durante 96 horas.

Hembras y machos	Control	0,025 mg	0,04 mg	0,05 mg	0,07 mg	0,1 mg
P	0,8072	0,3805	0,2513	0,0001	0,8890	0,3677
Wilcoxon	0,0595	0,7689	1,3159	14,457	0,0194	0,8114

Tabla 3. Valores de P y test de Wilcoxon, que analiza la supervivencia entre machos y hembras

6. DISCUSIÓN

Estudios previos han encontrado que el 50% de los individuos de *Arctodiaptomus salinus* mueren cuando son expuestos a una concentración de 0,129 mg/L de Azadiractina tras 96h (García-López, 2017). Dichos estudios se realizaron sobre una muestra mixta de machos y hembras por lo que no pudieron analizar la posible diferencia entre sexos en su respuesta al tóxico. Así, en el presente trabajo se estudia si el efecto del pesticida Azadiractina sobre el copépodo *Arctodiaptomus salinus* difiere entre sexos cuando son expuestos a concentraciones inferiores a dicha LC_{50} , esto es, inferiores a 0,129 mg/L.

Tras exponer a un total de 48 machos y 48 hembras por cada una de las 5 concentraciones distintas de Azadiractina, no hemos encontrado diferencias significativas en las curvas de supervivencia a distintas concentraciones entre individuos de distinto sexo. Sí ha habido diferencias en las concentraciones de 0,04 mg/L y 0,05 mg/L en cada sexo, pero parece indicar un efecto aleatorio al no haber ido aumentando la mortalidad con las concentraciones superiores.

En este estudio no se ha podido realizar el LC_{50} ya que indica una concentración a partir de la cual ha muerto la mitad de la población, pero las concentraciones aquí

usadas son más bajas y no han llegado a tener efecto en la población, por lo que no es viable dicho análisis estadístico.

En otros microcrustáceos planctónicos, como por ejemplo el género *Daphnia*, la Azadiractina empieza a tener efecto a partir de 0,05 mg/L en condiciones de laboratorio (Kreutzweiser *et al.*, 2002). En condiciones naturales, sin embargo, el zooplancton se ha visto afectado significativamente a concentraciones de 0,035 mg/L, siendo más sensibles los copépodos (Kreutzweiser *et al.*, 2002). Es por ello que en nuestro estudio habría cabido esperar efectos significativos a partir de 0,05 mg/L en las condiciones de laboratorio. En cambio observando los resultados obtenidos no ha habido ningún aumento ni en machos ni en hembras.

Cuando las curvas de supervivencia de los controles son comparadas con las de las distintas concentraciones de pesticida, no se observa ninguna diferencia entre ellas, por lo que el pesticida no ha llegado a afectar a los individuos y la supervivencia no ha variado prácticamente de unas concentraciones a otras.

Las concentraciones de 0,04 mg/L y 0,05 mg/L han sido las únicas con valor *p* significativo en la supervivencia de los individuos, lo que nos indica que la Azadiractina a estos valores ha podido actuar de forma aleatoria. Puede que exista algún factor de confusión en el diseño experimental que hace que el efecto de la Azadiractina actúe de forma aleatoria a esas concentraciones, ya que en otro estudio la concentración de 0,05 mg/L también tuvo efecto negativo sobre *Arctodiaptomus salinus* de forma aleatoria, y no fue hasta una mayor concentración cuando empezó a descender la población (García-López, 2017). No hay información suficiente para conocer su tiempo de vida en el agua, pero según un estudio el pesticida de Nim puede subsistir en el agua de estanque alrededor de 26 días, y causó efectos negativos en copépodos pero no afectó a *Daphnia* (Kreutzweiser *et al.*, 2002).

Los resultados respecto a la comparación en la supervivencia de hembras y machos dan como resultado que no hay diferencias entre ambos sexos respecto a la Azadiractina, aunque el valor 0,05 mg/L haya salido significativo ya que como hemos podido observar ha actuado de forma aleatoria en todos los análisis estadísticos. Si podemos afirmar con el control que en ausencia de Azadiractina ambos sexos de *A. salinus* no muestran diferencias en relación a la supervivencia. Por lo que nuestra

hipótesis de que hay diferencias en la supervivencia entre machos y hembras respecto a la Azadiractina, no se ha cumplido.

