

Detección de residuos biodisponibles de glifosato en aguas y suelos: Optimización de una técnica de bioensayo con plantas indicadoras

Detecting bioavailable glyphosate residues in water and soil: Optimising a bioassay technique using indicator plants

Camilo Forero V.¹, Edgar Eduardo Rodríguez P.¹ y Cilia L. Fuentes²

Resumen: Se optimizó una técnica de bioensayo para la detección de residuos biodisponibles de glifosato en agua y suelos, utilizando plantas indicadoras. Se evaluó la respuesta de varias especies (lechuga, pepino, tomate, coliflor y brócoli) al herbicida, a concentraciones entre 0 y 100 ppm. Para los bioensayos en agua, semillas pregerminadas fueron sometidas a concentraciones del herbicida entre 0 y 10 ppm. La lechuga fue la especie más sensible con $ED_{50}=8,38$ ppm; detectó residuos a partir de 2,22 ppm. El glifosato en solución acuosa se degradó después de 21 días por acción de microorganismos. Para los bioensayos en suelo se emplearon dos tipos de suelo del Tolima (arroz, pastizal). Se trataron 10 g de suelo homogéneamente con glifosato en solución a concentraciones entre 0 y 10 ppm, se sembraron 10 semillas pregerminadas en el suelo tratado con el herbicida. Se encontraron diferencias significativas entre concentración y tipo de suelo, e interacción concentración*tipo de suelo. Se sembraron semillas pregerminadas en materos llenos con suelo de arroz, pastizal y lote de Fedearroz, el último asperjado con glifosato tres días antes en una dosis equivalente a $1.440 \text{ g ia}\cdot\text{ha}^{-1}$, no se aplicó ningún tratamiento a esta muestra; los demás se trataron superficialmente con glifosato en dosis equivalentes a 960, 1.920 y $4.800 \text{ g ia}\cdot\text{ha}^{-1}$, se midió el peso seco de plantas de lechuga ocho días después de la siembra; no se detectó fitotoxicidad, no hubo diferencias significativas entre tratamientos por efecto de dosis ni por efecto del suelo, no fue posible calcular el valor de ED_{50} para los bioensayos en suelo.

Palabras clave: Sal isopropilamina de N-fosfonometil glicina, disipación en aguas y suelos, lechuga.

Abstract: A bioassay technique for detecting bioavailable glyphosate residues in water and soil was optimised in laboratory conditions. Different plants' (lettuce, cucumber, tomato, cauliflower and broccoli) response to glyphosate was evaluated in concentrations ranging from 0 to 100 ppm. Seedlings were exposed to 0 to 10 ppm concentrations for bioassays performed in water. Lettuce was the most sensitive plant having a $ED_{50}=8.38$ ppm value; sensitivity began at 2.22 ppm concentrations. The kinetic of dissipation was found; glyphosate was degraded by micro-organism action following 21 days in liquid media. Two types of soil (rice, grass) from the Tolima region were used for bioassays performed in soil. Soil was treated and homogenised with glyphosate solution in 0 to 10 ppm concentrations; the seedlings were then planted in the soil with the herbicide. Statistical differences were found according to concentration and soil type; interactions were also noted between concentration*soil type. A test was performed in pots filled with rice soil, grass soil and commercial rice field soil (FEDEARROZ); the last had been spread three days earlier with glyphosate in a $1,440 \text{ g ai}\cdot\text{ha}^{-1}$ dose (no treatment was also applied as control). The rice and grass soil samples were spread with glyphosate in doses of 960, 1920 and $4,800 \text{ g ai}\cdot\text{ha}^{-1}$; lettuce seedlings were then planted. The plants' dry weight was measured after 8 days; no phytotoxic effect was found nor were statistical differences according to either dose or soil type. ED_{50} values for bioassays performed in soil could not be calculated.

Key words: Glycine N-phosphonomethyl isopropylamine salt, dissipation in water and soil, lettuce.

Fecha de recepción: 25 de marzo de 2004.
Aceptado para publicación: 27 de mayo 2004.

- 1 Ingeniero Agrónomo, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mails: cforerov@yahoo.com, ecerodriguezp@yahoo.com
- 2 Profesora Titular, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. e-mail: ciliafuentes@mailcity.com

Introducción

LA PRODUCCIÓN EXTENSIVA del cultivo de arroz durante las últimas décadas, ha conllevado el uso intensivo de productos agroquímicos para el control de insectos, patógenos y malezas, aumentando, entre otros, los costos de producción. En arroz irrigado, el manejo de las plagas (insectos, patógenos y malezas), en general, representa en Colombia el 35% de los costos de producción, de los cuales 23% es únicamente para control de malezas (Pantoja *et al.*, 1997). En los últimos años, el uso intensivo de herbicidas en la producción de arroz en Colombia se ha venido incrementando, situación que preocupa desde el punto de vista ambiental, por sus efectos en diferentes compartimentos del ambiente, como suelos y aguas.

Debido a que el glifosato es un herbicida utilizado a gran escala y en grandes cantidades en el mundo, ha estimulado numerosos estudios referentes a su comportamiento y persistencia en los suelos (Forlani *et al.*, 1999; Araujo *et al.*, 2003).

El glifosato (sal isopropilamina de N-fosfometil glicina) es un herbicida sistémico de amplio espectro, con una alta actividad sobre casi todas las plantas anuales y perennes, tanto mono como dicotiledóneas (Chorbajian & Kogan, 2001). Es un potente inhibidor de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSP sintasa), enzima clave en la ruta biosintética de aminoácidos aromáticos. Causa acumulación del shikimato, el substrato defosforilado de EPSP sintasa, en diversas especies (Amrhein *et al.*, 1980; Becerril *et al.*, 1989; Rubin *et al.*, 1982).

Este herbicida ha sido extensivamente utilizado por cerca de 30 años y se espera que su uso se incremente con la disponibilidad de cultivos resistentes (Powles *et al.*, 1998). Es un herbicida de acción lenta y pueden pasar varios días antes de que el daño pueda ser observado; las plantas mueren alrededor de 10 a 20 días después de la aplicación (Singh y Shaner, 1998).

