

EFFECTO FITOTÓXICO DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS SOBRE SEMILLAS LEGUMINOSAS

RACCA, JOAQUÍN; MARTINO, TOMÁS

Facultad de Ciencias Veterinarias UNL
Director/a: Althaus, Rafael
Codirector/a: Nagel, Orlando

Área: Ciencias Naturales

INTRODUCCIÓN

En medicina veterinaria, las quinolonas se emplean por su actividad sobre un amplio espectro de bacterias Gram-negativas y algunas Gram-positivas. Estas moléculas se metabolizan en diferente grado, a excepción de oxofloxacina y sus metabolitos con actividad antimicrobiana pueden excretarse a través de heces y orina (Ghava et al. 2015) y llegar a suelos y agua, representando un riesgo para las cuencas acuíferas (Campagnolo et al., 2002). Las quinolonas pueden contaminar las aguas superficiales y subterráneas cercanas a lagunas de almacenamiento de efluentes de establecimientos ganaderos (Campagnolo et al., 2002)

Para evaluar el impacto ambiental de los antibióticos, algunos autores analizaron su acción fitotóxica sobre la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas. Hillis et al. (2011) analizaron el efecto de diez antibióticos sobre la germinación y desarrollo de *Lactuca sativa*, *Medicago sativa* y *Daucus carota*, señalando que 3,9 µg/l para levofloxacina produce daños y representa un riesgo. Por su parte, Eluk et al. (2016) estudiaron el efecto de cinco antibióticos sobre la frecuencia de germinación y la elongación de raíces de cinco cultivos argentinos. Ellos destacan que 0,10 mg/l de enrofloxacina fue perjudicial para el desarrollo de sorgo (*Sorghum bicolor*).

OBJETIVOS

El propósito de este trabajo fue evaluar la fitotoxicidad de seis quinolonas utilizadas en Medicina Veterinarias (ciprofloxacina, enrofloxacina, levofloxacina, marbofloxacina, norfloxacina y ofloxacina) sobre la elongación de raíces y tallos de tres especies forrajeras frecuentemente cultivadas en Argentina (*Medicago sativa*, *Melilotus albus* y *Trifolium pratense*).

Materiales y Métodos

Antibióticos: Se utilizaron seis quinolonas ciprofloxacina, enrofloxacina, levofloxacina, marbofloxacina, norfloxacina y ofloxacina. Se ensayaron cinco concentraciones de cada quinolonas siguiendo una escala logarítmica en base 10 (C0= 0 mg/l, C1= 0,1 mg/l C2= 1 mg/l, C3= 10 mg/l y C4= 100 mg/l).

Semillas forrajeras: Se utilizaron tres variedades de semillas forrajeras: *Medicago sativa* (alfalfa), *Lolium perenne* (raigrás) y *Trifolium pratense* (trébol rojo).



Estudios de toxicidad: Se utilizó el protocolo standard de pruebas de toxicidad en plantas terrestres propuesto por ASTM, (2003). A continuación, se seleccionaron en forma aleatoria 1500 unidades experimentales de cada especie. Por cada variedad de semilla (3) y concentración (5) de cada antibiótico (6) se analizaron quintuplicados (5) en placas de Petri (100 x 15 mm). En cada placa, se colocaron 10 semillas sobre un filtro de celulosa Whatman. Se añadieron 10 ml de las disoluciones antibióticas (C0, C1, C2, C3 y C4) a cada placa. Las placas se cubrieron con Parafilm M y se colocaron durante siete días en cámara de incubación a 25°C. Se realizaron duplicados de las mediciones de las longitudes de cada raíz y tallo utilizando un calibre Vernier (sensibilidad de 0,05 mm). Se empleó el Análisis de la varianza ANOVA y test de Tukey para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de antibióticos sobre la elongación de las raíces y tallos.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

En la Tabla 1 se expone el efecto de los diferentes niveles de quinolonas sobre las medias de las longitudes de raíces de las tres especies forrajeras. Los resultados del ANOVA muestran que las seis quinolonas ensayadas afectan significativamente ($p < 0,05$) a las elongaciones de las raíces de las tres variedades de semillas forrajeras. Así, concentraciones de 0,1 mg/l de enrofloxacin, ciprofloxacina, marbofloxacina y norfloxacina afecta a la raíz de *M. sativa*, mientras que, levofloxacina (1 mg/l) y ofloxacina (10 mg/l) requieren mayores niveles para producir un efecto fitotóxico.

