

Trabajo Original

Ecotoxicología

Toxicidad aguda del fungicida biológico Gluticid en planta acuática: *Lemna minor*.

Onelio Carballo Hondal¹, José Trujillo Hernández¹, Emilio Álvarez¹, Yaisel

Pomares Iturralde¹, Pilar Villa².

¹. Centro Nacional de Toxicología. Avenida 31 y 114. Marianao. Ciudad Habana. Cuba.

e-mail: ecotox@infomed.sld.cu, onelioch2006@yahoo.com.br

². Centro Instituto Cubano de Investigaciones de la Caña de Azúcar. ICIDCA Vía blanca

Nº 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón. Teléfono: 557015 Fax 336236

Resumen

El Gluticid, producto biológico de nueva creación, se obtiene por vía biotecnológica a partir de *Pseudomonas aeruginosas* cepa PSS y contiene metabolitos activos efectivos contra diferentes hongos fitopatógenos. Su evaluación toxicológica constituye un requisito de primer orden según regulaciones nacionales e internacionales. El objetivo del trabajo fue determinar la fitotoxicidad y el % de inhibición del crecimiento del Gluticid en la planta acuática *Lemna minor*.

Se desarrolló un sistema de ensayo estático, donde se evaluó el Gluticid, formulación final y la sustancia vehículo, Sulfato de Amonio [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], se utilizaron concentraciones de 0.01 ; 0.1; 1 ; 10 y 100 mg/L ; y concentraciones de 0.05; 0.5 ; 5 ; 50 y 500 mg/L para los grupos tratados y los grupos control y vehículo respectivamente. Las variables analizadas fueron: observación de signos de fototoxicidad y porcentaje de inhibición del crecimiento. Durante el tiempo del ensayo se pudo observar la presencia de signos de fitotoxicidad en todos los grupos tratados con Gluticid y en todos los grupos control vehículo, Sulfato de Amonio. El funguicida biológico Gluticid, su vehículo como la formulación final de aplicación estudiadas a concentraciones menores de 200 mg/L (Concentración de Aplicación en la Agricultura) produce signos de fitotoxicidad e inhibición del crecimiento en la planta acuática *Lemna minor* con una concentración efectiva media (CE_{50}) en el Gluticid, producto final, de 3.73 ± 0.36 mg/L y en la sustancia vehículo, Sulfato de Amonio, 50-500 mg/L .

Palabras clave: *Lemna minor*, Gluticid, Funguicida, Toxicidad aguda

Abstract

Acute toxicity of biological fungicide Gluticid on the aquatic plant *Lemna minor*.

Gluticid, biological product newly created is obtained by a biotechnological method, from the *Pseudomonas aeruginosas* strain PSS, which active metabolites are effective against different phytogeticfungi. Its toxicological evaluation is a first order requirement according to national and international standards. The Objective to evaluated the phytotoxicity and percent of inhibicion of Gluticid on the aquatic plant *Lemna minor*.

A statical assay system was developed for evaluating the final formulation of Gluticid and the vehicule, Ammonium Sulphate $[(\text{NH}_2) \text{SO}_4]$. The concentrations applied ranged from 0.01; 0.1, 1, 10 and 100 mg/L and concentrations of 0.05; 0.5, 5, 50 and 500 mg/L for the treated groups, control and vehicle groups respectively. The analysed variables were: phytotoxicity signs and percent of inhibition during the assay, signs of phytotoxicity were seen in all the groups treated with Gluticid and in all the control vehicle groups.

The biological fungicide Gluticid yours vehicle as well as the final formulation applied, studied at concentrations lower than 200 mg/L (Applied concentration in Agriculture) produced signs of phytotoxicity and inhibition in the growth of the lemna minor. The median effective concentration (CE_{50}) of the final product of Gluticid was 3.73 ± 0.36 mg/L and in the vehicle substance, ammonium Sulphate 50-500 mg/L

Key words: *Lemna minor*, Gluticid, Fungicide, Acute toxicity

Introducción

El uso de los plaguicidas químicos será una necesidad para la protección de las plantas cultivadas hasta tanto no se perfeccionen otros métodos para el control de insectos, bacterias, hongos, nemátodos y malezas, los que en su conjunto causan enormes pérdidas en la agricultura mundial. Por lo tanto, para el empleo de plaguicidas biológicos, los agricultores, investigadores y agrónomos, han de tener en cuenta una serie de efectos que pueden causar estos productos en el ambiente agroecológico.

