



Biotempo (Lima)

latindex
catálogo



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

TOXICITY OF THE BINARY MIXTURE OF METOMYL AND ROTENONE PESTICIDES ON DUCKWEED *LEMNA MINOR* (LINNAEUS, 1758)

TOXICIDAD DE LA MEZCLA BINARIA DE LOS PLAGUICIDAS METOMILO Y ROTENONA EN LA LENTEJA DE AGUA *LEMNA MINOR* (LINNAEUS, 1758)

Eduardo Alejandro Hidalgo-Nicho¹ & José Iannacone^{1,2,*}

¹ Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.

² Escuela Universitaria de Postgrado. Grupo de Investigación Sostenibilidad Ambiental (GISA). Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCCNM), Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA), Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV). Lima, Perú.

*Corresponding author: joseiannacone@gmail.com

ABSTRACT

Macrophyte *Lemna minor* (Linnaeus, 1753) was used to evaluate the phytotoxicity of the individual and mixed action of methomyl and rotenone pesticides under laboratory conditions (Temperature $29 \pm 2^\circ\text{C}$; Relative humidity $48.6 \pm 9.4\%$). The taken measures to establish half effective concentration were the frond area (AF) and production of new fronds (NF). In this study, BMDs^{*} and Probit statistical data analyses were used to compare the results about effective concentration. Results suggest Benchmark dose method of BMDs^{*} program was more effective than Probit program when EC₅₀ (mean Effective Concentration) were determined. Additionally, total chlorophyll concentration (TCC) and humidity weight (HW) parameters were calculated to determine the growth inhibition (*I_r*). Likewise, NOAEL (no observed adverse effect level) and LOAEL (low observer adverse effect level) were compared with BMDL (lower bench mark dose) and BMD (Bench mark dose), respectively. BMD and BMDL values were more accurate than NOAEL and LOAEL values. Phytotoxic action varied according the parameter. EC₅₀ values of *L. minor* showed poor sensibility to methomyl pesticide with an elevated concentration in both parameters (6919.79 mg·L⁻¹ and 7147.42 mg·L⁻¹ for AF and NF, respectively). Results of rotenone pesticide were lower than methomyl, with 1079.22 mg·L⁻¹ (NF) and 782.17 mg·L⁻¹ (AF). Finally, the mix toxicity was 597.90 mg·L⁻¹ (methomyl: NF), 298.93 mg·L⁻¹ (rotenone: NF), 629.51 mg·L⁻¹ (methomyl: AF) and 314.75 mg·L⁻¹ (rotenone: AF). Finally, the concentration-addition model showed that the phytotoxic action of the mixture of both pesticides in *L. minor* has a synergistic effect.

Keywords: Binary toxicity – BMD – BMDL – EC₅₀ – individual toxicity – *Lemna minor* – methomyl – rotenone

RESUMEN

Se evaluó la toxicidad individual y binaria de los plaguicidas metomilo y rotenona en la macrofitas *Lemna minor* (Linnaeus, 1753) para determinar la acción sinérgica o antagónica de una mezcla equitóxica. Los ensayos se realizaron

bajo condiciones de laboratorio (Temperatura: $29 \pm 2^\circ\text{C}$; Humedad relativa: $48,6 \pm 9,4 \%$) y los resultados fueron analizados con los programas estadísticos BMD^S y Probit para calcular la concentración efectiva media (CE_{50}) a través de los parámetros Área de la Fronda (AF) y Nuevas Frondas (NF). Los resultados sugieren una mayor precisión al utilizar el Método del Punto de Referencia del programa BMD^S para el cálculo de la concentración efectiva. Adicionalmente, se calculó la concentración total de clorofila (CTC) y peso húmedo (PH) para determinar la inhibición del crecimiento (*Ir*). Del mismo modo, se realizó una comparación entre los valores NOAEL (nivel de efecto no observado) y LOAEL (nivel bajo de efecto observado) versus los valores de BMDL (límite inferior del punto de referencia) y BMD (nivel de variación en el punto de referencia), respectivamente. El análisis muestra que existe una mayor precisión al emplear los valores BMD y BMDL. La acción fitotóxica varió según el parámetro analizado. La CE_{50} mostró mayores valores en el parámetro NF ($1079,22 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para rotenona; $7147,42 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para metomilo; $597,904 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ mezcla binaria: metomilo y $298,93 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ mezcla binaria: rotenona) que en el parámetro AF ($782,17 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para rotenona; $6919,79 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para metomilo; $629,51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ mezcla binaria: metomilo y $314,75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ mezcla binaria: rotenona). Finalmente, el modelo de concentración-adición mostró que la acción fitotóxica de la mezcla de ambos plaguicidas en *L. minor* tiene un efecto sinérgico.

