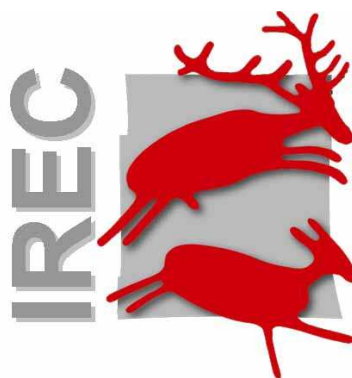


Identificación y cuantificación de los efectos de los plaguicidas agrícolas en la perdiz roja en España



Informe correspondiente al tercer periodo de ejecución
Marzo 2012 – Marzo 2013



Ciudad Real, Julio 2013

CONTENIDOS

Datos sobre el proyecto	3
Antecedentes	4
Objetivos y justificación	8
Metodología	10
Resultados	16
Conclusión	24
Difusión de resultados y perspectivas futuras	26
Referencias	28

DATOS SOBRE EL PROYECTO

Título del proyecto

Identificación y cuantificación de los efectos de los plaguicidas agrícolas en la perdiz roja en España

Institución ejecutora

Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC-UCLM-JCCM)

Financiación

Fundación para el Estudio y Defensa de la Naturaleza y La Caza (FEDENCA)

Investigador principal

Rafael Mateo Soria, Profesor Titular de Universidad

Investigadores participantes

François Mougeot, Científico Titular

Manuel Ortiz Santaliesra, Investigador Postdoctoral

Ana López-Antia, Becaria Predoctoral

ANTECEDENTES

Las aves de ambientes agrícolas han experimentado un declive pronunciado en Europa occidental desde hace ya varias décadas. Diversos estudios realizados en Reino Unido sobre una especie cinegética como es la perdiz pardilla (*Perdix perdix*) ya indicaban hace años que los cambios experimentados en la agricultura en la segunda mitad del siglo XX habían producido una disminución significativa de la abundancia de la especie. Tanto el número de aves cazadas cada año como los censos realizados en primavera mostraban idénticas tendencias (Sotherton, 1998; Greenwood, 2003). Esta misma tendencia ha sido observada en otras especies no cinegéticas que habitan ambientes agrícolas como la avefría (*Vanellus vanellus*), la alondra común (*Alauda arvensis*), la calandria (*Melanocorypha calandra*) o el sisón común (*Tetrax tetrax*) (Salamaolard & Moreau, 1999; Brickle *et al.* 2000; Sheldon *et al.*, 2004; EBCC, 2009). En el caso de la perdiz roja (*Alectoris rufa*), la tendencia de las poblaciones naturales es difícil de establecer debido a las numerosas sueltas de perdices de granja que dificultan la tarea de realizar seguimientos fiables de la evolución de los tamaños de población, pero la sensación generalizada es que cada vez son más escasas las perdices rojas salvajes en nuestros campos (Blanco-Aguilar *et al.*, 2003).

Estas tendencias negativas asociadas a las aves que viven en ambientes agrícolas contrastan con lo observado para otras especies de aves como por ejemplo las forestales, cuyas poblaciones en Europa se han mantenido relativamente estables durante las últimas décadas (Greenwood, 2003; SEO/BirdLife 2010). Así, dado que la intensificación agrícola es el nexo de unión de entre todas las especies cuyas poblaciones están en declive, todos los datos existentes indican que dicha intensificación estaría teniendo un impacto negativo en las especies de aves de medios agrícolas.

La transformación del medio es el principal impacto de la intensificación agrícola sobre las comunidades de aves; la modificación de los terrenos para su uso agrícola conlleva una reducción en la diversidad de hábitats (y en consecuencia, de la biodiversidad asociada a estos hábitats), disminución de los recursos alimenticios, pérdida de zonas de cría y refugios, etc. Sin embargo, uno de los impactos asociados a la actividad agrícola cuya importancia a este nivel ha adquirido niveles considerables es el uso de productos fitosanitarios (ver revisión en López-Antia *et al.*, 2011).

El efecto principal e inmediato del uso de fitosanitarios es debido a su capacidad para reducir la disponibilidad de alimentos para las aves o para sus presas. En este sentido, estudios llevados a cabo en el Reino Unido han demostrado que el control en la aplicación de plaguicidas sobre campos de cereal conllevaba un aumento significativo del éxito reproductor de la perdiz pardilla y la supervivencia de los pollos se incrementaba por encima de los valores mínimos que asegurarían el mantenimiento de la población. Por el contrario, en campos con un tratamiento convencional con fitosanitarios, el éxito reproductor y la supervivencia de los pollos serían demasiado bajos como para asegurar la estabilidad de las poblaciones (Rands, 1985).

Aparte de los efectos sobre la disponibilidad de alimento, los plaguicidas usados en la agricultura pueden producir efectos adversos en las aves actuando de diferentes maneras. Por ejemplo, los insecticidas organofosforados y carbamatos o los rodenticidas anticoagulantes presentan una elevada toxicidad aguda, causando efectos inmediatos tras periodos cortos de exposición. Por otra parte, los insecticidas organoclorados afectan de forma muy clara al éxito reproductor de las aves al alterar la formación de la cáscara de los huevos (Mateo *et al.*, 2000; Mañosa *et al.*, 2003). Hoy en día, aunque la mayoría de insecticidas organoclorados han sido prohibidos en España, existen otros muchos compuestos en uso de diversas familias químicas de los que se ha reconocido su actividad como disruptores endocrinos con efectos adversos sobre el sistema hormonal y alteradores de la capacidad reproductiva.

Una serie de productos fitosanitarios de diferentes tipos se utilizan para lo que se conoce como blindaje de semillas. El blindaje de semillas consiste en tratar las simientes de cereal antes de su siembra con compuestos químicos para evitar infecciones por hongos, parásitos y el ataque de los insectos del suelo. Muchas aves granívoras en determinados momentos del año pueden basar su alimentación en el consumo de semillas que, durante el proceso de siembra, no penetran lo suficiente en el suelo. En algunos casos, además, el consumo de semillas puede verse puntualmente estimulado por la falta de otros tipos de alimento. Un ejemplo lo encontramos en el caso de los gansos piquicorto (*Anser brachyrhynchus*) y común (*Anser anser*) que invernán en Escocia y las semillas tratadas con carbofenotion. Los gansos no suelen acceder a estas semillas pero de 1971 a 1975 se registraron 1492 muertes de estas especies por la ingestión de simiente tratada con el organofosforado. Factores como la escasez de su alimento habitual, el derrame de semillas que las hace más accesibles o la mayor

humedad en el suelo que hace más fácil arrancar las semillas recién germinadas consiguieron que en pocos años desapareciera una parte significativa de la población mundial de estas especies (Stanley & Bunyan, 1979).

Tabla 1: Listado de productos fitosanitarios registrados por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente para el tratamiento de simiente de cereal (actualizado en Julio de 2013).

