

INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE *CHLAMYDOMONAS SP.* POR LA SAL ISOPROPILAMINA DE N-(FOSFONOMETIL)GLICINA

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

Los bioensayos con microalgas como bioindicadores de ecotoxicidad son útiles para evaluar el impacto ambiental provocado por las descargas de productos químicos y el vertido de efluentes. Siendo el fitoplancton el primer eslabón de la cadena trófica en los ecosistemas acuáticos, cualquier alteración de la composición de la comunidad microalgal, producto de estrés toxicológico, modifica la estructura y la función de todo el sistema.

El Río Chubut, en Argentina, abastece de agua a varias localidades; se utiliza para el riego de superficies cultivadas y la generación de energía eléctrica. Su curso puede recibir filtraciones, impactando en la calidad higiénico-sanitaria de sus aguas. En el Valle Inferior del río Chubut (VIRCH) se utilizan diversos pesticidas organofosforados entre ellos el glifosato. El glifosato, (sal isopropilamina del N-fosfonometil glicina), es un herbicida organofosforado de acción sistémica usado por los agricultores del VIRCH para el control de malezas en diversos cultivos, como papa y remolacha. Existen investigaciones que reportan efectos potencialmente dañinos para la salud humana derivados de su uso, atribuibles al principio activo y al surfactante, (toxicidad aguda y crónica consistente en efectos cancerígenos y reproductivos, acción mutagénica y contaminación de alimentos). El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del herbicida glifosato sobre el crecimiento de la microalga *Chlamydomonas sp.* mediante un ensayo de toxicidad crónico.

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

INHIBITION GROWTH OF *Chlamydomonas sp* CAUSED BY ISOPROPYLAMINE SALT OF N-PHOSPHONOMETHYL GLYCINE

ABSTRACT

The bioassays with microalgae as ecotoxicity bioindicators are useful to evaluate the environmental impact caused by chemicals discharge and effluent disposal. As phytoplankton is the the food chain first link in aquatic ecosystems, any alteration of the microalgal community composition, due to toxicological stress, modifies the structure and function of the whole system. In Argentina, the Chubut River supplies

water to several cities, and it is used to irrigate cultivated areas and to generate electricity. Its course can get filtrations, impacting on health and hygiene quality of its water. Several organophosphate pesticides like glyphosate are used in the lower valley of the Chubut River (LVCR). Glyphosate (isopropylamine salt of N-phosphonomethyl glycine) is a systemic acting organophosphate herbicide used by (LVCR) farmers for weed control in various crops such as potatoes and beets. Investigations report harmful potential effects to human health from its use, attributable to the active principle and the surfactant (acute and chronic toxicity consisting of carcinogenic and reproductive effects, mutagenic action and food contamination). The aim of this study is to evaluate the effect of glyphosate herbicide on the microalgae *Chlamydomonas sp* growth by a chronic toxicity test.

Key words: *Chlamydomonas sp*, glyphosate, organophosphate, bioassay, ecotoxicity.

INTRODUCCIÓN

El glifosato, la sal isopropilamina de N-(fosfometil) 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). 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). A nivel eco-tóxico-epidemiológico, la situación se ve agravada no sólo 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 sólo podría ser poco confiable, sino que además es sumamente escasa.

Ante el uso frecuente de un sistema de tratamiento 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 bio-ensayos en aguas y suelos, no sólo 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 y col., 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 y col., 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, surge la necesidad de vigilar atentamente la calidad de sus aguas. Por lo expuesto resulta pertinente realizar bioensayos con microorganismos que sean indicadores de la probable contaminación de las mismas. En línea con los trabajos previos sobre el tema (Albaracín y col, 2009; Pío y col., 2006; Sáenz y col, 1997; Salomón y col., 2005; Wong, 2000) el presente estudio tiene por objetivo evaluar la sensibilidad de una cepa 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 es *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 ± 2 °C, 2500 lux y luz continua.

Se utiliza la fórmula comercial Glifosato de GLEBA, Línea Jardín, que contiene 48 % del producto activo. Se efectúan 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 lleva a cabo según la metodología propuesta por la U.S. Environmental Protection Agency (USEPA, 2002) durante 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 N. y Källqvist, 1989; Sáenz y col., 1993; Sáenz y col., 1997).

