

EFFECTOS LETALES Y SUBLETALES DEL GLIFOSATO (ROUNDUP® ACTIVO) EN EMBRIONES DE ANUROS COLOMBIANOS

Lethal and Sublethal Effects of Glyphosate (Roundup® Active) to Embryos of Colombian Anurans

TEÓFILA MARÍA TRIANA VELÁSQUEZ¹, Bióloga; CLAUDIA MARSELA MONTES ROJAS¹, Bióloga; MANUEL HERNANDO BERNAL BAUTISTA^{1,2}, Ph. D.

¹ Grupo de Investigación en Herpetología, Eco-Fisiología y Etología. Departamento de Biología, Universidad del Tolima. Altos de Santa Helena. Ibagué, Colombia. teofila.maria.triana@gmail.com, cmmontesr@ut.edu.co

² Profesor Asociado, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia.

Autor de correspondencia: Manuel Bernal Bautista, mhbernal@ut.edu.co.

Presentado el 21 de enero de 2013, aceptado el 6 de mayo de 2013, fecha de reenvío el 10 de mayo de 2013.

RESUMEN

El glifosato es un herbicida usado en la agricultura que puede afectar especies no blanco. El objetivo del trabajo fue determinar los efectos letales (concentración letal media - CL₅₀) y subletales (cambios en el tamaño corporal y desarrollo) del glifosato (Roundup® Activo) sobre embriones de cuatro especies de anuros expuestos durante 96 horas en pruebas de laboratorio y microcosmos. En laboratorio, la especie más tolerante fue *Engystomops pustulosus* (CL₅₀ = 3033,18 µg a.e./L) y la más sensible *Rhinella marina* (CL₅₀ = 1421,46 µg a.e./L), la cual mostró una reducción significativa en el tamaño corporal y retrasos en el desarrollo de los individuos. Las demás especies tuvieron un CL₅₀ intermedio (*Rhinella humboldti* = 2899,36 µg a.e./L; *Hypsiboas crepitans* = 2151,88 µg a.e./L). En todos los casos el CL₅₀ fue menor a la concentración empleada en campo (5392,92 µg a.e./L) indicando un efecto tóxico alto. En los microcosmos, los embriones de *E. pustulosus* fueron los más tolerantes (CL₅₀ = 19,41 kg a.e./ha), mientras que los de *R. humboldti* los más sensibles (CL₅₀ = 10,61 kg a.e./ha). Sin embargo, todas las especies tuvieron un CL₅₀ superior a la concentración asperjada en campo (3,69 kg a.e./ha), mostrando un efecto tóxico leve, y no hubo diferencias en el tamaño corporal ni en el desarrollo de los individuos. Este resultado muestra que el glifosato, en su presentación comercial como Roundup® Activo, genera una mortalidad moderada en los embriones de anuros.

Palabras clave: anuros, CL₅₀, embriones, glifosato.

ABSTRACT

Glyphosate is a herbicide widely used in agriculture, which may affect non-target species. The aim of this study was to determine the lethal (Median lethal concentration - LC₅₀) and sublethal effects (changes on body size and development) of glyphosate (Roundup® Active) to embryos of four anuran species, exposed during 96 hours under laboratory and microcosm tests. Under laboratory conditions, *Engystomops pustulosus* was the most tolerant species (LC₅₀ = 3033,18 µg a.e./L) and *Rhinella marina* was the most sensitive (LC₅₀ = 1421,46 µg a.e./L), which also showed a delayed development and significantly reduced body size. The other species had an intermediate LC₅₀ (*Rhinella humboldti* = 2899,54 µg a.e./L; *Hypsiboas crepitans* = 2151,88 µg a.e./L). In all cases, the laboratory LC₅₀ was lower than the concentration used in field (5392,92 µg a.e./L), indicating a high toxic effect. In the microcosm tests, embryos of *E. pustulosus* were the most tolerant (LC₅₀ = 19,41 kg a.e./ha), while *R. humboldti* were the most sensitive (LC₅₀ = 10,61 kg a.e./ha). In this case, all four study species had a higher LC₅₀ than the concentration sprayed in field (3,69 kg a.e./ha), so a lower lethal effect, and there were no significant differences in body size and development. This result shows that the glyphosate, as the commercial presentation Roundup® Active, produce a moderate mortality on anuran embryos.

Keywords: anurans, embryos, glyphosate, LC₅₀.