Producto o mezcla	Uso	Arroz	Avena	Cebada	Centeno	Trigo	Sorgo	Maíz	Girasol
Difenoconazol	Fungicida	-	-	+	-	+	-	-	-
Fludioxonil	Fungicida	-	-	+	-	+	-	+	-
Fludioxonil + metalaxil	Fungicida	-	-	-	-	-	-	+	-
Flutriafol	Fungicida	-	-	+	-	+	-	-	-
Flutriafol + maneb	Fungicida	-	-	+	-	+	-	-	-
Himexazol	Fungicida	+	-	+	-	+	-	+	-
Mancozeb	Fungicida	-	+	+	+	+	+	-	-
Maneb	Fungicida	-	+	+	-	+	+	+	-
Metalaxil	Fungicida	-	-	-	-	-	-	-	+
Oxicloruro de cobre	Fungicida	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Fungicida	-	-	+	-	-	-	-	-
Tebuconazol	Fungicida	-	+	+	+	+	-	-	-
Tiram	Fungicida	-	+	+	+	+	+	-	+
Triticonazol	Fungicida	-	-	+	-	+	-	-	-
Clotianidina	Insecticida	-	-	-	-	-	-	+	-
Fipronilo	Insecticida	-	-	-	-	-	-	+	+
Imidacloprid	Insecticida	-	+	+	+	+	+	+	-
Tiametoxam	Insecticida	-	-	-	-	-	-	+	-

En la actualidad, según el registro de productos fitosanitarios del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente se utilizan para el tratamiento de semilla de siembra de cereales un total de 18 compuestos o mezclas diferentes (incluyendo en total 16 principios activos) de los cuales 14 son fungicidas y los cuatro restantes son

insecticidas (Tabla 1), si bien es preciso destacar que según el Reglamento de la Comisión Europea 485/2013 publicado el pasado 24 de mayo, el uso de clotianidina, imidacloprid y tiametoxam para el blindaje de semillas debe ser prohibido en todos los estados miembros antes del próximo mes de septiembre.

Durante el periodo de siembra del cereal, en otoño, las aves presentes en ambientes agrícolas consumen las semillas que, durante la siembra, no penetran lo suficiente en el suelo. Dada la escasez de grano y otros recursos alimenticios durante esa época del año, las semillas de siembra pueden constituir un porcentaje muy elevado de la dieta de estos animales. Hasta ahora, los efectos sobre las perdices y otras aves agrícolas que consumen semillas tratadas con fungicidas o insecticidas han permanecido casi desconocidos. La ingesta de estas semillas, dependiendo del tipo de compuesto y la dosis con que hayan sido tratadas así como de la cantidad ingerida, podría acarrear consecuencias graves, desde la pérdida de condición corporal, pasando por la alteración del metabolismo, la disrupción del sistema endocrino o la disminución de la eficacia de la respuesta inmunológica, hasta llegar a la reducción del éxito reproductor o incluso la muerte del individuo.

Durante los dos primeros años del presente estudio hemos analizado la toxicidad de ocho productos fitosanitarios utilizados para el tratamiento de semillas, encontrando en algunos casos que el consumo de simiente de trigo tratada con la dosis recomendada para el blindaje de semillas producía efectos adversos severos tanto en las perdices adultas expuestas como en su descendencia (López-Antia *et al.*, 2013). Sin embargo, para conocer el riesgo real que supone el tratamiento de semillas con plaguicidas no basta con determinar el efecto que tiene el consumo de éstas por parte de las perdices, sino también conocer la probabilidad de que, en condiciones naturales, las semillas tratadas puedan ser ingeridas por las aves. En este sentido, es importante determinar la aceptación de las semillas por parte de las perdices ya que, de existir un rechazo del alimento tratado, el riesgo de exposición, y por tanto de intoxicación, se reduciría significativamente. El rechazo del alimento podría originarse de dos maneras; en primer lugar, podría existir un rechazo directo como consecuencia de las sabor, olor o color de las semillas (Avery, 1984; Luttik, 1998; Tucker, 1965), en cuyo caso el alimento sería rechazado antes de poder causar ningún efecto tóxico; sin embargo, el rechazo también puede producirse como consecuencia de un problema de salud causado por una intoxicación subletal (Avery *et al.*, 1997; Blackwell *et al.*, 2001; EFSA, 2009) tras la

ingesta de una cierta cantidad de semillas tratadas. Es por tanto fundamental conocer la conducta de las perdices frente a las semillas tratadas para poder determinar con precisión el riesgo de ingestión y, por lo tanto, de intoxicación.

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

Con este proyecto queremos identificar el riesgo que las semillas tratadas con pesticidas pueden constituir para las poblaciones de perdiz roja (*Alectoris rufa*). El principal núcleo de trabajo del proyecto consiste en la evaluación experimental de los posibles efectos adversos de la ingestión de semillas tratadas con compuestos fitosanitarios sobre la salud de las perdices, utilizando la misma vía de exposición que existe en el medio natural, es decir, los fitosanitarios son aplicados sobre semillas de trigo o maíz que posteriormente se administran a las perdices como alimento. Con el fin de identificar los efectos de cada plaguicida individualmente, se utiliza grano tratado con un solo plaguicida, si bien en el campo pueden estar utilizándose mezclas de un fungicida y un insecticida y por lo tanto existir sinergias entre ellos.

Para el conjunto de los tres años de duración prevista del proyecto, pretendíamos centrar el estudio en nueve compuestos utilizados para el tratamiento de simiente de cereales (avena, cebada, maíz y trigo), seleccionando del total de productos aprobados por el MAGRAMA para este uso (Tabla 1) aquellos que son más susceptibles de causar efectos a nivel poblacional, bien al actuar como disruptores endocrinos, afectando por tanto a la reproducción, bien al deprimir el sistema inmune facilitando así el desarrollo de enfermedades que en última instancia puede desembocar en epidemias, o bien por ser de mayor toxicidad aguda y por lo tanto capaces de producir la muerte directa de las aves. En este sentido, durante el tercer año de estudio hemos completado esta evaluación analizando la toxicidad del último de los productos seleccionados, el insecticida fipronilo.

Por otra parte, la evaluación del riesgo asociado al uso de semillas blindadas se ha completado con una caracterización de la exposición, ya que de no existir una exposición real de las perdices a las semillas tratadas, la identificación de los efectos adversos carecería de relevancia. La evaluación de la exposición se ha llevado a cabo

mediante dos aproximaciones; en primer lugar, se han analizado los contenidos de buches y mollejas de varias perdices cazadas en diferentes lugares del territorio español con el fin de comprobar la posible ingesta de semillas blindadas. En segundo lugar, se han llevado a cabo una serie de ensayos para determinar la conducta de rechazo de las semillas blindadas con diferentes compuestos por parte de las perdices. Además, se analizó el posible efecto del rechazo visual de la semilla coloreada con el pigmento más utilizado a este fin, rodamina B. La conducta de selección de alimento se evaluó mediante dos diseños experimentales diferentes con el fin de analizar, por un lado, el posible rechazo de la semilla tratada, y por otro, el impacto sobre dicha conducta de diferentes escenarios en los que varía la impredecibilidad de la disponibilidad de alimento

METODOLOGÍA

1) Evaluación de efectos del fipronilo

El fipronilo es un insecticida utilizado en el tratamiento de la semilla de maíz, por lo que, a diferencia del resto de los productos analizados durante los primeros años del presente proyecto, su uso sucede mayoritariamente durante la primavera. Así, en la primavera de 2012 adquirimos las semillas tratadas directamente con el insecticida (Regent TS®, Basf Crop Protection; contenido 50% de fipronilo p/v, 500 cc / 100 kg semillas), además de semillas de maíz sin tratar.