Palabras clave: BMD – BMDL – CE_{50} – *Lemna minor* – metomilo – rotenona – toxicidad binaria – toxicidad individual

INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas tienen un rol protagónico dentro de la agricultura peruana a pesar de los avances tecnológicos para mejorar la tecnología agrícola (Velazco & Velazco, 2012). Debido a ello, se ha ido regulando la comercialización de diversos plaguicidas para evitar que su empleo cause daños a la salud y el ambiente (Yanggen *et al.*, 2003; Iannacone & Alvariano, 2005; Park *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2020), estableciendo las concentraciones que generan efectos mínimos y letales en diversos organismos a través de ensayos ecotoxicológicos (SENASA, 2014; Tagun & Boxall, 2018). No obstante, poco se ha estudiado sobre el uso de la acción combinada de los plaguicidas, y por ende es fragmentada (Iannacone *et al.*, 2011; Tagun & Boxall, 2018; Kostopoulou *et al.*, 2020).

Dentro de los plaguicidas con mayor uso en el Perú se encuentran el metomilo y la rotenona, ambos utilizados para un amplio rango de plagas agrícolas. La rotenona, al ser de origen vegetal, tiene la ventaja de ser biodegradable y no producir desequilibrio en el ecosistema por lo que provoca un impacto mínimo sobre la fauna benéfica (Iannacone & Lamas, 2003; Wu *et al.*, 2020). En cambio, el metomilo puede tener una vida media persistente si se presentan las condiciones ideales en el suelo, pudiendo llegar hasta los cincuenta días (Iannacone & Alvariano, 2008; Napán *et al.*, 2010; Van Scoy *et al.*, 2013; Iannacone *et al.*, 2014). Si bien se conoce el efecto que produce cada plaguicida de manera individual en diversos organismos, aún no existen estudios que registren el efecto de la acción

combinada de ambos plaguicidas en plagas y organismos no destinatarios (Iannacone *et al.*, 2011).

El uso de plantas en ensayos de toxicidad permiten la investigación, detección y cuantificación del tóxico activo en el medio natural (Radić *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2020), siendo la *Lemna* frecuentemente utilizada para realizar ensayos toxicológicos de muchas sustancias debido a su pequeño tamaño, rápido crecimiento y por su alta sensibilidad a varios contaminantes (Swanson *et al.*, 1991; Park *et al.*, 2017; Kostopoulou *et al.*, 2020), evitando así el uso indiscriminado de los plaguicidas. La lenteja de agua *Lemna minor* (Linnaeus, 1758), es una monocotiledónea acuática que a menudo flota en las superficies de los cuerpos de agua, de rápido crecimiento y se utiliza habitualmente para establecer la calidad de los cuerpos de agua a través del monitoreo de metales pesados o de otros contaminantes acuáticos (Khellaf & Zerdaoui, 2010; Park *et al.*, 2017; Martínez *et al.*, 2019; Dias de Alkimin *et al.*, 2020; Martínez *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020).