En los últimos años se ha prestado especial atención al estudio de la contaminación tanto del suelo como de aguas subterráneas por el uso de plaguicidas. La utilización de productos químicos constituye una importante fuente de contaminación en zonas de intensa actividad agrícola (Guarrancino *et al.*, 1999). En Colombia, se ha validado una técnica analítica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), para la determinación de

residuos de glifosato y su metabolito, el ácido aminometilfosfónico (AMPA) en aguas, pero ésta resulta dispendiosa, costosa, y además existen problemas técnicos con el equipamiento para su aplicación, debido al tipo de solventes que se hace necesario emplear (Rodríguez, 2001); por lo cual, es necesario identificar y validar técnicas alternativas que resulten más económicas, sencillas, y que puedan ser igualmente sensibles para la detección de residuos de glifosato en aguas y suelos. Los bioensayos con plantas indicadoras para la detección de residuos de herbicidas son una posibilidad (Günther *et al.*, 1989), como se ha demostrado en investigaciones anteriores hechas en la Universidad Nacional de Colombia, por Blanco (1997) y Sánchez y Hernández (1999) con atrazina.

Los métodos de bioensayos ofrecen la oportunidad de detectar la presencia de un compuesto en cantidades biológicamente activas de compuestos tóxicos. Adicionalmente, los bioensayos generalmente no requieren equipos costosos (Selim *et al.*, 1989). Los bioensayos son útiles para confirmar la presencia de residuos biodisponibles de un herbicida, que podrían causar daño a organismos sensibles (e.g. cultivos subsiguientes sensibles) o estar contaminando otros componentes del ambiente (Richardson, 1985). Es un método que permite determinar la respuesta biológica de un organismo a un compuesto en un medio dado (agua, suelo). Estos bioensayos se llevan a cabo con organismos indicadores (susceptibles al herbicida) (Santelman, 1977). Los bioensayos permiten cualificar y cuantificar la presencia de compuestos químicos en diferentes medios de acuerdo con el parámetro de medida que se utilice (peso, longitud de la planta, del coleoptilo o radícula), y pueden ser utilizados de diferentes formas de acuerdo con el tipo de material biológico que se use (plantas, microorganismos) para estudiar el destino y el comportamiento de los plaguicidas en suelos y aguas (Horwitz, 1976 y Richardson, 1985).

Algunas veces los bioensayos han sido utilizados como sustitutos de las pruebas químicas para la detección de residuos de compuestos químicos en agua y suelo (Günther *et al.*, 1989).

Un aspecto de interés, desde el punto de vista del comportamiento de los plaguicidas en el ambiente, es el estudio de la cinética de degradación y disipación de estos compuestos en compartimentos del ambiente, como son aguas y suelos.

La degradación de un plaguicida puede ser biótica o abiótica. La degradación biótica es posible por la actividad microbial o por la toma y transformación del compuesto por parte de las plantas. La degradación abiótica es gobernada principalmente por procesos químicos, y por la fotodescomposición. La mayoría de estos procesos pueden ser estudiados con métodos instrumentales, pero los bioensayos son una herramienta de gran valor cuando los métodos analíticos convencionales no se encuentran disponibles o resultan demasiado costosos o dispendiosos.

Sprankle *et al.* (1975a, b) reportan que el glifosato se inactiva rápidamente debido su adsorción al suelo. Haney *et al.* (2000) y Araujo *et al.* (2003) encontraron aumentos en la actividad de los microorganismos del suelo, al aumentar las cantidades de glifosato adicionado, lo cual demuestra que los microorganismos desempeñan un papel importante en los procesos de transformación del herbicida, afectando así su persistencia en el ambiente.

Estudios comparativos entre metodologías analíticas convencionales y bioensayos han mostrado una alta correlación en varios de los compuestos evaluados (Schmidt, 1993). El propósito de los ensayos biológicos o bioensayos, es medir y comparar las actividades física, biológica, química o estímulo biológico dado, mediante la respuesta de un material biológico vivo.

El presente estudio se orientó a identificar una especie de planta suficientemente sensible al glifosato que permitiera detectar residuos biodisponibles de este compuesto en aguas y suelo, y optimizar un procedimiento de bioensayo en estas dos matrices; para lo cual se hizo necesario determinar valores de ED_{50} de las especies indicadoras en estudio para agua y suelo, determinar la cinética de disipación de glifosato en aguas utilizando la especie indicadora más sensible y comprobar si la especie indicadora detecta glifosato en el agua a concentraciones equivalentes a ED_{10} ; ED_{30} ; ED_{50} ; ED_{90} .

Materiales y métodos

Se hicieron cinco experimentos, tres de ellos para agua y dos para suelo bajo condiciones de laboratorio (21° C en promedio) en el laboratorio de Malherbología y Radiotrazadores de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Para todos los experimentos se usó Roundup SL[®], el agua empleada fue destilada y esterilizada. Como plantas indicadoras

fueron evaluadas cinco especies: lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Great Lakes), tomate (*Lycopersicon esculentum* M. var. Maxi Río Grande), coliflor (*Brassica oleraceae* L. var. Snow Ball), rábano (*Raphanus sativus* L. var. Crimson Giant), pepino (*Cucumis sativus* L. var. Point Set). Se tomaron semillas de estas especies y se hidrataron con 10 ml de agua destilada en cajas de petri con papel de filtro; luego se llevaron a una incubadora (Firmly Incubation WTB Binder (precisión $\pm 0,1^\circ$ C)), se probaron diferentes temperaturas de incubación, se determinó el tiempo de germinación para cada una de las especies y temperaturas. También se hicieron pruebas para observar el crecimiento de las semillas germinadas bajo diferentes condiciones: luz, oscuridad, temperatura de laboratorio (21° C) y temperatura de incubadora (28° C).

