

© 2019 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 22: 1-8, 2019.

DOI: [10.22201/fesz.23958723e.2019.0.192](https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.192)

Toxicidad aguda del herbicida N-(fosfonometil) glicina sobre representantes planctónicos *Artemia franciscana* y *Microcystis aeruginosa*

Gerardo Solís-González, Alondra A. Cortés-Téllez,

Zaida Irazú Téllez-Pérez y Ma. Carmen Bartolomé-Camacho*

Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Químico-Farmacobiología, Benemérita y Centenaria Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Santiago Tapia # 403, Colonia Centro, Morelia 58000, Michoacán, México. *E-mail: carbarcam@hotmail.com; carbarcam@outlook.es

RESUMEN

En los ecosistemas acuáticos se producen alteraciones cuando de forma continua están expuestos al N-(fosfonometil) glicina (glifosato), especies susceptibles a un determinado grado de concentración y tiempo de exposición a este compuesto químico. El objetivo del trabajo fue evaluar la concentración letal media ($CL_{50(24)}$) en *Artemia franciscana*, así como la concentración inhibitoria media poblacional (CI_{50}) y el coeficiente de forma (CF) en la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* en ecosistemas acuáticos. Los resultados para *A. franciscana* fueron de una $CL_{50(24)}$ 0.31 mg L⁻¹; y sobre *M. aeruginosa* de una $CI_{50(72)}$ 53.95 mg L⁻¹. En cuanto al estudio del coeficiente de forma, en las células control de *M. aeruginosa* resultó en un $CF \approx 1$, mientras que expuestas a 72h-NOEC (Concentración sin Efecto Observable) fue de 2.95 mg L⁻¹. La $CI_{50(72)}$ fue de 53.95 mg L⁻¹ indicando que las células se mantienen esféricas, sin embargo, hay cambios significativos en su volumen y superficie celular en la $CI_{50(72)}$ de $7.69 \pm 1.69 \mu\text{m}^3$ con un 33% en reducción de volumen comparada con la célula control, lo que refleja los peligros ecotoxicológicos de este herbicida. La exposición al glifosato resultó de categoría I (altamente tóxica) en *A. franciscana* y categoría II (tóxica) en *M. aeruginosa*, de acuerdo con la clasificación de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA).

Palabras Clave: glifosato, toxicidad aguda, *Artemia franciscana*, *Microcystis aeruginosa*, coeficiente de forma.

Acute toxicity of N-(phosphonomethyl) glycine herbicide on planktonic microorganisms *Artemia franciscana* and *Microcystis aeruginosa*

ABSTRACT

Continuous exposure to N-(phosphonomethyl) glycine (glyphosate) produces alterations on aquatic ecosystems, depending on the species or organism, concentration and exposure time. The aim of this research was to evaluate the median lethal concentration ($LC_{50(24)}$) in *Artemia franciscana*, as well as the median population inhibitory concentration (IC_{50}) and the coefficient of form (CF) in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in aquatic ecosystems. The results for *A. franciscana* were an $LC_{50(24)}$ 0.31 mg L⁻¹, and on *M. aeruginosa* of an $IC_{50(72)}$ 53.95 mg L⁻¹. About the study of the coefficient of form, in the control cells of *M. aeruginosa* it resulted in a $CF \approx 1$, while exposed to 72h-NOEC (No Observable Effect Concentration) was 2.95 mg L⁻¹. The $IC_{50(72)}$ was 53.95 mg L⁻¹ indicating that the cells remain spherical, however, there are significant changes in their volume and the cell surface exposed to $IC_{50(72)}$ of $7.69 \pm 1.69 \mu\text{m}^3$ with 33% volume reduction compared to the control cell, which reflects the ecotoxicological dangers of this herbicide. Exposure to glyphosate resulted as category I (highly toxic) in *A. franciscana* and category II (toxic) in *M. aeruginosa*, according to the classification of the United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA).

Key Words: glyphosate, acute toxicity, *Artemia franciscana*, *Microcystis aeruginosa*, form coefficient.

INTRODUCCIÓN

Ante el exponencial crecimiento demográfico, se acrecentó la demanda de alimentos y los agricultores para satisfacerla han tenido que tomar medidas con el fin de aumentar la calidad y cantidad de las cosechas, así como para disminuir los efectos adversos provocados por el clima o las plagas que merman la producción de los productos del campo.

El uso indiscriminado y a veces fraudulento de herbicidas y de sustancias reguladas en países subdesarrollados, que inclusive están prohibidos en algunos países desarrollados (ej. Unión Europea y Estados Unidos), ha causado un efecto negativo en plantas, suelo y aguas subterráneas en el área donde esas sustancias son aplicadas. Algunos plaguicidas, según su estructura y características fisicoquímicas, persisten en el ambiente, propiciando con ello la acumulación en agua y suelo principalmente, integrándose en la cadena trófica hasta llegar a los seres humanos (WHO, 1994; Jaramillo, Meléndez & Aldana, 2009). La contaminación ambiental también está presente en la población humana a través de la absorción de plaguicidas por inhalación durante su aplicación y consumo a través de los alimentos.

Carlisle & Trevors (1986), se refieren al glifosato como un herbicida sistémico no selectivo de amplio espectro que suprime el crecimiento de muchos tipos de pasto, hierbas, vides, arbustos y árboles. Estos autores comentan que su uso masivo y extendido necesita una evaluación constante a corto, mediano y largo plazo de sus potenciales efectos nocivos sobre la salud humana y el ambiente, analizando su interacción tanto entre organismos con la posible pérdida de sus hábitats en los agroecosistemas como con otros agroquímicos.