La cuantificación de los efectos fitotóxicos generados por la interacción de un determinado plaguicida con *L. minor* permite establecer el porcentaje de inhibición del crecimiento, la concentración efectiva al 10% (CE_{10}), la concentración efectiva media (CE_{50}) (Tagun & Boxall, 2018), el nivel con un menor efecto observado (LOAEL) y la ausencia del efecto observado (NOAEL). No obstante, en el presente estudio se ha incluido al método del punto de referencia (Benchmark dose – BMD) para el cálculo

de la concentración efectiva media y los equivalentes del NOAEL y LOAEL (BMD y BMDL, respectivamente). La ventaja de este método radica en que su valor no depende de las dosis trabajadas, siendo más específicos para el cálculo de aquellas concentraciones que mostrarán un bajo nivel de efecto tóxico.

En el presente trabajo, evaluó la toxicidad de la mezcla binaria de los plaguicidas metomilo y rotenona en *L. minor*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de ejecución: El presente trabajo de investigación se realizó en la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma (URP), Santiago de Surco, Lima, Perú (12°8'1,42"LS y 76°58'49,31"LW).

Plaguicidas empleados para el estudio: Se emplearon dos productos sintéticos formulados metomilo (Lannate® 90: 900gL⁻¹) obtenido de la casa comercial "Agroinversiones Señor de Muruhuay" y rotenona (Rotebiol®: 100,3 mgL⁻¹) obtenido de la casa comercial "Agro Alvino E.I.R.L."

Organismo bioindicador: *Lemna minor* se obtuvo de un acuario del centro de la ciudad de Lima. Para su identificación se utilizó la clave taxonómica propuesta por Daubs (1965). Adicionalmente, dicha clave se complementó con el trabajo de Suman & Venu (2012).

Condiciones físicas del ensayo: Se utilizó una cámara de

cultivo para reducir el grado de contaminación y mantener una temperatura y humedad estable. En la parte superior de la cámara, se ubicaron tres tubos fluorescentes de la marca GE Lighting® USA, cada uno con una luminiscencia de 40 Watts con la finalidad de proveer una iluminación vertical continua, con un fotoperiodo de 24: 0 h. Para determinar la luminosidad en lux, se utilizó el Software LoggerPro® Versión 3.2.1 en Español junto al sensor de luz y la interfase proporcionados por el Laboratorio de Física Intermedia de la Facultad de Ingeniería de la URP. Se realizaron las pruebas con los tres tubos fluorescentes para determinar la distancia, con un tiempo de 10 min por cada ensayo. El promedio de los datos obtenidos (3 datos por seg) a una distancia de 25 cm fue de 3556,50 lux.

Acondicionamiento: Semanas antes al inicio de los ensayos se seleccionaron aquellas colonias de *L. minor* que no presentaron daños visibles en sus frondas, siendo esterilizadas según el protocolo sugerido por OECD (2006). Cada colonia se sumergió en una solución de Hipoclorito de sodio al 0,5% (v:v) por al menos un min. Una vez finalizado el tratamiento, se lavaron las frondas con abundante agua destilada estéril y se repitió el procedimiento. Finalizada la esterilización, las colonias se colocaron en 400 mL de solución hidropónica La Molina®, la cual contiene una solución de macro nutrientes y micro nutrientes (tabla 1). Adicionalmente se añadió 0,5 mL del fertilizante Byfolan Forte® para asegurar que el cultivo posea todos los nutrientes minerales esenciales (tabla 2).

Tabla 1. Concentración en 1L de solución de los minerales en la Solución Hidropónica La Molina .

Minerales	Concentración (%)	Minerales	ppm (mg/L)
Solución A (macronutrientes)			
Nitrato de Potasio	2,2	K	210
Nitrato de Amonio	1,4	N	190
Superfosfato triple	0,72	Ca	150
Solución B (micronutrientes)			
Sulfato de Magnesio	5,5	S	70
Quelato de Hierro 6% Fe	0,425	Mg	45
Solución de micronutrientes			
	10	P	35
Sulfato de Manganeso	0,05	Fe	1
Ácido Bórico	0,003	Mn	0,5
Sulfato de Zinc	0,0017	B	0,5
Sulfato de Cobre	0,001	Zn	0,15
Molibdato de Amonio	0,0002	Cu	0,1
		Mo	0,05

Tabla 2. Concentración en 1L de solución de los minerales en el fertilizante Byfolan Forte[®].