Se ha podido evidenciar que en muchas oportunidades la aplicación de un plaguicida al suelo destinado a la destrucción de determinado fitopatógeno, provoca el desarrollo explosivo de otros, los cuales, a pesar del tratamiento pueden ocasionar la pérdida del cultivo. Este incremento de la actividad parasítica de muchos microorganismos ha sido puesto de manifiesto en numerosas oportunidades, cuestión de suma importancia en el campo de la fitopatología y la entomología.

La contaminación ambiental y específicamente de las aguas constituye una de los problemas que más interés y preocupación han generado en los últimos años y que hoy en día es un serio problema que enfrentan los países desarrollados y los que están en vías de desarrollo. Las estadísticas plantean que un 51 % de los desechos tienen como destino final los ríos, embalses y aguas costeras¹.

La valoración del riesgo medioambiental de plaguicidas biológicos, reguladas por las Directiva 91/414/EEC², 2001/36/EEC³ y vigente la 2005/25/CE¹⁷ están constituida por una serie de procedimientos destinados a conocer el comportamiento ambiental y la ecotoxicidad de cada compuesto químico y biológico que quiere ser registrado como sustancia activa y autorizado su uso como producto formulado en el ámbito nacional como establece la Comunidad Europea².

La producción y aplicación de bioplaguicidas ha permitido a Cuba contar con recursos propios para la protección fitosanitaria de los cultivos y reducir el uso de los químicos en la agricultura con el consecuente beneficio para la protección del medio ambiente y la inocuidad de los alimentos.

Los hongos, que son causa de muchas enfermedades en las plantas, se reproducen por cuerpos simples muy pequeños conocidos como esporas, viviendo algunos como saprofitos o como parásitos. Frecuentemente encontramos algunos de ellos que viven saprofiticamente, hasta que las condiciones son favorables para ellos atacar a las plantas, pasando a la condición de parásito.

El funguicida biológico Gluticid, producido por el ICIDCA, a partir de la Fermentación de un Microorganismo (*Pseudomona sp*) consiste en un producto biológico, formulado en un polvo humedecible, que ha demostrado efectividad en el control de diversos hongos foliares y del suelo, contiene metabolitos secundarios activos (Ácido salicílico, Pioverdin, Antibióticos)^{4, 5}.

Esta sustancia de contacto tiene una dosis de aplicación entre 3-3.5 Kg./ha, equivalente a la concentración de 200 mg/L, con una frecuencia de aplicación foliar cada 7 días durante 21 días, en dependencia al tipo de cultivo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la fitotoxicidad del fungicida biológico Gluticid sobre plantas acuáticas, utilizando la especie *Lemna minor* como organismo de ensayo, según lo regulado por la EPA ⁶ y las Guías de la OECD⁷.

Materiales y métodos

En este estudio se empleó como sustancia de ensayo el producto final Gluticid utilizado en la agricultura, el principio activo y la sustancia vehículo Sulfato de Amonio presentes en la formulación final.

Para el estudio se utilizó la *Lemna minor*, especie con abundante representatividad ecológica, miembro de la cadena trófica, con buena disponibilidad y adecuabilidad para pruebas de laboratorio y una adecuada información sobre la biología y la ecología ^{8, 9}.

Las plantas proceden del cultivo propio del laboratorio, donde se han reproducido en condiciones semicontroladas. De ahí fueron seleccionados los mejores ejemplares e

introducidos en la solución nutritiva recomendada para los ensayos ¹⁰ con el objetivo de garantizar los requerimientos nutritivos necesarios para mantenerlas en estado óptimo.

Las plantas son mantenidas en esta solución durante 21 días en las mismas condiciones de temperatura e iluminación a que serán sometidas durante el estudio. De este grupo se seleccionan las que cumplan los requisitos de presentar dos frondas de color y tamaño uniforme, con sus respectivas raíces.

Las condiciones ambientales para el período de adaptación y del ensayo coinciden manteniendo los siguientes parámetros: Iluminación: Fotoperíodos de 12 horas x 12 horas, Temperatura: 23 +/- 2 °C, pH de la solución: 7.5-8.5

Diseño experimental

El ensayo se desarrolló en un sistema estático para la determinación de la fitotoxicidad provocado por la sustancia de prueba Gluticid, el principio activo y la sustancia vehículo sulfato de amonio, sobre las plantas acuáticas de la especie *Lemna minor*. La prueba se ejecutó siguiendo la guía las directivas de la EPA ^{11, 6} y OECD ⁷ y cumpliendo las regulaciones de las Buenas Practicas de Laboratorio para este ensayo.

