

Efecto de un formulado comercial del herbicida glifosato sobre el cangrejo *Trichodactylus borellianus* (Crustacea, Decapoda: Braquiura)

Montagna, M.¹; Collins, P.^{1,2}

1- Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL), José Maciá 1933, (3016) Santo Tomé, Santa Fe, Argentina. Tel 0342-4740723, FAX: 0342-4750394 Email: inali@arcrude.edu.ar

2- Escuela Superior de Sanidad Fac. Bqca. y Cs. Biológicas. Univ. Nac. del Litoral, Pje. El Pozo s/n, 3000 Santa Fe, Argentina.

RESUMEN: El uso de agroquímicos en la llanura pampásica aumentó en los últimos años, siendo de alto riesgo para comunidades biológicas y el hombre incluyendo las desarrolladas en ambientes acuáticos. Este trabajo evalúa efectos letales, cambios en el consumo de oxígeno y efectos sobre el crecimiento y comportamiento del cangrejo *Trichodactylus borellianus* producidos por el formulado comercial ROUNDUP® con el principio activo del herbicida glifosato. Ejemplares colectados del río Salado se colocaron en concentraciones de glifosato ROUNDUP® bajo condiciones controladas. La sensibilidad del cangrejo al herbicida aumentó en el tiempo provocando mortalidad en las concentraciones testeadas. CL50 calculada correspondió a 0,1394 ml de ROUNDUP®/l a 96 horas. El consumo de oxígeno no varió entre las concentraciones tóxicas y control, indicando que el herbicida no afectó la actividad metabólica. El formulado ROUNDUP® incidió sobre el crecimiento de los cangrejos interrumpiendo el ciclo de ecdisis lo que provocó la muerte al no poder mudar.

Palabras claves: ROUNDUP®, *Trichodactylus borellianus*, CL50, crecimiento.

SUMMARY: Effect of commercial formulation from glyphosate on crab *Trichodactylus borellianus*. Montagna, M.¹; Collins, P.^{1,2}. The agrotoxic use in pampasic land is increased in the last years, being high risk to biological communities and man, including to aquatic environments. The acute toxicity, oxygen consumption and growth response of *Trichodactylus borellianus* was studied at several concentrations of glyphosate in their commercial formulation ROUNDUP®. The crabs were collected from the Salado river and were placed in test solutions of ROUNDUP® under laboratory conditions. Herbicide increased sensibility crabs at the time. There was mortality in each test solutions, with LC50 0,1394 ml of ROUNDUP®/l at 96 hours. Oxygen consumption was not different between concentrations and control. ROUNDUP® not affect the normal metabolism activity. The growth of *T. borellianus* was interrupt in all concentrations and crabs was dead.

Key words: ROUNDUP®, *Trichodactylus borellianus*, LC50, growth.

Introducción

La actividad agropecuaria utiliza una gran variedad de elementos xenobióticos que pueden ingresar en los ambientes acuáticos tanto en su forma original y/o como sus derivados (1). En la región pampeana de Argentina, con una superficie de 600.000 km², se hallan los cursos de agua y las ciudades más importantes de la región sur del continente. Durante las últimas décadas, se ha incrementado la superficie sembrada y la utilización del método de siembra directa con el empleo de semillas transgénicas resistentes a ciertos elementos. Junto a ello, el uso de biocidas también ha ido aumentando de manera de mejorar el rendimiento del cultivo. Es así

que, la probabilidad de introducir tóxicos en la red hidrográfica es mayor con el riesgo de afectar la biota autóctona y desequilibrar las tramas tróficas (2). Como consecuencia, surge la necesidad de considerar el impacto de agrotóxicos sobre el ecosistema acuático elaborando un diagnóstico de la influencia y lesiones en la fauna.

Entre los posibles agentes contaminantes se encuentra el herbicida ácido N-(fosfonometil) glicina conocido como glifosato, siendo una de sus formulaciones comerciales el producto ROUNDUP®. Plaguicida de amplio espectro para el control de malezas en áreas cultivadas y no cultivadas, con especial indicación para el control de aquellas presentes en el rastrojo del cultivo anterior al que va a

sembrarse usando la técnica de siembra directa en cultivos de soja, maíz, trigo y girasol (3).