Ingrediente	Concentración (%)
Nitrógeno total	11,470
Fósforo como P ₂ O ₃	8,000
Azufre	6,000
Boro	0,230
Calcio	0,036
Cobre	0,025
Cobalto	0,040
Fierro	0,002
Manganeso	0,050
Molibdeno	0,005
Magnesio	0,025
Zinc	0,080
Ácido indolacético	0,003
Clorhidrato de tiamina	0,004

El medio se repuso al cabo de una semana de cultivo; además, se cubrió la superficie de los vasos con un tapón de algodón para evitar la evaporación y facilitar el intercambio gaseoso. Siguiendo el protocolo de la OECD

(2006), las plantas se mantuvieron durante un mínimo de ocho semanas con la solución hidropónica y el agua de mesa Cielo[®] (tabla 3) para asegurar la depuración de todos los posibles residuos del lugar de origen.

Tabla 3. Análisis de los parámetros fisicoquímicos del agua de mesa embotellada con una sonda multiparámetro (Hanna HI9828).

Parámetro	Unidad	Medición
Oxígeno disuelto	DO mg·L ⁻¹	4,05
Porcentaje de saturación DO	DO%	46,9
pH	-	6,97
Salinidad	ppm	0,3

Ensayos: Un día antes de iniciar cada ensayo se seleccionaron 118 colonias sin lesiones visibles o cambios de color. Estas se depositaron en una vaso de precipitado con 300 mL de agua destilada estéril (pH = 6,6) sin solución hidropónica. Se realizaron un total de cuatro ensayos de toxicidad aguda individual (dos de metomilo y dos de rotenona) con modificaciones del protocolo de la OECD (2006). Dichos ensayos variaron en el tipo de agua utilizada; los dos primeros ensayos de metomilo y rotenona se realizaron con agua destilada y los otros dos con el agua de mesa Cielo[®].

Para cada ensayo se realizaron seis repeticiones por tratamiento, siendo el número inicial de colonias de 3 ejemplares (3 a 4 frondas por ejemplar). Asimismo, las unida-

des del ensayo se colocaron en un beaker BOECO[®] de 50 mL por un periodo de 168 h, con lecturas a los cuatro (96 h) y siete días (168 h). Luego de cumplido el tiempo de exposición, las muestras fueron procesadas para su posterior análisis. Se empleó el tratamiento control (sin el tóxico) para comparar los resultados. Debido a la naturaleza de los insecticidas a emplear, el tipo de ensayo fue con reposición del medio de cultivo a cuatro días de iniciado el ensayo. Las colonias se expusieron a diferentes concentraciones de los tóxicos escogidos durante siete días sin aireación y con iluminación vertical continua (24 h; luz artificial).

Toxicidad aguda individual: La actividad tóxica del metomilo y la rotenona, se analizaron empleando cinco

concentraciones más un control negativo por cada tóxico. Los productos fueron dosificados de acuerdo a las recomendaciones comerciales. Para el caso del metomilo, se preparó un stock de concentración distinto por cada ensayo realizado. La concentración máxima del primer ensayo con metomilo fue de 2000 mg·L⁻¹, realizando las siguientes diluciones: 400 mg·L⁻¹, 80 mg·L⁻¹, 16 mg·L⁻¹ y 2 mg·L⁻¹. El factor de dilución fue de 0,2. En el segundo ensayo con metomilo se utilizó las concentraciones empleadas por Iannacone & Alvariño (2008), preparando una solución stock de 2000 mg·L⁻¹ en 500 mL realizando las siguientes diluciones: 4000 mg·L⁻¹, 2000 mg·L⁻¹, 1000 mg·L⁻¹; 500 mg·L⁻¹ y 250 mg·L⁻¹. El factor de dilución empleado fue de 0,5.

