

Inhibición del crecimiento de *Chlamydomonas sp.* por la sal isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina

Inhibition growth of *Chlamydomonas sp.* caused by isopropylamine salt of N-(phosphonomethyl) glycine

Isabel Albarracín,^{1,2} Gabriela Pío,^{1,4} Ruth Salomón^{1,3} y Marcela Cravero^{1,5}

¹ Facultad de Ciencias Naturales – Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco – Roca 115 – 1er. Piso Trelew. Chubut. República Argentina.

² Estación de Fotobiología. CONICET - Playa Unión. Chubut. Argentina.

E-mail: fames@ar.inter.net

³ E-mail: groberts@infovia.com.ar

⁴ E-mail: gpiovalvarez@yahoo.com.ar

⁵ E-mail: acravero@ar.inter.net

RESUMEN

El hombre, en el afán de una agricultura más eficiente, permanentemente procura desarrollar productos plaguicidas, sin tener en cuenta que su uso indiscriminado provoca adaptaciones en plagas, tornándolas más resistentes. En el Valle Inferior del Río Chubut (VIRCH), provincia del Chubut, Argentina, los agricultores utilizan herbicidas organofosforados como el glifosato (sal isopropilamina del N-fosfonometil glicina), para el control de malezas en diversos cultivos, asumiendo el riesgo que implican las filtraciones en la calidad higiénico-sanitaria de sus aguas. Dado que las microalgas responden rápidamente a cambios ambientales debido a sus tiempos cortos de generación y a su papel como productores primarios en los ecosistemas acuáticos, se usan en ensayos de 72-96 h proporcionando información sobre los efectos ecológicos de algunos contaminantes. En este trabajo se evaluó la sensibilidad de *Chlamydomonas sp.* al glifosato comparando los porcentajes de inhibición respecto a un control, utilizando metodologías estándar para la valoración de los ensayos.

Se encontró que la CE50 fue de 68,57 mg/L, el NOEC de 40,0 mg/L y el LOEC de 20,0 mg/L. Se concluyó que *Chlamydomonas sp.* es efectiva como indicadora de ecotoxicidad, por lo que se recomienda evaluar su comportamiento con otros plaguicidas, como así también experimentar con otras cepas nativas aisladas de cuerpos de aguas locales.

Palabras clave: *Chlamydomonas sp.*, glifosato, organofosforado, bioensayo, ecotoxicidad.

ABSTRACT

The man in the desire for more efficient agriculture, constantly seeks to develop pesticide products without regarding that indiscriminate use causes pest adaptations, making them more resistant. In Chubut River Valley (VIRCH), province of Chubut, Argentina, farmers use organophosphate herbicides such as glyphosate (isopropylamine salt of N-phosphonomethyl glycine) for weed control in various crops, assuming the risk that leaks involve on health and hygiene quality of its waters. Since microalgae quickly respond to environmental changes due to their short generation times and their role as primary producers in aquatic ecosystems, they are used in 72-96 h tests to provide information on some pollutants ecological effects. In this study, the sensitivity of *Chlamydomonas sp* to glyphosate was evaluated comparing the inhibition percentages to a control, using standard methodologies for the assessment of the essays. It was found that the EC50 was 68,57 mg/L, the NOEC was 40,0 mg/L and the LOEC was 20,0 mg/L. It was concluded that *Chlamydomonas sp.* is effective as an ecotoxicity indicator, so it is recommended to evaluate its performance with other pesticides along with other native strains isolated from local water bodies.

Keywords: *Chlamydomonas sp.*, glyphosate, organophosphate, bioassay, ecotoxicity.

INTRODUCCIÓN

El glifosato, la sal isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina, es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, utilizado para eliminar malezas indeseables. Este organofosforado de acción sistémica es aplicado directamente sobre el follaje, siendo asimilado por las hojas y rápidamente translocado por el floema. La acción herbicida del glifosato se basa en la inhibición de la síntesis de aminoácidos esenciales (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación-República Argentina, 2003) y es utilizado por los agricultores del Valle Inferior del Río Chubut, de la provincia homónima de Argentina (Neira, 2001). Recientes estudios toxicológicos conducidos por instituciones científicas independientes, parecen indicar que el glifosato ha sido erróneamente calificado como “toxicológicamente benigno”, tanto a nivel sanitario como ambiental. Por ende, los herbicidas en base a glifosato pueden ser altamente tóxicos para animales y humanos, pudiendo afectar a especies no blanco. Estudios de toxicidad revelaron efectos adversos en todas las categorías estandarizadas de pruebas toxicológicas de laboratorio en la mayoría de las dosis ensayadas: toxicidad subaguda (lesiones en glándulas salivales), toxicidad crónica (inflamación gástrica), daños genéticos (en células sanguíneas humanas), trastornos reproductivos (recuento espermático disminuido en ratas; aumento de la frecuencia de anomalías espermáticas en conejos) y carcinogénesis (aumento de la frecuencia de tumores hepáticos en ratas macho y de cáncer tiroideo en hembras) (Kaczewer, 2002; Mañas, 2010). A nivel eco-tóxico-epidemiológico, la situación no se ve agravada solamente porque son pocos los laboratorios en el mundo que poseen el equipamiento y las técnicas necesarios para evaluar los impactos del glifosato sobre la salud humana y del medioambiente, sino también porque la información existente respecto de la concentración residual de glifosato en alimentos y el medio ambiente no solo podría ser poco confiable, sino que además es sumamente escasa.