INTRODUCCIÓN

El glifosato, N-fosfometil glicina, es uno de los herbicidas de mayor uso comercial en el mundo (Plötner y Matschke, 2012), que actúa principalmente inhibiendo la síntesis de aminoácidos aromáticos (Alibhai y Stallings, 2001). Es un herbicida no selectivo de acción sistémica, de amplio espectro, de acción post-emergente, que no cuenta con efecto residual y que es soluble en el agua (Plan de manejo ambiental para la erradicación de cultivos ilícitos, 2000). El principal uso del glifosato en Colombia es en la agricultura y el 10 al 14 % del total implementado en el país es utilizado para la erradicación de cultivos ilícitos (Solomon *et al.*, 2005). Algunos estudios sobre el efecto tóxico del glifosato han determinado que este representa un bajo riesgo para los organismos acuáticos (Giesy *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2010). No obstante, otros trabajos han concluido que existen efectos directos e indirectos sobre los anuros (Relyea, 2005; Lascano *et al.*, 2009), los cuales son un grupo de vertebrados muy sensibles a los cambios ambientales (Linder *et al.*, 2003). Estos trabajos han reportado que el efecto tóxico del glifosato puede variar entre los productos comerciales y que esta variación puede estar asociada más a los compuestos inertes que al ingrediente activo (Sparling *et al.*, 2010). Uno de los compuestos inertes de las formulaciones del herbicida glifosato es el POEA (Polioxietilamina), un surfactante empleado comúnmente en las presentaciones comerciales, al que se le atribuye una toxicidad mayor que a la sal de glifosato en embriones y renacuajos de anuros (Mann y Bidwell, 1999; Giesy *et al.*, 2000; Perkins *et al.*, 2000; Howe *et al.*, 2004; Tsui y Chu, 2004; Edginton *et al.*, 2004). Relyea (2004), Relyea (2005) y Relyea (2012), ha reportado que la exposición al glifosato en larvas de varias especies de anuros causa mortalidad tanto en pruebas de laboratorio como en mesocosmos, pero que la toxicidad del ingrediente activo puede verse afectada por factores ambientales como la temperatura, el pH, depredadores, entre otros. Por su parte, Wojtaszek *et al.* (2004) y Tsui y Chu (2004) afirman que la presencia de sedimentos y macrófitas acuáticas reducen la toxicidad del glifosato en condiciones de campo, lo que concuerda con Trumbo (2002), quien ha demostrado una disminución del pico de concentración del glifosato en el medio de exposición durante las primeras 24 horas. Además de los efectos letales del glifosato, ya sea en la formulación comercial o en la aplicación individual como sal de glifosato, otros trabajos han estudiado algunos efectos subletales en anfibios, como el causado en el crecimiento y desarrollo de los organismos expuestos a este herbicida. En general, estos trabajos han mostrado que el glifosato puede generar alteraciones en el desarrollo de la cresta neural y en el esqueleto craneofacial, causando malformaciones en la cabeza (Lenkowski *et al.*, 2010), incrementar la duración del periodo larval (Howe *et al.*, 2004; Relyea, 2004) y reducir la tasa de crecimiento de algunas especies de anuros (Cable y Wagner, 2005). En un estudio realizado por Bernal *et al.* (2009a, 2009b), se evaluó la toxicidad de la mezcla del glifosato (Glyphos®) y el coadyu-

vante Cosmo-Flux® 411F en renacuajos, juveniles y adultos de especies de anuros colombianos. Allí se encontró que la mezcla no resultó ser ecológicamente letal para las especies de estudio. Sin embargo, este trabajo no midió la toxicidad en los embriones, un estadio de desarrollo que podría ser más susceptible a los cambios ambientales, ni los efectos generados por la aplicación individual del glifosato, el cual podría interactuar sinérgica o antagónicamente en la mezcla con el Cosmo-Flux® 411F. El presente estudio evalúa los efectos letales y subletales (cambios en el tamaño corporal y desarrollo) del glifosato, en su presentación comercial como Roundup® Activo, sobre los embriones de cuatro especies de anuros colombianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies de estudio

Este trabajo se realizó con embriones de cuatro especies de anuros: *Rhinella humboldti* (Gallardo, 1965), *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758), *Hypsiboas crepitans* (Wied, 1824) y *Engystomops pustulosus* (Cope, 1864). Estas especies fueron seleccionadas por encontrarse en zonas de cultivo asperjadas con glifosato, no estar en alguna categoría de amenaza y por ovopositar un número alto de huevos. Los embriones fueron obtenidos de posturas colectadas en diferentes lugares del departamento del Tolima, Colombia: *R. humboldti* y *H. crepitans*, en los alrededores de la ciudad de Ibagué (04°26'20"N 75°13'56"W); *R. marina*, en el corregimiento de Payandé, municipio de San Luis (04°17'51"N 75°05'48"W), y la vereda Potrerillo, municipio de Coello (04°15'00"N 74°59'00"W); y *E. pustulosus* y *H. crepitans*, en el municipio de Mariquita (04°26'20"N 75°13'56"W). Para cada especie se colectaron entre dos y cuatro posturas, las cuales fueron transportadas al laboratorio de Herpetología de la Universidad del Tolima, donde se colocaron en agua de clorada con aireación hasta que los embriones alcanzaron el estadio diez de desarrollo (Gosner, 1960). Las pruebas iniciaron con embriones en este estadio (estadio diez) debido a que fue el más temprano que se obtuvo en el laboratorio para todas las especies después de su colecta en campo.