Para el caso de la rotenona, en ambos ensayos se efectuaron las siguientes diluciones: 2000 mg·L⁻¹, 1000 mg·L⁻¹, 500 mg·L⁻¹, 250 mg·L⁻¹ y 125 mg·L⁻¹. Por cada ensayo, se realizaron lecturas a las 96 h y 168 h. El factor de dilución utilizado fue de 0,5. El presente estudio sólo consideró el análisis de los resultados de un ensayo por cada plaguicida. En el caso del metomilo se analizó el ensayo realizado con agua Cielo® y en el caso de la rotenona el ensayo realizado con agua destilada.

Toxicidad aguda binaria: Se preparó una solución madre con 4000 mg·L⁻¹ de metomilo y 2000 mg·L⁻¹ de rotenona en agua de mesa Cielo®, considerándola como la proporción de 1:1. La evaluación de la mezcla equitóxica se realizó en cuatro diluciones seriadas al 50%, 25%, 12,5% y 6,25% más un control negativo. Asimismo, se establecieron lecturas a las 96 h y 168 h. Las concentraciones utilizadas en el ensayo de toxicidad fueron las señaladas en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones empleadas para el ensayo de la mezcla binaria equitóxica (mg·L⁻¹) en *Lemna minor*.

Concentración	Metomilo	Rotenona
Control	0	0
R ₁	250	125
R ₂	500	250
R ₃	1000	500
R ₄	2000	1000
R ₅	4000	2000

Análisis de los datos

Número de frondas (NF): Se utilizó el registro fotográfico para el conteo de las frondas durante el inicio del ensayo, así como la lectura durante el ensayo (96 h) y

la lectura final del ensayo (168 h). El mismo método se utilizó para la determinación de la clorosis (frondas se tornan amarillas) y la necrosis (presencia de tejido muerto en la fronda y borde irregular), supeditando la presencia de estos signos de fitotoxicidad cuando al menos la mitad de la fronda presentaba dichas características. Asimismo, se utilizó el protocolo de la OECD (2006) para la determinación de la tasa de producción de nuevas frondas (μ) y la inhibición del crecimiento (*Ir*).

Fórmula para la determinación de μ :

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t_j - t_i} \quad (1)$$

Donde:

- μ_{i-j} : Promedio de crecimiento específico de un momento *i* a un momento *j*.
- N_i : Número de frondas observadas en el ensayo o prueba control en el tiempo *i*.
- N_j : Número de frondas observadas en el ensayo o prueba control en el tiempo *j*.
- t_i : Momento en el que inicia el ensayo.
- t_j : Momento en el que finaliza el ensayo.

Fórmula para la determinación de *Ir*:

$$\%Ir = \frac{\mu_c - \mu_r}{\mu_c} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

- % *Ir*: Porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento promedio.
- μ_c : Valor promedio de μ en el control.
- μ_r : Valor promedio de μ en el grupo de tratamiento.

Área de la fronda (AF): El registro fotográfico se realizó en las lecturas de todos los ensayos utilizando una cámara compacta Canon® SX700HS. El área total de cada ensayo (Tagun & Boxall, 2018), así como el área de la necrosis y la clorosis, se determinó con el software de distribución gratuita ImageJ® (fig. 1), desarrollado por el Research Services Branch, del National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA. También se utilizaron las fórmulas (1) y (2). Las colonias se recolectaron inmediatamente después de la segunda lectura y se formaron dos grupos por cada concentración (tres unidades de ensayo en cada grupo). Con el primer grupo se determinó el peso seco y con el segundo grupo se calculó el contenido total de clorofila. Cada unidad de ensayo fue centrifugada de manera individual a 3000

rpm x 10 min en tubos eppendorf de 5 mL (Centrífuga Heraeus Labofuge 200[®]), a los cuales se les hizo un agujero en la parte inferior para descartar el exceso de agua. Luego, se utilizó una balanza analítica (Alexander MΦBBA[®])

para calcular el peso fresco de cada concentración. Cabe señalar que en los ensayos de toxicidad individual donde se utilizó agua destilada, este procedimiento se realizó por cada grupo y no por cada unidad de ensayo.