Una vez las semillas germinaron y sus radículas tenían una longitud promedio de 1mm, se llevaron a cajas de petri de 90 mm de diámetro, con doble hoja de papel de filtro (filtrak, rundfilter grade 3 hw 65 g·m⁻²), el papel de filtro se hidrató con soluciones de glifosato a concentraciones de 0; 0,05; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00; 7,50; 10,00 y 100,00 ppm obtenidas a partir de una solución stock. Se tuvieron cinco repeticiones por tratamiento y diez semillas por caja de petri.

La sensibilidad se evaluó a diferentes tiempos, haciendo la medición de la longitud de la radícula después de la exposición al herbicida para cada una de las especies de plantas e identificar la especie más sensible.

Para la detección de glifosato en solución acuosa en concentraciones equivalentes a ED_{10} ; ED_{30} ; ED_{50} ; ED_{90} , a partir del modelo Log-logistic se determinaron las concentraciones equivalentes a ED_{10} ; ED_{30} ; ED_{50} ; ED_{90} . Se prepararon soluciones acuosas del herbicida a concentraciones equivalentes a ED_{10} ; ED_{30} ; ED_{50} ; ED_{90} , más un tratamiento testigo (0 ppm). Para el experimento se usaron cajas de petri con doble papel de filtro; en cada caja se depositaron diez semillas pregerminadas y el papel de filtro se hidrató con 10 ml de la solución del herbicida. Las cajas se sellaron con film plástico y se dejaron en condiciones de laboratorio. Se tuvieron cinco repeticiones y el ensayo se replicó tres veces en el tiempo. La respuesta se midió mediante la longitud de la radícula, 72 horas después de exponer las semillas a la solución del herbicida.

Para medir la cinética de la disipación del glifosato en agua, se prepararon soluciones del herbicida (un litro)

a concentraciones equivalentes de 0, 3, 5 y 10 ppm, se dejaron en frascos de vidrio transparente con capacidad para 5 litros, en el laboratorio, y expuestos a luz directa del sol en una ventana, durante 30 días. El procedimiento para evaluar la cinética de la disipación del herbicida, consistió en: (1) germinar semillas, 18 horas antes de someterlas a las soluciones del herbicida, 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 días después de preparar las soluciones; (2) sembrar 10 semillas en cajas de petri con doble hoja de papel de filtro; (3) agregar 10 ml de la solución del herbicida; (4) tapar y sellar las cajas con film plástico y dejarlas en condiciones de laboratorio y (5) medir la longitud de la radícula 72 horas después de la exposición al herbicida. Se tuvieron cuatro repeticiones.

La detección de residuos biodisponibles de glifosato en el perfil del suelo consistió en comparar la respuesta de la planta indicadora a concentraciones del herbicida equivalentes a 0, 0,05, 0,50, 1,00, 2,50, 5,00, 7,50 y 10,00 ppm, en dos tipos de suelo provenientes del Tolima; uno que se había dedicado a la siembra de arroz, en el cual se emplean dosis comerciales de glifosato ($1,5$ a $2 \text{ kg ia}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{a}^{-1}$), y otro proveniente de un pastizal. Para cada uno de estos suelos se determinó el porcentaje de materia orgánica, arenas, limos, arcillas y pH; fue secado al aire y cernido a través de un tamiz de dos mm de tamaño de grano, luego fue tratado en el laboratorio con la cantidad de herbicida requerido para obtener concentraciones de 0, 0,05, 0,50, 1,00, 2,50, 5,00, 7,50 y 10,00 ppm distribuidas uniformemente en todo el perfil del suelo. El procedimiento para tratar el suelo con la solución herbicida para cinco cajas de petri, consistió en tomar en bolsas plásticas, 10 g de arena cuarzítica (tamaño de partícula 20-40), se adicionaron 6 ml de solución de cada concentración ($1 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$) y se homogenizó, luego se agregaron 50 g de suelo y se homogenizó (arena, herbicida y suelo). Para obtener concentraciones en suelo de 0, 0,05, 0,50, 1,00, 2,50, 5,00, 7,50 y 10,00 ppm.

Para cada concentración se utilizaron cuatro cajas de petri. Se depositaron 10 g de la mezcla de suelo-arena en cada caja de petri, se sembraron 10 semillas pregerminadas, y se hidrató con 10 ml de solución de cloruro de calcio (0,01 mol) para evitar el apelmazamiento del suelo. Las cajas de petri se sellaron con film plástico, y se dejaron en condiciones de laboratorio. Cuando emergieron los cotiledones (48 horas después de la siembra), las cajas fueron destapadas y se evaluó la longitud de la radícula 72 horas después de la emergencia de los

cotiledones. Se tuvieron cinco repeticiones y el experimento se replicó dos veces en el tiempo.

En la detección de residuos biodisponibles de glifosato en suelo, se utilizaron muestras de tres tipos de suelo provenientes del Tolima, Suelo 1 (cultivo comercial de arroz), Suelo 2 (suelo de pastizal) y Suelo Fedearroz (cultivo comercial de arroz, Fedearroz tratado con glifosato 72 horas antes con una dosis de $1.440 \text{ g ia}\cdot\text{ha}^{-1}$). Se prepararon soluciones del herbicida a dosis equivalentes a 0; 960; 1.920 y $4.800 \text{ g ia}\cdot\text{ha}^{-1}$, se utilizaron materos plásticos con dimensiones de 60 mm diámetro superior, 48 mm diámetro inferior, 57 mm altura y un área de superficie de $0,0028274 \text{ m}^2$. El procedimiento consistió en llenar los materos con el suelo hasta 3 mm antes del borde, se adicionaron 10 ml de agua destilada-esterilizada a cada matero y posteriormente se sembraron 20 semillas pregerminadas, a una profundidad de 2,0 mm. Para los suelos uno y dos, se aplicaron 10 ml de solución herbicida de manera superficial a concentraciones equivalentes a 0, 960, 1920 y $4.800 \text{ g ia}\cdot\text{ha}^{-1}$, dejando sobre la superficie una lámina de solución del herbicida. Con el suelo Fedearroz, se llenaron materos con el suelo hasta 3 mm antes del borde, y se sembraron 20 semillas pregerminadas de lechuga por cada matero, se adicionaron 20 ml de agua destilada-esterilizada; en este caso, no se le agregó ninguna solución del herbicida, debido a que estaba recién tratado con glifosato a una dosis de $1.440 \text{ g ia}\cdot\text{ha}^{-1}$.

