

## Ecotoxicidad del herbicida Glifosato sobre cuatro algas clorófitas dulceacuícolas

María Elena Sáenz\* y Walter Darío Di Marzio

Programa de Investigación en Ecotoxicología, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján. Casilla de Correo 221 (6700) Luján (B) Argentina. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-CONICET.

\* Autor responsable de la correspondencia: mesaenz@speedy.com.ar

Recibido: 4/9/08

Aceptado: 19/1/09

### ABSTRACT

#### Ecotoxicity of herbicide Glyphosate to four chlorophyceae freshwater algae

The increasing use of glyphosate in Argentina is directly related to the increase of areas cultivated with a glyphosate-tolerant transgenic variety of soybean. That has raised concern about the effects of this herbicide in the pampean aquatic ecosystems. Hence, the ecotoxicity of pure (active ingredient) and commercial grade (Roundup) of the herbicide glyphosate was evaluated towards four green freshwater algae: *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*, and *Raphidocelis subcapitata*. Toxic effects of glyphosate were assessed on both short-term (photosynthetic rates, determined as oxygen production) and at long-term (growth of the populations, determined as number of cells). A stimulation of the photosynthetic rate was observed at low herbicide concentrations (hormesis). Pure grade short-term effects on the photosynthetic rates appeared at concentrations between 50 and 166 mg L<sup>-1</sup>, whereas long-term effects on growth appeared in the 1.55-4 mg L<sup>-1</sup> range. The commercial grade resulted more toxic than the pure grade; its long-term effects appeared at concentrations between 0.1-3.7 mg L<sup>-1</sup>. These concentrations are clearly below the expected environmental concentrations (EEC) for this herbicide. Recovery experiments showed that both the pure grade and the commercial grade had algistatic and not algicidal effects. Possible effects and implications at algal community level regarding competitiveness are discussed.

**Key words:** Toxicity, herbicides, algae, *Scenedesmus* sp, *Chlorella vulgaris*, *Raphidocelis subcapitata*, photosynthesis, hormesis.

### RESUMEN

#### Ecotoxicidad del herbicida Glifosato sobre cuatro algas clorófitas dulceacuícolas

El incremento en el uso de glifosato en Argentina está directamente relacionado con el incremento de las áreas cultivadas con una variedad de soja transgénica tolerante al glifosato. Este hecho ha incrementado la preocupación acerca de los efectos de este herbicida sobre los ecosistemas acuáticos de la región pampeana. Así, la ecotoxicidad del herbicida glifosato en su forma pura (ingrediente activo) y su formulado comercial (Roundup) fue evaluada hacia cuatro algas verdes dulceacuícolas: *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris* y *Raphidocelis subcapitata*. Los efectos tóxicos del glifosato fueron evaluados tanto en su toxicidad a corto plazo (tasa fotosintética, determinada como producción de oxígeno) como en su toxicidad a largo plazo (crecimiento poblacional, determinado como número de células). Una estimulación de la tasa fotosintética fue observada a bajas concentraciones del herbicida (hormesis). Los efectos a corto plazo del principio activo puro sobre la tasa fotosintética aparecieron a concentraciones entre 50 y 166 mg L<sup>-1</sup> mientras los efectos a largo plazo sobre el crecimiento aparecieron en el rango de 1.55-4 mg L<sup>-1</sup>. El formulado comercial resultó más tóxico que el ingrediente activo puro; sus efectos a largo plazo aparecieron a concentraciones entre 0.1 y 3.7 mg L<sup>-1</sup>. Estas concentraciones se encuentran claramente por debajo de la Concentración Esperada en el ambiente (CEA) para este herbicida. Las experiencias de recuperación mostraron que tanto el ingrediente activo en forma pura y el formulado comercial ejercieron efectos algistáticos y no algicidas. Se discute los posibles efectos e implicancias a nivel de la comunidad algal en relación a la capacidad competitiva.

**Palabras clave:** Toxicidad, herbicidas, algas, *Scenedesmus* sp, *Chlorella vulgaris*, *Raphidocelis subcapitata*, fotosíntesis, hormesis.

## INTRODUCCIÓN

Las actividades agrícola-ganaderas son las más importantes de Argentina tanto histórica como económicamente. Debido al incremento de la actividad agrícola de los últimos años, en especial relacionado al aumento de las áreas destinadas al cultivo de soja transgénica, se están liberando al ambiente cantidades importantes de distintas clases de fitosanitarios. Entre los herbicidas, el glifosato es el más utilizado, con 170 y 146 millones de litros/kg. en 2006 y 2007, respectivamente. A partir de estos datos, resulta de importancia fundamental el estudio de su impacto sobre los ecosistemas acuáticos. Este estudio se centra sobre los efectos a corto y largo plazo que la exposición a glifosato tendrá sobre los productores primarios componentes del fitoplancton. Este aspecto es remarcado en el manual de registro del glifosato de la US EPA (1993), donde concluye que son necesarios estudios adicionales sobre este grupo de organismos ya que cabría esperar efectos adversos.