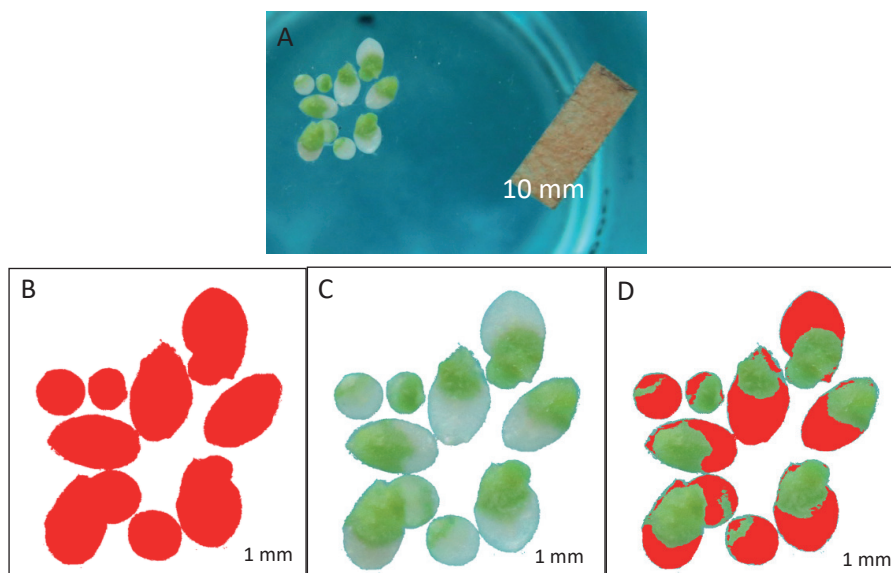


Figura 1. Detección de área total y necrosis en *Lemna minor*. Ensayo metomilo (agua Cielo[®]); lectura 96 h; 4000 mg·L⁻¹ [2]. A: Imagen original con una tira de papel de 10 mm; B: frondas aisladas; C: cálculo del área total y D: cálculo de la necrosis.

Peso húmedo (PH): Se colocaron todas las muestras del primer grupo en una estufa (Thermo Electron Corporation[®]) durante 24 h a 43°C para posteriormente determinar el peso seco.

Contenido Total de Clorofila (CTC): La prueba del contenido total de clorofila se realizó una vez determinado el peso fresco del segundo grupo. Para esta prueba, las muestras fueron sumergidas en metanol en tubos herméticos de 2 mL; posteriormente, fueron cubiertas con papel platino y guardadas durante 96 h en un ambiente frío. Finalizado el tiempo de extracción de la clorofila, se midió la absorbancia a 635 nm y 660 nm (con un espectrofotómetro Merck SQ118[®]). Para calcular el contenido total de clorofila a (Cchl a) y clorofila b (Cchl b), se modificó la absorbancia en la fórmula mencionada por Valenzuela (2013):

$$\begin{aligned} \text{Cchl a} &= 12,63 \times A_{664,5} - 2,52 \times A_{647} \\ \text{Cchl b} &= 20,47 \times A_{647} - 4,73 \times A_{664,5} \\ \text{Cchl total} &= 17,95 \times A_{647} + 7,90 \times A_{664,5} \end{aligned}$$

Determinación de BMDL y BMD: En el presente estudio se optó por utilizar el método Benchmark dose (punto de referencia), empleando el paquete estadístico BMDS[®] versión 2,6 elaborado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 2015). Este

método, reemplaza los valores de NOAEL (nivel de efecto no observado) y LOAEL (nivel con bajos efectos adversos) por el BMDL (nivel inferior al punto de referencia) y el BMD (punto de referencia), respectivamente. Cabe señalar que los valores de NOAEL y LOAEL son ampliamente utilizados en la toxicología. No obstante, el modelo BMD supera las limitaciones que implican el uso del NOAEL, tales como la dependencia estricta en la selección de concentraciones y el tamaño de la muestra de estudio a partir del cual se identifica el efecto crítico.