La evaluación del producto ROUNDUP® se realizó utilizando como organismo de prueba el cangrejo dulceacuicola *Trichodactylus borellianus* (4) perteneciente al grupo de los crustáceos decápodos braquiuros de amplia distribución a lo largo de la cuenca parano-platense (5, 6). Especie de gran importancia local por su abundancia y disponibilidad. Además, es de fácil manejo pudiendo incorporarse a ensayos ecotoxicológicos.

El objetivo del trabajo es evaluar los efectos del producto comercial ROUNDUP®, un herbicida con glifosato como principio activo, sobre *Trichodactylus borellianus* a través de la determinación de la concentración letal en periodos cortos de tiempo (24, 48, 72 y 96 horas), las variaciones en la tasa de consumo de oxígeno, así como también la incidencia del tóxico sobre el crecimiento y comportamiento del cangrejo.

Materiales y Métodos

Los cangrejos se colectaron en el río Salado (tributario del río Paraná) a la altura de la ciudad de Santo Tomé provincia de Santa Fe y fueron transportados inmediatamente al laboratorio de bioensayos del Instituto Nacional de Limnología. Luego, se colocaron en acuarios de 3 litros durante 7 días para su aclimatación alimentándolos *ad libitum* con músculo de pescado y camarón. Las experiencias fueron conducidas a una temperatura de 25 ± 2 °C, con fotoperíodo de 14-10 horas luz-oscuridad, pH 7,7, conductividad 900 mohms/cm² y dureza 83 mg CaCO₃/l.

Los ejemplares fueron medidos bajo microscopio binocular con calibre de 0,01 mm de precisión.

El producto activo empleado corresponde al glifosato ácido N-(fosfonometil) glicina con formulación comercial ROUNDUP® (48%) registrado por Monsanto Argentina S.A.I.C. Se realizó un test previo de prueba de 72 horas a partir de concentraciones utilizadas en otros crustáceos no regionales aportadas por la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (3), definiendo luego las concentraciones definitivas en el test agudo. Las concentraciones utilizadas en los test definitivos fueron menores a la concentración más baja registrada en la literatura

para cangrejos (3). Lamentablemente no poseemos información sobre las concentraciones que llegan al medio acuático debido al amplio rango de dosis utilizadas en el campo.

Toxicidad aguda

Se emplearon 108 cangrejos en estado de intermuda determinado por setogénesis (7), siendo distribuidos de a 6 en cada recipiente de plástico de 3 litros de capacidad. Se utilizaron 5 concentraciones de glifosato ROUNDUP®: 0,3000 ml/l; 0,1500 ml/l; 0,0750 ml/l; 0,0370 ml/l y 0,0190 ml/l, con un diseño de 3 réplicas por cada concentración del tóxico y control.

La mortalidad o inmovilidad de los individuos se registró a las 24, 48, 72 y 96 horas desde el inicio de la experiencia. Los resultados obtenidos se sometieron a un Análisis Probit para estimar el valor de la CL50 (8) en cada día de duración del ensayo. Estos valores de CL50 obtenidos fueron comparados estadísticamente mediante ANOVA de una vía (9).

Consumo de oxígeno

Treinta y seis individuos fueron colocados individualmente en recipientes de vidrio de 300 ml de capacidad cerrados herméticamente. Se evaluó el consumo de oxígeno del cangrejo expuesto a 3 concentraciones de glifosato ROUNDUP®: 0,3000 ml/l; 0,1000 ml/l y 0,0300 ml/l. Cada solución test y el control contó con 9 réplicas.

Las determinaciones de consumo de oxígeno se efectuaron en forma individual con un oxímetro Orion 830A con sensor de temperatura calibrado antes de cada medición. La concentración de oxígeno disuelto se registró al comienzo y a cada hora durante las primeras 6 horas de duración del ensayo y luego a las 24 horas.

El consumo (mgO₂/g/h) se calculó multiplicando la diferencia observada de oxígeno disuelto por el volumen de agua del recipiente y dividiendo este resultado por el peso del organismo y el tiempo empleado (10, 11). El efecto del herbicida sobre el consumo de oxígeno se analizó a través de ANOVA (9).

Crecimiento y comportamiento

El crecimiento se analizó en 55 ejemplares juveniles en intermuda (7), con un ancho de cefalotórax (AC) entre 2,0 y 5,5 mm durante 180 días. A cada

cangrejo se lo colocó en un recipiente de plástico de 300 ml de capacidad exponiéndolos a 4 concentraciones de glifosato ROUNDUP®: 0,0370 ml/l; 0,0190 ml/l; 0,0090 ml/l; 0,0048 ml/l y control.