Ante el uso frecuente de un sistema de tratamiento con pesticida, basado en una única sustancia cuyos impactos toxicológicos y ecológicos parecen no haber sido evaluados con la profundidad y el rigor suficientes, se hace evidente la urgencia de multiplicar localmente estudios toxicológicos a mediano y largo plazo y dosajes y bioensayos en aguas y suelos, no únicamente con respecto al principio activo y el producto tal como sale a la venta, sino también sobre cada uno de los coadyuvantes (Kaczewer, 2002).

El efecto del glifosato sobre un cuerpo hídrico receptor puede ser directo sobre la vegetación costera y la comunidad acuática, o secundario al promover la liberación de nutrientes, aumento de carbono orgánico y consecuente disminución de la concentración de oxígeno disuelto.

La vida media del glifosato en un ambiente acuático se estima entre 7 y 14 días, siendo comparable a la del ácido aminometilfosfórico (AMPA), el principal metabolito de su descomposición bacteriana, en tanto que la de los surfactantes puede estimarse entre 21 y 42 días (Giesy *et al.*, 2000).

En este contexto, teniendo en cuenta que el río Chubut recibe a través de filtraciones, escurrimientos y drenaje residuos agrícolas con efectos potencialmente perjudiciales (Sastre *et al.*, 1998) y que constituye un recurso de importancia regional por suministrar agua a varias localidades; siendo la única fuente de agua potable en la zona de su valle inferior, se hace necesario vigilar atentamente la calidad de sus aguas, resultando pertinente la realización de bioensayos con microorganismos que sean indicadores de la probable contaminación de las mismas. En línea con los trabajos previos sobre el tema Sáenz *et al.*, 1997; Wong, 2000; Salomón *et al.*, 2005; Pío *et al.*, 2006; Albaracín *et al.*, 2009, el presente estudio tiene por objetivo evaluar la sensibilidad de la microalga *Chlamydomonas sp.* aislada en la región patagónica al glifosato, comparando los porcentajes de inhibición de crecimiento respecto a un control.

MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa utilizada fue *Chlamydomonas sp.* LMPA43, perteneciente a la Colección del Laboratorio de Microalgas de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, sede Trelew, Provincia del Chubut, Argentina. La misma fue aislada de la Laguna Cacique Chiquichano de la ciudad de Trelew y es mantenida en Medio Detmer modificado (Accorinti, 1960), a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 2 500 lux y luz continua.

Se utiliza la fórmula comercial Glifosato de GLEBA, Línea Jardín, que contiene 48 % del producto activo. Se efectuaron ensayos preliminares para determinar el rango adecuado de concentraciones del tóxico. Las concentraciones de glifosato utilizadas están comprendidas en el rango de 5 a 80 ppm. El bioensayo se llevó a cabo según la metodología propuesta por la U.S. Environmental Protection Agency (USEPA, 2002). Durante un período de 96 h. Se realizan tres réplicas de cada tratamiento y del control. Los tratamientos y controles se inoculan con un volumen de suspensión algal en crecimiento exponencial

tal que la densidad inicial en 100 mL de medio de cultivo sea de 6×10^4 cél./mL, en frascos erlenmeyer de 250 mL. Se incuban en las condiciones indicadas, agitando en forma manual y discontinua cada 24 h (Nyholm & Källqvist, 1989; Sáenz *et al.*, 1993; Sáenz *et al.*, 1997).

La densidad algal fue determinada por medio de recuentos en cámara de Neubauer, cada 24 h y se calculó la tasa de crecimiento (μ), el tiempo de generación (TG) y el porcentaje de inhibición ($I_{\mu\%}$) de acuerdo con las ecuaciones 1 y 2 (Reynolds C.S., 1984; Salomón *et al.*, 2005).