Para la determinación del BMDL y el BMD de las pruebas evaluadas, se utilizó el modelo dicotómico, el cual es utilizado para describir dos niveles de respuesta, usualmente categorizados como presencia o ausencia (ej. frondas vivas y frondas muertas). Para el análisis de los datos, se utilizó la necrosis como valor de respuesta frente a los parámetros de NF y AF. En el caso de NF se consideró como fronda necrótica a aquella hoja que presentaba más de la mitad del tejido muerto mientras que en el parámetro de AF se consideró como necrosis a toda el área de la fronda que presentó tejido muerto. En algunos casos, el análisis computarizado de las imágenes no permitió la detección del área necrótica, optándose por la selección manual del área.

El modelo dicotómico presenta nueve variaciones del

mismo, las cuales ayudan a representar el amplio rango de la curva de la dosis-respuesta de un determinado tóxico. Se emplearon ocho de estas variaciones, escogiendo aquella que presentó un valor de p más significativo. Además, se optó por analizar la suma de las respuestas de todos los ensayos por cada concentración, considerando como respuesta a la cantidad de frondas necróticas (parámetro NF) y el área total necrosada (parámetro AF).

Determinación de la Concentración Efectiva Media (CE_{50}): Para la determinación de la CE_{50} individual de cada tóxico y de la mezcla binaria, se empleó el programa computarizado Probit versión 1,5 (Thron *et al.*, 1995). Luego, el resultado fue contrastado con el método del BMD a través del programa estadístico BMD5[®] para establecer su efectividad en el cálculo de la concentración efectiva al 10% y 50% (CE_{10} y CE_{50} , respectivamente). Para hallar la CE_{50} con el modelo BMD, se modificó el valor de respuesta al 50%. Por defecto, este valor es equivalente al 10% del efecto observado (CE_{10}).

Determinación del efecto sinérgico o antagónico: Se determinó el valor de Concentración-Adición (CA) para el ensayo de toxicidad binaria (Martínez *et al.*, 2019). En la Concentración-Adición se asume que, cuando dos tóxicos actúan de modo similar siendo mezclados en cualquier proporción, ellos se sumarán para dar la respuesta observada (Gaete & Chávez, 2008). El valor de CE_{50} estimada se obtiene sumando los valores de CE_{50} de los tóxicos obtenidos experimentalmente de forma individual según su contribución en la mezcla de acuerdo a las proporciones probadas. Luego, estos valores de CE_{50} estimadas son divididos por los valores obtenidos experimentalmente de la mezcla binaria, para así determinar la clase de acción conjunta de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$CA = CE_{50} \text{ estimada} / CE_{50} \text{ experimental de la mezcla}$$

Donde CA = 1 indica que el efecto es aditivo, CA > 1 que hay sinergia y que CA < 1 que hay antagonismo.

Validación de los ensayos: Como primer criterio para la validación de los ensayos de toxicidad individual se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 22 para Windows 7. De este modo, se calculó la homogeneidad de los parámetros evaluados mediante el factor ANOVA y a un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. Los parámetros evaluados para este análisis estadístico fueron la producción de NF, la totalidad de frondas necróticas y cloróticas, el AF y el área necrótica y clorótica. Asimismo, se utilizó el parámetro de CTC como un factor determinante para la elección de los ensayos analizados de toxicidad individual.