Los materos se dejaron bajo condiciones de laboratorio, se taparon con film plástico y se mantuvieron sellados usando bandas de caucho, hasta la emergencia de los cotiledones; una vez los cotiledones emergieron, se destaparon los materos, 96 horas después de destapados los materos se sacaron las plantas completas, se secaron en un horno (WTB Binder) durante 24 horas a 80° C para obtener peso seco. La respuesta a la presencia de los residuos biodisponibles del herbicida se registraron como peso seco de las plantas. En todos los casos se tuvieron cuatro repeticiones y se duplicó el experimento en el tiempo.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de longitud de la radícula se sometieron a un análisis matemático bajo el modelo Log-logistic, para determinación de la curva de dosis de respuesta, identificar la especie más sensible a la presencia del herbicida, calcular los valores de ED_{10} , ED_{30} , ED_{50}

y ED₉₀ mediante la utilización del programa SAS (v. 8.2). Los datos obtenidos se registraron y se sometieron a análisis estadístico bajo un diseño completamente al azar (DCA).

La expresión matemática del modelo Log-logistic, que relaciona una respuesta y con la dosis x , genera una curva típica de dosis-respuesta de forma sigmoidal, que se expresa por la siguiente ecuación:

$$Y = C + \frac{D - C}{1 + (X/ED_{50})^b} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$= C + \frac{D - C}{1 + \exp(b(\log(X) - \log(ED_{50})))}$$

Donde C es el límite inferior, D es el límite superior, b es la pendiente alrededor de la ED₅₀, ED₅₀ es la concentración a la cual se reduce en un 50% el crecimiento del organismo indicador, en respuesta a la presencia de un compuesto. Las ventajas que se tiene al usar la ecuación 1, es que los parámetros son biológicamente significativos; el límite superior D corresponde a la respuesta media del testigo no tratado y el límite inferior C es la respuesta media a concentraciones muy altas, sin ocasionar necesariamente la muerte del organismo indicador (Streibig *et al.*, 1993, 1995; Seefeldt *et al.*, 1995).

Resultados y discusión

Se encontró una germinación promedio de 82% a temperatura constante de 28° C, con rango de tiempo de germinación entre 18 y 24 horas en oscuridad para todas las especies. Se determinó que las condiciones óptimas para el crecimiento de la radícula después de la germinación son 21° C en presencia de luz y se determinó que 72 horas después de la exposición al herbicida, era el tiempo óptimo de medición en los bioensayos en agua, debido a que existían la mayores diferencias de crecimiento de la radícula entre el testigo sin glifosato y los tratamientos.

Para las especies de pepino, rábano, tomate y coliflor, no se encontró un buen ajuste al modelo matemático Log-logistic, esto es, que no se encontró convergencia al modelo, mientras que lechuga fue la especie que mostró la mejor respuesta. Para esta especie se encontró convergencia del modelo matemático Log-logistic con 8 iteraciones; así, se determinó la lechuga como la mejor

especie bioindicadora de residuos de glifosato, entre las cinco especies evaluadas.

Se determinaron los parámetros de la ecuación 1, obteniendo valores para D = 19,789 mm, que representa el límite superior de la curva en donde las concentraciones de herbicida son más bajas y se obtiene el mayor crecimiento de la planta; ED₅₀ = 8,3884 ppm, representa la concentración requerida para disminuir el crecimiento de la planta en un 50%; C = 8,3518 mm, es el límite inferior de la curva que representa el crecimiento de la planta a concentraciones muy altas, y b = 41,6554, que es la pendiente de la curva ajustada con el modelo Log-logistic incluye el valor de ED₅₀ (8,39 ppm) (Figura 1). Los resultados obtenidos indican que la lechuga resultó sensible a la presencia del herbicida y que el crecimiento de la radícula fue una buena variable para medir la respuesta.

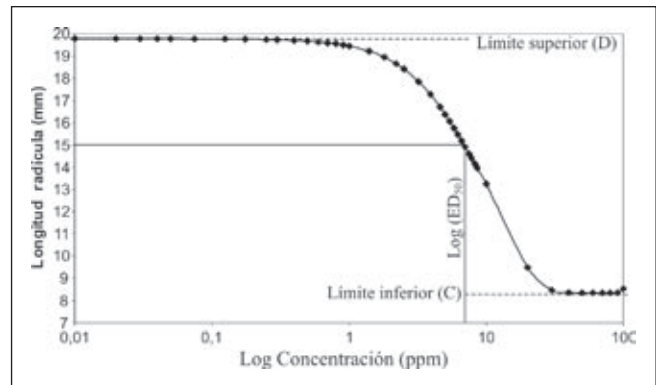


Figura 1. Curva dosis-respuesta para lechuga (*Lactuca sativa* L.) ajustada con el modelo Log-Logistic, del efecto del incremento de la concentración de glifosato en solución acuosa sobre la longitud de la radícula, para la cual se encontró: $y = 8.3518 + (19.789 - 8.3518) / (1 + (x/8.3884)^{1.6554})$; con ED₅₀ = 8.3884 ppm.

Para el presente trabajo se usa el modelo matemático Log-logistic, pero se pueden usar otros procedimientos, como por ejemplo, transformación de los valores a valores probit (Fuentes y Leroux, 2003) o utilizar otros modelos matemáticos.