En estudios hechos en insectos, la Azadiractina ha mostrado afectar al sistema hormonal, alterando su desarrollo y provocando una pérdida de apetito por el alimento (Chaudhary *et al.*, 2017). Diversos estudios han concluido que la supervivencia se debe a esas variaciones en el desarrollo y alimentación, como ha ocurrido en estudios sobre himenópteros, lepidópteros, coleópteros (Pradhan y Jotwani, 1971; Meisner *et al.*, 1976; Kumar *et al.*, 2009).

Los copépodos en estado pre adulto (C5) son más sensibles a la Azadiractina que los juveniles. Esto puede ser debido a que los juveniles son menos propensos a absorberla en su organismo que los adultos (Kreutzweiser *et al.*, 2002; Kreutzweiser *et al.*, 2004).

También influye en la oviposición de los insectos hembras y en la producción de esperma en machos (Linton *et al.*, 1997; Morgan, 2009), como ocurre en un estudio de Abedi *et al.*, (2014) donde las hembras de la avispa *Habrobracon hebetor* sufrieron una reducción en la oviposición. En la alimentación, un estudio determinó que a partir de una ingestión de Azadiractina de 5 ppm tras 48h, disminuye la fecundidad en áfidos, y a partir de 10 ppm se producen ninfas no viables (Nisbet *et al.*, 1996). En la reproducción de los insectos, se ha visto que afectó la capacidad reproductiva del himenóptero *Trichogramma cacoeciae* y se redujo la fecundidad de hembras fértiles del hemíptero *Podisus maculiventris* (Saber *et al.*, 2004; Viñuela *et al.*, 1997). Debido a que los crustáceos comparten junto con los insectos la hormona ecdisona, sufren los mismos daños que ellos, como es en el caso de la muda (Sieber y Rembold, 1983). Esto se ha podido ver en un estudio que se ha realizado sobre *A. salinus*, en donde a una concentración de 6 µg/L se han encontrado efectos negativos en la supervivencia de los recién nacidos, pero no ha habido efecto sobre la fecundidad ni sobre el éxito de eclosión. Es decir, antes de la muda la población moría (Martins, 2018).

En trabajos anteriores que analizaron también la toxicidad de Azadiractina sobre *A. salinus* se encontró que el LC₅₀ a las 96 horas de exposición fue de 0,129 mg/L (García-López, 2017) como ya se ha comentado. La máxima concentración usada en este experimento ha sido de 0,1 mg/L, muy similar a la de dicho LC₅₀, y sin embargo

no ha habido ningún indicio de que afectara a los individuos de *A. salinus*. En nuestro caso, no ha habido un efecto significativo en los copépodos, a pesar de que en el estado adulto (C6) son más sensibles como ya se ha comentado. Es posible que los efectos negativos sean más visibles si se hubiera expuesto a los copépodos desde su estado juvenil hasta que fuera adulto, ya que la Azadiractina afecta desde el proceso de muda en insectos y crustáceos, y así se encontrarían malformaciones en los adultos (Viñuela, 1998).

También la alteración en el crecimiento cambia en función de si la Azadiractina es ingerida o aplicada tópicamente, siendo más tóxica cuando es ingerida como se ha revelado en diversos estudios (Zamora *et al.*, 2008).

En un estudio sobre pupas del himenóptero *Eretmocerus mundus*, los efectos subletales produjeron una deshidratación en ellas y una coloración más oscura tras 72h; aquellas con menor oscurecimiento mostraron adelgazamiento en el abdomen y los adultos que emergieron de ellas murieron a partir del segundo día. Como se comentó anteriormente sobre el efecto que causa en la hormona ecdisona, en dicho estudio también se vio una interrupción en el desarrollo de la pupa. Respecto a los adultos, diversos estudios han corroborado que la Azadiractina tiene efecto menos tóxico y mayor porcentaje de supervivencia en diversos himenópteros parásitos como *Aphytis*, *Eretmocerus*, *Encarsia* tras varios días de ensayo (Francesena, 2015).