Este estudio duró 7 días (168 horas) y la ruta de exposición de la sustancia de ensayo fue directamente en la solución nutritiva.

Las sustancias de ensayo se administraron directamente en la solución de ensayo y se espero un tiempo de 15 minutos para lograr homogeneidad y uniformidad en la solución, previa a la introducción de las plantas de ensayo, la exposición será a concentración única durante el ensayo

Se realizó un estudio preliminar en el principio activo y el producto final a la concentración de 100 mg/l y en el caso del sulfato de amonio a la concentración de 500 mg/l, cantidad de sulfato de amonio presente al pesar la cantidad de producto final correspondiente. Se presentaron signos de fitotoxicidad e inhibición del crecimiento en el producto final y en el sulfato de amonio, por lo que se realizaron curvas a concentraciones menores, tomando como factor de dilución 10.

Se utilizaron concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 mg/l para el control negativo, principio activo y producto final. Para el sulfato de amonio las concentraciones fueron de 0.05, 0.5, 5, 50 y 500 mg/l.

Las plantas se distribuyeron aleatoriamente, quince plantas por grupos a razón de cinco plantas de dos frondas en cada réplica en frascos de 400 ml con 200 ml de la solución nutritiva, contando con tres réplicas en cada grupo.

Las observaciones se realizaron durante los 7 días que duró el ensayo teniendo en cuenta aquellos parámetros capaces de cambiar el aspecto normal de las plantas y/o signos de fitotoxicidad que expresen trastornos fisiológicos y detrimentales, según las siguientes definiciones:

- ◆ Crecimiento del grupo control. (td=2.5 días)
- ◆ Clorosis en las frondas: Las frondas toman una coloración amarilla.
- ◆ Necrosis: Las frondas toman una coloración oscura (parda)
- ◆ Muerte total: Las frondas pierden toda su coloración.
- ◆ Estrés: Separación de las frondas.

Para la determinación de la LC 50 se utilizó el programa Probit de la EPA y el Dunet para la significación estadística ^{12,13}.

El porcentaje de inhibición del crecimiento es calculado para cada concentración de ensayo utilizando la siguiente fórmula:

$$\%Ir = C\mu - T\mu / C\mu \times 100$$

Donde:

C μ : Es el valor medio para μ en los grupos controles

T μ : Es el valor medio para μ en los grupos tratados.

Resultados y discusión

Durante el tiempo del ensayo no se observaron signos de fitotoxicidad ni ocurrió mortalidad en los grupos Control Negativo y Principio Activo.

Sin embargo se pudo observar la presencia de signos de fitotoxicidad, en los grupos correspondientes al Sulfato de Amonio y Gluticid (Formulación Final). Los signos de fitotoxicidad se expresan como el porciento de réplicas que presentaron signos de estrés, clorosis, necrosis y muerte total de las plantas (**Fig. 1**).



A: Control negativo B: Producto Final (100 mg/l).

1: clorosis, 2: necrosis, 3: muerte total.

Fig.1 Signos de fitotoxicidad mostrados por las Frondas.

En el caso del producto final vemos como los signos de fitotoxicidad se hacen más intensos en la medida en que la concentración aumenta, siendo más severa en los niveles de concentración de 10 y 100 mg/l. En el sulfato de Amonio se aprecia un incremento de los signos de fitotoxicidad en los niveles de 50 y 500 mg/l, siendo muy bajos en los niveles correspondientes a las concentraciones de 5 - 0,5 - 0,05 mg/l. El crecimiento de las frondas fue el otro parámetro que mostró el efecto negativo provocado sobre la Lemna por los grupos Gluticid Formulación Final y

Sulfato de Amonio, a las concentraciones de 100 y 500 mg/l respectivamente. Como se puede observar no ocurrió crecimiento alguno en estos niveles de concentración (Tabla No. 1).

Tabla N° 1 Conteo del número de frondas por niveles de concentración para el
Principio Activo, Producto Final y Sulfato de Amonio.

Niveles de Concentración.	TIEMPO (horas)							
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
CN	X	16	21.3	33.3	41.7	55	73.6	83
	SD	1.6	0.47	1.7	1.2	1.6	1.2	1.5
PRINCIPIO ACTIVO	X	15.3	21.7	33.3	42.3	55	75	83
	SD	0.9	1.2	0.5	0.5	0.8	0.8	0.8
PRODUCTO FINAL	X	10	10	10	10	10	10	10
	SD	0	0	0	0	0	0	0
SULFATO DE AMONIO	X	10	10	10	10	10	10	10
	SD	0	0	0	0	0	0	0

El crecimiento de las frondas presenta una alta correlación con los resultados del porcentaje de inhibición, obtenidos para estos niveles de concentración (Tabla No 2).