Las vías de entrada de este compuesto a los sistemas acuáticos pueden ocurrir por aplicación directa en el terreno, con una deriva posterior influenciada por características locales relacionadas a la orientación y intensidad de los vientos y por aplicaciones aéreas, en el caso de grandes extensiones. En este último caso, la magnitud de la deriva a los sistemas acuáticos es mayor. Por otra parte, existe un transporte hacia los ambientes acuáticos por drenaje y escorrentía de los terrenos tratados.

El Glifosato (N-(fosfonometil) glicina) (fórmula molecular:  $C_3H_8NO_5P$ ) es el ingrediente activo más utilizado en herbicidas de amplio espectro, rápida acción, y de bajo costo. Su aplicación se realiza a través de spray en la superficie foliar. Según CASAFE (2007), la formulación más utilizada es de 48 % de principio activo ocupando el primer lugar entre los 30 fitosanitarios más utilizados (82.3 %).

En virtud de la solubilidad en agua y de las características iónicas del glifosato, no cabría esperar fenómenos de bioacumulación. Esto ha sido confirmado por estudios realizados en condiciones de campo sobre peces, crustáceos y moluscos (WHO, 1994). Se considera que el glifosato

se disipa rápidamente en los ambientes acuáticos (WHO, 1994). El sitio de acción del herbicida es la inhibición de la enzima EPSP (5-enolpiruvilsikimato-3-fosfato sintetasa), una enzima del ciclo del ácido sikímico, una de las dos vías metabólicas de la síntesis de los aminoácidos aromáticos. Esta enzima se encuentra en plantas y bacterias, pero no se encuentra en animales. Aunque no es considerado un herbicida que ejerza acción directa sobre las reacciones de la fotosíntesis, existen algunos estudios que informan que inhibiría el flujo de electrones en el fotosistema II (Duke, 1988). Se ha demostrado que ejerce importantes efectos sobre la síntesis de clorofila, inhibiendo la síntesis del precursor de la síntesis de clorofila, el ácido 5-aminolevulínico (ALA) (Duke, 1988). Esto ocasionaría efectos secundarios como el blanqueado del pigmento, produciendo una alteración en la función de los cloroplastos. Aunque los efectos sobre la síntesis de proteínas serían indirectos, éstos serían responsables en el desarrollo de los daños posteriores ocasionados por este herbicida. De la misma manera, los efectos observados sobre la síntesis de los ácidos nucleicos se deberían a una disfunción general de la célula asociada a la inhibición de la síntesis de proteínas. En este mismo contexto, se han observado mitosis anormales, y efectos ultraestructurales como ruptura de las envolturas de los cloroplastos, degeneración de las mitocondrias y separación del plasmalema de la pared celular (Duke, 1988).

Se han realizado estudios acerca del efecto del glifosato ingrediente activo sobre el crecimiento de especies de Cianofitas como *Anabaena-flos-aquae*, sobre Clorofitas como *Raphidocelis subcapitata* y *Chlorella pyrenoidosa* y sobre Diatomeas como *Skeletonema costatum* y *Navicula pelliculosa*. Estos estudios han arrojado diferencias en sensibilidad entre los distintos grupos, encontrándose valores de  $EC_{50}$  entre 1.2 y 7.8 mg glifosato/l y valores de NOEC entre 0.3 y 34 mg glifosato/l (Pipe, 1992; WHO, 1994).

Una forma de estudiar de manera conjunta los efectos directos e indirectos del glifosato, es el análisis de sus efectos sobre el crecimiento, ya que este resulta ser un proceso integrador que combina diferentes reacciones celulares. Aunque

el glifosato no es considerado un inhibidor de las reacciones de la fotosíntesis, algunos trabajos informan de su acción sobre el transporte de electrones a nivel del fotosistema II (Duke, 1988). Se realizaron evaluaciones a fin de establecer el efecto de distintas concentraciones del producto puro del herbicida sobre la tasa fotosintética de las especies algales elegidas. A fin de conocer el riesgo ambiental asociado con aplicaciones terrestres también se evaluó una de sus formulaciones comerciales (Round-up®), determinando la acción sobre el crecimiento algal y la capacidad de recuperación de las poblaciones tratadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Organismos

Las cuatro especies algales utilizadas pertenecen a la División Chlorophyta. Estas fueron: *Scenedesmus quadricauda* (aislada a partir de muestras recolectadas en las nacientes del río Luján por técnicas de aislamiento y purificación según Sáenz, 2000), *Scenedesmus acutus* (SAG 273-3a), *Chlorella vulgaris* (Companhia de Saneamento Ambiental del Estado de São Paulo, Brasil, CETESB) y *Raphidocelis subcapitata* (ESE L1, Metz, Francia). Las cepas mencionadas se mantienen actualmente en el Cepario del Programa de Investigaciones en Ecotoxicología de la Universidad Nacional de Luján, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

### Substancias químicas

Se utilizó glifosato grado técnico (95 % Glifosato) en forma de sal de isopropilamina y el formulado comercial Round-up® que contiene 48 % de Glifosato como ingrediente activo y una amina polietoxilada (POEA) como surfactante.