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \text{ día}^{-1} \quad (1)$$

$$TG = \frac{\ln 2}{\mu} \text{ día} \quad (2)$$

Donde:

X_2 : número de células al tiempo t_2
 X_1 : número de células al tiempo t_1

La inhibición del crecimiento algal respecto al control (USEPA, 2002), se calculó con la ecuación 3.

$$I_{\mu\%} = \frac{(\mu_{\text{testigo}} - \mu_i)}{\mu_{\text{testigo}}} \times 100 \quad (3)$$

TABLA 1. Tasas de crecimiento promedio y tiempos de generación (TG) de *Chlamydomonas sp.* a las 96 h

Tratamientos	Concentración de tóxico(ppm)	Tasas de crecimiento (μ promedio, día^{-1})	Tiempos de generación (TG promedio, día)
T	---	0,724	0,957
1	5,0	0,786	0,881
2	10,0	0,659	1,051
3	20,0	0,668	1,037
4	40,0	0,405	1,711
5	80,0	0,328	2,113

Los tiempos de generación, calculados a partir de las tasas de crecimiento (μ), se incrementan a mayor concentración del tóxico, debido al efecto metabólico (fisiológico) que se produce a nivel celular por la acción

Donde:

$I_{\mu\%}$: porcentaje de inhibición
 μ_i : velocidad de crecimiento del tratamiento i
 μ_{testigo} : velocidad de crecimiento del testigo

La CE50 (Concentración Efectiva 50) se obtiene por el método de interpolación gráfica según International Standards Organization (ISO, 1989). El análisis estadístico se basa en un análisis de varianza ($p < 0,05$) de una vía (Walpole & Myers, 1992; Reyes Castañeda, 1999). Se aplica el test de Dunnett para calcular los índices de toxicidad LOEC (la concentración más baja a la cual se observa inhibición significativa del crecimiento) y NOEC (la concentración más alta a la cual no hay inhibición significativa del crecimiento). Se calcula el MATC (máxima concentración tóxica aceptable) como la media geométrica de los dos anteriores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha descrito y comprobado que a concentraciones bajas del tóxico puede ocurrir una estimulación del crecimiento, lo cual podría ser resultado de estrés fisiológico (Sáenz *et al.*, 1993, 1997; Wong, 2000). Las velocidades de crecimiento (μ) de *Chlamydomonas sp.*, correspondientes a los tratamientos de 40 y 80 ppm, disminuyen significativamente ($p < 0,05$) con respecto al control (TABLA 1, Fig. 1).

del principio activo del glifosato (TABLA 1). Esto expresado en términos de porcentaje de inhibición (%) confirma el incremento de inhibición al aumentar la concentración de tóxico (TABLA 2).