Herbicida Empleado

El glifosato utilizado en este trabajo fue el producto comercial Roundup® Activo, el cual tiene una concentración de 363 g/L de ácido glifosato de formulación a 20 °C, equivalente a 446 g/L de sal potásica de N-(fosfometil)-glicina. Adicionalmente, la presentación comercial menciona que tiene ingredientes aditivos, c.s.p. 1 L, pero no los describe. Las soluciones experimentales del herbicida se prepararon con agua previamente de clorada por aireación y se aplicaron en experimentos de laboratorio y microcosmos.

PRUEBAS DE LABORATORIO

Veinticinco embriones en estadio diez (Gosner, 1960) de cada especie, más su réplica proveniente de una postura diferente,

(total embriones = 50), fueron expuestos a cada una de cinco concentraciones experimentales de glifosato (325; 750; 1500; 3000 y 6000 µg a.e./L) y un control negativo (agua decolorada), en peceras de 2 L de capacidad con 1 L de la solución. Estas peceras fueron colocadas en un área del laboratorio bajo condiciones controladas de temperatura (24 ± 2 °C) y un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h, mantenido con lámparas de luz blanca (Phillips TLT 20W/54RS) y un temporizador digital (General Electric PM621, China). El experimento consistió en un sistema semiestático, donde las soluciones fueron renovadas diariamente con el fin de mantener las concentraciones del glifosato, las cuales se reducen al cabo de 24 h (Trumbo, 2002). Durante este recambio se midieron previa y posteriormente a la renovación, el pH, el oxígeno disuelto, la conductividad y la temperatura.

PRUEBAS DE MICROCOSMOS

Cincuenta embriones en estadio diez (Gosner, 1960) por cada especie, más su réplica proveniente de una o varias posturas diferentes (total embriones = 100), se expusieron a cada una de cinco concentraciones experimentales de glifosato (1,845 kg a.e./ha; 3,69 kg a.e./ha; 7,38 kg a.e./ha; 14,76 kg a.e./ha y 29,52 kg a.e./ha), más un control negativo (agua decolorada) durante 96 h. Las concentraciones se expresaron en unidades de kilogramo ácido equivalente por hectárea para poder compararlas con las unidades de aplicación en campo. Estas se prepararon a partir de una solución madre de 59,04 kg a.e./ha, obtenida con un volumen de 2376,96 µL de glifosato (Roundup® Activo) en 1 L de agua decolorada, para adicionarse a 9 L de agua contenida en los microcosmos. Posteriormente, mediante diluciones seriadas se obtuvo el rango de concentraciones nominales entre 1,845 y 29,52 kg a.e./ha. Se utilizaron seis tinajas plásticas de 70 cm de diámetro y 13 cm de profundidad (área = 0,1520 m²), a las que se les colocaron 9 L de agua con 450 g de tierra y 645 g de arena (obtenidas del jardín botánico de la Universidad del Tolima), que se cubrieron con una tela blanca (muselina), con el propósito de facilitar la observación de los individuos para su posterior conteo. Luego, a cada microcosmos se le agregó 1 L de la concentración experimental, una pequeña cantidad de hojarasca (dos hojas), una macrófita y los embriones. Los microcosmos fueron puestos aleatoriamente en un área ventilada del laboratorio bajo condiciones ambientales de temperatura (25 ± 3 °C) y luz-oscuridad de 12:12 h, aproximadamente. Este experimento consistió en un sistema estático sin recambio de las soluciones, con el propósito de simular las condiciones de exposición en campo. Los parámetros fisicoquímicos de pH, oxígeno disuelto, conductividad y temperatura fueron medidos cada 24 h hasta finalizar las pruebas.

REGISTRO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Las observaciones de mortalidad se hicieron a las 24, 48, 72 y 96 h después de iniciada la prueba. La mortalidad acumulada hasta las 96 h fue usada para estimar los valores de CL₅₀, que

representa la concentración de glifosato que ocasiona la muerte del 50 % de los organismos. Esta estimación, con sus intervalos de confianza al 95 %, se realizó a través del programa *Trimmed Spearman-Kärber* (TSK) versión 1.5. Para evaluar los efectos subletales, al finalizar el experimento (96 h), se tomaron fotos de 20 individuos sobrevivientes (ya como renacuajos) por cada concentración y el control, y con la ayuda del programa ImageJ 1.42j se midió la longitud total, la longitud corporal, la longitud de la cola y el ancho de la cabeza. Estos datos se analizaron por medio de un análisis multivariado de varianza (Manova) y posteriores análisis de varianza (Anovas), para establecer las diferencias morfométricas de los individuos entre los tratamientos. De este análisis fueron excluidas las dos concentraciones experimentales mayores del glifosato, debido a su alta mortalidad. También, en estos renacuajos se registró el estadio de desarrollo a las 96 h de exposición, de acuerdo con la tabla de Gosner (1960), el cual se comparó a través de un análisis de varianza (Anova), para establecer diferencias entre los tratamientos.