Con respecto a *L. perenne* (raigrás), se observa en Tabla 1 que es más sensible de las tres especies forrajeras. Bajas concentraciones (0,1 mg/l) de las seis quinolonas ensayadas producen una disminución en la elongación radicular de raigrás.

Por el contrario, se necesitan mayores concentraciones de quinolonas (1 mg/l) para producir una disminución en la longitudes de las raíces de *T. repens* (trébol rojo), a excepción de marbofloxacina que manifiesta su efecto fitotóxico a baja concentración (0.1 mg/l). En lo referente al efecto fitotóxico de las quinolonas sobre la elongación de los tallos de las semillas forrajeras, también se puede apreciar (Tabla 2) que estos antimicrobianos afectan significativamente ($p < 0,01$) al desarrollo de los tallos de las tres variedades forrajeras. En efecto, bajas concentraciones (0,1 mg/l) de enrofloxacin, marbofloxacina, levofloxacina y norfloxacina produce una disminución en la longitud de los tallos de *M. sativa*; mientras que, se necesitan mayores concentraciones de ofloxacina (1 mg/l) y ciprofloxacina (10 mg/l) para ejercer un efecto negativo sobre los tallos.

En forma similar al efecto observado en las raíces de *L. perenne*, los tallos de esta especie presentan mayor sensibilidad a las quinolonas, puesto que, 0,1 mg/l de prácticamente todas las moléculas ensayadas presentan efecto fitotóxico sobre el crecimiento de los tallos, a excepción de enrofloxacin y norfloxacina que deben estar presentes a una concentración superior (1 mg/l).

Por último, el comportamiento de las quinolonas sobre los tallos de *T. repens* fue similar al señalado para *L. perenne*; ya que 0,1 mg/l de ciprofloxacina, levofloxacina y ofloxacina producen disminuciones significativas en las longitudes de los tallos. Marbofloxacina (1 mg/l), norfloxacina (1 mg/l) y enrofloxacin (100 mg/l) deben estar presentes a mayores niveles para producir efectos significativos sobre sus tallos.

Semilla forrajera	Quinolonas	Concentración de quinolona (mg/l)				
		0	0,1	1	10	100
Alfalfa	Ciprofloxacina	2.99 _a ±0.56	1.92 _b ±0.36	0.86 _c ±0.30	0.70 _c ±0.22	0.35 _d ±0.19
	Enrofloxacin	3.25 _a ±0.52	1.79 _b ±0.46	2.17 _b ±0.54	1.51 _c ±0.31	0.93 _d ±0.32
	Levofloxacin	2.99 _a ±0.56	3.09 _a ±0.37	2.16 _b ±0.25	1.58 _c ±0.28	1.24 _d ±0.21
	Marbofloxacina	3.99 _a ±0.23	2.99 _b ±0.55	2.36 _c ±0.86	1.13 _d ±0.31	1.14 _d ±0.32
	Norfloxacin	3.45 _a ±0.78	1.79 _b ±0.46	2.05 _b ±0.22	1.30 _c ±0.44	1.15 _c ±0.16
	Ofloxacin	2.99 _a ±0.56	3.05 _a ±0.32	2.87 _a ±0.32	2.39 _b ±0.19	1.88 _c ±0.34
Raigrás	Ciprofloxacina	9.16 _a ±0.59	5.16 _b ±0.45	4.29 _c ±0.61	2.99 _d ±0.34	2.38 _e ±0.30
	Enrofloxacin	8.62 _a ±0.40	5.27 _b ±0.36	4.43 _c ±0.28	3.92 _d ±0.68	3.12 _e ±0.42
	Marbofloxacina	9.16 _a ±0.59	6.86 _b ±0.81	4.65 _c ±0.60	2.64 _d ±0.59	0.94 _e ±0.27
	Levofloxacin	9.16 _a ±0.59	7.15 _b ±0.32	4.44 _c ±0.45	3.24 _d ±0.48	0.92 _e ±0.27
	Norfloxacin	8.62 _a ±0.40	5.40 _b ±0.32	4.48 _c ±0.28	3.77 _d ±0.28	3.08 _e ±0.34
	Ofloxacin	9.17 _a ±0.59	7.32 _b ±0.43	6.06 _c ±0.47	2.35 _d ±0.28	1.08 _e ±0.33
Trébol Rojo	Ciprofloxacina	2.06 _a ±0.57	2.31 _a ±0.46	1.34 _b ±0.19	1.34 _b ±0.24	0.75 _c ±0.14
	Enrofloxacin	2.06 _a ±0.57	1.96 _b ±0.53	1.55 _b ±0.35	1.34 _b ±0.28	1.71 _c ±0.26
	Marbofloxacina	2.06 _a ±0.57	1.26 _b ±0.35	1.20 _b ±0.26	0.96 _{bc} ±0.29	0.89 _c ±0.20
	Levofloxacin	2.06 _a ±0.57	2.20 _a ±0.15	1.15 _b ±0.24	0.96 _b ±0.23	0.32 _c ±0.17
	Norfloxacin	2.46 _a ±0.52	2.38 _a ±0.22	1.94 _b ±0.25	1.36 _c ±0.11	1.02 _d ±0.28
	Ofloxacin	2.69 _a ±0.56	2.59 _a ±0.28	2.36 _b ±0.31	2.38 _c ±0.19	1.88 _c ±0.34