Además de esto, en un estudio este pesticida pudo persistir hasta 26 días en el agua, por lo que provocó daños en los copépodos (Kreutzweiser *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2002). De alguna forma el pesticida en nuestro estudio no ha tenido efecto aparente en nuestros individuos a pesar del aumento de su concentración, ya sea porque no ha sido eficaz en el organismo de estos o por su cuestionable persistencia en el agua (Kreutzweiser *et al.*, 2002).

En estudios sobre Azadiractina en el medio acuático, se vieron efectos significativos a partir de concentraciones de 0,01 mg/L (Kreutzweiser *et al.*, 2004), pero en otro estudio de Kreutzweiser *et al.*, (2002) no hubo efectos significativos por debajo de 0,025 mg/L. Al parecer no se sabe a ciencia cierta los efectos claros del pesticida sobre los copépodos por los distintos resultados de diversos estudios. En Kreutzweiser *et al.*, (2004) se comprobó mayor susceptibilidad de los copépodos adultos al pesticida que los juveniles. A diferencia de nuestro estudio, el extracto usado

en este tenía una pureza de 4'5% azadiractina y no fue hasta pasados 14 días que tuvo un efecto significativo con una concentración de 0,028 mg/L. Pero los efectos tóxicos parecen variar en función del extracto de Nim usado y sus componentes, siendo responsable de la toxicidad la Azadiractina pura, variando así la toxicidad en crustáceos dependiendo de los componentes (Stark, 2001).

Otro dato a tener en cuenta respecto al medio acuático es que los copépodos de aguas frías tienen mayor tiempo de vida pero menor número de puestas. Las hembras pueden llegar al año mientras que los machos no alcanzan tanto tiempo. Pero los de aguas cálidas apenas pueden llegar a dos meses de vida (Fernández, 2015).

Como podemos comprobar, los insectos en los diversos estudios necesitan de concentraciones más altas para que se produzcan efectos significativos, mientras que los copépodos parecen ser más sensibles a menores concentraciones. Y como se ha comentado, parecen ser más sensibles los adultos a los juveniles, tal vez por su mecanismo de absorción. La falta de documentación al respecto sobre los copépodos y cómo actúa la Azadiractina en estos, y al comprobarse que en los insectos dependiendo de la especie la actividad ovicida de la Azadiractina varía (Adán *et al.*, 1996), no permite dar una resolución clara a los resultados observados. Las variaciones sobre el efecto que causa en el organismo pueden ser distintas, aunque no hay estudios suficientes que determinen tanto su persistencia en el agua como sus efectos significativos sobre esta especie.

En este estudio el uso de estas concentraciones se debe a que queremos ver si hay una posible diferencia entre machos y hembras a tan bajas concentraciones. Pero observando los resultados podemos decir que es interesante seguir realizando estudios sobre *A. salinus* a tiempos más largos y con concentraciones más altas, ya que a simple vista no hay diferencias ni efectos negativos sobre la población, pero no significa que no puedan haber efectos subletales distintos a los comentados.

7. CONCLUSIÓN

A concentraciones de Azadiractina comprendidas entre 0,025 mg/L y 0,1 mg/L y tras 96 horas de exposición, no se detecta una respuesta clara en la supervivencia de *A. salinus*, esto es, la mortalidad se incrementa significativamente a concentraciones intermedias pero no en las más bajas ni en las más altas. Otros autores han encontrado efectos negativos de este pesticida sobre la supervivencia de especies similares como en el género *Daphnia* pero sin saber a ciencia cierta su eficacia. Estos resultados controvertidos pudieran deberse a su cuestionable persistencia en el agua ya que no está clara, y a su poca solubilidad, que pudiera afectar tal vez de forma no uniforme a los organismos. También la variación del tiempo de exposición al pesticida puede influir.

Dado que las concentraciones usadas no han dado resultados claros sobre la eficacia del pesticida en *A. salinus*, a la vista de los resultados podríamos decir que se necesita de mayor concentración para que tengan un efecto en la supervivencia de este copépodo, como ocurre estudios previos. Al ser datos dispares, independientemente de usar menor o mayor concentración, no hay una relación directa entre la Azadiractina y probabilidad de mortalidad en *A. salinus*.