Detección del glifosato en solución acuosa en concentraciones equivalentes a ED₁₀; ED₃₀; ED₅₀; ED₉₀; usando lechuga como planta indicadora. Para calcular las concentraciones del herbicida equivalentes a ED₁₀; ED₃₀; ED₅₀ y ED₉₀, a partir de la ecuación 1 (modelo matemático Log-logistic), se despeja

jó la variable ED_x , que representa la concentración de herbicida a la cual se reduce el crecimiento de la radícula en un porcentaje X.

Al despejar la ecuación 1 del modelo Log-Logistic se tiene que:

$$ED_{50} = \frac{ED_x}{(x / (100-x))^{(1/b)}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Despejando la ecuación 2

$$ED_x = ED_{50} * ((x / (100-x))^{(1/b)}) \quad (\text{Eq. 3})$$

Aplicando la ecuación 3 para la lechuga, se calcularon las concentraciones equivalentes a ED_{10} ; ED_{30} ; ED_{50} ; ED_{90} .

Según el análisis estadístico, para este experimento, se encontró efecto de las dosis del herbicida sobre la longitud de la radícula de lechuga, por lo cual se confirma que la lechuga responde (reducción de crecimiento) a la presencia de residuos biodisponibles de glifosato en agua.

De acuerdo con la prueba de Tukey, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones correspondientes a la $ED_{10} = 2,22$ ppm; $ED_{30} = 5,02$ ppm y $ED_{50} = 8,38$ ppm. La concentración de $ED_{90} = 31,63$ ppm, y el tratamiento testigo (0 ppm), fueron diferentes entre sí; y a su vez diferentes respecto a las concentraciones equivalentes a ED_{10} ; ED_{30} y ED_{50} . Esto muestra que para obtener una respuesta de la especie a la presencia del herbicida, las dosis deben ser muy altas ($ED_{90} = 31,63$ ppm) (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de la prueba de Tukey para longitud de la radícula a concentraciones de glifosato equivalentes a ED_{10} ; ED_{30} ; ED_{50} y ED_{90} . Los datos presentados fueron calculados a partir de 100 observaciones por dosis.

Grupos de Tukey	Longitud de la radícula observada (mm)	Longitud de la radícula esperada (mm)	Concentración (ppm)
A	15,54	19,78*	0
B	12,66	18,64*	$ED_{10} = 2,22$
B	12,66	16,36*	$ED_{30} = 5,02$
B	12,0	14,07*	$ED_{50} = 8,38$
C	10,02	9,49*	$ED_{90} = 31,63$

Las dosis señaladas con letras iguales, son iguales entre sí, de acuerdo con la prueba de Tukey.
* Datos calculados a partir de la ecuación 2

Con el procedimiento de modelo lineal general (GLM), se obtuvieron diferencias estadísticas altamente significativas entre las concentraciones equivalentes a ED_{10} ; ED_{30} ; ED_{50} y ED_{90} , para la longitud promedio de la radícula medida en milímetros. Sin embargo, con esta técnica, no fue posible cuantificar la concentración presente en la solución.

Cinética de la disipación del glifosato en agua utilizando lechuga como especie indicadora.

En este experimento el ANOVA indicó efecto significativo de la concentración del herbicida (Figura 2). Para la primera medición, hecha 72 horas después de preparadas las soluciones (día 3), se observaron diferencias altamente significativas entre las concentraciones; esta tendencia se mantuvo hasta el día 18 (432 horas) después de preparadas las soluciones. A partir del día 21 (504 horas) el efecto de las concentraciones se pierde y el porcentaje de reducción del crecimiento de la planta indicadora no resulta significativo (7-9%) (Figura 2), es decir, dejan de existir diferencias significativas entre todos los tratamientos, incluido el testigo (Figura 2).

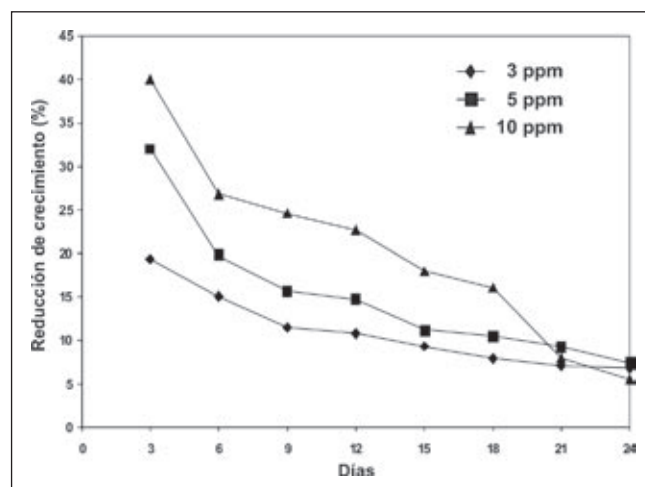


Figura 2. Curva efecto del tiempo en la actividad herbicida de diferentes concentraciones de glifosato en agua, calculado a partir de la longitud de la radícula de lechuga. Los datos se presentan en % de reducción del crecimiento con relación al testigo sin tratamiento (0 ppm) calculados a partir de 50 observaciones por dosis.

Las soluciones se prepararon en agua destilada y se dejaron a condiciones de laboratorio, expuestas a luz directa del sol, durante la duración del experimento (30 días). Según Monsanto (2003), el glifosato no sufre una degradación significativa debida a fotodescompo-

sición; Haney *et al.*, 2000; Araujo *et al.*, 2003 reportan que los principales factores de descomposición del herbicida son algas, bacterias y hongos en agua y suelo, por lo cual se puede atribuir la pérdida del efecto herbicida del glifosato a la acción degradadora de los microorganismos.

Debido a que la literatura reporta que el herbicida no se degrada por acción de la luz solar, se procedió a hacer aislamientos de microorganismos a partir de las soluciones, para identificar grupos que probablemente estarían descomponiendo el herbicida.