El experimento consistió en dos tratamientos, un control en el que las perdices eran alimentadas únicamente con semillas sin tratar, y un tratamiento experimental en el que las perdices eran alimentadas con una mezcla de semillas tratadas (20%) y sin tratar (80%). Esta mezcla se eligió con base al consumo medio de semillas blindadas descrito para la perdiz roja (Pérez y Pérez, 1981).

Se emplearon 26 parejas de perdices adultas (N = 13 parejas por tratamiento), todas ellas de un año de edad, adquiridas al Grupo Altube. La exposición de las perdices se llevó a cabo en las instalaciones existentes en la finca Dehesa de Galiana para la cría de esta especie (Fig. 1). Todas las perdices se midieron (longitud del tarso) y pesaron antes de comenzar el experimento. La exposición se prolongó durante 10 días en el mes de abril.



Figura 1: Parque para la cría de perdices en la finca Dehesa de Galiana.

Se analizaron las siguientes variables:

a) Mortalidad. Se anotó el día exacto de la muerte y se practicó una necropsia a cada una de las perdices que murieron tanto durante los periodos de exposición, como durante los periodos posteriores.

b) Biometría. Uno de los primeros efectos subletales que aparecen como consecuencia de la exposición a un tóxico es la pérdida de peso, la cual puede venir motivada por dos razones no excluyentes; por un lado, los animales podrían perder el apetito y rechazar el alimento al sentirse enfermos; por otro lado, los procesos que se desencadenan en el organismo para metabolizar y eliminar las sustancias tóxicas (lo que se conoce como detoxificación) requieren un gasto energético que, si no se compensa con una mayor ingesta de alimento, termina por reflejarse en una pérdida de peso. El balance energético es algo fundamental porque nos indica que la energía que el animal emplea en la detoxificación no puede ser empleada en otros procesos fundamentales como la reproducción o la respuesta inmune.

Además de la longitud del tarso y la masa corporal tomados antes del inicio de la exposición, todas las perdices se pesaron nuevamente en el momento de finalizar cada periodo de exposición. El índice de masa corporal se calculó en cada caso como el cociente entre la masa y el cuadrado de la longitud del tarso.

c) Ornamentación. Como cualquier coloración u ornamentación que depende de los carotenoides, la intensidad de la coloración del pico y el anillo ocular así como el porcentaje de pigmentación del anillo ocular, constituyen medidas indirectas de la condición del individuo. Se midió la coloración del pico y anillo ocular de todos los animales tanto antes de la exposición a los plaguicidas como una vez finalizada ésta mediante un espectrofotómetro portátil. Los resultados correspondientes esta variable no han sido analizados en el momento de redacción del presente informe.

d) Respuesta inmune celular. La respuesta inmune celular depende de los linfocitos T, los cuales son atraídos hacia el lugar donde aparece un antígeno (bacteria, virus, etc...) gracias a la acción de unas sustancias llamadas citoquinas que producen una inflamación localizada en la zona de infección. Mediante la aplicación intencionada

de un antígeno, esta inflamación puede cuantificarse y conocer así la capacidad del organismo de desarrollar una respuesta inmune celular.

Para el análisis de la respuesta inmune celular, utilizamos la prueba de la fitohemaglutinina (PHA), que consiste en la inyección de 100 µl de una dilución 1:10 de esta proteína de origen vegetal en el patagio de una de las alas. La PHA actúa como un antígeno, desencadenando una respuesta inmune celular que se manifiesta externamente en una inflamación del área en la que se inyectó la PHA. Utilizando un calibre de espesor, se midió el grosor del patagio antes de la inyección; 24 horas después (cuando se supone que la inflamación ha alcanzado su máximo nivel), se volvió a medir la misma zona, anotándose el grado de inflamación. La inyección de la PHA se llevó a cabo 10 días después de la finalización de la exposición.

e) Reproducción. Los huevos se recogieron diariamente y se fueron introduciendo en incubadoras por tandas cada 15 días, manteniéndose en una cámara fría mientras esperaban a entrar en la incubadora. Tras tres semanas de incubación, se realizaba una prueba de luz con el fin de observar si el feto había crecido en el interior del huevo. En el caso de que así fuera, el huevo era introducido en una jaula individual convenientemente etiquetada la cual, a su vez, pasaba a una cámara de nacimientos. Los efectos de los plaguicidas administrados a las perdices adultas sobre su reproducción y el crecimiento de sus pollos (que, recordemos, nunca fueron expuestos directamente a los plaguicidas) se analizaron mediante diferentes variables:

- Tamaño y masa de los huevos.
- Tasas de fecundación de los huevos: para calcular dichas tasas, aquellos huevos en los que el embrión no se desarrolló fueron abiertos para comprobar la presencia o no de disco germinal, indicador del carácter fecundado del huevo.
- Tasa de eclosión de los huevos relativa al número de huevos fecundados.

f) Consumo de semillas tratadas. Durante el experimento se pesó el alimento suministrado a cada pareja de perdices al iniciarse la exposición y el que quedó en las tolvas una vez éstas fueron retiradas al finalizar la exposición; del mismo modo, se colocaron bolsas debajo de las jaulas para recoger el maíz que pudiesen tirar las perdices

y ajustar así de la manera lo más precisa posible la cantidad de alimento consumido en cada caso.

Análisis de datos

Las tasas de mortalidad acumuladas se compararon mediante un test de Mantel Cox utilizando el estadígrafo de chi-cuadrado. Del mismo modo, las tasas de fecundación y eclosión se compararon entre tratamientos utilizando un modelo lineal generalizado (GLMZ) con una distribución binomial de la variable dependiente, e introduciendo la condición corporal de la madre como covariable. El resto de las variables se transformaron logarítmicamente y se analizaron mediante modelos lineales generales (GLM) introduciendo el tratamiento como factor fijo.

2) Presencia de plaguicidas en buches y mollejas

Analizamos contenidos de buches y mollejas proporcionados por cazadores en diferentes zonas de España. En la Tabla 2 se detalla el número de muestras analizadas y su procedencia.

Tabla 2: Número y procedencia de los buches y mollejas analizados.

Zona	Nº muestras
Lleida	26
Madrid – Toledo	23
Murcia	52
Soria	7
Valladolid	81
TOTAL	189

Los plaguicidas presentes en las muestras fueron extraídos con acetonitrilo, tras mezcla, sonicado y filtrado de la muestra. Las extracciones se analizaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas. Los compuestos para los que se puso a punto la técnica analítica incluyeron ocho

ingredientes activos de los permitidos para el tratamiento de semillas de cereal, los insecticidas fipronilo e imidacloprid, y los fungicidas difenoconazol, fludioxonil, flutriafol, tebuconazol, tiram y triticonazol. También se analizó la presencia de butóxido de piperonilo, presente en los insecticidas a base de piretrinas naturales utilizados para el tratamiento de semillas en almacenamiento. Por último, se incluyeron en la analítica dos insecticidas de la familia de los carbamatos, aldicarb y oxamilo, que no se utilizan en el blindaje de semillas.