Una vez analizada la posible diferencia en la mortalidad entre los sexos de *Arctodiaptomus salinus*, podemos asegurar que tanto en condiciones naturales (control) como a las concentraciones de Azadiractina de este estudio, no encontramos diferencia entre los sexos respecto a la mortalidad.

Es innegable que las prácticas agrícolas han conllevado un efecto negativo sobre los organismos y calidad de agua de los alrededores por el uso de diversos insecticidas hoy en día. Si es cierto que los pesticidas botánicos son menos dañinos, hay que evolucionar hacia una práctica que sea más conservadora con el medio ambiente y seres vivos. Para ello se sigue necesitando llevar a cabo más estudios con diferentes insecticidas y su influencia en los organismos, para poder conseguir un mayor equilibrio entre los productos utilizados y la supervivencia de las especies.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abedi, Z., Saber, M., Gharekhani, G., Mehrvar, A. y Kamita, S.G. (2014). Lethal and sublethal effects of azadirachtin and cypermethrin on *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Economic Entomology*, 107(2), 638-45.
- Adán, A., Del Estal, P., Budia, F., González, M. y Viñuela, E. (1996). Laboratory evaluation of the novel naturally derived compound spinosad against *Ceratitis capitata*. *Pestic. Sci.* 48, 261-268.
- Anufriieva, E. V. y Shadrin, N.V. (2015). Morphometric variability of *Arctodiaptomus salinus* (Copepoda) in the Mediterranean-Black Sea región. *Zoological Research*, 36(6), 328-336.
- Anufriieva, E. V. y Shadrin, N.V. (2013). Factors determining the average body size of geographically separated *Arctodiaptomus salinus* (Daday, 1885) populations. *Zoological Research*, 35 (2), 132–141.
- Bag, D. (2000). Pesticides and health risks. *Econ. Polit. Wkly.* 35, 3381–3383.
- Barroso Gutiérrez, Elvira (2017). Efecto de un producto fitosanitario autorizado en producción ecológica sobre una especie zooplanctónica. Trabajo Fin de Grado. Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología. Universidad de Jaén.
- Bayly, I.A.E. (1978). Variation in sexual dimorphism in nonmarine calanoid copepods and its ecological significance. *Limnology and Oceanography*, 23(6), 1224-1228.
- Belmonte, G., Moscatello, S., Batogova, E. A., Pavlovskaya, T., Shadrin, N. V. y Litvinchuk, L. F. (2012). Fauna of hypersaline lakes of the Crimea (Ukraine). *Thalassia Salentina*, 34, 11–24.
- Castro, M.C. (2004). Caracterización limnológica y variabilidad temporal de la comunidad planctónica en Laguna Honda (Jaén). PhD Tesis, Universidad de Jaén.
- Castro, M.C., Rivera, M., Crespo, M., Martín-García, J.M. y Guerrero F. (2003). Morphological and sedimentological characterization of Honda temporary lake (southern Spain). *Limnetica*, 22, 147–154.
- Ceccon, E. (2008). La revolución verde: tragedia en dos actos. *Ciencias*, 91, 20-29.