Cada cangrejo fue colocado en la concentración del herbicida una vez realizada la primer muda, ya que esta podría estar influenciada por otros factores como traslado, cambios de temperatura y manipuleo propios del período de aclimatación (12).

Para evitar el estrés de los ejemplares por la presencia del aireador, se procedió a la renovación del 60 % del volumen del recipiente cada 48 horas. Las soluciones tóxicas de los 4 lotes de individuos utilizadas se prepararon cada 96 horas hasta el final del ensayo. Se los alimentó con músculo de pescado, quitando previamente el excedente de la comida del día anterior antes de ofrecer el nuevo alimento.

El crecimiento de los organismos se analizó individualmente en las diferentes concentraciones tóxicas como en los controles a través de la observación diaria de la presencia de exuvias y de ejemplares muertos. Cada muda detectada fue extraída para la medida del AC (correspondiendo al período de intermuda anterior).

Para representar el crecimiento de los cangrejos se utilizó el método gráfico de Hiatt (13, 14):

$$AC_{t+1} = a + b AC_t$$

Donde **a** es la intersección del valor de postmuda y **b** es la constante de crecimiento.

Todos los días se observó de manera cualitativa el comportamiento de los individuos aislados indicando variaciones en los movimientos reptatorios realizados. Estas observaciones no fueron analizadas estadísticamente.

Resultados y Discusión

Efectos letales

No se registró mortalidad en las cinco concentraciones estudiadas durante las primeras 24 y 48 horas de exposición al tóxico. A partir de las 72 horas se hallaron ejemplares muertos en las concentraciones a excepción del grupo de cangrejos colocados en la solución menor (0,0190 ml de ROUNDUP®/l). A las 96 horas hubo mortalidad en todas las concentraciones, registrándose una mortalidad del 100% en las soluciones más altas (Figura 1). No se obser-

varon individuos muertos en los controles. En la Tabla 1 se muestran los valor medios de la CL50 obtenidos a lo largo del ensayo, los cuales disminuyeron significativamente con el tiempo ($p=0,056$).

Si bien el glifosato es considerado un herbicida de baja toxicidad, el producto comercial ROUNDUP® provocó mortalidad en todas las concentraciones testeadas en *T. borellianus* a las 96 horas. Este cangrejo dulceacuícola mostró ser sensible a la toxicidad del plaguicida en concentraciones menores que la indicada sobre la especie considerada de referencia para cangrejos (3).

La aplicación de este formulado en la Argentina no supera los 6 litros de ingrediente activo por hectárea y depende del tipo de uso (3). La cantidad de glifosato que aparece en forma de sal de isopropilamina corresponde a 48 gr/l en 100 cc de elementos coadyuvantes siendo estos posiblemente tóxicos. Se considera un producto relativamente no tóxico para abejas y ligeramente tóxico para aves y peces, con comprobada toxicidad sobre ciertos invertebrados acuáticos como en crustáceos cladóceros *Moina minuta* y *Daphnia magna* con valores de CL50 de 0,03793 ml/l y 0,03073 ml/l respectivamente (Asinari, comunicación personal). Los distintos modos de aplicación del plaguicida, entre ellos la aérea, constituyen un riesgo de contaminación de sistemas acuáticos con el consiguiente efecto nocivo sobre organismos sensibles como la especie de cangrejo testada.

Los resultados que presentó *T. borellianus* fueron obtenidos a partir de la evaluación de la toxicidad de una marca de uso comercial del herbicida donde se incluyó todos sus componentes, faltaría comprobar el potencial tóxico de los elementos constitutivos del producto en forma aislada.

Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno no difirió significativamente entre el control y las distintas concentraciones de glifosato ROUNDUP® (ANOVA $F_{(0,05, 17)}$: 2,71, $p = 0,0848$), siendo los valores medios semejantes en el tiempo entre las diferentes soluciones y el control (Figura 2). El mayor consumo inicial observado podría asociarse al estrés del manipuleo en los ensayos.

En organismos juveniles las concentraciones más altas de herbicida provocaron un mayor consu-

mo de oxígeno a las 24 horas disminuyendo este con el aumento en la edad del cangrejo (Figura 3). La concentración más baja (0,0300 ml de ROUNDUP®/l) fue similar al lote control (ANOVA $F_{(0.05, 15)}: 2,59, p = 0,1300$) en todo el grupo etario utilizado.