Tabla 1. Efecto de diferentes concentraciones de quinolonas sobre elongación de raíces de semillas forrajeras (a,b,c,d,e: Diferentes letras en una misma fila indican diferencias significativas con p<0,05).

Semilla	Quinolonas	Concentración de quinolona (mg/l)				
		0	0,1	1	10	100
Alfalfa	Ciprofloxacina	5,85 _a ±0,61	5,73 _a ±0,54	5,27 _a ±0,45	4,16 _b ±0,31	4,49 _b ±0,18
	Enrofloxacin	6,22 _a ±0,76	3,99 _b ±0,50	3,96 _b ±0,53	3,49 _c ±0,35	2,55 _d ±0,28
	Levofloxacin	6,22 _a ±0,76	5,35 _b ±0,61	5,39 _b ±0,44	4,41 _c ±0,30	3,81 _d ±0,29
	Marbofloxacina	5,85 _a ±0,61	4,96 _b ±0,23	4,36 _b ±0,52	4,13 _c ±0,58	2,72 _d ±0,47
	Norfloxacin	6,22 _a ±0,76	4,55 _b ±0,79	4,05 _c ±0,22	3,18 _d ±0,68	3,13 _d ±0,56
	Ofloxacin	6,13 _a ±0,66	6,48 _a ±0,63	5,35 _b ±0,61	5,44 _b ±0,27	3,74 _c ±0,21
Raigrás	Ciprofloxacina	10,94 _a ±1,05	7,91 _b ±0,62	7,90 _b ±0,61	6,95 _c ±0,37	4,92 _d ±0,76
	Enrofloxacin	9,74 _a ±0,58	10,11 _a ±0,45	8,31 _b ±0,54	6,43 _b ±0,35	4,36 _d ±0,62
	Levofloxacin	10,94 _a ±1,05	8,02 _b ±0,42	6,82 _c ±0,66	5,41 _d ±0,42	2,98 _e ±0,42
	Marbofloxacina	10,94 _a ±1,05	8,53 _b ±0,72	6,42 _c ±0,62	3,86 _d ±0,49	2,22 _e ±0,57
	Norfloxacin	9,74 _a ±0,58	9,31 _a ±0,49	7,89 _b ±0,41	6,05 _c ±0,29	3,94 _d ±0,53
	Ofloxacin	10,94 _a ±1,05	8,02 _b ±0,42	3,73 _c ±0,26	5,49 _d ±0,38	3,98 _e ±0,40
Trébol Rojo	Ciprofloxacina	4,40 _a ±0,26	3,10 _b ±0,36	4,18 _b ±0,25	3,92 _b ±0,29	3,45 _c ±0,23
	Enrofloxacin	4,15 _a ±0,54	3,84 _a ±0,54	3,97 _a ±0,50	3,93 _a ±0,34	3,32 _b ±0,32
	Levofloxacin	4,40 _a ±0,26	4,09 _b ±0,24	4,10 _b ±0,35	3,65 _c ±0,41	1,15 _d ±0,36
	Marbofloxacina	4,42 _a ±0,30	4,65 _a ±0,25	3,63 _b ±0,32	3,21 _c ±0,43	3,05 _c ±0,39
	Norfloxacin	4,65 _a ±0,54	4,81 _a ±0,31	4,31 _b ±0,27	3,63 _c ±0,15	3,31 _d ±0,33
	Ofloxacin	4,40 _a ±0,26	4,12 _b ±0,21	3,73 _c ±0,26	3,57 _c ±0,23	3,18 _d ±0,27