Tabla No 2. Porciento de inhibición del crecimiento (% Ir) en los diferentes tiempos para cada grupo experimental.

Niveles de Concentración	Tiempo (h)						
	24	48	72	96	120	144	168
Principio Activo	0	0,13	3,53	3,25	0	0	0
Producto Final	100	100	100	100	100	100	100
Sulfato de Amonio	100	100	100	100	100	100	100

Como se explicó inicialmente en los materiales y métodos, si en el nivel de concentración correspondiente a la dosis límite 500 mg/l para el Sulfato de Amonio y 100

mg/l para la formulación Gluticid aparecían signos de toxicidad u ocurría mortalidad, se realizaría una curva a concentraciones menores utilizando como factor 10.

En las curvas correspondientes a la formulación Gluticid y al Sulfato de Amonio, se observó el alto porcentaje de réplicas en que las plantas mostraron signos de estrés correspondiente a los niveles de 10 y 100 mg/l, para el Gluticid así como 50 y 500 mg/l para el Sulfato de Amonio, en las primeras 48 horas de iniciado el ensayo. Además se apreció el alto porcentaje de réplicas donde ocurrió muerte total de las plantas en los niveles de concentración de 10 y 100 mg/l para el Gluticid y el nivel de 500 mg/l para el Sulfato de Amonio.

El crecimiento de las frondas fue el otro parámetro afectado. En el Gluticid en la concentración de 100 mg/l no hubo crecimiento, se observó un crecimiento ligero en el nivel de 10 mg/l y existió una ligera disminución en 1 y 0,01 mg/L. En el Sulfato de Amonio no hubo crecimiento en la concentración de 500 mg/l, hubo una ligera disminución del número de frondas en el nivel de 50 mg/l, pero ya en el resto de los puntos no se apreció una afectación sensible.

Estos valores están en concordancia con los resultados relacionados con el porcentaje de inhibición del crecimiento para el Producto Final, (Tabla No 3), donde se observa una inhibición total en el nivel de 100 mg/l y una afectación severa en el nivel de 10 mg/l. Algo similar sucede en el Sulfato de Amonio (Tabla No 4), en este caso la toxicidad en el nivel de 500 mg/l es bastante severa pero en sentido general podemos plantear que la afectación es menor. En los niveles restantes también existen alteraciones, siendo más ligeras en la medida que los valores de concentración disminuyen.

Tabla Nº 3. Porciento de inhibición del crecimiento (% Ir) en los diferentes tiempos para cada concentración de la formulación Gluticid.

Niveles de Concentración	Tiempo (h)						
	24	48	72	96	120	144	168
0,01mg/l	0	0	0	0	0	0	0
0,1mg/l	21.0	0	6.25	6.7	0	7.1	7.7
1mg/l	36.8	6.7	18.7	13.3	14.3	21.4	23.0
10 mg/l	63.1	40	50	53	57.1	64.3	61.5
100 mg/l	100	100	100	100	100	100	100

Tabla Nº 4 Porciento de inhibición del crecimiento (% Ir) en los diferentes tiempos para cada concentración de sulfato de amonio.

Niveles de Concentración	Tiempo (h)						
	24	48	72	96	120	144	168
0,05mg/l	0	0	0	0	0	0	0
0,5mg/l	0	0	0	0	0	0	0
5mg/l	22.2	0	15.4	7.6	0	0	0
50 mg/l	50.0	0	0	25.0	18	10	20
500 mg/l	100	100	100	100	100	100	100

Al realizar un análisis de la inhibición del crecimiento y el valor de la concentración efectiva para el 50 % (CE50) relacionada con el crecimiento de las frondas, vemos que:

Para el grupo Gluticid Formulación Final, la concentración efectiva media,

$$CE50 = 3,73 \pm 0.36 \text{ mg/l.}$$

Para el grupo Sulfato de Amonio, la concentración efectiva media,

$$CE50 = 50\text{-}500 \text{ mg/l.}$$

Hay una mayor inhibición del crecimiento de las frondas en el grupo correspondiente al Producto Final que el Grupo Correspondiente al Sulfato de Amonio. Esto asociado a que existen diferencias respecto a la ocurrencia de muertes a las concentraciones de 10 y 100 mg/l para el Gluticid Formulación Final, y solamente a la concentración de 500 mg/l para el Sulfato de Amonio, nos permite plantear que la asociación que pudiera ocurrir entre los metabolitos del Principio Activo y el soporte

Sulfato de Amonio presente en una proporción igual al 20 %, es responsable del aumento de la toxicidad para el Producto Final respecto al Sulfato de Amonio.