Se determina la densidad algal, por medio de recuentos en cámara de Neubauer, cada 24 h y se calcula la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de generación (TG) y el porcentaje de inhibición (I_{µi} %) de acuerdo a las ecuaciones 1 y 2 (Reynolds CS. 1984; Salomón y col., 2005)

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

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

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.

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

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 (ISO, 1989). El análisis estadístico se basa en un análisis de varianza ($p < 0,05$) de una vía (Walpole y Myers, 1992; Reyes Castañeda, 1999). Se aplica el test de Dunnett para calcular los índices de toxicidad LOEC y NOEC.

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 stress fisiológico (Sáenz y col, 1993 y 1997; Wong, 2000). Las velocidades de crecimiento (μ) de *Chlamydomonas sp.*, correspondientes a los tratamientos de 40 ppm y 80 ppm, disminuyen significativamente ($p < 0,05$) con respecto al control (Tabla 1).

Tabla 1. Tasas de crecimiento promedio y tiempos de generación de *Chlamydomonas sp* a las 96 h

ID	Concentración tóxico	Tasas de crecimiento (μ promedio, día ⁻¹)	TGprom (día)
T	-----	0,724	0,957
1	5.0 ppm	0,786	0,881
2	10.0 ppm	0,659	1,051
3	20.0 ppm	0,668	1,037
4	40.0 ppm	0,405	1,711
5	80.0 ppm	0,328	2,113

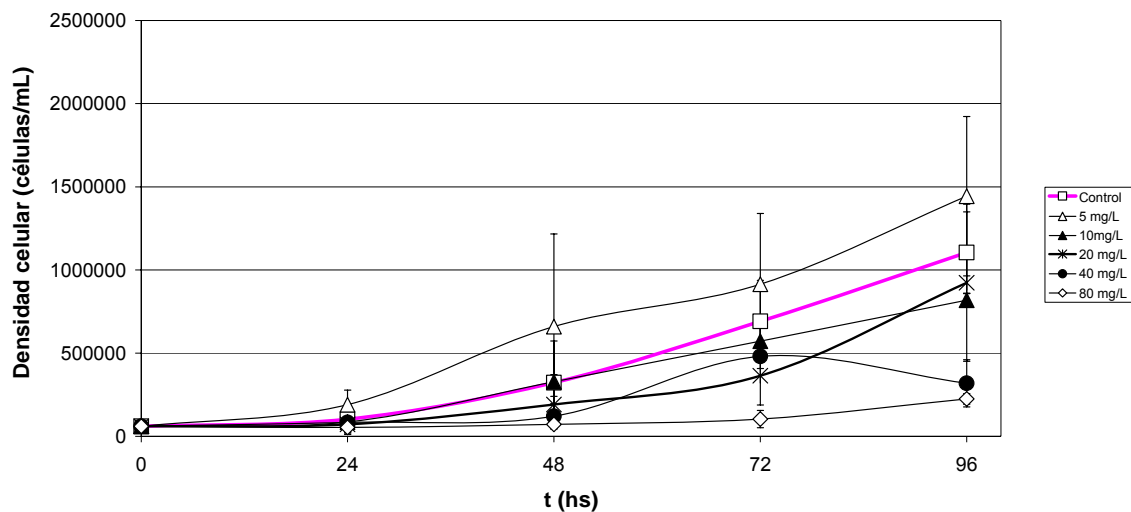


Fig. 1. Curvas de crecimiento de *Chlamydomonas sp.* correspondientes a tratamientos y control.

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 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).

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

Concentración (ppm)	I μ i%
5.00	- 8,55 *
10.0	9,88
20.0	7,84
40.0	44,03
80.0	54,64

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 concentración efectiva 50 (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 y 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, *Clamydomonas sp.* es menos sensible a la sal de glifosato que *Scenedesmus quadricauda* (CE50 = 35,59 ppm) (Pío y col., 2006).