3) Conducta de rechazo de semillas tratadas

Preparamos dos diseños experimentales diferentes. Por un lado, un diseño para evaluar la conducta de rechazo mostrada por las perdices, y por otro lado, un diseño para analizar como el incremento de la impredecibilidad en la localización del alimento tratado y sin tratar podía afectar en la conducta de selección mostrada por las perdices.

Diseño experimental 1

Analizamos dos insecticidas (imidacloprid y piretrinas naturales) y dos fungicidas (tiram y maneb), además del pigmento rodamina B. Se utilizaron los siguientes preparados comerciales y dosis de aplicación, que corresponden a las recomendadas para el tratamiento de semillas:

- Escocet (Bayer CropScience): 35% imidacloprid. Registro de Productos Fitosanitarios 19.188. Dosis de aplicación: 200 ml imidacloprid (35%) / 100 kg semillas (concentración teórica: 0,7 mg/g).
- Granet-L (Comercial Química Massó): 5% Piretrinas (extracto de pelitre). Registro de Productos Fitosanitarios 16.194). Dosis de aplicación: 150 g piretrinas / 100 kg semillas (concentración teórica: 0,003 µg/g).
- Pormasol Forte (Bayer CropScience): 80% tiram. Registro de Productos Fitosanitarios 12.005/11. Dosis de aplicación: 350 ml tiram (50%) / 100 kg semillas (concentración teórica: 1,75 mg/g).

- Sembral Maneb (Cequisa): 40% maneb. Registro de Productos Fitosanitarios 15.476. Dosis de aplicación: 350 ml maneb (40%) / 100 kg semillas (concentración teórica: 1,4 mg/g).
- Rodamina B: proporcionada por el centro de investigación de semillas de Ciudad Real. Dosis de aplicación: 0,13 ml / kg semillas.

Las perdices se alojaron por pares en aviarios exteriores (3 x 3 x 2 m), donde se mantuvieron durante tres días para aclimatación. Cada uno de los cinco ensayos (correspondientes a las cinco sustancias químicas testadas), contó con 24 parejas que se dividieron en 4 grupos experimentales (N = 6 parejas por tratamiento):

- Grupo limpio: perdices alimentadas únicamente con trigo sin tratar.
- Grupo tratado: perdices alimentadas únicamente con trigo tratado.
- Grupo elección sin cambio de posición: perdices a las que se les ofreció tanto trigo tratado como trigo sin tratar, encontrándose siempre cada tipo de trigo en el mismo lugar.
- Grupo elección con cambio de posición: perdices a las que se les ofreció tanto trigo tratado como trigo sin tratar, modificándose cada día la posición de los comederos de cada tipo de trigo.

Diariamente se cuantificó el trigo de cada tipo consumido por las perdices mediante el peso de los remanentes. Los experimentos se prolongaron durante cuatro días.

Analizamos el consumo total, el consumo de trigo tratado y, en los grupos con elección, el porcentaje de trigo tratado consumido. Para los dos primeros análisis realizamos modelos lineales generales con el tratamiento como factor fijo, mientras que la última variable se analizó mediante pruebas t para datos pareados.

Diseño experimental 2

Este diseño experimental se llevó a cabo únicamente con imidacloprid. Utilizando los mismos aviarios que en el diseño anterior, alojamos 24 parejas que fueron asignadas a cada uno de los cuatro tratamientos, correspondientes a aviarios con 2, 4, 8 ó 16 comederos (N = 6 parejas por tratamiento). Tras la aclimatación, en cada aviario se añadió la misma cantidad de semillas tratadas y sin tratar (50 g de cada tipo), pero

repartida entre el número correspondiente de comederos. Tras 27 horas, se analizó la cantidad de trigo de cada tipo consumido por las perdices.

Analizamos el porcentaje y la cantidad total de trigo tratado consumido y comparamos ambas variables mediante un GLM con el número de comederos como factor fijo.

RESULTADOS

1) Evaluación de efectos del fipronilo

a) Mortalidad. Ningún control murió durante el experimento, mientras que un 20% de las perdices expuestas al fipronilo causaron baja durante el periodo de exposición (Fig. 2) mostrándose esta tasa de mortalidad marginalmente significativa ($p = 0,08$).

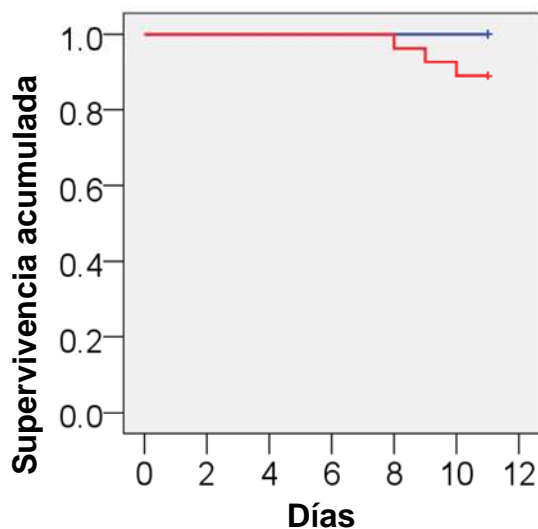


Figura 2: Evolución de la supervivencia en cada uno de los tratamientos de exposición al fipronilo. Línea azul: controles; línea roja: perdices expuestas.

b) Biometría. La exposición al fipronilo redujo la condición corporal en un 19.6% respecto de los controles (Fig. 3; $p < 0,001$).

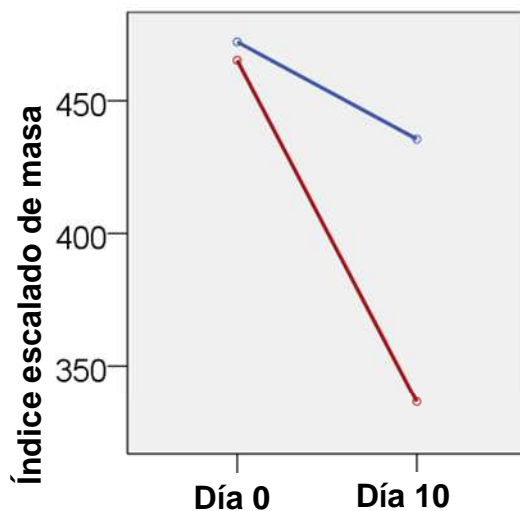


Figura 3: Evolución del índice de masa corporal por tratamiento. Línea azul: controles; línea roja: perdices expuestas.

c) Ornamentación. El porcentaje de pigmentación por carotenoides de la región periocular resultó significativamente menor en perdices expuestas al fipronilo que en perdices control (Fig. 4; $p < 0,001$).