### Efectos sobre el crecimiento algal

Las evaluaciones sobre el crecimiento algal se realizaron siguiendo los protocolos de la US EPA (1996). Los ensayos consistieron en la exposición durante 96 horas de una densidad algal inicial de 50.000 células/ml a diferentes concentraciones

del principio activo y el formulado comercial de Glifosato. En el caso del principio activo se utilizaron las siguientes concentraciones de exposición: 1; 2.5; 6.2; 15.6; 39 y 97 mg/l para *Raphidocelis subcapitata* y *Chlorella vulgaris* y 0.77; 1.55; 3.1; 6.2; 12.5; 25; 50 y 100 mg/l para *Scenedesmus quadricauda* y *Scenedesmus acutus*. Para el formulado comercial se utilizaron las concentraciones de 0.3; 1.1; 3.7; 12.3 y 41.4 mg/l para todas las especies. Se incubaron cultivos en las mismas condiciones en ausencia de tóxico que fueron consideradas como controles. Las incubaciones se realizaron en una cámara de incubación marca Forma provista de temperatura, fotoperíodo y agitación programables. Se determinó la biomasa algal mediante la medición de la concentración de la clorofila "a" *in vivo* mediante fluorometría utilizando un fluorómetro marca Turner modelo TD 700 (New York, USA). Las determinaciones se realizaron cada 24 horas. Los ensayos de realizaron dos veces y se realizaron tres réplicas de cada concentración y los controles. Al final de las incubaciones se realizaron observaciones al microscopio óptico con contraste de fase.

Se utilizó el procedimiento de Payne & Hall (1979) para la diferenciación de efectos algistáticos (reducción en crecimiento) de alguicidas (muerte de las células). En síntesis, tras del período de contacto de 96 horas, los cultivos expuestos fueron centrifugados (10 minutos, 1000 x g) y el pellet resuspendido en medio nutritivo en ausencia de tóxico. Se observó el crecimiento algal durante un período de recuperación de 10 días que se realizó bajo las mismas condiciones experimentales que el período de contacto. Durante este período se contaron el número de células en los días 3, 5, 7 y 10 (Rand, 1995; US EPA, 1996; Sáenz, 2000). Se consideraron como efectos algistáticos a aquellos que impidieron un cambio neto en el número de células algales durante el período de contacto, pero que permitieron una recuperación y retorno al crecimiento exponencial en el período de recuperación. La concentración algistática fue la concentración de herbicida que causó un efecto inhibitorio temporal a nivel celular, pero que no causó un daño permanente o irreversible a la población algal. Se determinó realizando una regresión entre el logaritmo del cociente entre el

número de células al final del período de contacto y el inóculo inicial y el logaritmo de las concentraciones del herbicida ensayadas según Payne & Hall (1979) y Ricker (1973). Los efectos algicidas fueron considerados como los que impidieron un cambio neto en el número de células algales durante el período de contacto, y no permitieron una recuperación y retorno al crecimiento exponencial en el período de recuperación.

### Efectos sobre la tasa fotosintética

La acción sobre la tasa fotosintética se evaluó a partir del análisis del cambio en la concentración de oxígeno mediante la utilización de microelectrodos de oxígeno de Clark (Walker, 1987). Estos efectos se estudiaron solo para el principio activo. Los cultivos algales utilizados en estos estudios fueron mantenidos en una cámara climatizada a  $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , con una intensidad lumínica de  $50 \text{ Watt/m}^2$  bajo un fotoperíodo de 14 horas luz/10 horas oscuridad y en un agitador orbital a 100 rpm en forma continua. Previamente se determinó la intensidad lumínica, densidad celular y edad de los cultivos óptimos para la realización de las evaluaciones. Se obtuvieron curvas de saturación lumínica para cada una de las especies utilizadas (Hall & Rao, 1992). Un radiofotómetro marca Licor modelo LI 185 fue utilizado en las determinaciones de irradiancia. Se determinó la tasa fotosintética de cultivos controles (en ausencia de tóxico) y así se calculó el porcentaje de inhibición o estimulación de la tasa fotosintética a fin de obtener las curvas de dosis respuesta. La exposición fue de 40 a 60 minutos. Las experiencias se realizaron por duplicado. Una descripción detallada de los métodos y procedimientos utilizados en la determinación de las condiciones experimentales se describen en Sáenz (2000) donde se incluye la metodología e intervalos de las mediciones. La aplicación de esta metodología en la evaluación de efectos de herbicidas sobre algas verdes se detalla en Mingazzini *et al.*, (1997).