El glifosato es una sal isopropilamina de N-(fosfometil) glicina con un peso molecular de $228.18 \text{ g mol}^{-1}$, que funciona como un herbicida no selectivo, sistémico de acción foliar; el glifosato ingresa a la planta a través de las hojas y de ahí migra a otros tejidos vegetales donde es mínimamente metabolizado. El mecanismo de acción del glifosato radica en la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina) mediante la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSPS), con lo que se reduce la producción de proteínas y el desarrollo. El descontrol en la catálisis por la enzima EPSPS en el penúltimo paso en la vía del shikimato, reduce también la biosíntesis de otros compuestos como el tetrahidrofolato, la ubiquinona y la vitamina K (Eslava, Ramírez & Rondón, 2007; COFEPRIS, 2009).

Así, la inhibición de la EPSPS causa una escasez de proteínas, y consecuentemente la muerte de la planta. Como la vía del ácido shikímico no se encuentra en vertebrados, se asume que el glifosato es más seguro para mamíferos, incluyendo

humanos (Williams, Kroesb & Munro, 2000; Aparicio & Costa, 2013; Vera *et al.*, 2014; Mesnage, Defarge, Vendômois & Séralini, 2015; Myers, Zoeller & Vom Saal, 2016).

La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), autoriza el uso de glifosato en acciones urbanas de jardinería y agrícola. En la agricultura, el glifosato se usa para la destrucción de malezas en los cultivos de maíz, frijol, trigo, cítricos, tomate, vid, sorgo y papa, entre otros. Es comercializado bajo diferentes nombres en presentaciones de concentrado soluble, gránulo soluble, líquido soluble, polvo soluble, solución concentrada y solución acuosa, las cuales se expenden en concentraciones de 350 a $720 \text{ g i. a. L}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$ (COFEPRIS, 2009).

Goldsborough & Beck (1989), afirman que el glifosato se degrada rápidamente en aguas superficiales de sistemas lénticos (estáticos, lagos o lagunas) y sugieren que las principales formas de pérdida de este compuesto en la columna de agua, se deben a la adsorción por el sedimento y a la biodegradación. Mann & Bidwell (1999), mencionan la importancia de evaluar la persistencia de los componentes surfactantes en las formulaciones comerciales de glifosato, debido a que este factor es el principal contribuyente de su toxicidad aguda; en el caso del surfactante POEA (polioxi-etilenamina), utilizado en el producto comercializado como Roundup, se espera que este sea removido rápidamente de la columna de agua. No obstante, su vida media es de tres días a dos meses. Con base en los estudios anteriores, se sugiere que existen efectos negativos significativos al usarlo, por causar cambios ecológicos graves. De ahí que es importante realizar estudios ecotoxicológicos en los ecosistemas. Para estos fines, el uso de bioensayos a través de indicadores biológicos (bioindicadores), definidos como especies particulares o sus comunidades que por su presencia y la manifestación de alteraciones son una alternativa experimental que proporcionan información valiosa sobre el estado del entorno físico y químico circundante en un sitio en particular. Dentro de los bioindicadores, los de primer nivel trófico son altamente sensibles al contacto de xenobióticos, entre ellos se incluye a *Microcystis aeruginosa*, como organismo representante del fitoplancton, y a *Artemia franciscana* constituyente del zooplancton. Los biotopos de *Artemia* tienen como característica ser microcrustáceos cosmopolitas con preferencia a los hábitats de alta salinidad, ya que poseen un sistema de osmorregulación que les permite mantener la composición del líquido corporal constante (9 g L^{-1} de salinidad) (Barrionuevo & Marcial, 2006; Sánchez & Neira, 2006). Como organismo zooplanctónico, es de alta importancia ecológica, ya que presenta un elevado contenido proteico, lipídico y de ácidos grasos esenciales (Begon, Harper & Townsend, 1999). *Artemia* es un modelo biológico adecuado para el estudio de la toxicidad sobre medios acuáticos, no sólo por ser un representante del primer nivel trófico como consumidor primario, sino por su facilidad para la

eclosión de sus quistes, siendo su manutención y crecimiento en el laboratorio muy fácil usando un medio sintético similar a las condiciones de su hábitat natural.

Por su parte, *Microcystis* es una microalga del Phylum Cyanobacteria y de la familia *Microcystaceae* representante del fitoplancton. Las cianobacterias son los organismos fotosintéticos más primitivos con una larga historia evolutiva que se extiende al menos hasta hace 3.5 mil millones de años (Cronberg & Annadotter, 2006).

Las cianobacterias son productores primarios que tienen un rol crucial como componentes del ciclo del nitrógeno (van den Hoek, Mann & Jahns, 1995). Por consiguiente, *Microcystis aeruginosa* resulta ser un buen bioindicador, ya que es un productor primario fotosintético y como también se mencionó pertenece al primer nivel trófico, con una alta tasa de división celular, (crecimiento) y de una elevada captación lumínica.