- Chaudhary, S., Kanwar R. K., Sehgal, A., Cahill, D. M., Barrow C. J., Sehgal, R. y Kanwar, J. R. (2017). Progress on *Azadirachta indica* Based Biopesticides in Replacing Synthetic Toxic Pesticides. *Frontiers in Plant Science*, 8, 610.
- Comín, F.A., Alonso, M., Lopez, P. y Comelles, M. (1983). Limnology of Gallocanta Lake, Aragon, northeastern Spain. *Hydrobiologia*, 105(1), 207-221.
- Conover, R. J. (1971). Some relations between zooplankton and bunker C oil in chedabucto Bay following the wreck of the tanker Arrow. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 28, 1327-1330.
- Consejería de Medio Ambiente Junta de Andalucía (2005). *Caracterización Ambiental de Humedales en Andalucía* (330-335pp). Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
- Consejería de Medio Ambiente Junta de Andalucía (2004). Red de control de zonas húmedas de Andalucía. Informe Técnico. Dirección General de Planificación, Sevilla.
- Deevey, G.B. (1948). The zooplankton of Tisbury Great Pond. *Bulletin of the Bingham Oceanographic Collection*, 12(1), 1-44.
- European Pond Conservation Network (2008). *The Pond Manifesto*. Disponible en www.europeanponds.org
- Fernández, M. (2015). Clase maxilópoda, subclase copépoda, orden calanoida. *IDE@-SEA.*, 89,1-27.
- Francesena, Natalia (2015). Efectos letales y subletales de insecticidas sobre *Bemisia tabaci* y su principal parasitoide *Eretmocerus mundus* e impacto sobre aspectos comportamentales del mismo. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.
- García López, M^a Auxiliadora (2017) Efecto de un producto fitosanitario autorizado en producción ecológica sobre una especie zooplanctónica. Trabajo Fin de Grado. Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología. Universidad de Jaén.
- Geddes, M.C. y Cole, G.A. (1981). Variation in sexual size differentiation in North American diaptomids (Copepoda: Calanoida): Does variation in the degree of dimorphism have ecological significance? *Limnology and Oceanography*, 26(2), 367-374.

- Gilbert, J.D., De Vicente, I., Jiménez-Melero, R., Parra, G. y Guerrero, F. (2014). Selecting priority conservation areas based on zooplankton diversity: the case of Mediterranean wetlands. *Marine and Freshwater Research*, 65, 857–871.
- Gilden, R. C., Huffling, K. y Sattler, B. (2010). Pesticides and health risks. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs.*, 39, 103–110.
- Guerrero, F. y Castro, M.C. (1997). Chlorophyll a of size fractionated phytoplankton at a temporary hypersaline lake. *International Journal of Salt Lake Research*, 5, 253–260.
- Helson, B., Lyons, B. y De Groot, P. (1999). Evaluation of neem EC formulations containing azadirachtin for forest insect pest management in Canada. En Singh, R.P. y Saxena, R.C. (Eds.), *Azadirachta indica A. Juss. International Neem Conference* (pp. 79–89). New Delhi: Oxford & IBH Publishers.
- Isman, M., Koul, O., Arnason, J., Stewart, J. y Salloum, G. (1991). Developing a neem-based insecticide for Canada. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 123, 39–46.
- Jiménez-Melero, R., Parra, G. y Guerrero, F. (2012). Effect of temperature, food and individual variability on the embryonic development time and fecundity of *Arctodiaptomus salinus* (Copepoda: Calanoida) from a shallow saline pond. *Hydrobiologia*, 686, 241–256.
- Jiménez-Melero, R., Parra, G., Souissi, S. y Guerrero, F. (2007). Post-embryonic developmental plasticity of *Arctodiaptomus salinus* (Copepoda: Calanoida) at different temperaturas. *J. Plankton Res.*, 29, 553-567.
- Kleinbaum, D.G. y Klein, M. (2005). *Survival analysis: a self-learning text*. New York: Springer.
- Koul, O. y Wahab, S. (2004). *Neem: Today and in the New Millennium*. New York, NY: Kluwer Academic Publishers.
- Kreutzweiser, D.P., Back, R.C., Sutton, T.M., Pangle, K.L. y Thompson, D.G. (2004). Aquatic mesocosm assessments of a neem (azadirachtin) insecticide at environmentally realistic concentrations—2: zooplankton community responses and recovery. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(2), 194-204.
- Kreutzweiser, D.P., Back, R.C., Sutton, T.M., Thompson, D.G. y Scarr, T.A. (2002). Community-level disruptions among zooplankton of pond enclosures treated with a neem (azadirachtin) insecticide. *Aquat. Toxicol.*, 56, 257–273.