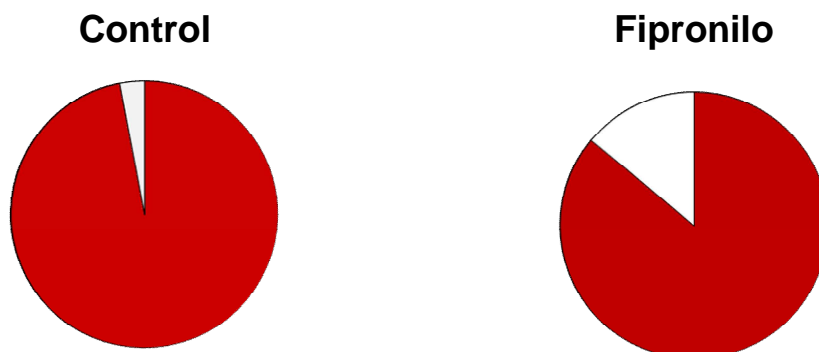


Figura 4: Porcentajes de pigmentación de la región periocular por tratamiento.

d) Respuesta inmune celular. La administración de semillas tratadas con fipronilo causó una disminución de la capacidad para desarrollar una respuesta inmune celular (Fig. 5). Resulta especialmente interesante que fueran únicamente los machos los que sufrieran el efecto inmunosupresor del insecticida, tal vez relacionado con el mayor esfuerzo realizado por los machos durante las semanas previas a la reproducción, periodo en el que sus reservas energéticas se dirijan preferentemente al desarrollo de exhibiciones nupciales, comprometiendo así otras funciones vitales.

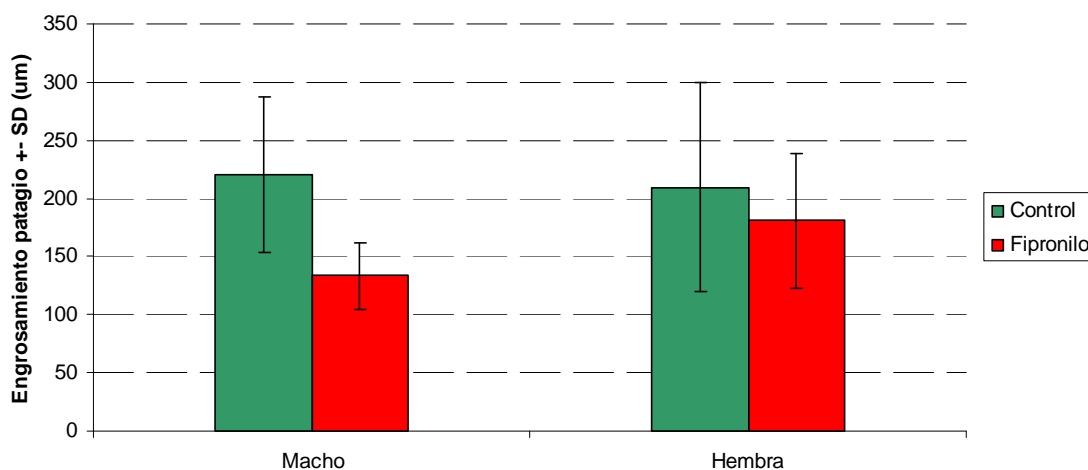


Figura 5: medida de la respuesta inmune celular, en términos de inflamación del patagio 24 h después de la inyección de PHA, en el ensayo correspondiente al fipronilo. Se muestran los resultados por sexo para reseñan las diferencias entre ambos en esta respuesta particular.

e) Reproducción. La exposición al fipronilo motivó una reducción en la tasa de fecundación de los huevos al compararla con el grupo control (Fig. 6; $p < 0.001$). Curiosamente, los huevos puestos por las hembras expuestas al insecticida fueron más pesados que los puestos por las hembras control (Fig. 7; $p = 0.004$).

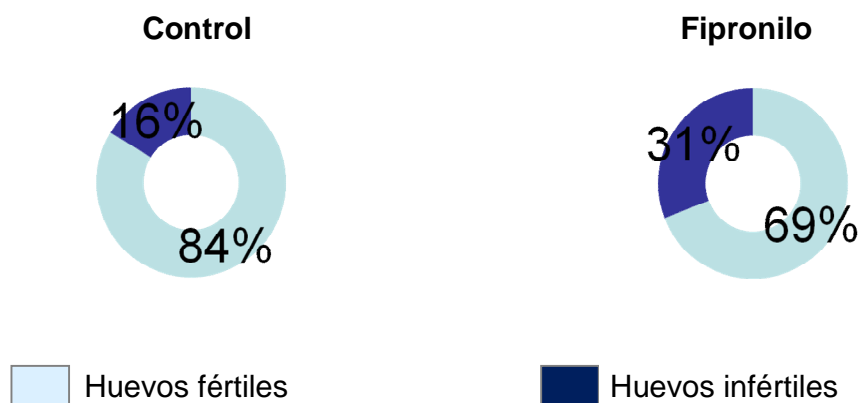


Figura 6: tasas de fecundación de huevos por tratamiento.

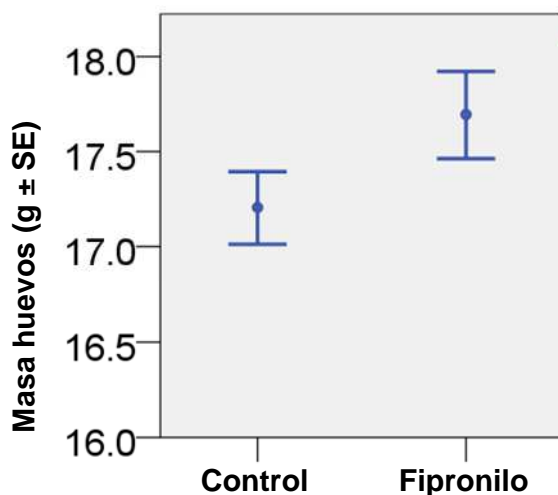


Figura 7: peso medio de los huevos por tratamiento.

f) Consumo de semillas tratadas. Durante el experimento observamos una reducción significativa en la ingesta de semillas por parte de aquellas perdices a las que se les suministró la mezcla con fipronilo (ingesta diaria por individuo = $9,7 \pm 5,7$ g) en comparación con los controles (ingesta diaria por individuo = $32,1 \pm 11,8$ g). Además, entre las perdices expuestas al fipronilo, el porcentaje promedio de semilla tratada

ingerida fue del 15,9%, cuando en la mezcla suministrada dicho porcentaje era del 20% (Fig. 8); esto indicaría una cierta capacidad de selección por parte de las perdices de las semillas no tratadas respecto de las tratadas con fipronilo. Sin embargo, un análisis más detallado de estos datos muestra una realidad diferente; una de las 13 parejas expuestas mostró una reducción evidente en el consumo de semillas, registrándose un consumo medio diario por individuo inferior a un gramo de maíz (lo que, en esencia, se puede considerar anorexia estricta); entre las pocas semillas consumidas por esa pareja se contabilizó un 79% de semilla tratada, si bien en términos absolutos estamos hablando de una cantidad muy pequeña. Si esa pareja se elimina del cómputo global de consumo de semilla tratada, el porcentaje medio baja hasta el 10.1%, claramente inferior al 20% proporcionado originalmente. De este modo, existe una clara tendencia hacia el rechazo de la semilla tratada con fipronilo que se manifiesta, por una parte, en una selección activa de la semilla sin tratar, y por otra, en una reducción significativa de la ingesta diaria de semillas.