Aislamiento de organismos descomponedores de glifosato a partir de las soluciones empleadas. Se observó el crecimiento evidente de algas en las tres soluciones; en una mayor cantidad en la concentración del herbicida correspondiente a 10 ppm, seguida por la de 5 ppm y en menor cantidad la concentración de 3 ppm, lo cual indicaría que las algas estaban usando como fuente nutritiva el glifosato, que contiene nitrógeno, carbono y fósforo. En cajas de petri con medio PDA (papa dextrosa agar), se sembraron 20 µl de cada una de las soluciones empleadas en el experimento cuatro, y se llevaron a una incubadora durante ocho días a temperatura constante de 28° C en ausencia de luz, para evitar el crecimiento de algas. Se tuvieron tres repeticiones por cada solución (concentración de glifosato), y se procedió a hacer el conteo de unidades formadoras de colonias, ocho días después de la siembra.

Para los aislamientos efectuados se encontraron predominantemente bacterias y actinomicetos, y en menor proporción hongos. Dentro de las bacterias se observó mayor crecimiento de un tipo de bacteria de color amarillo en todos los tratamientos (soluciones de glifosato). Los actinomicetos no se presentaron en el aislamiento correspondiente a la concentración de 3 ppm, y para las demás concentraciones creció de forma muy escasa. En el aislamiento correspondiente a la mayor concentración del herbicida (10 ppm), se encontró de igual manera la mayor cantidad de unidades formadoras de colonias; esto es explicable por la mayor disponibilidad de sustrato para los microorganismos. Los resultados obtenidos para el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) se presentan en el Tabla 2.

Haney *et al.* (2000) y Araujo *et al.* (2003) reportaron que la actividad microbiana en el suelo se incrementa al incrementarse la cantidad de glifosato adicionado. Araujo

Tabla 2. Promedios de unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml) de solución herbicida a diferentes concentraciones, de microorganismos descomponedores de glifosato, aislados en agar papa dextrosa.

Concentración (ppm)	Promedio ufc/ml	% Organismo
3	48.233,33	5 % actinomiceto
		15 % bacteria roja
		40 % bacteria blanca
		40 % bacteria amarilla
5	64.666,66	40 % bacteria blanca
		60 % bacteria amarilla
10	107.933,33	5 % actinomiceto
		40 % bacteria blanca
		55 % bacteria amarilla

et al. (2003) reportaron la descomposición de glifosato por parte de algas, bacterias, actinomicetos y hongos presentes en el suelo. Por lo cual se puede decir que la pérdida de la actividad herbicida en la solución acuosa se debe al efecto degradador de los microorganismos. Las metodologías analíticas desarrolladas en la Universidad Nacional de Colombia para determinación de residuos de glifosato en aguas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), reportan a partir de muestras de agua estudiadas, cantidades mínimas detectables 0,0008-0,004 ppm y cantidades mínimas cuantificables entre 0,002-0,022 ppm (Rodríguez y Guerrero, 2001).

En cuanto a los datos obtenidos en este trabajo, se comienzan a detectar residuos del herbicida en solución acuosa a partir de 2,22 ppm, manifestados en reducción del crecimiento de la radícula de la planta indicadora. Por lo cual se puede decir que las técnicas de bioensayos en lechuga permitirían detectar la presencia del herbicida en aguas en cantidades superiores a 2,22 ppm, y no para detectar trazas. Mediante técnicas analíticas se puede detectar la cantidad total del herbicida presente en una muestra (fracción biodisponible y no biodisponible), y mediante los bioensayos podemos detectar la disponibilidad del compuesto que puede ser tomado por el organismo indicador (fracción biodisponible).

Detección de residuos biodisponibles de glifosato en suelo usando lechuga como planta indicadora. Para este experimento se encontraron diferencias significativas por efecto de las concentraciones del herbicida y del tipo de suelo, así como la interacción suelo*concentración, resultó significativa.

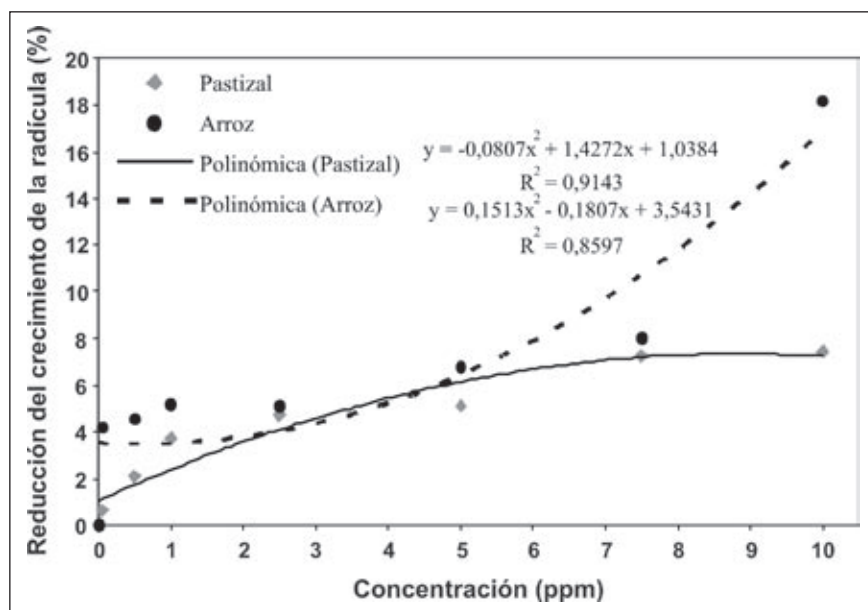


Figura 3. Curva de porcentaje de reducción del crecimiento de la raíz de lechuga al incrementar la concentración de glifosato en dos tipos de suelos. Los promedios se obtuvieron a partir de 100 observaciones por cada una de las concentraciones.

Tabla 3. Resultados del análisis de suelos provenientes de diferentes cultivos en El Tolima.