El sulfato de amonio a concentraciones menores de 50 mg/l (0.05- 0.5 y 5 mg/l), produjo un incremento significativo en el número de frondas, sin embargo se produce un efecto contrario en los niveles de 50 y 500 mg/l. Esto es debido a que el sulfato de amonio a bajas concentraciones constituye una fuente importante de nitrógeno, elemento que conjuntamente con el fósforo, son importantes nutrientes para el desarrollo y crecimiento de las plantas.

El Sulfato de amonio es tóxico para el fitoplancton de agua dulce y plantas vasculares, pero existen estudios que indican que las plantas de agua dulce son más tolerantes al amonio que los peces y los invertebrados.¹⁵

Existen reportes de estudios de toxicidad realizados en plantas acuáticas al sulfato de amonio como sustancia de ensayo. Podemos mencionar el ensayo estático, de 22 días de duración utilizando la Hierba de Estanque (*Potamogeton illinoensis*), reportándose una concentración tóxica de 40mg/l.¹⁶

No existen reportes en Cuba de estudios empleando *Lemna minor* como organismo de ensayo, solo se han realizado estudios ecotoxicológicos a un Brasinoesteroide utilizando *Lemna aequinoctialis*.⁹

Conclusiones

El Principio Activo no provocó signos de fitotoxicidad ni se reportó inhibición del crecimiento, el Gluticid Formulación Final provocó signos de fitotoxicidad y se reportó inhibición del crecimiento $CE_{50} = 3,73 \pm 0.36$ mg/l y el vehículo Sulfato de Amonio provocó signos de fitotoxicidad y se reportó inhibición del crecimiento $CE_{50} = 50 - 500$ mg/l.

Referencias bibliográficas

1. Velásquez Lustiniano, Plantas Acuáticas Vasculares de Venezuela. Código: L 323-97 (1987)
2. EEC, 1991.EEC Directiva 91/414/CE. Ecotoxicological studies relative to plant protection products. (1991)
3. Directiva 2001/36/CE. Comisión del consejo, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. Diario Oficial N° L 164 de 20/06/2001 p. 0001-0038.
4. Gluticid .Expediente preliminar. Villa, P. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. ICIDCA. 2000.
5. Villa P; ME. Díaz de Villegas 1996. Potencialidades de un producto biológico de pseudomonas spp cepa pss para el control de hongos y malezas. En: Sobre los Derivados. XXX; 6-12. ICIDCA.
6. United States Environmental Protection Agency. USEPA (1989). Short-Term Methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to fresh water organism. 2n Edition.
7. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals proposal for a Guideline. Lemna Growth Sp. Inhibition Test. Draft Document. December.1999.
8. American Society for testing and materials ASTM(1991).Standard Guide for conducting Static Toxicity Test with Lemna gibba G3; Designation: E 1415-45. 1-10.
9. Pérez Davison G.Lic.et.al.,(2000). Tesis presentada en opción al grado científico de: Maestro en Ciencias. Estudios Ecotoxicológicos al Biobras- 16. Universidad de la Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos. Centro de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas.
10. Environmental Protection Agency. Methods for acute toxicity test fish, macroinvertebrate, and amphibians. Ecol Res Ser. EPA-660/3-75- 009/s1/:EPA; 1975.

11. Shayne C; Carrot W. Statistic for toxicologist. En Wallace P. Principles and methods for toxicology. New York: Ed. Raven Press; 1982 p. 273-319.
12. Environmental Protection Agency. Dunett. Programa versión 1.5 Ecological Monitoring Research /s.l/; EPA1989.
13. Knie J; Halke A; Juhnke I, Schiller W. Results of Studies on Chemical Substances with Four Biotests. Dtsch. Gewaesserkd.Mitt. 1983 27(3); 77-9.
14. US Environmental Protection Agency. Ambient water quality Criteria for ammonia, /s.l/; EPA; 1985
15. Pesticide Action Network North America - Chemical Toxicity Studies on Aquatic Organisms. Disponible: http://www.pesticideinfo.org/List_AquireAll.
16. Comisión del Consejo relativa a la comercialización de productos Fitosanitarios. Directiva 2005/25/CE. Diario oficial Mar. 14; 2005. p. 1 – 34.

Recibida: 14/04/2008

Aceptada: 02/05/2008