Los resultados obtenidos indican que este producto comercial de glifosato no afectó la actividad metabólica normal de *T. borellianus* en las concentraciones de niveles letales y subletales durante el lapso de tiempo de duración del ensayo (24 horas). Una fase de hiperactividad por estrés en los cangrejos asociada a una mayor demanda de oxígeno podría relacionarse con el alto consumo registrado inicialmente en los tratamientos y el control.

Crecimiento y comportamiento

Los cangrejos de *T. borellianus* presentaron un ancho inicial medio de cefalotórax de $4,53 \pm 0,309$ mm en la experiencia a 0,0370 ml de ROUNDUP®/l, de $4,07 \pm 0,465$ mm a 0,0190 ml/l, de $4,06 \pm 0,645$ mm a 0,0090 ml/l, de $4,77 \pm 0,645$ mm a 0,0048 ml/l, y de $4,22 \pm 0,601$ mm en los controles, esta talla inicial no fue diferente significativamente entre los grupos testeados (ANOVA $F_{(0.05, 38)}: 1,91, p = 0,1465$).

Los ejemplares mantenidos en los controles aumentaron su AC luego de cada muda (Figura 4). El incremento (AC%) por muda fue inferior en los individuos con mayor tiempo de intermuda (tiempo de intermuda medio: 44 días - porcentaje de incremento medio 15,03 mm; tiempo de intermuda medio: 24 días - porcentaje de incremento medio: 19,92 mm).

El cangrejo *T. borellianus* colocado en agua sin tóxico creció isométricamente en cada muda para las tallas analizadas. La isometría está indicando que el aumento en el tamaño siempre es constante luego de cada muda, esta situación coincide con el registrado en la misma especie durante la etapa juvenil a igual temperatura (12). También es común en varios grupos de crustáceos especialmente durante la etapa juvenil de los individuos como en Cladocera (*Daphnia magna* y *Daphnia pulex*), en Copepoda (*Pseudoboeckella silvestri*), en Amphipoda (*Gammarus duebent* y *Psendoprotella plasma*), en Decapoda (*Carcinus maenas*, *C. mediterraneus*, *Callinectes sapidus* y *Maja squinado* y *Pisa tetradon*) (13, 14).

No se registraron mudas entre los individuos colocados en las diferentes concentraciones tóxicas de ROUNDUP®, produciéndose la muerte de la totalidad de los mismos durante el estadio de premuda temprana de su ciclo de ecdisis. En consecuencia, se observó que bajo estas condiciones experimentales, donde se utilizaron concentraciones subletales muy inferiores al valor de CL50 registrado para la especie en este trabajo, el crecimiento de los ejemplares no fue posible.

Concentraciones subletales del mismo producto comercial ROUNDUP® del herbicida glifosato evaluado sobre el caracol *Pseudosuccinea columella* ejercieron un efecto diferente sobre el crecimiento, incrementando los valores de crecimiento y desarrollo de estos organismos (15).

En experiencias con niveles letales y subletales de ROUNDUP® los cangrejos tuvieron una gran actividad durante las primeras horas de exposición al tóxico, seguido de movimientos lentos y esporádicos. Una respuesta similar fue observada en individuos de la misma especie sometidos a concentraciones de cipermetrina (10).

En la naturaleza discontinua del crecimiento de los crustáceos, podemos distinguir dos componentes: el incremento en la muda y el tiempo de intermuda. Estos elementos pueden estar afectados por la calidad del alimento, la temperatura, las enfermedades y cualquier otro factor que interfiera en las funciones neurohormonales (14), como puede ser en nuestro caso el producto ROUNDUP®. El ciclo de muda ocurre bajo la regulación principal de la hormona ecdisona (o β -ecdisona, ecdiesterona) secretada por el órgano Y (16, 17). No se descarta que el efecto tóxico del herbicida analizado ejerza una acción sobre esta hormona o su glándula inhibiendo el proceso de ecdisis por eso los cangrejos en concentraciones subletales no pudieron mudar durante la experiencia. A su vez la relación entre el ROUNDUP® y los distintos componentes internos del cangrejo pueda provocar un desbalance fisiológico que induce a la muerte de los ejemplares expuestos a este herbicida.