Finalmente, los parámetros fisicoquímicos de las pruebas de laboratorio, antes y después de los recambios, fueron comparados con la prueba no paramétrica de Wilcoxon (Zar, 1996), mientras que en los microcosmos se utilizó un análisis de correlación de Pearson, para detectar si había o no un cambio significativo en estos parámetros a lo largo de las 96 h de transcurrido el experimento. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa InfoStat Versión 2011.

RESULTADOS

Pruebas de laboratorio

Los resultados de los CL₅₀ para las cuatro especies de estudio (Fig. 1A) muestran que *R. marina* fue la especie más sensible, mientras que *E. pustulosus* fue la más resistente y *H. crepitans* presentó una letalidad intermedia. Al comparar los intervalos de confianza (Fig. 1A), solo *E. pustulosus* y *R. humboldti* no se diferenciaron estadísticamente. Los porcentajes de mortalidad para cada una de las concentraciones experimentales por especie se pueden apreciar en la Tabla 1. Las medidas morfométricas de los renacuajos sobrevivientes mostraron diferencias significativas entre las concentraciones experimentales (Hotelling; $T^2 = 0,23$; $p < 0,0001$). Sin embargo, estas diferencias fueron generadas únicamente en los renacuajos de *R. marina* expuestos a la concentración de 1500 µg/L, donde se presentó una disminución de la longitud total (Anova; $F = 18,33$; $p < 0,0001$), longitud de la cola (Anova; $F = 13,00$; $p < 0,0001$), longitud corporal (Anova; $F = 13,82$; $p < 0,0001$) y ancho de la cabeza (Anova; $F = 4,20$; $p = 0,0062$). En las demás especies no hubo diferencias significativas para las variables morfométricas (Anovas; $p > 0,05$) (Fig. 2). En cuanto al desarrollo, *R. marina* mostró una diferencia significativa en la concentración de 1500 µg/L en comparación con el control (Anova; $F = 10,96$; $p < 0,0001$), porque un 25 % de los organismos se encontraban en estadio 23, mientras que

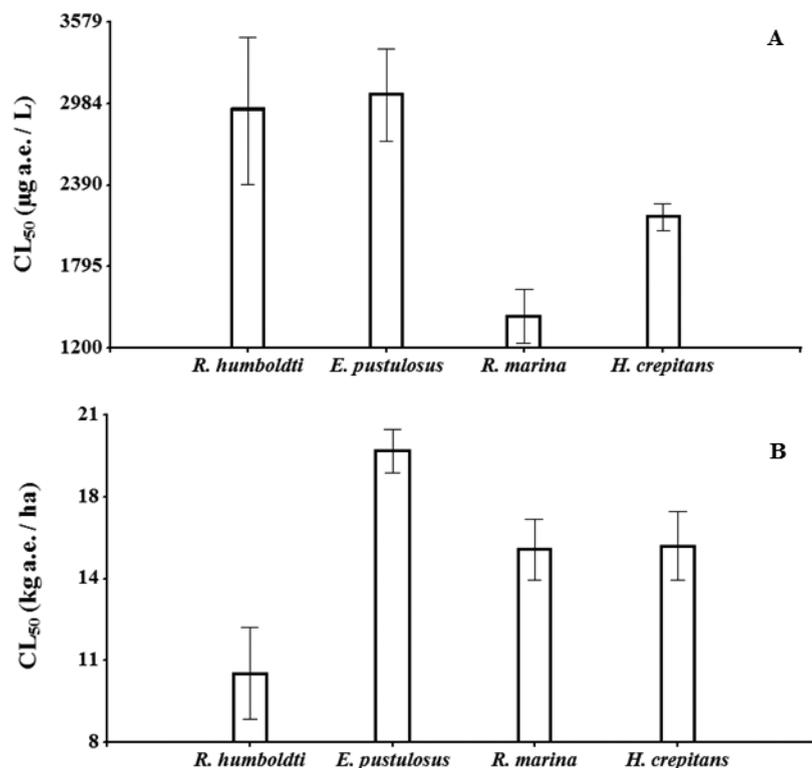


Figura1. Comparación de los valores de toxicidad (CL₅₀) en los embriones expuestos al glifosato (Roundup® Activo) en condiciones de laboratorio (A) y microcosmos (B). Las barras indican los intervalos de confianza al 95 %.