- Krupa, E.G, Stuge, T.S, Lopareva, T.Ya. y Shaukharbaeva, D.S. (2008). Distribution of planktonic crustaceans in Lake Balkhash in relation to environmental factors. *Inland Water Biology*, 1(2), 150-157.
- Kumar, B.V., Kuttalam, S. y Chandrasekaran, S. (2009). Efficacy of a new insecticide spirotetramat against cotton whitefly. *Pesticide Research Journal*, 21, 45-48.
- Kumar, N., Pathera, A. K., Saini, P. y Kumar, M. (2012). Harmful effects of pesticides on human health. *Ann. Agri Bio Res*, 17, 125–127.
- Ley, S. V., Denholm, A. A. y Wood, A. (1993) The chemistry of azadirachtin. *Nat. Products Reports*, 2, 109-157.
- Linton, Y.M., Nisbet, A. J. y Mordue, A. J. (1997). The effects of azadirachtin on the testes of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål). *J. Insect Physiol.*, 43, 1077–1084.
- López-González, P.J., Guerrero, F. y Castro, M.C. (1998). Seasonal fluctuations in the plankton community in a hypersaline temporary lake (Honda, southern Spain). *International Journal of Salt Lake Research*, 6, 353–371.
- Martínez, J.L., González, M.J., Belmonte, A. y Garrido, A. (2004). Estudio de la contaminación por pesticidas en aguas ambientales de la provincia de Almería. *Ecosistemas*, 13 (3), 30-38.
- Martins Aragão, Guillermo (2018). Efectos sub-letales del plaguicida de origen natural Azadiractina sobre una especie zooplanctónica. Trabajo Fin de Máster. Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología. Universidad de Jaén.
- Meisner, J., Wysoki, M. y Ascher, K.R.S., (1976). The residual effect of some products from neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds upon larvae of *Boarmia* (Ascotis) selenaria Schiff in laboratory trials. *Phytoparasitica*, 4, 185-192.
- Morgan, E. D. (2009). Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 4096–4105.
- Nisbet, A. J., Nasiruddin, M. y Walker, E. (1996). Differential thresholds of azadirachtin for feeding deterrence and toxicity in locusts and an aphid. *Entomol. Exp. Appl.*, 80, 69–72.

- Ntow, W. J., Tagoe, L. M., Drechsel, P., Kelderman, P., Gijzen, H. J. y Nyarko, E. (2008). Accumulation of persistent organochlorine contaminants in milk and serum of farmers from Ghana. *Environ. Res*, 106, 17–26.
- Olea, N., Molina, M.J. y García-Martin, M. (1995). Modern agricultural practices: The human price. *Comments Toxicology*, 5, 447.
- Organización Mundial de la Salud (1990). Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture. Ginebra: World Health Organization.
- Ortiz-Hernández, M. L.; Olvera-Valera, A.; Sánchez-Salinas, E. y Folch-Mallol, J. L. (2011). *Pesticides in the environment: impacts and its biodegradation as a strategy for residues treatment* (368 pp). México: INTECH.
- Paul, R., Prasad, M. y Sah, N. K. (2011). Anticancer biology of *Azadirachta indica* L (neem): a mini review. *Cancer Biol. Ther.*, 12, 467–476.
- Payne, M.F. y Rippinggale, R.J. (2000). Evaluation of diets for culture of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquac*, 187, 85-96.
- Pradhan, S y Jotwani, M.G. (1971). Repeated confirmation of our discovery of antifeed ant property of neem kernel. *Entomological News*, 1, 75-77.
- Ramsar Convention Secretariat (2010). *Ramsar handbooks for the wise use of wetlands*. (4th ed). Gland, Switzerland: Ramsar Convention Secretariat.
- Raut, R. R., Sawant, A. R. y Bhagyashree, B. J. (2014). Antimicrobial activity of *Azadirachta indica* (Neem) against pathogenic microorganisms. *J. Acad. Ind. Res*, 3, 327–329.
- Robles-Molina, J., Gilbert-López, B., García-Reyes, J.F. y Molina-Díaz, A. (2014). Monitoring of selected priority and emerging contaminants in the Guadalquivir River and other related surface waters in the province of Jaén, South East Spain. *Science of the Total Environment*, 479–480, 247–257.
- Rokneddine, A. (2004). The influence of salinity and temperature on the growth of *Arctodiaptomus salinus* (Daday, 1885) (Copepoda, Calanoida), from the temporary salt marsh, “La Sebkha Zima”, Morocco. *Crustaceana*, 77(9), 1025-1044.
- Saber, M., Hejazl, M.J. y Hassan, S.A. (2004). Effects of Azadirachtin/Neemazal on different stages and adult life table parameters of *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Economic Entomology*, 97(3), 905-910.