Agradecimientos:

Este trabajo fue financiado por el Programa de Biodiversidad (SECYT)

Tabla 1: Valores medios de CL50 para el cangrejo dulceacuicola *T. borellianus* expuesto al formulado comercial ROUNDUP®.

Tiempo (h)	CL50 (ml ROUNDUP®/l)	Limite de Confianza	
		Inferior	Superior
24	- *	-	-
48	- *	-	-
72	0,7225 **	0,2699	0,9210
96	0,1394 **	0,0998	0,1954

* - Sin mortalidad.

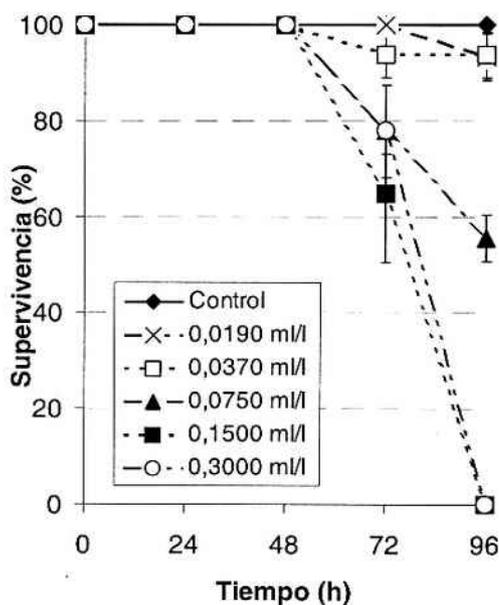
** - Comparación entre estos dos días: ANOVA $F_{(2,5,0,05)} 21,65, p = 0,056$.**Figura 1:** Supervivencia media y desvío estándar de *T. borellianus* expuestos a distintas concentraciones del formulado comercial ROUNDUP® y control durante 96 horas. Soluciones expresadas en ml de ROUNDUP®/l.

Figura 2: Variación en el tiempo del consumo de oxígeno medio y desvío estándar del cangrejo dulceacuicola *T. borellianus* expuesto a distintas concentraciones del formulado ROUNDUP® y control. Soluciones expresadas en ml de ROUNDUP®/l.

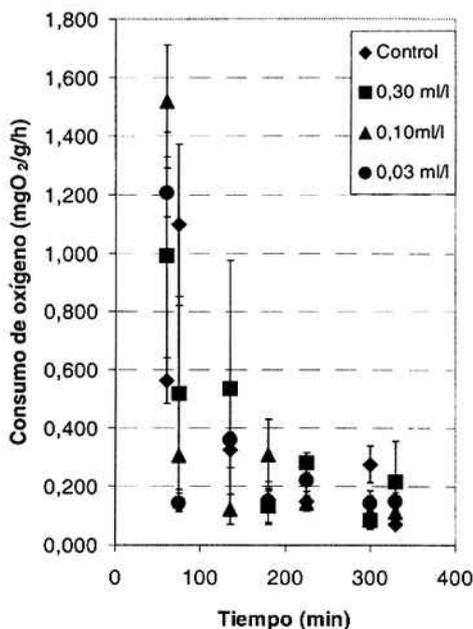


Figura 3: Consumo de oxígeno individual en distintas tallas del cangrejo dulceacuicola *T. borellianus* sometidos a diferentes concentraciones de ROUNDUP® y control. Soluciones expresadas en ml de ROUNDUP®/l.

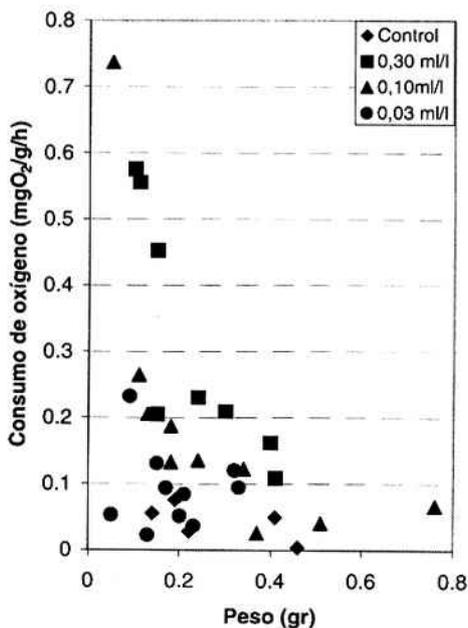
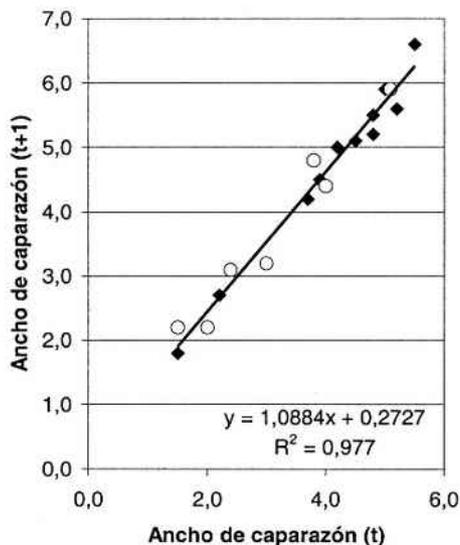