### Análisis de los datos

El análisis de las diferencias observadas entre los tratamientos y los controles se realizó mediante

un análisis de la varianza ANOVA de un factor combinado con test de Dunnet. Se cumplieron los criterios de normalidad (chi cuadrado) y homogeneidad de varianzas (Bartlett). La acción de las diferentes concentraciones de las sustancias tóxicas se evaluó con el test post ANOVA de comparaciones múltiples de Tuckey. Ambos análisis se realizaron con el programa TOXSTAT Version 3.5 (West Inc & Gulley, 1996). Las variables utilizadas fueron: la concentración de clorofila *a* en el caso de las evaluaciones sobre el crecimiento algal y los milimoles de oxígeno producido por minuto en el caso de las evaluaciones sobre la tasa fotosintética. Las diferencias se consideraron significativas a un nivel de confianza del 95 % ( $p < 0.05$ ). Los valores de las  $\text{EC}_{50}$  (concentración efectiva) fueron estimados mediante análisis probit. Las comparaciones estadísticas entre pares de  $\text{EC}_{50}$ -96 horas se realizaron mediante t- de student (efectos sobre la tasa fotosintética) mientras que las comparaciones entre las  $\text{EC}_{50}$ -96 horas provenientes de más de dos especies (efectos sobre el crecimiento algal) se realizaron mediante análisis de la varianza (Sprague, 1990).

Para la estimación del LOEC (concentración efectiva más baja) y NOEC (concentración no efectiva) fue utilizado el test de Dunnet (EPA, 1996). El valor crónico (ChV) fue estimado como la media geométrica entre el NOEC y LOEC (EPA, 1996).

## RESULTADOS

### Efectos sobre el crecimiento algal

#### *Efectos del glifosato ingrediente activo*

Al final de las evaluaciones se observó que las poblaciones de *Scenedesmus quadricauda* expuestas a  $0.77 \text{ mg Gli/l}$  no presentaron una inhibición significativa del crecimiento respecto de los controles. Sin embargo aquellas expuestas a concentraciones superiores e iguales a  $1.55 \text{ mg Gli/l}$  experimentaron una inhibición significativa del crecimiento. En el caso de *Scenedesmus acutus* concentraciones de glifosato de 8 a  $20 \text{ mg Gli/l}$  provocaron una inhibición significativa del crecimiento algal respecto de los controles. El gli-

**Tabla 1.** Índices de toxicidad (mg Gli/l) estimados en base al crecimiento poblacional después de 96 horas de exposición al ingrediente activo glifosato. \* Intervalos de confianza del 95 %. *Toxicity indexes (mg Gli/l) estimated based on population growth after 96 hrs of exposure to the active ingredient glyphosate. \* 95 % confidence intervals.*

	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	<i>Scenedesmus acutus</i> (SAG 276-3a)	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Raphidocelis subcapitata</i>
EC <sub>50</sub> -96 horas	7.2 (4.4 - 8.9)*	10.2 (9.5 - 11.4)	13.1 (11.4 - 15.0)	11.66 (9.9 - 13.6)
NOEC	0.77	2	2.5	1
LOEC	1.55	4	5	2.5
ChV	1.09	2.82	3.53	1.58

fosato ejerció efectos similares sobre *Chlorella vulgaris*. Las concentraciones superiores a 5 mg Gli/l provocaron una inhibición significativa del crecimiento. *Raphidocelis subcapitata* respondió en forma similar a concentraciones superiores a 2.5 mg Gli/l. A partir de 97 mg Gli/l se observó una inhibición casi total del crecimiento en las poblaciones expuestas. Las especies algales estudiadas presentaron diferente sensibilidad a la acción del glifosato en forma de principio activo. En la Tabla 1 se observan los índices estimados para cada una de las especies mencionadas, indicando una mayor sensibilidad (diferencia significativa ANOVA  $p < 0.05$ ) de *Scenedesmus quadricauda*, mientras que *Scenedesmus acutus*, *Chlorella vulgaris* y *Raphidocelis subcapitata* presentaron una sensibilidad similar (diferencias no significativas ANOVA  $p < 0.05$ ).

### Efectos del formulado comercial

Los resultados obtenidos en las evaluaciones realizadas con el formulado comercial Round-up® determinaron una acción más severa sobre el crecimiento algal que el principio activo. *Scenedesmus quadricauda* fue severamente inhibida frente a concentraciones de exposición mayores e iguales a 0.1 mg Gli/l en forma de formulado comercial, a los 96 horas de exposición. *Scenedesmus acutus* presentó una inhibición significativa en las poblaciones expuestas a concentraciones superiores e iguales a 0.9 mg Gli/l al cabo del mismo período. En el caso de *Chlorella vulgaris* se observó que las concentraciones que ejercieron una inhibición significativa del crecimiento, resultaron ser superiores e iguales a 1.1 mg Gli/l. *Raphidocelis subcapitata* fue significativamente

inhibida en presencia de concentraciones superiores o iguales a 3.7 mg Gli/l.