Tabla 2 Efecto de diferentes concentraciones de quinolonas sobre elongación de tallos de semillas forrajeras (a,b,c,d,e: Diferentes letras en una misma fila indican diferencias significativas con p<0,05).

Eluk et al. (2017) cuando analizan el efecto fitotóxico de cinco antibióticos sobre a elongación de las raíces de tres especies forrajeras (*M. sativa*, *M. Albus* y *T. repens*),

encuentran que 0,10 mg/l de enrofloxacin afecta a las tres especies. Cuando Eluk et al. (2016) evalua el efecto de cinco antibióticos sobre especie de cultivos extensivos (*Glycine max*, *Helianthus annuus*, *Sorghum bicolor*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*) se observa que 0,1 mg/l de enrofloxacin afecta solamente al crecimiento radicular de *S. bicolor*.

Hillis et al. (2011) evaluaron el efecto fitotóxico de otros antibióticos sobre el crecimiento radicular de las especies forrajeras *M. sativa* y *L. sativa*. Ellos señalan que elevadas concentraciones de oxitetraciclina producen efecto fitotóxico sobre *M. sativa* (10 mg/l) y *L. sativa* (4.8 mg/l). Además, estos autores reportan que concentraciones elevadas de tilosina (10 mg/l) ejercen efecto negativo sobre la elongación de las raíces ambas especies forrajeras.

El efecto fitotóxico de las quinolonas sobre elongación de raíces y tallos de las tres especies forrajeras puede atribuirse a la posible acción anti-cloroplástica de estas moléculas, según lo señala Brain et al. (2004) cuando analizan el efecto de lomefloxacin (25-38 mg/l) sobre el crecimiento de *Lemna gibba*.

A modo de síntesis, se puede establecer que la especie *L. perenne* representa un adecuado biomarcador dentro de las especies forrajeras porque presenta buena sensibilidad hacia las seis quinolonas, constituyendo un adecuado biosensor de alerta para la detección de quinolonas en suelo.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

ASTM. American Society for Testing Materials., 2003. Standard guide for conducting terrestrial plant toxicity tests. ASTM International, West Conshohocken, PA, 1534-1554.

Brain R., Johnson D., Richards J., Sanderson H., Sibley P., Solomon S., 2004. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(2), 371-382.

Campagnolo E., Johnson K., Karpati A., Rubin C., Kolpin D., Meyer M., Esteban J., Currier R., Smith K., Thu K., Mc Geehin M., 2002. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *Science of the Total Environment*, 299, 89-95.

Eluk D., Nagel O.G., Zimmermann J., Molina M.P., Althaus R.L., 2016. Effect of Antibiotics on the Germination and Root Elongation of Argentine Intensive Crops. *International Journal of Environmental Research*, 10(4), 471-480.

Eluk D.; Franck R.; Nagel O. G; Molina M P.; Althaus R. L., 2017. Phytotoxic Effect of Antibiotic Residues on Forage Seeds. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 5, 828-848.

Ghava K., Rathod M., Dhale D., 2015. Effect of antibiotics on seed germination and root elongation of wheat. *International Journal Current Microbiology Applied Science*, 4(1), 516-527.

Hillis D., Fletcher J., Solomon K., Sibley P., 2011. Effects of Ten Antibiotics on Seed Germination and Root Elongation in Three Plant Species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60, 220-232.