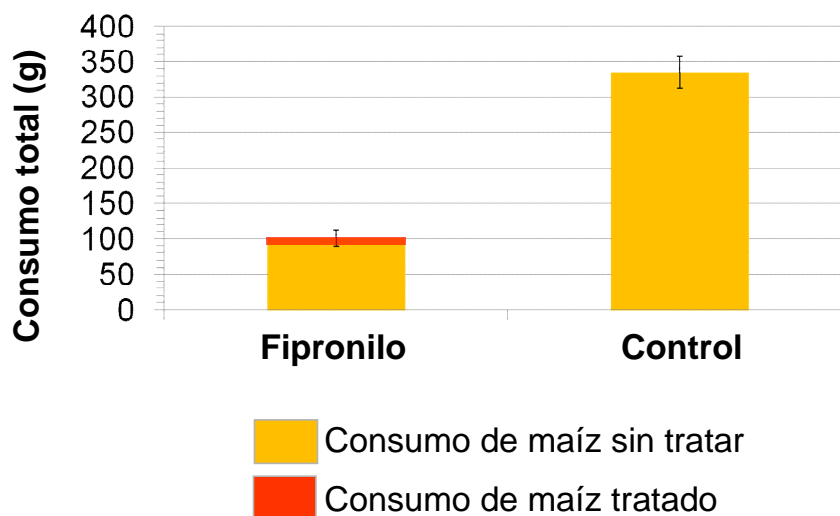


Figura 8: consumo de cada tipo de semilla de maíz (tratada o sin tratar) por tratamiento a lo largo de los 10 días de exposición.

2) *Presencia de plaguicidas en buches y mollejas*

Los resultados de los análisis se resumen en la Tabla 3. En las muestras de contenido de buche y/o molleja se detectaron 9 de los 11 principios activos para los que se puso a punto la técnica analítica. Los dos productos no detectados fueron

precisamente los insecticidas que no se utilizan para el blindaje de semillas. El tebuconazol fue el plaguicida más frecuentemente encontrado en las muestras analizadas. Si realizamos una comparación de los niveles de los diferentes plaguicidas detectados en buches y mollejas con las concentraciones esperadas en las semillas tratadas (estimadas a partir de las dosis de aplicación recomendadas), resulta llamativo que el único producto que apareció en los contenidos digestivos en concentraciones superiores a las esperadas fue el butóxido de piperonilo. Este compuesto, presente en los insecticidas a base de piretrinas naturales, no está específicamente recomendado para el blindaje de semillas, sino para el tratamiento de la semilla almacenada. Para el resto de plaguicidas, los niveles detectados en buches y mollejas estuvieron muy por debajo de las concentraciones esperadas en las semillas tras su tratamiento.

Tabla 3: resultados de los análisis de los contenidos de buches y mollejas en perdices cazadas procedentes de diversas regiones de España.

Producto	% positivos			Media (µg/g)	Máxima (µg/g)	Dosis aplicación (µg/g)*	Regiones				
	Total	Buche	Molleja				M-TO	LL	MU	SO	VA
Imidacloprid	3,1	0,5	2,6	0,08163	0,10427	700	+		+		+
Flutriafol	2,1	0,0	2,1	0,03489	0,04654	62,5			+		+
Tiram	1,0	0,5	0,5	0,17756	0,26064	1750			+		+
Triticonazol	5,7	3,1	2,6	0,00982	0,01458	50	+	+			+
Tebuconazol	19,1	12,9	11,3	0,35083	9,31300	37,5		+			+
Difenoconazol	2,1	1,5	0,5	1,03848	3,79056	60		+	+	+	+
Butóxido de piperonilo	1,0	0,5	0,5	0,13865	0,30291	0,03			+	+	
Fipronilo	0,5	0,5	0,5	0,00412	0,00679	2500					+
Fludioxonil	1,0	1,0	0,0	0,02991	0,04565	20		+			+

*Dosis máxima posible siguiendo las recomendaciones para el tratamiento de semilla de cereal.

3) Conducta de rechazo de semillas tratadas

Imidacloprid

En el diseño experimental 1, la ingestión total de alimento fue un 83-85% menor en el grupo tratado que en el resto de grupos ($p < 0,001$; Tabla 4). Las perdices de los grupos con elección seleccionaron claramente el trigo tratado (para ambos grupos: $p \leq 0,005$) y consumieron menos trigo tratado que las perdices que no pudieron elegir ($p <$

0,001; Tabla 4). El cambio diario en la ubicación del trigo tratado y sin tratar no afectó a la cantidad o proporción de trigo tratado consumido. El consumo de trigo tratado en los grupos con elección disminuyó significativamente durante el experimento ($p < 0,001$). Las únicas tres perdices que murieron durante los ensayos de conducta correspondieron a este experimento: dos hembras del grupo tratado que murieron los días primero y tercero de experimento, y un macho del grupo elección con cambio de posición que murió el cuarto día de experimento. Las tres perdices mostraron el intestino distendido y concentraciones de imidacloprid en buche o molleja variando entre 0,6 y 3,5 $\mu\text{g/g}$. A pesar de estas bajas, el análisis de la supervivencia entre grupos experimentales no resultó significativo.

Tabla 4: consumo de trigo limpio (L) y tratado (T) en cada uno de los grupos experimentales de los ensayos de selección de alimento con cuatro fitosanitarios y el colorante rodamina B. Datos en gramos (media \pm error estándar).

Grupo experimental	Trigo	Imidacloprid	Piretrinas	Tiram	Maneb	Rodamina B
Limpio	L	169.1 \pm 31.2	257.4 \pm 32.1	197.7 \pm 17.4	159.4 \pm 17.7	151.02 \pm 24.4
Tratado	T	28.5 \pm 7.9	198.5 \pm 9.7	94.5 \pm 16.0	126.8 \pm 17.3	119.1 \pm 22.6
Elección sin cambio de posición	L	172.9 \pm 18.4	155.2 \pm 43.5	212.2 \pm 17.1	156.8 \pm 25.9	113.6 \pm 14.6
	T	6.2 \pm 1.9	136.1 \pm 37.7	2.2 \pm 1.8	16.0 \pm 11.7	21.6 \pm 10.7
Elección con cambio de posición	L	176.8 \pm 30.9	110.1 \pm 5.2	180.5 \pm 16.8	90.1 \pm 21.4	134.3 \pm 21.6
	T	7.0 \pm 3.0	104.8 \pm 15.4	6.8 \pm 4.5	31.2 \pm 17.1	24.6 \pm 8.0