El objetivo de la presente investigación se enfocó en evaluar la toxicidad aguda de la sal isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina (glifosato), sobre los bioindicadores *Artemia franciscana*, determinando la concentración letal 50 a las 24h de exposición ($CL_{50(24)}$) y *Microcystis aeruginosa*, estableciendo la concentración inhibitoria al 50% de la población a las 72h ($CI_{50(72)}$) y el coeficiente de forma (CF), a través del volumen y superficie celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustancias de ensayo

La sustancia de ensayo utilizada fue el herbicida organofosforado glifosato con una pureza del 97% [$C_3H_8NO_5P$] (La FAM®), con un contenido de glifosato ácido [N-(fosfonometil) glicina] no menor de 74% en concentración de 480 g L^{-1} de sal de isopropilamina de glifosato. Se trabajó a concentraciones crecientes del herbicida en un rango de 0.25 a 0.32 mg L^{-1} en las pruebas realizadas sobre *Artemia franciscana* y de 10 a 110 mg L^{-1} en las realizadas sobre *Microcystis aeruginosa*, estas diferencias en concentración se establecieron a partir de las diferencias biológicas de los bioindicadores y su ambiente acuático, siendo *A. franciscana* un microcrustáceo de ambientes acuáticos salinos y *M. aeruginosa* una cianobacteria de ambientes acuáticos dulces.

Para los estudios de morfología celular sobre *Microcystis aeruginosa* se trabajó a concentraciones de glifosato referentes a la 72h-NOEC y a la $CI_{50(72)}$ de acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de crecimiento.

Medio de cultivo BG-11

El medio de cultivo BG-11 se preparó bajo condiciones asépticas empleando agua tridestilada o destilada. Para el medio experimental se hizo una disolución 1:100, es decir,

para 1000 mL se disolvió 10 mL de BG-11 basal en 990 mL de agua tridestilada estéril. El pH se ajustó a 7.1 con solución de NaOH 1 M . Una vez preparada la solución se mantuvo en refrigeración ($2-8 \text{ }^\circ\text{C}$) en frascos estériles.

Material biológico

El material biológico consistió en nauplios de 24 horas de *Artemia franciscana* obtenidos a partir de la eclosión de quistes (Argent Chemical Laboratories, Washington, USA) por incubación en agua marina (Sera Premium, Germany) a 34 g L^{-1} de salinidad, pH de 8.4 ± 0.2 por 24 horas a una intensidad lumínica de $20 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Microcystis aeruginosa (cepa MaD12) fue obtenida de la colección de cultivos de microalgas de la Unidad de Genética, de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España, las cuales se mantienen en cultivo axénico a $21 \text{ }^\circ\text{C}$ y periodo de luz-oscuridad de 12:12h a una intensidad fotónica de $60 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, en matraces de cultivo (Greiner; Bio-One; GmbH, Germany), con 20 mL de medio de cultivo BG-11 (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Determinación de la mortalidad en *Artemia franciscana*

Se determinó la Concentración Letal 50 (CL_{50}), que es aquella que causa la muerte del 50% de nauplios de *Artemia franciscana* en 24 horas, mediante intoxicación aguda con el herbicida en una placa multipocillo (Sarstedt Inc., USA), según la técnica descrita por Persoone, Van de Vel, Van Steertegem & De Nayer, (1989). En cada pocillo se incluyeron 10 nauplios de *Artemia* que fueron expuestos a distintas concentraciones del agente tóxico (glifosato) en un volumen total de 1 mL . Se incluyó una línea de pocillos de control (sin agente tóxico) y se realizaron nueve repeticiones ($n = 9$), en incubación a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas en ausencia de luz. Para cuantificar el número de nauplios muertos en cada pocillo, se realizó la lectura a través del estereoscopio (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany).

Ensayos de inhibición de la tasa de crecimiento

Para estudiar el efecto inhibitorio se utilizaron tubos de doble cierre de poliestireno estériles (Sarstedt, AG & Co. Germany). Se establecieron 14 réplicas por cada concentración ensayada y un control sin xenobiótico.

Inicialmente, en cada tubo se incluyó una concentración de 10^6 cel mL^{-1} en un volumen total de 3 mL . Las células se obtuvieron de cultivo axénico, ajustando la concentración por recuento utilizando un microscopio óptico (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) sobre cámara de Neubauer (Blau Brand, GmbH + CO KG, Germany). Los grupos fueron expuestos a las concentraciones crecientes del xenobiótico, manteniéndolos durante todo el ensayo a $21 \text{ }^\circ\text{C}$ e iluminación en ciclo 12:12 de luz-oscuridad. Tras 72h (3d) de exposición, se midió la biomasa celular en cámara de Neubauer.

Análisis de la morfología celular

El diámetro, área, volumen y perímetro fue obtenido a partir de una $n = 30$ células de *Microcystis aeruginosa*. Para la cuantificación del coeficiente de forma se utilizó la metodología propuesta por Renau-Piqueras, Gómez-Perretta, Guerri & Sanchis, 1985, y las medidas de superficie y volumen celular por medio de los modelos geométricos propuestos por Hillebrand, Dürselen, Kirschtel, Pollingher & Zohary (1999) y Sun & Liu (2003). Se usó un sistema de análisis de imagen por observación a 100x en microscopio óptico (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany), por medio de una cámara incorporada (Am Scope Microscope Digital Camera, Model Number: MU1000, FMA050, 5mm, 10MP, Color CMOS) e interpretación con el software Am Scope versión 3.7.3377 (United Scope LLC, Irvine CA, U. S.), de las células control y las expuestas a los valores de 72h-NOEC y CI_{50} .

Análisis estadístico

Tanto los valores de las $CL_{50(24)}$ y las 24h-NOEC sobre *Artemia franciscana*, como de la $CI_{50(72)}$ y 72h-NOEC en *Microcystis aeruginosa* fueron obtenidos por regresión lineal a través de la relación de Concentración-Respuesta. La prueba de distribución normal de los datos se realizó a través de la prueba D'Agostino-Pearson por el sistema estadístico Graphpad Prism v7.0 (Graph-Pad Software Inc., USA), basada en el test de normalidad por D'Agostino & Pearson, (1973).