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad de los embriones expuestos durante 96 h a la aplicación individual de glifosato (Roundup® Activo) en condiciones de laboratorio y microcosmos.

Concentraciones en laboratorio (µg a.e. / L)						
Especie	Control	[325]	[750]	[1500]	[3000]	[6000]
<i>E. pustulosus</i>	0	0	8	0	40	100
<i>R. humboldti</i>	0	24	24	22	46	100
<i>R. marina</i>	0	2	26	30	100	100
<i>H. crepitans</i>	0	6	2	2	94	100
Concentraciones en microcosmos (kg a.e. / ha)						
Especie	Control	[1,845]	[3,69]	[7,38]	[14,76]	[29,52]
<i>E. pustulosus</i>	0	5	0	0	10	100
<i>R. humboldti</i>	0	17	18	39	53	100
<i>R. marina</i>	4	4	14	2	37	100
<i>H. crepitans</i>	0	10	10	9	39	100

Tabla 2. Valores promedio y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados antes y después del recambio de las soluciones en los experimentos de laboratorio.

Parámetros	Antes del recambio	Después del recambio
Conductividad (S/m ²)	259,46 ± 34,98	246,38 ± 26,93
Temperatura (°C)	24,70 ± 1,54	22,61 ± 1,50
pH	7,45 ± 0,33	7,41 ± 0,28
Oxígeno disuelto (ppm)	6,98 ± 0,58	6,68 ± 0,88

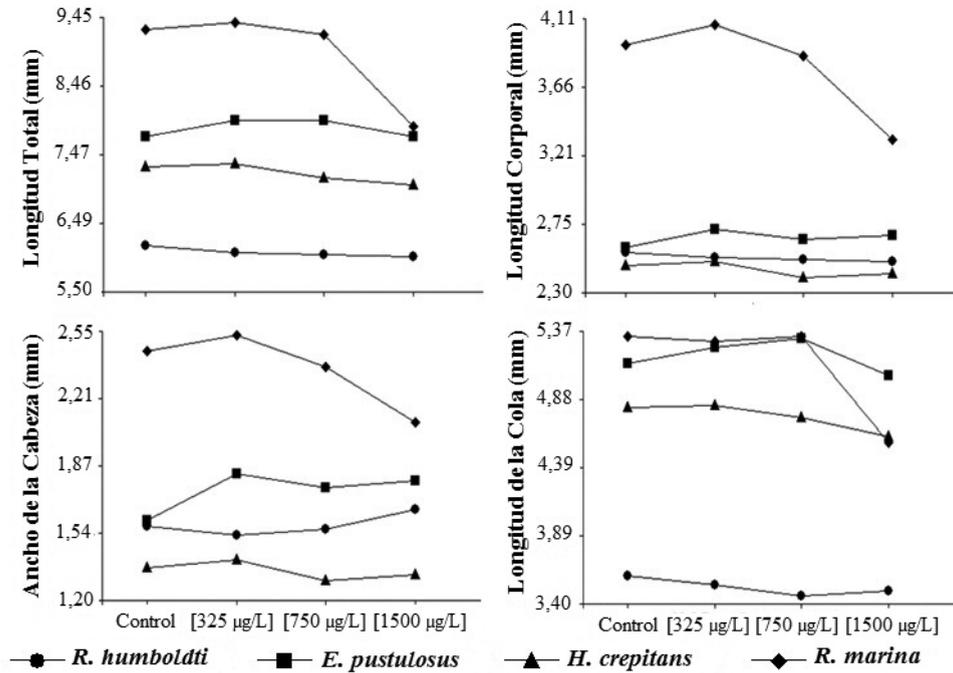


Figura 2. Promedios de las medidas morfométricas de los renacuajos de las cuatro especies de anuros sobrevivientes a las concentraciones del glifosato (Roundup® Activo) bajo condiciones de laboratorio.