Figura 4: Crecimiento del cangrejo dulceacuicola *T. borellianus* observado a través de la relación AC_{t+1} y AC_t . Los datos obtenidos corresponden únicamente al grupo control (rombo negro). Circulo blanco corresponden a datos de bibliografía (10).



Bibliografía

- 1- Walker, C. H.; Hopkin, S. P.; Sibly, R. M. y Peakall, D. B. 2001 Principles of Ecotoxicology, Second Edition. Ed. TAYLOR & FRANCIS, 309pp.
- 2- Gardi, C. 2001 Land use, agronomic management and water quality in a small Northern Italian watershed. Agriculture, Ecosystems and Environment, **87**: 1 – 12.
- 3- C.A.S.A.F.E (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes) 2001 Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina. Tomo I y II. Buenos Aires.
- 4- Nobili, G. 1896 Crostacei decapodi. Viaggio del Dott. A. Borelli nella Repubblica Argentina e nel Paraguay. Boll. Mus. Zool. Anat. comp. Univ. Torino **11** (222): 1 – 4.
- 5- Lopretto, E. 1995 Crustacea Eumalacostraca. En: Lopretto, E. y Tell, G. (ed). Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio. Ed. Sur, Tomo III, 1002 – 1039 p.
- 6- Magalhães, C. y Türkay, M. 1996 Taxonomy of the Neotropical freshwater crab family Trichodactylidae. II. The genera Forsteria, Melocarcinus, Sylviocarcinus and Zilchiopsis. Senckenbergiana biol., **75** (1/2): 97 – 130.
- 7- Drach, P. 1939. Mue et cycle d'intermue chez les crustacés décapodes. Ann. L' Inst. Océanogr. **19**: 103 – 391.
- 8- Finney, D. J. 1971 Probit analysis. Cambridge University Press, New York, p: 6689.
- 9- Zar, J. H. 1996 Biostatistical Analysis. Prentice Hall, New York, p: 918.
- 10- Williner, V. y Collins, P 2003 Effects of Cypermethrin upon the Freshwater Crab *Trichodactylus borellianus* (Crustacea: Decapoda: Braquiura). Environ. Contam. Toxicol., **71**: 106 – 113.
- 11- Chen, J.-C.; Lin, C.-Y. 1995 Responses of oxygen consumption, Ammonia-N excretion and Urea-N excretion of *Penaeus chinensis* exposed to ambient ammonia at different salinity and pH levels. Aquaculture, **136**: 243 – 255.
- 12- Renzulli, P. y Collins, P. 2000 Efecto de la temperatura en el

crecimiento de *Trichodactylus borellianus* (Crustacea Eumalacostraca). FABICIB, 4: 129 – 136.

13- Kurata, H. 1962 Studies on the age and growth of crustacea. Bull. Hokkaido. Reg. Fish. Res. Lab., 24: 135 – 213.

14- Hartnoll, R. G. 1982 Growth. En: The Biology of Crustacea, Vol. 2, Williamson (ed), New York, 111 – 197 p.

15- Tate, T. M., Spurlock, O. J. y Christian, F. A. 1997 Effect of Glyphosate on the Development of *Pseudosuccinea columella* Snails. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 33: 286 – 289.

16- Dall, W. y Barclay, M. 1977 Induction of Viable Ecdysis in the Western Rock Lobster by 20-Hydroxyecdysone. General and Comparative Endocrinology 31: 323 – 334.

17- Fingerman, M. 1995 Endocrine Mechanisms in Crayfish, with Emphasis on Reproduction and Neurotransmitter Regulation of Hormone Release. Amer. Zool. 35: 68 – 78.