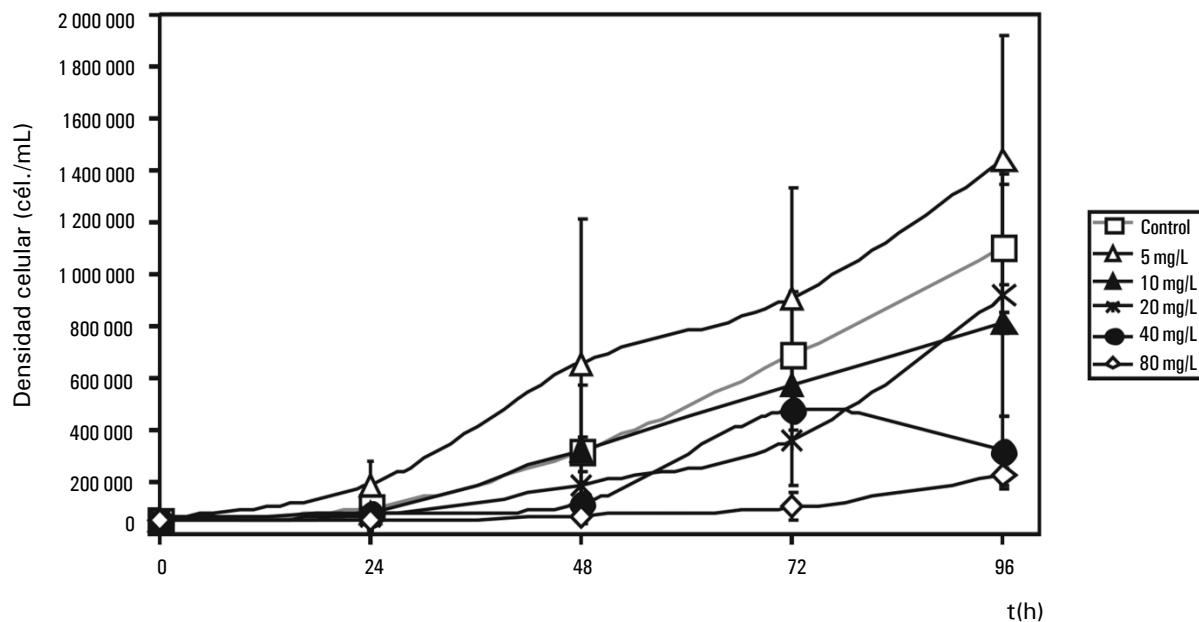


Fig. 1 Curvas de crecimiento de *Chlamydomonas* sp. correspondientes a tratamientos y control.

TABLA 2. Inhibición de crecimiento de *Chlamydomonas* sp. por glifosato (96 h)

Concentración (ppm)	Porcentaje de Inhibición ($I_{\mu\%}$)
5,00	-8,55*
10,0	9,88
20,0	7,84
40,0	44,03
80,0	54,64

* Estimulación

La figura 2 presenta la determinación de CE50 usando la correlación entre el porcentaje de inhibición de las velocidades de crecimiento y el logaritmo de la concentración del tóxico. La CE50 es de 68,57 ppm para *Chlamydomonas* sp. Este resultado coincide con la bibliografía que señala que las algas serían bastante

resistentes a la forma salina del glifosato (Dengler & Mende, 1994), informan que una concentración igual a 72,9 mg/L provoca una disminución de la biomasa de la especie *Scenedesmus subspicatus*. Por otro lado, *Chlamydomonas* sp. es menos sensible a la sal de glifosato que *S. quadricauda* (CE50 = 35,59 ppm) (Pío et al., 2006).

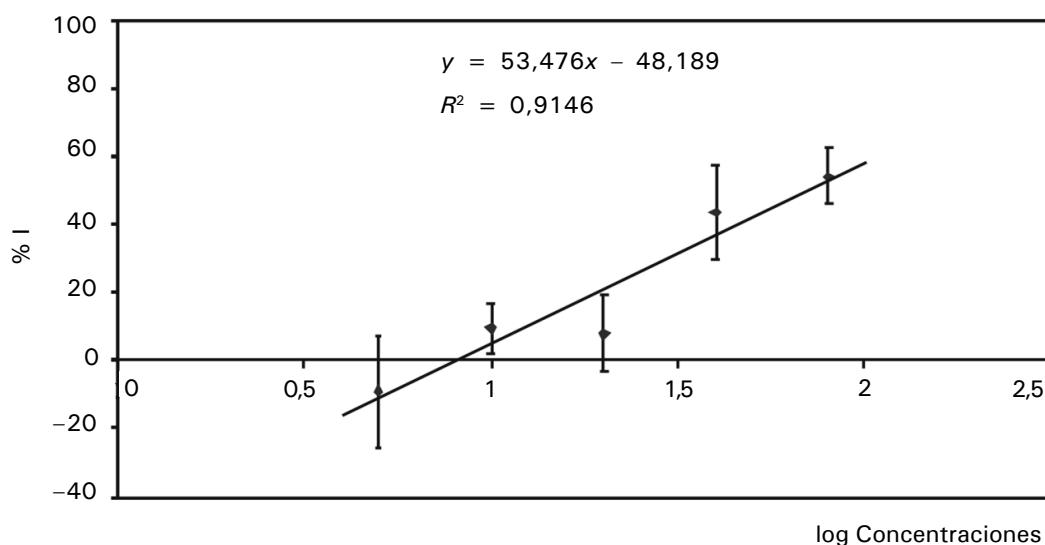


Fig. 2 Representación gráfica del porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento para la determinación de CE50 de *Chlamydomonas sp.* expuesta a glifosato.

Con la aplicación de la prueba de Dunnett, a un nivel de significancia alfa de 0,01, los valores de NOEC resultan de 20,0 ppm, los de LOEC de 40,0 ppm y el MATC de 28,3 ppm para *Chlamydomonas sp.*; Hess (1980) y Giesy *et al.* (2000) reportan para *Chlamydomonas eugametos* un NOEC de 16,9 ppm.

CONCLUSIONES

El valor de CE50 del glifosato para *Chlamydomonas sp.* es 68,57 ppm. Se concluye que:

- *Chlamydomonas sp.* muestra sensibilidad al glifosato a las concentraciones elegidas.
- *Chlamydomonas sp.* es menos sensible al glifosato que *S. quadricauda* (CE50 = 35,59 ppm) (Pío *et al.*, 2006).
- La microalga *Chlamydomonas sp.* es efectiva como indicadora de ecotoxicidad, por lo que se recomienda evaluar su comportamiento con otros plaguicidas así como también experimentar con otras cepas nativas aisladas de cuerpos de aguas locales.