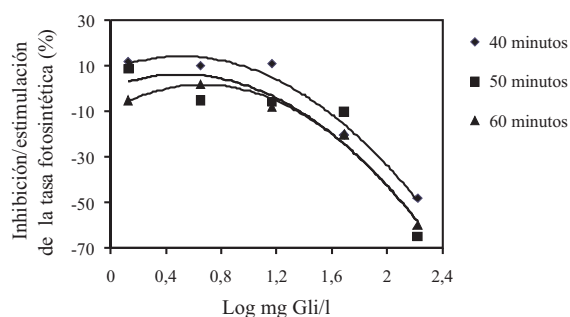
La estimación de los índices de toxicidad indicaron una mayor sensibilidad de las especies del género *Scenedesmus*, respecto de las otras dos especies utilizadas, tanto para la toxicidad a corto plazo como a largo plazo (Tabla 2).

### Recuperación del crecimiento

El glifosato en forma de principio activo, y el formulado comercial Round-up ejercieron efectos algistáticos sobre las especies *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus acutus*, *Chlorella vulgaris* y *Raphidocelis subcapitata*. Aún las poblaciones que resultaron severamente inhibidas frente a la acción de las diferentes concentraciones ensayadas del herbicida tanto en forma de principio activo como de formulado comercial, recuperaron su crecimiento exponencial al cabo de los diez días del período de recuperación. Las estimaciones de las concentraciones algistáticas para glifosato principio activo se encontraron entre 10.07 y 43.2 mg Gli/l, mientras que para el formulado comercial Round-up este intervalo fue entre 3.36 y 62.5 mg Gli/l.

**Tabla 2.** Índices de toxicidad (mg Gli/l) estimados al cabo de 96 horas de exposición, para el formulado comercial Round-up®. \* Intervalos de confianza del 95 %. *Toxicity indexes (mg gli/l) estimated after 96 hrs of exposure, for the Round-up® Commercial formulation. \* 95 % confidence intervals*

	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	<i>Raphidocelis subcapitata</i>
EC <sub>50</sub> -50 minutos	120 (100 -141)*	154 (122 -194)
NOEC	15	50
LOEC	50	166
ChV	27.3	91.10



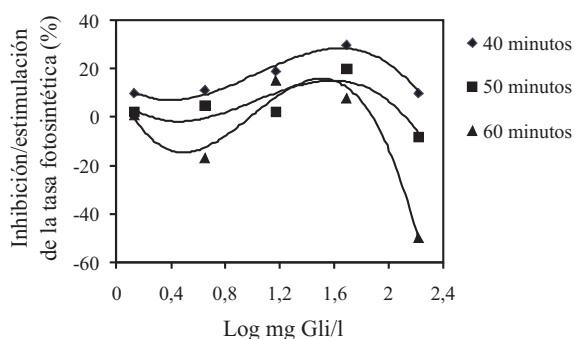
**Figura 1.** Efecto del glifosato sobre la tasa fotosintética de *Scenedesmus quadricauda*. Effect of glyphosate on *Scenedesmus quadricauda* photosynthetic rate.

### Efectos sobre la tasa de fotosintética

El Glifosato principio activo ejerció un efecto de estimulación de la tasa fotosintética de poblaciones de *Scenedesmus quadricauda* tras 40 minutos de exposición a concentraciones inferiores o iguales a 15 mg Gli/l. Al aumentar el tiempo de exposición, frente al mismo rango de concentraciones, el efecto de estimulación no fue observado sino que, por el contrario, se produjo una inhibición del 5 %, no significativa respecto a los controles.

Se observó una inhibición significativa en la tasa fotosintética, respecto de los controles, en aquellas poblaciones expuestas a concentraciones entre 50 y 166 mg Gli/l al cabo de 40 y 60 minutos de exposición (Fig. 1). Cuando se consideraron los efectos producidos sobre *Raphidocelis subcapitata*, se observó que concentraciones del herbicida entre 1.35 y 50 mg Gli/l produjeron una estimulación significativa (hormesis) en la tasa fotosintética respecto de los controles, a los 40 y 50 minutos de exposición. Al cabo de 60 minutos de exposición, se observó una inhibi-

ción significativa en la tasa fotosintética respecto



**Figura 2.** Efecto del glifosato sobre la tasa fotosintética de *Raphidocelis subcapitata*. Effect of glyphosate on *Raphidocelis subcapitata* photosynthetic rate.

de los controles, cuando las poblaciones fueron expuestas a 166 mg Gli/l (Fig. 2).

Los índices de toxicidad estimados en base a la tasa fotosintética se indican en la Tabla 3. Ambas especies presentaron una sensibilidad similar frente a la acción del glifosato en forma de ingrediente activo ya que no se hallaron diferencias significativas entre los valores de  $EC_{50}$  de ambas especies ( $t$ - student  $p < 0.05$ ). Considerando los valores de NOEC, LOEC y ChV, los mismos resultaron ser menores para la especie *Scenedesmus quadricauda*, indicando una mayor sensibilidad frente al herbicida evaluado.