	% de materia orgánica	pH	Textura
Suelo 1 (proveniente de cultivo pastos)	7	5,55	Arena: 58% Limo: 21% Arcilla: 21%
Suelo 2 (proveniente de cultivo arroz)	3	4,73	Arena: 67,3% Limo: 14,4% Arcilla: 18,3%
Suelo 3 (proveniente de lote de Fedearroz)	2,83	5,53	Arena: 68,8% Limo: 26,0% Arcilla: 5,2%

La curva de dosis-respuesta del efecto del incremento de la concentración de glifosato en dos tipos de suelo, sobre la longitud promedio de la raíz de lechuga, se presenta en la Figura 3. Las diferencias encontradas entre los dos tipos de suelo se pueden explicar por los diferentes contenidos de materia orgánica (Tabla 3); de acuerdo con Sprankle *et al.*, 1975a,b.

Richardson, 1985; Chobradjian y Kogan, 2001, quienes reportan que el herbicida se inactiva rápidamente

debido a su adsorción al suelo y no a una degradación química o biológica, incrementándose esta adsorción al aumentar el contenido de arcillas y materia orgánica en el suelo.

Según Sprankle *et al.* (1975b), la penetración del glifosato dentro del perfil del suelo se limita a unos pocos milímetros (1-2 mm). En este experimento, el glifosato se encontraba homogenizado en el suelo, de manera que en cualquier sitio del suelo en el que la raíz hiciera contacto el herbicida estaría presente.

Las diferencias entre las concentraciones pueden explicarse debido a que la adsorción del glifosato por los coloides del suelo no es de 100%, dejando así una fracción biodisponible que afectó el crecimiento de

la planta indicadora, presentándose un porcentaje de reducción de crecimiento de la longitud de la raíz, mayor en todos los casos para el suelo de arroz, llegando a obtener valores de 18,19% en reducción de crecimiento de la raíz comparado con 7,42% a una concentración de 10 ppm para arroz y pastos respectivamente (Figura 3).

El mayor contenido de materia orgánica para el suelo de pastos (7%), además de la mayor proporción de limos (21%) y arcillas (21%) que de arenas (58%) respecto al suelo de arroz (limo 14,4%, arcilla 18,3% y arenas 67,3%), produjo un rango de porcentaje de reducción del crecimiento de la raíz menos amplio (0-7,42%), mientras que para el suelo de arroz el rango fue mucho más amplio (0-18,19%); estos resultados corresponden a lo encontrado por Hensley *et al.* (1978) y Mallat y Barceló (1998). Se puede observar cómo al presentarse un aumento en las concentraciones aplicadas de glifosato al suelo, se presenta un aumento en el porcentaje de reducción de crecimiento para el suelo de arroz que, además de tener un menor contenido de materia orgánica, presenta un pH (4,73) menor, en comparación con el suelo de pastizal que tiene mayores contenidos de materia orgánica y un pH de 5,55, lo cual produce una mayor fracción biodisponible de glifosato para el suelo de arroz que para el suelo de pastizal, ya que el pH de la solución se relaciona inversamente con la adsorción

(Nomura y Hilton, 1977; McConnell y Hossner, 1985; Sprankle *et al.*, 1975a) (Figura 3).

Kogan *et al.* (2003), concluyen que la adsorción del glifosato está influenciada por el tipo de suelo, observándose mayor adsorción en suelos con altos contenidos de materia orgánica y, por tanto, menor reducción del crecimiento de la planta indicadora y una menor adsorción para suelos muy arenosos y, en consecuencia, mayor reducción del crecimiento de la planta indicadora. Este experimento muestra cómo los mayores contenidos de materia orgánica reducen la fracción disponible del glifosato y, por consiguiente, produce un menor porcentaje de reducción del crecimiento en la planta indicadora.

Los resultados obtenidos de los bioensayos con compuestos dispersos en medios sólidos se ven afectados por el tipo de sustrato y por las propiedades físicas y químicas del compuesto y del sustrato, entre otros; así, el medio arenoso con bajos contenidos de materiales que podrían interactuar con el herbicida, tiende a producir los mayores valores de porcentaje de reducción del crecimiento del organismo indicador, y valores de dosis letales bajas, mientras que los ensayos en suelos con mayor cantidad de partículas de materiales orgánicos y coloides, tienden a adsorber los compuestos químicos produciendo valores de porcentaje de reducción del crecimiento del organismo indicador más bajos y valores de dosis letales más altas (Figura 3).

Detección de residuos biodisponibles de glifosato en suelo provenientes de muestras de campo, y usando lechuga como planta indicadora. Para este experimento se empleó una simulación de aplicación, la presencia de residuos biodisponibles en diferentes suelos, y a diferentes dosis comerciales de glifosato, equivalentes a 0; 960; 1920 y 4800 g $\text{ia}\cdot\text{ha}^{-1}$. Además se hizo una prueba con suelo traído del campo y recientemente asperjado a una dosis de 1.440 g $\text{ia}\cdot\text{ha}^{-1}$, tomado de un lote comercial dedicado a una explotación arrocera.

El análisis hecho para los datos de peso seco obtenidos en este experimento, no indicaron diferencias significativas para el tipo de suelo ni para dosis del herbicida.

La pérdida del efecto herbicida del glifosato, al ser aplicado sobre el suelo, puede ser explicado de acu-

erdo con lo expuesto por Sprankle *et al.* (1975b) y Chorbadjian y Kogan (2001), quienes reportan que el herbicida no se mueve más allá de unos pocos milímetros sobre la superficie del suelo debido a su alta tasa de adsorción a los coloides del suelo, lo que pudo impedir el contacto del herbicida con la radícula de la lechuga, que se sembró a una profundidad de dos milímetros.

Otra causa de la pérdida del efecto herbicida en el tiempo es la actividad microbiana en el suelo de acuerdo con lo reportado por Mallat y Barceló, (1998); Forlani *et al.* (1999); Haney *et al.* (2000); Chorbadjian y Kogan (2001) y Araujo *et al.* (2003).

Forlani *et al.* (1999) y Haney *et al.* (2000) reportan un aumento en la cantidad de carbono mineralizado en el suelo al aumentar la cantidad de glifosato aplicado; las cantidades de nitrógeno mineralizado se incrementan en forma lineal con la adición de glifosato, por lo cual podemos asegurar que los microorganismos juegan un papel muy importante en la descomposición del glifosato.