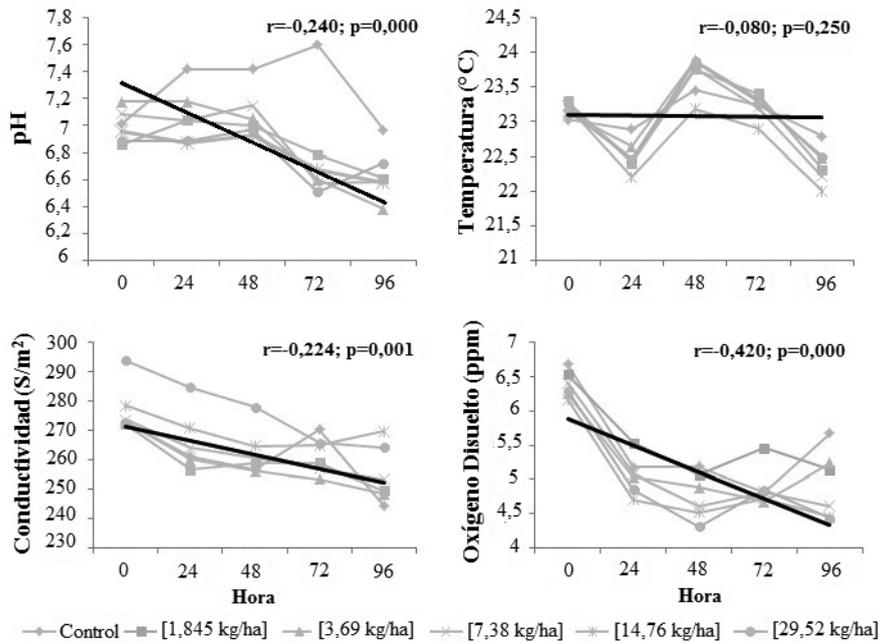


Figura 3. Tendencia de los parámetros fisicoquímicos en las pruebas de exposición al glifosato (Roundup® Activo) bajo condiciones de microcosmos en las cuatro especies de estudio. La línea negra representa la tendencia general para cada parámetro durante las 96 h de experimentación.

el 100 % del control se hallaban en estadio 25. En *R. humboldti* también se observaron diferencias significativas (Anova; $F = 12,67$; $p < 0,0001$) entre la concentración de 1500 µg/L, donde había un 40 % de los individuos en estadio 24, y el control donde el 100 % estaban en estadio 25. En *H. crepitans*

y *E. pustulosus* no se observaron retrasos en el desarrollo porque el 100 % de los individuos se encontraba en el mismo estadio en todas las concentraciones y el control, específicamente en estadio 23 y 25, respectivamente.

Pruebas en microcosmos

La especie más sensible a la aplicación de glifosato fue *R. humboldti* y la más tolerante *E. pustulosus*, las demás especies mostraron valores de CL_{50} intermedios sin diferenciarse significativamente (Fig. 1B). En todos los casos, los CL_{50} fueron iguales o superiores a 10,61 kg a.e./ha., y la mortalidad no fue superior al 18 % en la concentración de aspersión en campo (3,69 kg a.e./ha) (Tabla 1). Respecto de la longitud total, longitud corporal, longitud de la cola y ancho de la cabeza de los renacuajos sobrevivientes a las tres primeras concentraciones de glifosato y el control, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Hotelling; $T^2 = 0,03$; $p = 0,2633$). Tampoco se encontraron diferencias intraespecíficas en el desarrollo, ya que en *R. humboldti* y *E. pustulosus* todos los individuos se hallaron en estadio 25, mientras que en *H. crepitans* y *R. marina* se observaron en estadio 23.

Parámetros fisicoquímicos

En las pruebas de laboratorio, los valores de los parámetros fisicoquímicos antes y después de realizado el recambio de las soluciones (Tabla 2), no presentaron diferencias estadísticas (Wilcoxon; $p > 0,05$). En los microcosmos (Fig. 3), a lo largo de las 96 h de exposición, se encontró una tendencia general negativa y significativa para el pH (Pearson; $r = -0,240$; $p = 0,000$), la conductividad (Pearson; $r = -0,224$; $p = 0,001$) y el oxígeno disuelto (Pearson; $r = -0,420$; $p = 0,000$), pero no para el caso de la temperatura (Pearson; $r = -0,080$; $p = 0,250$).

DISCUSIÓN

Los embriones de *E. pustulosus* fueron los más tolerantes a la aplicación del glifosato (Roundup® Activo) bajo las dos condiciones experimentales de exposición, mientras que los de *R. marina* y *R. humboldti* presentaron una mayor sensibilidad en condiciones de laboratorio y microcosmos, respectivamente. Esta diferencia en la tolerancia ante el herbicida podría estar relacionada con el modo reproductivo de las especies. Por ejemplo, en *E. pustulosus* se presenta una postura de huevos recubierta por un nido de espuma (Guayara-Barragán y Bernal, 2012), que podría proporcionar una mayor protección a los embriones ante agentes químicos contaminantes de su entorno. Por su parte, en las especies del género *Rhinella* se presenta una postura de huevos en forma de cadena (Guayara-Barragán y Bernal, 2012), cubiertos por una membrana delgada que podría ofrecer poca resistencia a la difusión de agentes tóxicos en el agua. Teniendo en cuenta la concentración del glifosato asperjada en campo con fines de erradicación de cultivos ilícitos (3,69 kg a.e./ha = 5392,92 µg/L) (Bernal *et al.*, 2009b), o la sugerida para aplicar con fines agrícolas (1,77 kg a.e./ha = 2586,84 µg a.e./L) (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2007), los CL_{50} obtenidos en laboratorio (Fig. 1A), inferiores al mayor valor de aplicación, indican una toxicidad alta para los embriones de todas las especies evaluadas. Sin embargo, en los microcosmos, a la mayor concentración de aspersión (3,69 kg a.e./ha), el CL_{50} para *R. humboldti* fue 2,87