### DISCUSIÓN

El glifosato resultó tóxico para las poblaciones algas estudiadas, ejerciendo efectos sobre el crecimiento poblacional y la tasa fotosintética. Los efectos más notables se observaron sobre el cre-

**Tabla 3.** Índices de toxicidad (mg Gli/l) al cabo de 50 minutos de exposición para el ingrediente activo glifosato estimados sobre la base de la tasa fotosintética. \* Intervalos de confianza del 95 %. Toxicity indexes (mg gli/l) after 50 minutes of exposure for the active ingredient glyphosate estimated on the base of the photosynthetic rate. \* 95 % confidence intervals.

	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	<i>Scenedesmus acutus</i> (SAG 276-3a)	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Raphidocelis subcapitata</i>
$EC_{50-96}$	2.9	2.7	6.2	4.4
horas	(1.44- 6.18)*	(2.2-3.5)	(4.2-9.7)	(3.1-6.2)
NOEC	0.01	0.27	0.3	1.1
LOEC	0.1	0.9	1.1	3.7
ChV	0.03	0.49	0.57	2.01

cimiento algal, ya que las concentraciones más elevadas donde se observaron efectos tóxicos se encontraron entre 1.55 y 5 mg Gli/l. Las poblaciones algales expuestas a concentraciones mayores de 1.09 mg Gli./l, podrían evidenciar efectos crónicos sobre su crecimiento. Tomando en consideración los valores de los índices NOEC, LOEC y ChV, la especie *Scenedesmus quadricauda* aislada del nacimiento del río Luján, resultó ser la especie más sensible frente a la acción del Glifosato principio activo sobre el crecimiento algal.

Las evaluaciones realizadas sobre la tasa fotosintética determinaron la existencia de una estimulación de este parámetro en *Scenedesmus quadricauda* y *Raphidocelis subcapitata* frente a bajas concentraciones del herbicida, mientras que concentraciones mayores ejercieron efectos inhibitorios. Este fenómeno, ha sido descrito hace más de un siglo como ley de Arndt-Schulz (Calabrese, 2005), siendo introducido el término “hormesis” en 1943 por Southam y Erlich. Sería una respuesta adaptativa de los organismos frente a una disrupción de la homeostasis debido a un estrés ambiental inducido. Ocurriría una sobrecompensación como resultado de un proceso de traslado de recursos levemente en exceso para recuperar la homeostasis.

Un reciente estudio (Cedergreen *et al.*, 2007) realizado con plantas vasculares terrestres y acuáticas y algas expuestas a bajas dosis de 10 herbicidas, ha demostrado que existen algunos herbicidas que provocan fenómenos leves de hormesis, mientras que otros provocan respuestas más marcadas describiendo fenómenos bifásicos (Calabrese, 2005). Entre estos últimos se encuentran el glifosato y el metsulfuron-metil, herbicidas que afectan la síntesis de aminoácidos aromáticos. En el caso de los efectos observados sobre las algas ocurriría un incremento de la tasa fotosintética, que se correspondería a un aumento en la tasa de crecimiento. Los resultados obtenidos por nosotros en el presente estudio sobre la tasa fotosintética, corresponden al comportamiento bifásico de dosis-respuesta descrito en Calabrese (2005) como tipo A correspondiente a la forma más común de curva de U invertida y corrobora lo encontrado por Cedergreen *et al* (2007) para el glifosato, como mencionado con anterioridad.

El glifosato se encontró entre los herbicidas que provocaron una mayor respuesta en varios grupos de plantas acuáticas y algas y en plantas terrestres (Duke *et al.*, 2006), iniciando un interesante debate acerca de la habilidad de este herbicida utilizado ampliamente a nivel mundial, en la estimulación del crecimiento de una amplio rango de especies vegetales. Otro aspecto fundamental es la exploración del efecto sostenido en el tiempo de la estimulación, con posibles efectos sobre la reproducción, vinculado a la habilidad competitiva de las plantas afectadas con modificación de las comunidades vegetales (Cedergreen, 2008b).

Goldsborough y Brown (1988) realizaron evaluaciones de la toxicidad del glifosato sobre la fotosíntesis de algas perifíticas, encontrando  $EC_{50}$  estimadas entre 69.7 y 35.4 mg Gli/l. Duke (1988) estimó una  $EC_{50}$  de 118 mg/l tras 60 a 90 minutos de exposición al glifosato principio activo para una especie del género *Scenedesmus*. Estos valores son similares a los estimados en este trabajo.

Estudios realizados con anterioridad (Sáenz *et al.*, 1997a) demostraron que el glifosato principio activo no produciría una reducción en el contenido en proteínas de las especies estudiadas, tras 96 horas de exposición a concentraciones entre 2.5 y 50 mg Gli/l. A pesar que el sitio de acción directo del glifosato principio activo es a nivel de la inhibición en la síntesis de aminoácidos aromáticos, el efecto sobre la reducción en la síntesis de proteínas que contienen dichos aminoácidos, pudo no haberse detectado en los tiempos de realización de nuestras evaluaciones. Las evaluaciones realizadas sobre el crecimiento poblacional resultaron ser las más sensibles, arrojando índices de toxicidad inferiores. La especie *Scenedesmus quadricauda* presentó valores inferiores de NOEC, LOEC y ChV tanto en las evaluaciones realizadas sobre el crecimiento poblacional como en las realizadas sobre la tasa fotosintética, indicando su mayor sensibilidad a exposiciones prolongadas del herbicida.