REFERENCIAS

- Accorinti, J. (1960). Cultivo unialgal y masivo de *Scenedesmus obliquus*. Turp. Ktz. Técnicas de obtención. Com. Museo Arg. Cien. Nat. Bs. As. Cien. Bot., t. I., No. 9, pp. 21-29.
- Albarracín, I., Salomón, R., Pío, G., Cravero, M. & Parra, A. (2009). Efectos del herbicida Paraquat sobre el crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* (turp.) breb. Publicado en el I Congreso Internacional de Ambiente y Energías Renovables. Universidad Nacional de Villa María. ISBN 978-987-1253-62-3.
- Dengler, D. & Mende, P. (1994). Testing of toxic effects of aminomethyl phosphonic acid (AMPA) on the single cell green alga (*Scenedesmus subspicatus*). Unpublished study XX-93-271. Monsanto Company, St. Louis, MO. En: Giesy, J. P., Dobson, S. & Solomon, K. R. (2000), Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 167, 35-120.
- Giesy, J. P., Dobson, S. & Solomon, K. R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 167, 35-120.
- Hess, F. D. (1980). A *Chlamydomonas* Algal Bioassay for Detecting Growth Inhibitor Herbicides. *Weed Science Society of America*, 28 (5), 515-520.
- ISO (1989). Water quality- Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. Technical Committee ISO/TC 147. Water quality. Switzerland, pp. 11-15.
- Kaczewer, J. (2002). Toxicología del glifosato: riesgos para la salud humana. Extraído de <http://www.ecoportal.net>
- Mañas, F. (2010) Genotoxicidad de glifosato y su principal metabolito AMPA. Cuantificado por los ensayos de aberraciones cromosómicas, micronúcleos y cometa. Extraído el 10 de enero de 2010 de <http://www.globalizate.org>
- Neira, P. (2001). Uso de plaguicidas en el Valle Inferior del Río Chubut. Informe Interno de la Dirección de Agricultura. Laboratorio de Sanidad Vegetal. Ministerio de la Producción Chubut. Argentina, 10 pp.

- Nyholm, N. & Källqvist T. (1989). Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 679-703.
- Pio, G., Albaracín, I., Salomon, R. & Stemitsiotis, B. (2006). Efectos del herbicida glifosato sobre el crecimiento de *Scenedesmus quadricauda*. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Aidis*, 84, 80-83.
- Reynolds, C. S. (1984). The ecology of freshwater phytoplankton (384pp). Cambridge Univ. Press.
- Reyes Castañeda, P. (1999). *Bioestadística Aplicada* (216 pp.). Ed. Trillas.
- Sáenz, M. E., Accorinti, J. & Tortorelli, M. C. (1993). Toxicity of paraquat to a green alga, *Scenedesmus acutus*. *J. Environ. Sci. Health*, 28 (2), 193-240.
- Sáenz, M. E., Alberdi, J. L., Dimarzio, W. D., Accorinti, J. & Tortorelli, M. C. (1997). Paraquat toxicity to different green algae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, 922-928.
- Sáenz, M. E., Alberdi, J. L., Dimarzio, W. D. & Tortorelli, M. C. (1997). Effects of Technical Grade and a Comercial Formulation of Glyphosate on Algal Population Growth. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59 (4), 638-644.
- Salomón, R., Albaracín, I. & Pío, G. (2005). Sensibilidad de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus quadricauda* a la cipermetrina. Fase preliminar. Extraído de <http://www.sertox.com.ar/retel/n07/n04.pdf>
- Sastre, A. V., Santinelli, N. H., Otaño, S., Ivanissevich, M. E., Pangaro, M., Ayestarán, G., Rivera, S. & Reynoso, R. (1998). Factores naturales y antrópicos causantes de las floraciones de diatomeas en el curso inferior del Río Chubut. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Facultad de Ciencias Naturales, Sede Trelew. Chubut. Argentina. Informe final. 130 pp.
- Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación-República Argentina (2003). Desarrollos de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente Correspondientes a Glifosato (II-1).
- USEPA (2002). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms. Environmental Monitoring and Support Laboratory Office of Research and Development, Ohio.
- Walpole, R. & Myers, R. (1992). Probabilidad y Estadística (4^a ed., 797 pp.). Mc Graw Hill.
- Wong, P. K. (2000). Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere*, 41 (1-2), 177-82.