veces superior, para *R. marina* y *H. crepitans* fue de 4,2 veces, y para *E. pustulosus* fue de 5,2 veces. Considerando que las pruebas de microcosmos pueden simular mejor las condiciones de campo, al incluir sedimentos y plantas, el producto formulado del glifosato (Roundup® Activo) a las concentraciones sugeridas de aplicación genera un efecto letal moderado (hasta el 18 %) en los embriones de estas especies.

El retraso significativo observado en el desarrollo embrionario y la disminución del tamaño corporal de los renacuajos de *R. marina*, bajo condiciones de laboratorio, concuerda con la mayor sensibilidad (menor CL_{50}) presentada por esta especie. Un retardo en el desarrollo de los renacuajos ante pesticidas también ha sido reportado en otros anfibios bajo condiciones de laboratorio (Relyea, 2004). Sin embargo, en los microcosmos no se presentó este cambio significativo, posiblemente por la disminución de la toxicidad del compuesto activo ante la presencia de los sedimentos (Wojtaszek *et al.*, 2004; Tsui y Chu, 2004).

En los parámetros fisicoquímicos medidos bajo condiciones de laboratorio no se encontraron diferencias significativas durante las 96 h de experimentación, probablemente por la renovación diaria que se hizo a las soluciones. Por el contrario, en los microcosmos se encontró una disminución significativa del pH con el paso de las horas, hasta 6,38, el cual es un valor lejano al CL_{50} de letalidad (pH < 4,5) reportado para los embriones y renacuajos de estas especies (Henao-Muñoz y Bernal, 2011). De igual forma, la concentración del oxígeno disuelto disminuyó con el paso de las horas en los microcosmos, lo cual podría atribuirse a que no hubo una renovación o aireación continua de las soluciones; no obstante, los valores mínimos de oxígeno disuelto (> 4 ppm, Fig. 3), fueron superiores a los reportes de letalidad para embriones y renacuajos en algunas especies de anuros (Seymour *et al.*, 2000; Bernal *et al.*, 2011). En la conductividad se observó un ligero descenso durante las 96 h; sin embargo, este cambio probablemente tampoco afectó la letalidad de los individuos, porque esta reducción también se registró en el control en donde la tasa de mortalidad fue baja o nula. Por lo tanto, los cambios en el pH, el oxígeno disuelto y la conductividad durante las 96 h de experimentación en los microcosmos están dentro de los rangos tolerables para estas especies, y posiblemente no fueron los causantes de la mortalidad observada a las concentraciones experimentales mayores, aunque no se debe descartar que su interacción en el medio y con el glifosato puedan incrementar su toxicidad.

CONCLUSIÓN

En conclusión, las pruebas de laboratorio sugieren una toxicidad alta del glifosato (Roundup® Activo) en los embriones de los anuros, pero las pruebas de microcosmos indican que su uso, a las concentraciones sugeridas de aspersión en campo, tendrían una letalidad cercana al 20 % sin causar efectos en el tamaño corporal ni en el desarrollo de los individuos sobrevivientes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Marcela Henao y Jorge Luis Turriago el apoyo en el montaje y desarrollo de los experimentos. Este trabajo hace parte del proyecto 490110 financiado por el Fondo de Investigaciones de la Universidad del Tolima y cuenta con el permiso de investigación científica en diversidad biológica de la Corporación Autónoma Regional del Tolima, CORTOLIMA (Resolución número 2886 de 2011).