El glifosato principio activo resulta ser un herbicida moderadamente tóxico ( $EC_{50}$ -96 horas entre 7.2 y 13.1 mg/l) en comparación con los herbicidas inhibidores del transporte de electrones, como Diurón y Atrazina ( $EC_{50}$ -96 horas entre 0.011 y 0.09 mg/l) y los herbicidas desviadores de la

energía fotosintética, como el Paraquat ( $EC_{50}$ -96 horas entre 0.047 y 0.67 mg/l) (Sáenz *et al.*, 1997b). Es posible llegar a la misma conclusión si consideramos las  $EC_{50}$  calculadas a partir de los efectos sobre la tasa fotosintética, donde encontramos valores de  $EC_{50}$  entre 50 y 166 mg Gli/l en el caso del glifosato principio activo y entre 0.013 y 0.082 mg/l, en el caso de la Atrazina y Diurón (Sáenz, 2000), o en el caso de la Simazina con valores de  $EC_{50}$  de 0.8 mg/l (Goldborough y Robinson 1988). Estos resultados confirman la clasificación de la US EPA respecto a la moderada toxicidad del glifosato para los organismos acuáticos, con valores de  $EC_{50}$  entre 1 y 10 mg/l sobre el crecimiento algal (Giesy *et al.*, 2000).

La comparación entre la metodología tradicional de 96 horas de exposición (crecimiento algal) y la utilización de los electrodos de oxígeno de Clark (tasa fotosintética) arroja resultados similares para aquellos herbicidas que ejercen acción directa sobre la actividad fotosintética (Mingazzini *et al.*, 1997; Sáenz 2000). En lo que respecta a herbicidas con distinto modo de acción, como el glifosato los resultados obtenidos con ambos métodos mostraron amplias diferencias, ya que se trata de un herbicida que afecta varios procesos celulares. La elevada  $EC_{50}$  estimada a los 50 minutos indicaría que el herbicida evaluado presenta una reducida toxicidad para las poblaciones algales expuestas. Cabe destacar, que la información toxicológica mencionada con anterioridad acerca de los efectos del glifosato sobre el crecimiento algal, sobre la base de la realización de ensayos ecotoxicológicos tradicionales, permite llegar a similares conclusiones. La ventaja de la aplicación de los electrodos de oxígeno de Clark, radica en la velocidad en la obtención de respuestas tóxicas significativas, permitiendo obtener en forma rápida una primera aproximación acerca de la toxicidad de una sustancia. Esto puede resultar válido aún en el caso de evaluar sustancias tóxicas que no ejerzan su acción directa sobre el proceso de la fotosíntesis.

Los estudios realizados con el formulado comercial Round-up demostraron que ejerció efectos adversos sobre el crecimiento de las cuatro especies estudiadas, no existiendo diferencias en sensibilidad entre las especies algales conside-

rando las  $EC_{50}$  96 horas. Analizando los valores de NOEC, LOEC y ChV, *Scenedesmus quadricauda* resultó la especie más sensible.

La mayor toxicidad del Roundup sobre el crecimiento algal se vio reflejada en índices de toxicidad menores que los del producto puro. Estos resultados coinciden con los encontrados por otros autores en relación a los efectos del Round-up sobre el crecimiento poblacional (WHO, 1994). El resultado de evaluaciones de riesgo realizadas teniendo en cuenta microorganismos, anfibios, invertebrados, peces y macrófitos acuáticas, arrojan las mismas conclusiones, aumentando el riesgo en aquellos sistemas de escasa profundidad (0.15 m) situación muy frecuente en las lagunas bonaerenses (Giesy *et al.*, 2000). Hernando *et al.*, (1989) realizaron estudios acerca de los efectos del Round-up sobre la fotosíntesis de cloroplastos aislados expuestos a concentraciones mayores e iguales a 55 mg Round-up/l, encontrando una mayor inhibición del fotosistema II respecto del fotosistema I. Los autores concluyen que esta mayor inhibición es debida al surfactante polioxietilenamina (POEA) presente en el formulado, como fue indicado en materiales y métodos. Estudios realizados acerca de la toxicidad del principio activo y el surfactante POEA en forma independiente arrojaron índices de toxicidad de 120-140 mg Glifosato/l y de 0.65-7.4 mg POEA/l, respectivamente, indicando la mayor toxicidad de este último (US EPA, 1993). Los efectos producidos por el formulado comercial corresponderían a un efecto sinérgico ocasionado por las propiedades herbicidas del principio activo y por los efectos adversos que ocasionarían los surfactantes.