Las diferencias morfológicas en superficie y volumen celular exhibidas en *Microcystis aeruginosa*, que es un género con forma esférica (modelo 1H) se evaluaron por la Ecuación 1 A), B) de Hillebrand *et al.* (1999) y Sun & Liu (2003). Como medida de la forma de las células, el coeficiente de forma (CF) propuesto por Renau-Piqueras *et al.* (1985), fue calculado como se muestra en la Ecuación 1 C).

$$A) \quad V = \frac{(a^3)\pi}{6}$$

$$B) \quad A = a^2\pi$$

$$C) \quad CF = \frac{4\pi A}{p^2}$$

Ecuación 1. A) Cálculo del volumen y B) superficie celular de acuerdo con el modelo esférico (1H) (Hillebrand *et al.*, 1999; Sun & Liu, 2003), C) Cálculo del Coeficiente de Forma (CF) (Renau-Piqueras *et al.*, 1985).

Las comparaciones múltiples de volumen y superficie celular se realizaron por medio de un ANOVA de 1 vía por test Dunnett y todos los cálculos estadísticos de cada sección se manejan con un intervalo de confianza de $P \leq 0.05$ mediante el paquete estadístico Graphpad Prism v7.0 (Graph-Pad Software Inc., USA).

RESULTADOS

Con el microcrustáceo *Artemia franciscana* tras 24h de exposición al herbicida glifosato se obtuvo una $CL_{50(24)}$ de 0.3054 mg L^{-1} (0.2983 – 0.3151) y una de 24h-NOEC de 0.2488 mg L^{-1} (0.2370 – 0.2569), por lo que de acuerdo con la clasificación propuesta por la U.S. EPA para la categorización de los contaminantes acuáticos por toxicidad aguda, está incluido dentro de la Categoría I como una sustancia muy tóxica para el ambiente acuático (Tabla I).

Valores de $CL_{50(24)}$ en mg L^{-1} (L.C. al 95%)	Valores de 24h-NOEC en mg L^{-1} (L.C. al 95%)
0.3054 (0.2983 – 0.3151)	0.2488 (0.2370 – 0.2569)
Clasificación I U.S. EPA	

Tabla I. Valores de la $CL_{50(24)}$ y 24h-NOEC del glifosato sobre *Artemia franciscana* a 24 horas de exposición.

El efecto de la exposición aguda al herbicida resultó en una potente respuesta tóxica sobre los nauplios de *Artemia*, con una relación directa de Concentración-Respuesta (Figura 1). Con la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* tras 72 horas de exposición, se obtuvo una $CI_{50(72)}$ para el herbicida de 53.95 mg L^{-1} (36.31–95.72) y una 72h-NOEC de 2.95 mg L^{-1} (0.36–6.89) (Tabla II, Figura 2), para este bioindicador, el glifosato se categoriza como tóxico en la clasificación II de acuerdo con la categorización por la U.S. EPA.

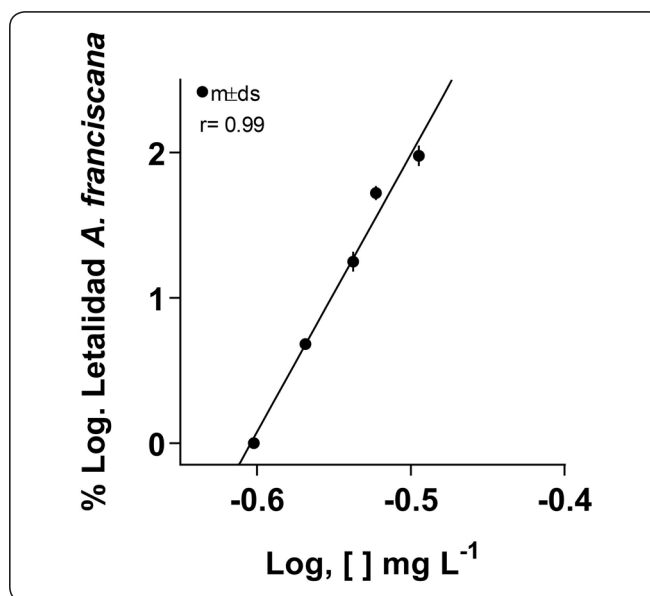


Figura 1. Curva Concentración-Respuesta de la exposición aguda de *Artemia franciscana* con el herbicida glifosato.

El efecto de la exposición aguda de *Microcystis aeruginosa* al herbicida tuvo como resultado una respuesta altamente tóxica, que se relaciona de manera directa con la concentración del xenobiótico.

Valores de $CI_{50(72)}$ en $mg L^{-1}$ (L.C. al 95%)	Valores de 72h-NOEC en $mg L^{-1}$ (L.C. al 95%)
53.95 (36.31 – 95.72)	2.95 (0.36 – 06.89)
Clasificación II U.S. EPA	

Tabla II. Valores de la $CI_{50(72)}$ y 72h-NOEC del glifosato sobre *Microcystis aeruginosa* a 72 horas de exposición.

En el estudio del coeficiente de forma (CF) por medio del perímetro celular de *M. aeruginosa* (Tabla III) y con el uso de la Ecuación 1, se obtuvo un valor $CF = 1 \pm 0.001$ tanto para las células control como para las expuestas a la CI_{50} , en cambio para las células expuestas a las 72h-NOEC el $CF = 0.99 \pm 0.001$, indica que las células no presentaron modificaciones en su estructura esférica.