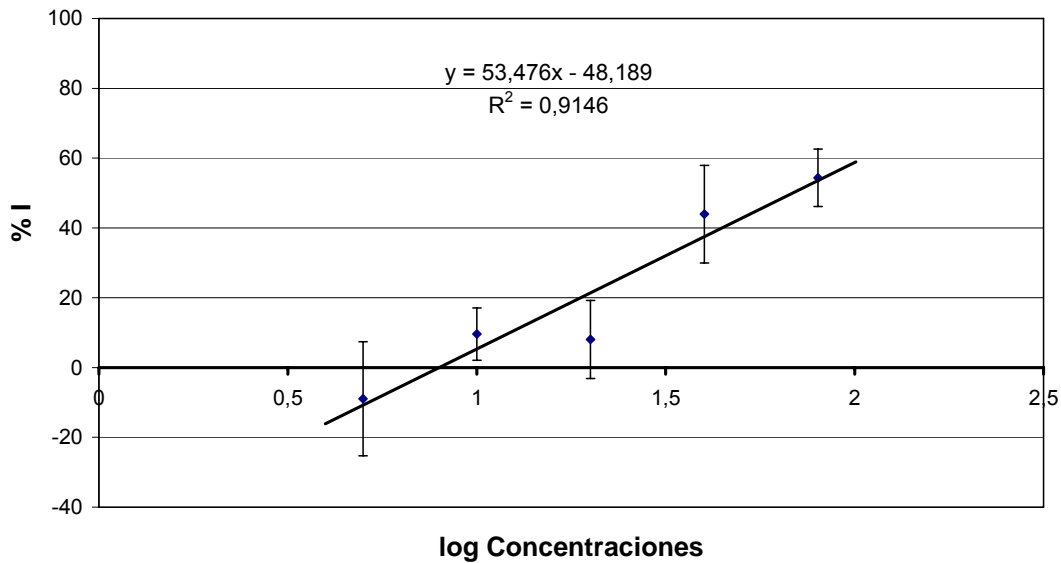


Fig. 2. Representación gráfica del Porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento para la determinación de CE50 de *Chlamydomonas sp.* expuesta a glifosato

Con la aplicación de la prueba de Dunnett, a un nivel de significancia alfa de 0,01, los valores de NOEC resultan de 20,00 ppm y de LOEC de 40,00 ppm y MATC de 28,28 ppm para *Chlamydomonas sp.* Hess (1980) en J. P. Giesy y col. (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 *Scenedesmus quadricauda* (CE50 = 35,59 ppm) (Pío y col., 2006).

Se recomienda evaluar el comportamiento de *Chlamydomonas sp.* con otros plaguicidas, dada su efectividad como especie indicadora de ecotoxicidad y otras cepas nativas aisladas de cuerpos de agua 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. Tomo I. N° 9: 21-29.
- Dengler, D. y 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.y Solomon KR. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 167: 35-120.
- Giesy JP, Dobson, S; Solomon, KR. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 167:35-120.
- Hess, FD. 1980. A *Chlamydomonas* Algal Bioassay for Detecting Growth Inhibitor Herbicides. Weed Science Society of America. Volume 28, Issue 5.
- International Standards Organization. 1989. (E). 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. <<http://www.ecoportel.net>>
- 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. y Källqvist T. 1989. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. Environmental Toxicology and Chemistry I 8: 679-703.
- Pío G., Albarracín, I., Salomón R., Sternitsiotis, B. 2006. Efectos del herbicida "glifosato" sobre el crecimiento de *Scenedesmus quadricauda*. Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Aedis N° 84. 2006. 80-83. ISSN 0328-2937.
- Reynolds CS. 1984. The ecology of freshwater phytoplankton, Cambridge Univ. Press.: 384 pp.
- Reyes Castañeda P. 1999. Bioestadística Aplicada. Ed. Trillas. 216 pp.
- Sáenz ME, Accorinti J y Tortorelli MC. 1993. Toxicity of paraquat to a green alga, *Scenedesmus acutus*. J. Environ. Sci. Health, 28 (2): 193-240.
- Sáenz M E, Alberdi JL, Dimarzio WD, Accorinti J y Tortorelli MC. 1997. Paraquat toxicity to different green algae. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58: 922-928.
- Sáenz ME, Alberdi JL, Dimarzio WD, y Tortorelli MC. 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., Albarracín I y. Pío G. 2005. Sensibilidad de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus quadricauda* a la Cipermetrina. Fase preliminar [En línea] <http://www.sertox.com.ar/retel/n07/n04.pdf>
- Sastre AV, Santinelli, NH, Otaño, Ivanissevich, S., ME; Pangaro, M; Ayestarán, G. Rivera, S y. 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)
- U. S. Environmental Protection Agency. 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 H y Myers J. 1992. Probabilidad y Estadística. Mc Graw Hill. 4ª. Edición. 797pp.
- Wong PK. 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.