En las evaluaciones de riesgo realizadas con el formulado comercial Round-up®, se ha considerado que de acuerdo a sus propiedades y a las tasas y forma de aplicación en las prácticas agrícolas, la CEE (concentración esperada en el ambiente) se hallaría entre 1.7 y 2.88 mg Gli/l (WHO, 1994; Peterson *et al.*, 1994; Giesy *et al.*, 2000) dependiendo de la profundidad de los sistemas acuáticos. La comparación entre estas concentraciones ambientales de herbicida y los índices de toxicidad estimados, sugiere que se ejercerían acciones adversas a largo plazo sobre los

componentes algales en el rango de aplicación recomendado para este compuesto.

## BIBLIOGRAFÍA

- CALABRESE, E. J. 2005. Paradigm lost, paradigm found: the re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environmental Pollution*, 138: 378-411.
- CASAFE. 2007. *Registro de plaguicidas de la Cámara Argentina de Productos Sanitarios y Fertilizantes*. CASAFE. <http://www.CASAFE.ORG>
- CEDERGREEN, N., J. C. STREIBIG, P.K. S. K. MATHIASSEN & S. O. DUKE. 2007. The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose-Response*, 5: 150-162.
- CEDERGREEN, N. 2008a. Herbicides can stimulate plant growth. *Weed Research*, 48: 1-10.
- CEDERGREEN, N. 2008b. Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained over time? *Environ. Pollut.* doi:10.1016/j.envpol.2008.04.016
- DUKE, S. O. 1988. Glyphosate. In: *Herbicides: chemistry, degradation and mode of action*. P.C. Kearney & D.D. Kaufman (eds.): 1-70. Marcel Dekker, USA.
- DUKE, S. O., N. CEDERGREEN, E. D. VELINI & R. G. BELZ. 2006. Hormesis: is it an important factor in herbicide use and allelopathy? *Outlooks on Pest Management*, 17: 29-33.
- GIESY, J. P., S. DOBSON & K. R. SOLOMON. 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide. *Rev. Env. Contam. Toxicol.*, 167: 35-120.
- GOLDSBOROUGH, L. G. & D. J. BROWN. 1988. Effect of Glyphosate (Round-up® formulation) on periphytic algal photosynthesis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 41: 253-260.
- HALL, D. O. & K. K. RAO. 1992. *Photosynthesis. New studies in biology*. Cambridge: University Press. 122 pp.
- HERNANDO, F., M. ROYUELA, A. MUÑOZ-RUEDA & C. GONZÁLEZ-MURUA. 1989. Effect of Glyphosate on the greening process and photosynthetic metabolism in *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Plant Physiol.*, 136: 26-31.
- MINGAZZINI, M., M. E. SÁENZ, F. G. ALBERGONI & M. T. MARRÉ. 1997. Algal photosynthesis measurements in toxicity testing. *Fresh. Environ. Bull.*, 6: 308-313.
- PAYNE, A. G. & R. H. HALL. 1979. A method for measuring algal toxicity and its application to the safety assessment of new chemicals. In: *Aquatic Toxicology*. L. L. Marking & R. A. Kimerle (eds.): 171-180. ASTM STP 667 American Society for Testing and Material, USA.
- PETERSON, H. G., C. BOUTIN, P. A. MARTIN, K. E. FREEMARK, N. J. RUECKER & M. J. MOODY. 1994. Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentration. *Aquat. Toxicol.*, 28: 275-292.
- PIPE, A. E. 1992. Pesticides effects on soil algae and Cyanobacteria. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 127: 95-170.
- RAND, G. R. 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. New York: Taylor & Francis. 1125 pp.
- RICKER, W. E. 1973. Lineal regressions in fishery research. *J. Fish. Res. Board Canad.*, 30: 409-434.
- SÁENZ, M. E., W. D. DI MARZIO, J. L. ALBERDI, J. ACCORINTI & M. C. TORTORELLI. 1997a. Effects of technical grade and a commercial formulation of Glyphosate on algal population growth. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59: 638-644.
- SÁENZ, M. E., J. L. ALBERDI, W. D. DI MARZIO, J. ACCORINTI & M. C. TORTORELLI. 1997b. Paraquat Toxicity to different Green Algae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58: 922-928.
- SÁENZ, M. E. 2000. *Estudios de los efectos de contaminantes sobre poblaciones algales de agua dulce*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. 375 pp.
- SPRAGUE, J. B. 1990. Aquatic Toxicology. In: *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, 491-527 USA.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA) 1993. Re-registration Eligibility Decision (RED), Glyphosate. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. 738-F-93-011. (738-R-93-014).
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). 1996. Algal Toxicity Ecological Effect test guideline. Prevention, Pesticides and Toxic Substances OPPTS 850.5400. EPA 712-C-96-164.
- WALKER, D. 1987. *The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of*

*photosynthesis*. Research Institute for photosynthesis. UK: University of Sheffield. 188 pp.  
WEST, INC & D. D, GULLEY. 1996. TOXSTAT®  
V 3.5. Western Ecosystems Technology Inc. WY.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).  
1994. International Program on Chemical Safety.  
Environmental Health Criteria N° 159: Glyphosate  
175 pp.