Además, conforme a los datos de diámetro y perímetro celular obtenidos de las mediciones de las células de *Microcystis aeruginosa* expuestas a los valores correspondientes de la $CI_{50(72)}$ y a las 72h-NOEC (Tabla II), se observaron reducciones tanto en volumen, como en superficie celular, de 33.07% y de 23.40%, respectivamente en las células expuestas a la $CI_{50(72)}$ (Tabla III y Figura 3).

Mientras que en las células expuestas a las 72h-NOEC, hubo un incremento en el volumen celular demás del 16% en relación a las células control (Tabla III, Figura 3 y Figura 4), presentando diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$).

DISCUSIÓN

Con base en los resultados, se puede afirmar que el herbicida glifosato es un xenobiótico tóxico para el medio acuático. Un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) menciona que en pruebas con el microcrustáceo *Daphnia magna* se reportó una $CL_{50(24)}$ de $9.34 mg L^{-1}$ (WHO, 1994). Por otra parte, en un estudio realizado por Reno, Gutierrez, Regalado & Gagneten (2014), sobre la toxicidad aguda de la formulación basada en glifosato denominada Eskoba® y sobre los microcrustáceos de agua

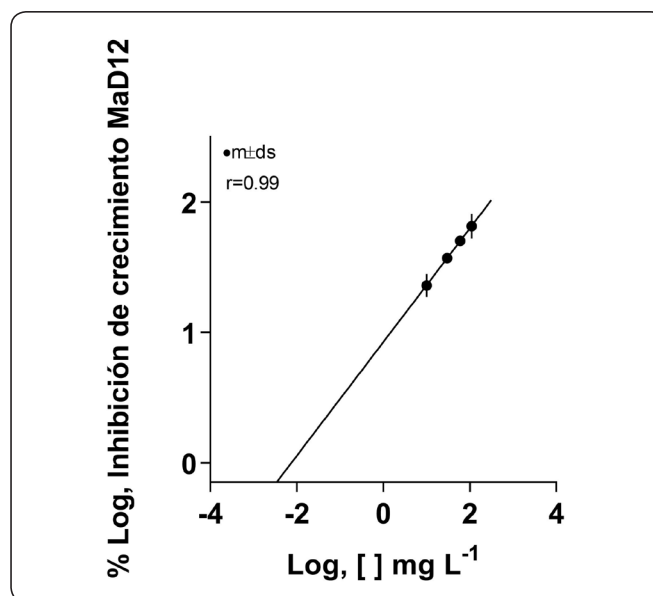


Figura 2. Curva Concentración-Respuesta de *Microcystis aeruginosa* a la exposición aguda del herbicida glifosato.

dulce *Simocephalus vetulus* y *Notodiatomus conifer*, se obtuvo una $CL_{50(48)}$ de $21.5 mg L^{-1}$ y una $CL_{50(48)}$ de $95.2 mg L^{-1}$, respectivamente. Es de notar que estos bioindicadores son característicos de agua dulce, lo cual puede ser causante de la variación tóxica del glifosato en organismos de agua salada (*Artemia franciscana*), donde la toxicidad resultó de categoría I.

En un estudio realizado por Tsui & Chu (2003), acerca de la toxicidad aguda del surfactante (POEA), el glifosato ácido y el producto comercializado (Roundup), sobre los bioindicadores *Acartia tonsa* (característico de agua salada) y *Ceriodaphnia dubia* (característico de agua dulce), se obtuvo una $CL_{50(48)}$ de $0.57 mg L^{-1}$ para el surfactante; de $35.3 mg L^{-1}$ para el glifosato ácido y de $1.77 mg L^{-1}$ para el producto sobre *Acartia tonsa* y una $CL_{50(48)}$ de $1.15 mg L^{-1}$ para el surfactante; de $147 mg L^{-1}$ para el glifosato ácido y

Parámetros de tamaño celular	Control	CI_{50}	72h-NOEC
Diámetro (μm)	2.77 ± 0.23	$2.44 \pm 0.18^{**}$	$2.94 \pm 0.18^*$
Perímetro (μm)	8.74 ± 0.71	$7.65 \pm 0.58^{**}$	$9.23 \pm 0.56^*$
Área (μm^2)	6.12 ± 1.01	$4.69 \pm 0.70^{**}$	$6.78 \pm 0.85^*$
Volumen (μm^3)	11.49 ± 2.88	$7.69 \pm 1.69^{**}$	$13.44 \pm 2.56^*$
CF (adimensional)	1.00 ± 0.001	1.00 ± 0.001	0.99 ± 0.001

* diferencias poco significativas con una $p \leq 0.05$ con respecto a las células control.
 ** diferencias significativas con una $p \leq 0.0001$ con respecto al control.

Tabla III. Parámetros medidos y Coeficiente de Forma de *Microcystis aeruginosa*.