- Samraoui, B. (2002). Branchiopoda (Ctenopoda and Anomopoda) and Copepoda from eastern Numidia, Algeria. *Hydrobiologia*, 470(1-3), 173-179.
- Schmutterer, H. (1985). Which insect pests can be controlled by application of neem seed kernel extracts under field conditions? *Z. Angew. Entomol.*, 100, 468–475.
- Senicheva, M. I., Gubelit, V., Prazukin, A. V. y Shadrin, N. V. (2008). Phytoplankton of the Crimean hypersaline lakes. En Tokarev, Yu. N., Finenko, Z. Z. & Shadrin, N. V. (Eds.), *The Black Sea microalgae: problems of biodiversity preservation and biotechnological usage* (pp.5-18). Sevastopol: ECOSI- Gidrofizika.
- Shadrin, N.V y Anufrieva, E.V. (2013). Dependence of Arctodiaptomus salinus (Calanoida, Copepoda) halotolerance on exoosmolytes: new data and a hypothesis. *Journal of Mediterranean Ecology*, 12, 21-26.
- Shadrin, N.V. y Solokhina, E.V. (1991). Variability of the degree of sexual dimorphism of the body length in population of *Pseudocalanus minutus* (Kroyer, 1848) Copepoda, Calanidae in the Avachinian Inlet (Kamchatka). *Ekologiya Morya*, 37, 62-64.
- Sieber, K.P. y Rembold, H. (1983). The effects of azadirachtin on the endocrine control of moulting in *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.*, 29, 523–527.
- Stark, J.D. (2001). Population-level effects of the neem insecticide, Neemix, on *Daphnia pulex*. *J. Environ. Sci. Health B*, 36, 457–465.
- Stottrup, J.G. y Norsker, N.H. (1997). Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 155, 231-247.
- Thompson, D.G., Kreutzweiser, D.P., Staznik, B., Chartrand, D. y Capell, S.S. (2002). Fate and persistence of azadirachtin A following applications to mesocosms in a small forest lake. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 69, 250–256.
- Viñuela, E., Adan, A., González, M., Smagghe, G. y Del Estal, P. (1998). Spinosad y azadiractina: efectos de dos plaguicidas de origen natural en el chinche depredador *Podisus maculiventris* (Say) (Hemiptera: Pentatomidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, 24, 57-66.
- Viñuela, E., Adan, A., González, M., Budía, F., Smagghe, G. y Del Estal, P. (1997). Spinosad y azadiractina: efectos de dos plaguicidas naturales hacia

Podisus maculiventris (Say) (Hemiptera: Pentatomidae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 24 (1), 57-66.

- Voordouw, M. J., Robinson, H. E. y Anholt, B. R. (2005). Paternal inheritance of the primary sex ratio in a copepod. *J. Evol. Biol.*, 18, 1304–1314.
- Wan, M.T., Watts, R.G., Isman, M.B. y Strub, R., (1996). Evaluation of the acute toxicity to juvenile Pacific Northwest salmon of azadirachtin, neem extract, and neem-based products. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 56, 432–439.
- Yadav, I. C., Devi, N. L., Syed, J. H., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G. y Jones, K. C. (2015). Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: a comprehensive review of India. *Sci. Total Environ*, 511, 123–137.
- Zamora, M., Martínez, A., Nieto, M., Schneider, M., Figueroa, J. y Pineda, S. (2008). Actividad de algunos insecticidas biorracionales contra el gusano cogollero. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31 (4), 351-357.
- Zebitz, C.P.W. (1987). Potential of neem seed kernel extracts in mosquito control. En Schmutterer, H. y Ascher, K.R.S. (Eds.), *Proceedings of the 3rd International Neem Conference: Natural Pesticides from the Neem Tree (Azadirachta indica A. Juss) and Other Plants* (pp. 537–555). Eschborn: GTZ.