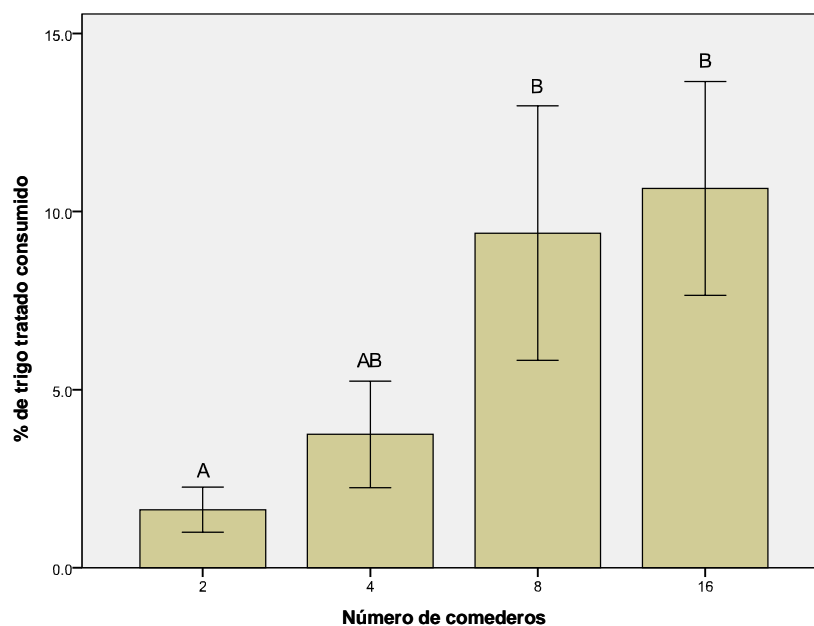


Figura 9: porcentaje medio (\pm error estándar) de la ingesta de trigo tratado respecto del total ingerido en función del número de comederos. Las letras definen grupos significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En cuanto al diseño experimental 2, el porcentaje de semillas tratadas ingerido aumentó significativamente con el incremento en el número de comederos ($p = 0,050$), es decir, con el incremento en la impredecibilidad de la localización de la comida tratada y sin tratar (Fig. 9). Las perdices en los aviarios con 16 comederos comieron alrededor de 3 veces más trigo tratado (7.00 ± 2.05 g) que las perdices en los aviarios con 4 comederos (2.33 ± 0.84 g, $p = 0,057$), y unas cinco veces más que las perdices en los aviarios con 2 comederos (1.33 ± 0.61 g, $p = 0,023$).

Piretrinas

El único efecto destacable hallado en este ensayo fue el mayor consumo de trigo tratado en el grupo tratado que los grupos con posibilidad de elección ($p = 0,009$; Tabla 4). No hubo diferencias en el consumo total ni, cuando las perdices pudieron elegir, en el porcentaje de trigo tratado consumido.

Tiram

La ingesta total de alimento fue menor (51-56%) en el grupo tratado que en el resto de grupos ($p < 0,001$; Tabla 4). Las aves que pudieron elegir seleccionaron claramente el trigo limpio (para ambos grupos $p \leq 0,001$) y comieron menos trigo tratado que las aves que no pudieron elegir ($p < 0,001$) (Tabla 4). Tampoco en este caso el cambio diario en la ubicación del trigo tratado y sin tratar afectó a la cantidad o proporción de trigo tratado consumido. El consumo de trigo tratado en el grupo sin posibilidad de elección se incrementó a medida que avanzó el experimento ($p = 0,001$).

Maneb

El consumo total de trigo no fue diferente entre los distintos grupos experimentales (Tabla 4). Las perdices que pudieron elegir comieron más trigo limpio que trigo tratado cuando no hubo cambio en la disposición de los comederos ($p = 0,012$), pero dicha elección no se observó al cambiar diariamente la ubicación de la comida tratada y sin tratar ($p = 0,116$). La cantidad de trigo tratado consumido fue mayor en el grupo tratado que en los grupos con posibilidad de elección ($p < 0,001$; Tabla 4). De un modo similar a lo sucedido con el tiram, el consumo de trigo tratado en el grupo sin posibilidad de elección se incrementó significativamente a partir del segundo día de experimento ($p < 0,001$).

Rodamina B

El consumo total de trigo no fue diferente entre los distintos grupos experimentales (Tabla 4). Las perdices que pudieron elegir comieron más trigo limpio que trigo coloreado (para ambos grupos: $p \leq 0,006$). El consumo de trigo coloreado fue mayor en el grupo tratado que en los grupos con posibilidad de elección ($p < 0,001$; Tabla 4). En los grupos tratado y elección con cambio de posición se produjo, al igual que se observó en algunos casos con los fungicidas, un incremento significativo del consumo de trigo coloreado a medida que avanzaba el experimento ($p < 0,001$).

CONCLUSIÓN

Los resultados del test de exposición al fipronilo revelan que el consumo de semillas de maíz tratadas con este insecticida puede producir efectos adversos severos en las perdices, incluyendo pérdida de la condición corporal, alteraciones en la ornamentación dependiente de los carotenoides, afectación de la respuesta inmune y reducción de las tasas de fecundación de los huevos. Estos resultados aparecen después de observarse un claro rechazo de la semilla tratada, si bien es cierto que dicho rechazo viene acompañado de un descenso en el consumo total de alimento, el cual podría estar detrás de algunos de los efectos observados.

Los efectos negativos del fipronilo se suman a los que, a lo largo del presente proyecto, hemos descrito para otros plaguicidas utilizados para el tratamiento de semillas, fundamentalmente imidacloprid y tiram. A este respecto, conviene recordar la reciente publicación del Reglamento 485/2013 de la Comisión Europea que prohíbe el uso del imidacloprid para el blindaje de semillas, y que será definitivo el próximo mes de septiembre. La prohibición del imidacloprid para el tratamiento de semillas es sin duda muy relevante en términos de protección de aves silvestres frente al riesgo de intoxicación por consumo de semillas blindadas. Sin embargo, el único insecticida que quedará provisionalmente aprobado para el tratamiento de semillas de cereal es precisamente el fipronilo, que como hemos demostrado tampoco parece la mejor alternativa. Recomendamos utilizar alternativas menos tóxicas como las piretrinas.

Como hemos demostrado en el ensayo de la conducta de las perdices, la mayoría de los productos fitosanitarios con que son tratadas las semillas generan un rechazo en las perdices. El origen de este rechazo puede estar en un efecto neofóbico del color o el olor, efecto que con el tiempo tiende a desaparecer al verse forzadas las perdices a consumir el alimento tratado, siempre y cuando no aparezcan efectos adversos como consecuencia de dicho consumo. Este efecto coincidiría con lo observado en nuestro estudio para el tiram, el maneb o el pigmento rodamina B. Por otra parte, el rechazo puede ser consecuencia de una intoxicación por el consumo de semillas, como parece suceder con el imidacloprid. Lo que resulta más significativo a la hora de valorar el riesgo de exposición de las perdices a los plaguicidas presentes en las semillas blindadas es que, ante escenarios de impredecibilidad en la presencia, disponibilidad y ubicación del alimento tratado y de las alternativas limpias, la conducta de rechazo que puedan

mostrar las aves no resulta tan efectiva. Estos escenarios de impredecibilidad, que son seguramente los más habituales en el campo, conducen por tanto a los animales a consumir semillas blindadas con mayor frecuencia. En cuanto a las piretrinas, que como hemos mencionado es el insecticida que recomendaríamos para el tratamiento de semillas, es cierto que no produjo ningún efecto de rechazo, con lo que la exposición sería potencialmente elevada; sin embargo, debemos destacar dos aspectos: por una parte, al ser un producto de baja toxicidad, el riesgo global se reduce incluso ante un hipotético escenario de no rechazo de la semilla tratada. Por otra parte, las semillas tratadas con piretrinas que empleamos en los ensayos no estaban coloreadas, ya que, al no emplearse las piretrinas para el blindaje de las semillas de siembra sino para el almacenamiento de las mismas, no existe en la actualidad ningún producto comercial con el preceptivo colorante que deben llevar los productos aprobados para el blindaje de semillas. Los resultados observados en el ensayo de conducta relativo a la rodamina B nos hacen pensar que el rechazo de las semillas tratadas con piretrinas sería mayor del observado en nuestro estudio si dichas semillas hubieran estado coloreadas.