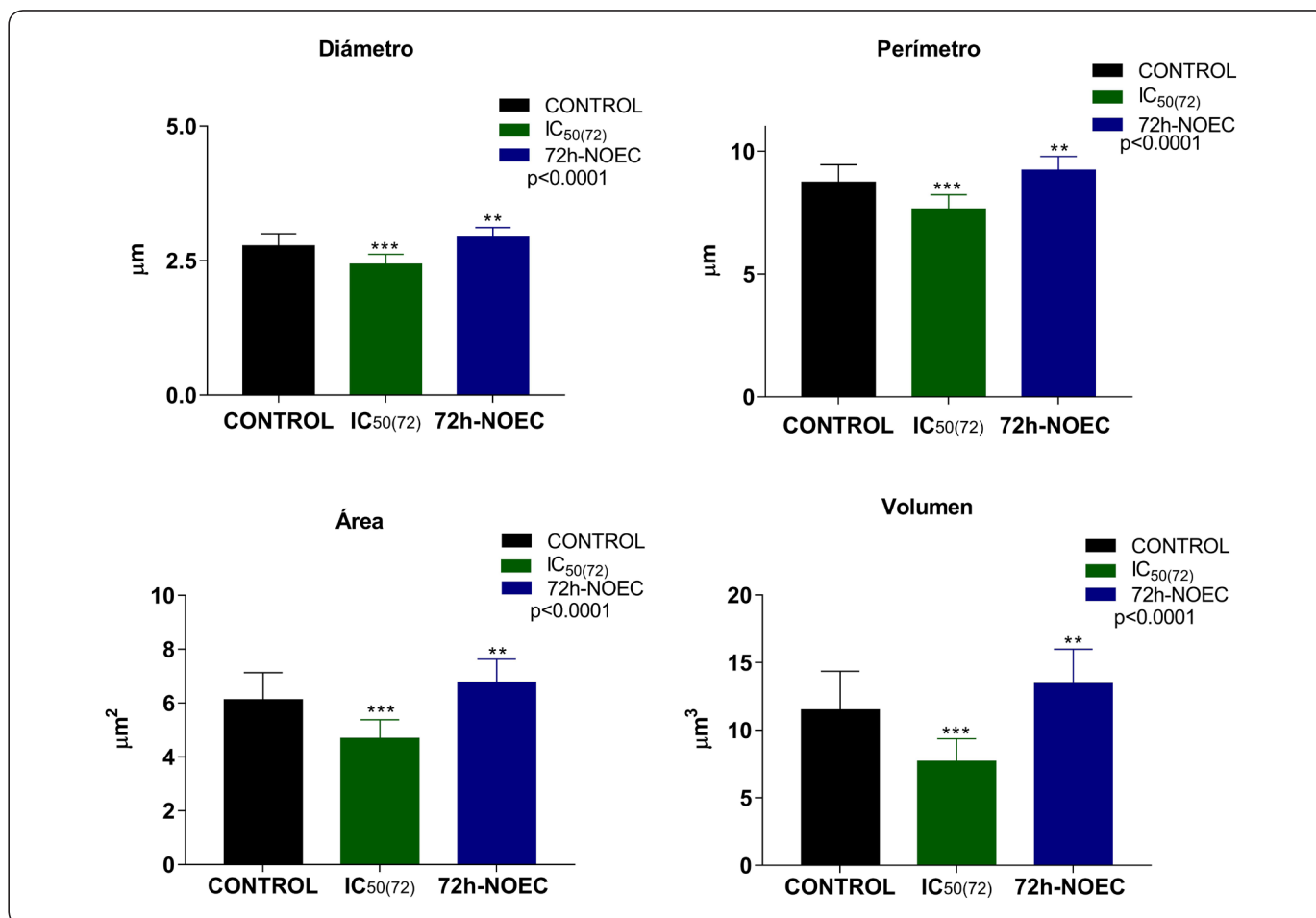


Figura 3. Diferencias entre el diámetro, perímetro, área y volumen de las células de *Microcystis aeruginosa* ($n = 30$). **, *** diferencias estadísticamente significativas $P \leq 0.05$.

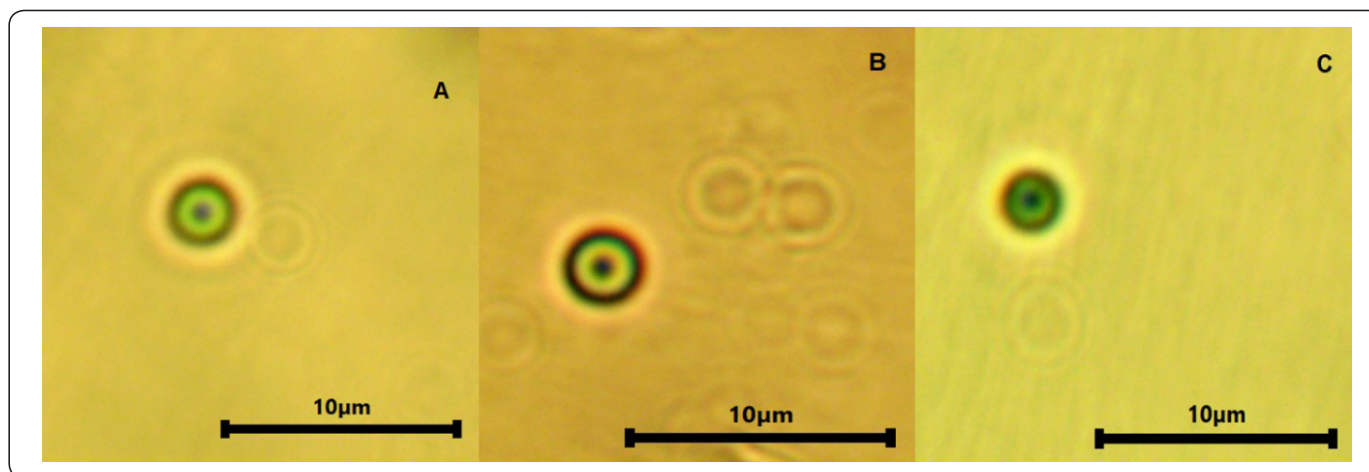


Figura 4. Células de *Microcystis aeruginosa* del cultivo Control (A), expuestas a 72h-NOEC (B) y a la IC₅₀(72) (C).

de 5.39 mg L⁻¹ para el producto, sobre *Ceriodaphnia dubia*. De estos resultados, destaca la alta toxicidad observada para la exposición a POEA, ya que es posible postular que es el surfactante el que produce la mayor respuesta. La comparación de los resultados obtenidos con el producto usado por estos autores (Roundup) y los obtenidos en este estudio (La FAM®, CL₅₀₍₂₄₎ 0.3054 mg L⁻¹), indican que la combinación del surfactante más los aditivos, incrementan la toxicidad del glifosato.