Bibliografía

Amrhein, N.; B. Deuas; P. Gehrke y H. Steinrucken. 1980. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiology* 66, 830-834.

Araujo, A.; R. Monteiro y R. Abarkeli, 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* 52, 799-804.

Becerril, J.; S. Duke y J. Lydon. 1989. Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf. *Phytochemistry* 28, 695-699.

Blanco, A. 1997. Susceptibilidad de *Pilea microphylla* L. a ^{14}C -atrazina y degradación de la atrazina en agua y suelo usando técnicas de bioensayo con *Lactuca sativa* como especie indicadora. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Chorbadjian, R. y M. Kogan. 2001. Pérdida de actividad del glifosato debido a la presencia de suelo en el agua de aspersión. *Revista Ciencia e Investigación Agraria* 28(2), 83-87.

Forlani, G.; A. Mangiacalli; E. Nelsen y C. Suardi. 1999. Degradation of the phosphonate herbicide glypho-

sate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 991-997.

Fuentes, C. y G. Leroux. 2003. Rimsulfurom uptake, translocation, metabolism and acetolactate synthase (ALS) sensitivity in two maize hybrids. *Agronomía Colombiana* 21(1-2), 17-28.

Guarrancino, L.; L. Candela y E. Santos. 1999. Simulación numérica del transporte del herbicida glifosato en la zona no saturada del suelo. En: *Estudios de la zona no saturada del suelo*. ICIE. Tenerife, España. pp. 151-155.

Günther, P.; A. Rahman y W. Pestemer. 1989. Quantitative bioassay for determining residues and availability to plants of sulphonylurea herbicides. *Weed Research* 29, 141-146.

Haney, L.; S. Senseman; F. Hons y D. Zuberer. 2000. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science* 48, 89-93.

Hensley, D.; D. Beuerman y P. Carpenter. 1978. The inactivation of glyphosate by various soils and metal salts. *Weed Research* 18, 287-291.

Horowitz, M. 1976. Application of bioassay techniques to herbicide investigations. *Weed Research* 16, 209-215.

Kogan, M., A. Metz y R. Ortega. 2003. Adsorption of glyphosate in Chilean soils and its relationships with unoccupied phosphate binding sites. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 38(4), 513-519.

Mallat, E. y D. Barceló. 1998. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 823, 129-136.

McConnell, J. y L.Hossner. 1985. pH-dependent adsorption isotherms of glyphosate. *Journal Agric. Food Chem.* 33, 1075-1078.

Monsanto. 2003. Glyphosate and environmental fate studies. Backgrounder 1-4.

Nomura, N. y H. Hilton. 1977. The adsorption and degradation of glyphosate in five Hawaiian sugarcane soils. *Weed Research* 17, 113-121.

Pantoja, A.; A. Ramírez y L. Sanint. 1997. Producción de arroz en América Latina: área sembrada y costos. MIP en arroz: manejo integrado de plagas, artrópodos, enfermedades y malezas. Publicación CIAT 292, 3-5.

Powles, S. B.; D. F. Lorraine-Colwill; J. J. Dellow y C. Preston. 1998. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Science* 46, 604-607.

Richardson, W. G. 1985. Bioassays for glyphosate. En: Grossbard, E. y D. Atkinson (eds.). *The herbicide glyphosate*. Butterworths, Londres. pp. 286-298.

Rodríguez, H. 2001. Determinación de residuos de glifosato y de su metabolito ácido aminometilfosfónico en aguas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia. Trabajo de grado. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. pp. 70-78.

Rubin, J.; R. Gaines y R. Jensen. 1982. Enzymological basis for herbicidal action of glyphosate. *Plant Physiology* 70, 833-839.

Sánchez, L. y C. Hernández. 1999. Detección de residuos biodisponibles de atrazina en suelos y aguas, usando técnicas de bioensayo con plantas indicadoras, en Saldaña, Tolima. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. pp. 51-56.

Santelman, P. W. 1977. Herbicide bioassay. En: Truelove B. (ed.). *Research methods in weed science*. 2ª edición. Southern Weed Science Society. 85 p.

Schmidt, R. 1993. Development of herbicides – Role of Bioassays. En: Streibig, J. C. y P. Kudsk (eds.). *Herbicide bioassay*. CRC Press, Boca Ratón. pp. 7-28.

Seefeldt, S.S.; J.E. Jensen y P. Fuerst. 1995. Log-Logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed Technology* 9, 218-227.

Selim, S.; S. O'neal; M. Ross y C. Lembi. 1989. Bioassay of photosynthetic inhibitors in water and aqueous soil extracts with Eurasian watermilfoil (*Myriophyllum spicatum*). *Weed Science* 37, 810-814.

Singh, K. y L. Shaner. 1998. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technology* 12, 527-530.

Sprinkle, P.; W. Meggitt y D. Penner. 1975a. Rapid inactivation of glyphosate in the soil. *Weed Science* 23, 224-228.

Sprankle, P.; W. Meggitt y D. Penner. 1975b. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in soil. *Weed Science* 23, 229-234.

Streibig, J.C.; M. Rudemo y J.E. Jensen. 1993. Dose-response curves and statistical models. En: Streibig, J. C. y P. Kudsk (eds.). *Herbicide bioassay*. CRC Press, Boca Ratón. pp. 29-56.

Streibig, J.C.; A. Walker; A. Blair; G. Anderson-Taylor; D. Eagle; H. Friedländer; E. Hacker; W. Iwanzik; P. Kudsk; C. Labhart; B. Luscombe; G. Madafoglio; P. Nel; W. Pestemer; A. Ahman; W. Retzlaff; J. Rola; L. Stefanovic; H. Straathof y E. Thies, 1995. Variability of bioassays with metsulfuron-methyl in soil. *Weed Research* 35, 215-224.