BIBLIOGRAFÍA

- Alibhai M, Stallings W. Closing down on glyphosate inhibition—with a new structure for drug discovery. *PNAS*. 2001;98(6):2944-2946.
- Bernal Mh, Solomon KR, Carrasquilla G. Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos) and Cosmo-Flux to larval Colombian frogs 1. Laboratory acute toxicity. *Toxicol Environ Health*. 2009a;72(15):961-965.
- Bernal MH, Solomon KR, Carrasquilla G. Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos) and Cosmo-Flux to larval and juvenile colombian frogs 2. Field and laboratory microcosm acute toxicity. *Toxicol Environ Health*. 2009b;72(15):966-973.
- Bernal MH, Alton LA, Cramp RL, Franklin CE. Does simultaneous UV-B exposure enhance the lethal and sub-lethal effects of aquatic hypoxia on developing anuran embryos and larvae? *J Comp Physiol*. 2011;181(7):973-980.
- Cauble K, Wagner RS. Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2005;75(3):429-435.
- Edginton AN, Sheridan PM, Stephenson GR, Thompson DG, Boermans HJ. Comparative effects of pH and Vision herbicide on two life stages of four anuran amphibian species. *Environ Toxicol Chem*. 2004;23(4):815-822.
- Giesy JP, Dobson S, Solomon KR. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Environ Contam Toxicol*. 2000;167:35-120.
- Gosner KL. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*. 1960;16(3):183-190.
- Guayara-Barragán MG, Bernal MH. Fecundidad y fertilidad en once especies de anuros colombianos con diferentes modos reproductivos. *Caldasia*. 2012;34(2):483-496.
- Henao-Muñoz LM, Bernal-Bautista MH. Tolerancia al pH en embriones y renacuajos de cuatro especies de anuros colombianos. *Rev Acad Colomb Cienc*. 2011;35(134):105-110.
- Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K, Veldhoen N. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environ Toxicol Chem*. 2004;23(8):1928-1938.
- Jones DK, Hammond JI, Relyea RA. Roundup® and Amphibians: The Importance of Concentration, Application Time, and Stratification. *Environ Toxicol Chem*. 2010; 29(9):2016-2025.
- Lascano CI, Sotomayor V, Ferrari A, Venturino A. Alteraciones del desarrollo embrionario, poliaminas y estrés oxidativo inducidos por plaguicidas organofosforados en *Rhinella arenarum*. *Acta Toxicol Argent*. 2009;17(1):8-19.
- Lenkowski JR, Sanchez-Bravo G, McLaughlin KA. Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. *J Environ Sci*. 2010;22(9):1305-1308.
- Linder G, Krest SK, Sparling DW. Amphibian Decline: An Integrated Analysis of Multiple Stressor Effects. En: *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*. Pensacola, Florida; 2003. p. 490.
- Mann RM, Bidwell JR. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of Southwestern Australian frogs. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1999;36(2):193-199.
- Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Resolución Número 1435. [serial online] 2007 [citado 06 marzo 2013]; 1(1): [18 Pantallas]. Disponible en URL: http://www.minambiente.gov.co/documentos/res_1435_150807.pdf
- Plan de manejo ambiental para la erradicación de cultivos ilícitos. Identificación del herbicida glifosato: propiedades y toxicidad. [Serial online] 2000. [Citado 15 de febrero de 2013]; 1(1). Disponible en URL: http://www.dne.gov.co/recursos_user/documentos/Doc_tecnicos/glifosato.pdf.
- Perkins PJ, Boermans HJ, Stephenson R. Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay—*Xenopus*. *Environ Toxicol Chem*. 2000;19(4):940-945.
- Plötner J, Matschke J. Akut-toxische, subletale und indirekte Wirkungen von Glyphosat und glyphosathaltigen Herbiziden auf Amphibien – eine Übersicht. *Zeitschrift für Feldherpetologie*. 2012;19(1):1-20.
- Relyea RA. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environ Toxicol Chem*. 2004;23(7):1737-1742.
- Relyea RA. The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2005;48(3):351-357.
- Relyea RA. New effects of Roundup on amphibians: Predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. *Ecol Appl*. 2012;22(2):634-647.
- Seymour RG, Roberts JD, Mitchell NJ, Blaylock AJ. Influence of environmental oxygen on development and hatching of aquatic eggs of the Australian frog, *Crinia georgiana*. *Physiol Biochem Zool*. 2000;73(4):501-507.
- Solomon KR, Anadón A, Cerdeira AL, Marshall J, Sanin LH. Estudio de los efectos del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD), 2005. p. 5.

Sparling DW, Linder G, Bishop CA, Krest SK. Ecotoxicology of amphibians and reptiles. 2 ed. Pensacola, Florida: The society of environmental toxicology and chemistry (SETAC); 2010. p. 916.

Trumbo J. An Assessment of the Hazard of a Mixture of the Herbicide Rodeo® and the Non-Ionic Surfactant R-11® to Aquatic Invertebrates and Larval Amphibians. Calif Fish Game. 2002;91(1):38-46.

Tsui MTK, Chu LM. Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: Aqueous and sediment porewater exposures. Arch Environ Contam Toxicol. 2004;46(3):316-323.

Wojtaszek BF, Staznik B, Chartrand DT, Stephenson GR, Thompson DG. Effects of Vision herbicide on mortality, avoidance response, and growth of amphibian larvae in two forest wetlands. Environ Toxicol Chem. 2004;23(4):832-842.

Zar JH. Biostatistical Analysis. 3 ed. New Jersey: Prentice-Hall, Inc.; 1996.