Existen pocos datos acerca de las respuestas del glifosato en microalgas. En este estudio con *Microcystis aeruginosa*, la CI₅₀₍₇₂₎ 53.95 mg L⁻¹ con sus respectivos Límites de Confianza al 95% (36.31 – 95.72), quedó registrada como sustancia tóxica para el medio acuático dentro de la categoría II de acuerdo con la U.S. EPA. Un estudio realizado por Lipok, Studnik & Gruyaert (2010), sobre la toxicidad aguda de la sal isopropilamina (IPA), la sal isopropilamina de glifosato (GIPA), el glifosato ácido y el producto comercializado (Roundup), sobre la microalga *Microcystis aeruginosa*, se obtuvo una CI₅₀₍₉₆₎ de 2.5 mg L⁻¹ para la sal isopropilamina; de 10.7 mg L⁻¹ para la sal isopropilamina de glifosato; de 251.4 mg L⁻¹ para el glifosato ácido y de 6.7 mg L⁻¹ para el producto. De estos resultados, destaca la toxicidad observada para la exposición a la sal isopropilamina, sin embargo, ésta no se encuentra de manera individual, sino en combinación con el glifosato, es decir, en su forma de sal isopropilamina de glifosato, que es el ingrediente activo de la mayoría de los herbicidas basados en glifosato. Por otra parte, un estudio realizado por Qiu *et al.* (2013), puntualiza que el glifosato puede tener un doble efecto deletéreo sobre las microalgas, ya sea como fuente de fósforo o como pesticida. Estos autores obtuvieron un mayor número de células al aumentar la concentración del principio activo del glifosato de 0.01 a 5 mg P L⁻¹, opuesto al utilizar un producto comercial (Roundup), donde observaron un incremento en el número de células de *Microcystis aeruginosa* en concentraciones debajo de 1 mg P L⁻¹ y una inhibición del crecimiento en concentraciones mayores a esta concentración. Además, en un estudio realizado por Wang, Lin, Li & Lin (2016), demuestran el efecto dual del glifosato sobre las microalgas (*Dunaliella tertiolecta* pertenecientes al Phylum Chlorophyta), al adicionar una fuente de fósforo, ésta no presenta efecto en su crecimiento al igual que al adicionar una concentración baja de glifosato, opuesto al utilizar una concentración alta de glifosato, el cual inhibe el crecimiento de la microalga, por otro lado, sobre *Isochrhysis galbana* perteneciente al Phylum Haptophyta, al adicionar una fuente de fósforo, ésta presenta un cambio en su crecimiento, que no se manifiesta al adicionar una baja concentración de glifosato, pero sí al adicionar una concentración alta de glifosato.

En un estudio realizado por López-Rodas *et al.* (2007), se utilizaron dos cepas de *Microcystis aeruginosa* llevando a cabo

un análisis de la morfología celular de ambas, obteniendo un CF de 1.00 ± 0.01 y de 0.99 ± 0.01 para cada una de ellas, es decir, en células de forma esférica. En este estudio, tanto para las células control, como para las expuestas a las concentraciones 72h-NOEC y CI₅₀₍₇₂₎ de glifosato, se obtuvo un CF ≈ 1, indicando que las células se mantienen esféricas, sin embargo, si hay un cambio en el tamaño de las células expuestas a la concentración 72h-NOEC, que son significativamente más grandes que las células control. Mientras que, las células expuestas a la CI₅₀, son significativamente más pequeñas. Posiblemente, el incremento en volumen y superficie celular de *M. aeruginosa* esté asociado a la utilización del glifosato como fuente de fósforo, produciéndose un fenómeno de hormesis (Qiu *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

La evaluación de la toxicidad aguda sobre *Artemia franciscana* y sobre *Microcystis aeruginosa* presentado en este estudio, certifica que además de que estos microorganismos son útiles para bioensayos ecotoxicológicos, el uso continuo de herbicidas basados en la sal isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina, resulta con efectos muy tóxicos para los organismos zooplanctónicos y fitoplanctónicos del ambiente acuático.

Adicionalmente, los resultados del coeficiente de forma sobre *Microcystis aeruginosa* indican que, si bien el glifosato no causa cambios morfológicos significativos en las células, sí provoca cambios significativos en el diámetro, volumen, área y perímetro de las células en diferentes concentraciones, posiblemente asociados a un proceso de hormesis.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a la Coordinación de Investigación Científica de la Benemérita y Centenaria Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por los recursos aportados y a la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid por proporcionarnos los bioindicadores para este estudio.

REFERENCIAS

- Aparicio, V. & Costa, J. L. (2013). Soil quality indicators under continuous cropping systems in the Argentinean Pampas. *Soil & Tillage Research*, **96**, 155-165. DOI: 10.3232/SJSS.2015.V5.N3.04.
- Barrionuevo, R. & Marcial, R. (2006). Ecología trófica de la fauna acuática en el manglar de San Pedro, Sechura. *Universalia*, **11**, 44-56.
- Begon, M., Harper, J. L. & Townsend, C. R. (1999). *Ecología: individuos, poblaciones y comunidades* (No. 04; QH541, B43y 1999). Barcelona: Omega. DOI: 10.1016/j.tree.2008.07.011.
- Carlisle, S. M. & Trevors, J. T. (1986). Glyphosate in the environment. *Water, Air, and Soil Pollution*, **29**, 409.