Por último, debemos destacar que los resultados de los análisis de los contenidos digestivos de las perdices cazadas ponen en duda la efectividad del hipotético rechazo que se ha empleado como argumento en defensa de la aplicación de dosis de plaguicidas susceptibles de causar efectos tóxicos severos en las aves consumidoras de semillas (e.g. caso del imidacloprid). La presencia de trazas detectables de insecticidas o fungicidas empleados en el tratamiento de semillas se ha hallado en un 32% de las perdices analizadas, lo que confirma que el posible rechazo hacia las semillas tratadas que las perdices puedan mostrar en condiciones controladas no tiene por qué suceder en el campo, en condiciones de escasez de recursos o ante la presencia de estresantes adicionales como depredadores o competidores.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Con la finalización de los trabajos descritos en el presente informe damos por concluido el proyecto en los términos en los que fue planteado inicialmente. Consideramos, no obstante, que la línea de investigación no está ni mucho menos cerrada, y que sería deseable continuar investigando sobre todo en dos aspectos:

- Evaluación de los efectos de principios activos que puedan proponerse como alternativas más seguras a los que se emplean en la actualidad, de un modo análogo a lo planteado en el caso de las piretrinas naturales.
- Evaluación del riesgo de exposición de las perdices en libertad, mediante métodos de seguimiento de los animales en el campo, analizando la disponibilidad de semillas tratadas y de otros alimentos a lo largo de las diferentes estaciones del año, así como la conducta de forrajeo de las perdices ante los diferentes escenarios de disponibilidad de alimento tratado y sin tratar. A este respecto, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria recomienda la realización de dichos seguimientos en su Documento Guía para la Evaluación de Riesgos en Aves y Mamíferos.

A lo largo del último año se han difundido los resultados del proyecto en dos congresos internacionales:

- 6th Society of Environmental Contamination and Toxicology (SETAC) World Congress (Berlín).
 - o *Assessment of fungicide- and insecticide-coated seed risks for red-legged partridges*
- 23rd Annual Meeting of SETAC Europe (Glasgow).
 - o *Effect assessment of fipronil treated seeds in red-legged partridge*

Además, los resultados de los experimento del primer año han sido publicados en la revista *Ecotoxicology* (Lopez-Antia A, Ortiz-Santaliestra ME, Mougeot F & Mateo R. 2013. Experimental exposure of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole. *Ecotoxicology* vol. 22 pp. 135-128), y en la actualidad se esta preparando un nuevo trabajo, incluyendo los resultados de los ensayos de selección, para su publicación en una revista científica.

Igualmente, en el momento de redacción del presente informe, se está ultimando un manuscrito con los resultados del experimento 1 para someter para su publicación en una revista científica.

REFERENCIAS

- Avery, M.L., 1984. Relative importance of taste and vision in reducing bird damage to crops with methiocarb, a chemical repellent. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 11, 299-308.
- Avery, M.L., Fischer, D.L., Primus, T.M., 1997. Assessing the hazard to granivorous birds feeding on chemically treated seeds. *Pesticide Science* 49, 362-366.
- Blackwell, B.F., Helon, D.A., Dolbeer, R.A., 2001. Repelling sandhill cranes from corn: Whole-kernel experiments with captive birds. *Crop Protection* 20, 65-68.
- Blanco Aguiar, J., Virgós, E., Villafuerte, R. 2003. Perdiz Roja *Alectoris rufa*. En Martí, R., Del Moral, J.C. (Eds), Atlas de las Aves Reproductoras de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza - Sociedad Española de Ornitología, Madrid, pp. 212-213.
- Brickle, N.W., Harper, D.G., Aebischer, N.J., Cockayne, S.H., 2000. Effects of agricultural intensification on the breeding success of corn buntings *Miliaria calandra*. *Journal of Applied Ecology* 37, 742-755.
- EBCC, 2009. Trends of Common Birds in Europe, 2009 Update. European Bird Census Council. <http://www.ebcc.info/>
- EFSA, 2009. Guidance Document on Risk Assessment for Birds & Mammals. *EFSA Journal* 7, 1438.
- Greenwood, J.J.D., 2003. The monitoring of British breeding birds: a success story for conservation science? *Science of the Total Environment* 310, 221-230.
- López-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mateo, R., 2011. Impacto de la intensificación agrícola y el uso de agroquímicos en la conservación de la fauna silvestre. En: Meco, R., Lacasta, C., Moreno, M.M. (Coord.). Manejo ecológico de secanos. MARM, Madrid, pp. 357-376.
- López-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Mateo, R., 2013. Experimental exposure of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole. *Ecotoxicology* 22, 125-128.

- Luttik, R., 1998. Assessing repellency in a modified avian LC50 procedure removes the need for additional tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40, 201-205.
- Mañosa S., Mateo R., Freixa C., Guitart R., 2003. Persistent organochlorine contaminants in eggs of northern goshawk and Eurasian buzzard from northeastern Spain: temporal trends related to changes in the diet. *Environmental Pollution* 122, 351-359.
- Mateo, R., Carrillo, J., Guitart, R., 2000. p,p'-DDE residues in eggs of European kestrel *Falco tinnunculus* from Tenerife (Canary Islands, Spain). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 65, 780-785.
- Rands, M.R.W, 1985. Pesticide use on cereals and the survival of grey partridge chicks: A field experiment. *Journal of Applied Ecology* 22, 49-54.
- Pérez y Pérez, F., 1981. La Perdiz Roja Española. Ed. Científico-médica, Barcelona, 504 p.
- Salamolard, M., Moreau, C., 1999. Habitat selection by little bustard *Tetrax tetrax* in a cultivated area of France. *Bird Study* 46, 25-33.
- SEO/BirdLife, 2010. Estado de Conservación de las Aves en España en 2010. SEO/BirdLife, Madrid.
- Sheldon, R., Bolton, M., Gillings, S., Wilson, A., 2004. Conservation management of lapwing *Vanellus vanellus* on lowland arable farmland in the UK. *Ibis* 146, 41-49.
- Sotherton, N.W., 1998. Land use changes and the decline of farmland wildlife: an appraisal of the set-aside approach. *Biological Conservation* 83, 259-268.
- Stanley, P.I., Bunyan, P.J., 1979. Hazards to wintering geese and other wildlife from the use of dieldrin, chlorfenvinphos and carbophenothion as wheat seed treatments. *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences* 205, 31-45.
- Tucker, D., 1965. Electrophysiological evidence for olfactory function in birds. *Nature* 207, 34-36.