- DOI: 10.1007/BF00279485.
- COFEPRIS (2009). Catálogo de Plaguicidas. http://www.cofepris.gob.mx/wb/cfp/catalogo_de_plaguicidas (Página visitada el 12-11-2018).
- Cronberg, G. & Annadotter, H. (2006). *Manual of aquatic cyanobacteria: A photo guide and a synopsis of their toxicology*. Lund: Institute of Ecology/Limnology.
- D'Agostino, R. & Pearson, E.S., (1973). Tests for Departure from Normality. Empirical Results for the Distributions of b_2 and $\sqrt{b_1}$. *Biometrika*, **60**, 613–622. DOI: 10.2307/2335012.
- Eslava, P., Ramírez, W. & Rondón, I. (2007). *Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos*. Instituto de Acuicultura de los Llanos. Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana. 34-43.
- Goldsborough, L.G. & Beck, A.E. (1989). Rapid dissipation of glyphosate in small forest ponds. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **18(4)**, 537-544. DOI: 10.1007/BF01055020.
- Hillebrand, H., Dürselen, C. L., Kirschtel, D., Pollinger, U. & Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, **35**, 403-424. DOI: 10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x.
- Jaramillo, F., Meléndez, M.E. & Aldana, M.L. (2009). Toxicología de los Plaguicidas. En *Toxicología Ambiental*. **270**. Textos Universitarios. Universidad Autónoma de Aguascalientes - Universidad de Guadalajara, México.
- Lipok, J., Studnik, H. & Gruyaert, S. (2010). The toxicity of Roundup® 360 SL formulation and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs. *Ecotoxicology and Environmental Saftey*, **73**, 1681-1688. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2010.08.017.
- López-Rodas, V., Flores-Moya, A., Maneiro, E., Perdígones, N., Marva, F., García, M. E. & Costas, E. (2007). Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of pre-selective mutations. *Evolutionary Ecology*, **21**, 535-547. DOI: 10.1007/s10682-006-9134-8.
- Mann, R.M. & Bidwell, J.R. (1999). The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **36(2)**, 193-199. DOI: 10.1007/s002449900460.
- Mesnage, R., Defarge, Ni., Vendômois, J. & Séralini, G.-E. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*, **84**, 133-153. DOI: 10.1016/j.fct.2015.08.012.
- Myers, J.P., Zoeller, R.T. & Vom Saal, F.S. (2016). A clash of old and new scientific concepts in toxicity, with important implications for public health. *Environ Health Perspect*, **117(11)**, 1652–1655. DOI: 10.1289/ehp.0900887.
- Persoon, G., Van de Vel, A., Van Steertegem, M. & De Nayer, B. (1989). Predictive value of laboratory tests with aquatic invertebrates: influence of experimental conditions. *Aquatic Toxicology*, **14(2)**, 149-167. DOI:10.1016/0166445X(89)90025-8.
- Qiu, H., Geng, J., Ren, H., Xia, X., Wang, X. & Yu, Y. (2013). Physiological and biochemical responses of *Microcystis aeruginosa* to glyphosate and its Roundup® formulation. *Journal of Hazardous Materials*, **Vol. 248-249**, 172-176. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.12.033.
- Renau-Piqueras, J., Gómez-Perretta, C., Guerri, C. & Sanchis, R. (1985). Qualitative and quantitative ultrastructural alterations in hepatocytes of rats prenatally exposed to ethanol with special reference to mitochondria, golgi apparatus and peroxisomes. *Virchows Archiv.*, **405**, 237–251. DOI: 10.1007/BF00704375.
- Reno, U., Gutierrez, M. F., Regalado, L. & Gagneten, A. M. (2014). The impact of Eskoba®, a Glyphosate Formulation, on the Freshwater Plankton Community. *Water Environment Research*, **86**, 2294. DOI: 10.2175/106143014X13896437493580.
- Sánchez, L. & Neira, A. (2006). Bioensayo General de la Letalidad de *Artemia salina*, a las Fracciones del Extracto Etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. *Cultura Científica*, **3(3)**, 40-45.
- Sun, J. & Liu, D. (2003). Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of plankton research*, **25 (11)**, 1331-1346. DOI: 10.1093/plankt/fbg096.
- Tsui, M. T. K. & Chu, L. M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, **52**, 1189-1197. DOI: 10.1016/S0045-6535(03)00306-0.
- van den Hoek, C., Mann, D.G. & Jahns, D.M. (1995). *Algae. An Introduction to Phycology*.: Cambridge University. *European journal of Phycology*, **32(2)**, 203-205. DOI: 10.1017/S096702629621100X.
- Vera, M., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G., Zagarese, H. & Ferrano, M. (2014). New evidences of Roundup (glyphosate formulation) impact on the periphyton community in the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, **19(4)**, 710-721. DOI: 10.1007/s10646-009-0446-7.
- Wang, C., Lin, X., Li, L. & Lin, S. (2016). Differential Growth Responses of Marine Phytoplankton to Herbicide Glyphosate. *PLoS ONE*, **11(3)**, 1-20. DOI: 10.1371/journal.pone.0151633.
- WHO. (1994). Glyphosate. *Environmental Health Criteria*, **No. 159**. Geneva: World Health Organization, USA. DOI: 10.1002/food.19960400341.
- Williams, G.M., Kroesb, R. & Munro, I.C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **31(2)**, 117-165. DOI: 10.1006/rtph.1999.1371.