RESULTADOS

Determinación taxonómica de *Lemna minor*

Las colonias utilizadas para el presente estudio presentan frondas planas, elípticas, ligeramente asimétricas, con el ápice redondeado, un nervio central y cámaras de aerénquima pequeñas y no prominentes. El color verde del envés es más claro que en el haz. Asimismo, se evidencia una sola raíz (talo) por fronda madre, sin escamillas dorsales o ventrales y con una vaina alada (caliptra) en la base de la misma. Las medidas de las frondas se ubican dentro del rango establecido para esta especie (1,5 – 5 x 1 – 3,32 mm), lo mismo que con el talo (hasta 6,2 mm) y la caliptra (0,5 – 3,1 mm). (Fig.2)

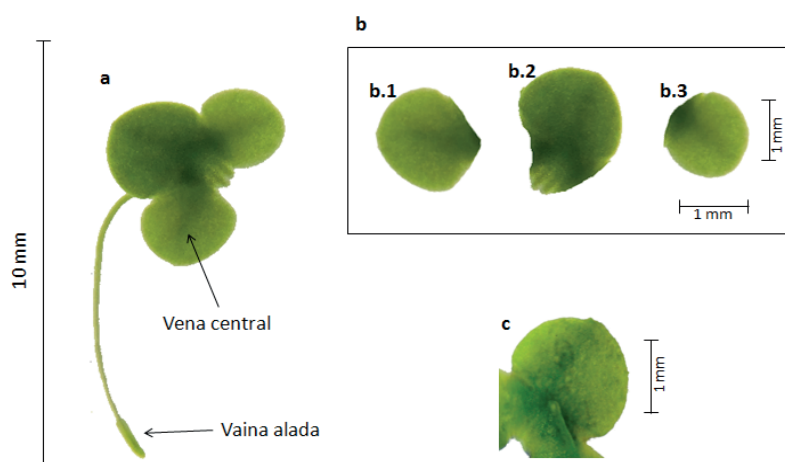


Figura 2. *Lemna minor* L. A. Vista del haz. Medida de la raíz: 6,13 mm; caliptra: 0,994 mm B. Medida transversal: b.1) 1,79 mm; b.2) 2,86 mm y b.3) 1,40 mm. Medida longitudinal: b.1) 2,06 mm; b.2) 2,33 mm y b.3) 1,87 mm. C. Vista del envés. Cámaras de aerénquima no prominentes.

Validación de los ensayos

Con el análisis mediante ANOVA se obtuvo un nivel de

significancia menor a 0,05 para las pruebas de homogeneidad de varianzas en todos los parámetros evaluados en los ensayos donde se utilizó agua Cielo® (tabla 5).

Tabla 5. Nivel de significancia en la prueba de homogeneidad de las varianzas en *Lemna minor*.

Parámetros evaluados	Metomilo		Rotenona	
	AD	AC	AD	AC
número de frondas (NF)	0,02	0,00	0,00	0,00
frondas con necrosis	0,00	0,00	0,40	0,00
frondas con clorosis	0,05	0,00	0,00	0,00
área total (AF)	0,41	0,00	0,03	0,01
área con necrosis	0,00	0,00	0,15	0,00
área con clorosis	0,00	0,00	0,00	0,00

AD: Agua destilada; AC: Agua Cielo®

No obstante, para el caso de la rotenona se decidió emplear la data generada en el ensayo AD puesto que, cuando se empleó la data obtenida con el ensayo AC, no

se pudo realizar el análisis respectivo debido a la ausencia de una relación entre el tóxico y los parámetros evaluados (tabla 6).

Tabla 6. Número de frondas y área total (mm²) en *Lemna minor* sometida a dos ensayos de toxicidad individual según el tipo de agua empleada (día 7: lectura 168 h).

	Metomilo				Rotenona			
	AD		AC		AD		AC	
	NF	AF	NF	AF	NF	AF	NF	AF
control	210	387,15	285	702,63	165	275,49	307	681,90
A	199	384,54	229	524,39	114	200,57	139	262,96
B	162	304,18	203	419,82	123	197,17	127	255,26
C	175	322,22	149	287,25	100	160,08	128	244,56
D	146	235,05	139	254,30	59	117,47	123	233,90
E	83	158,32	72	162,70	56	111,27	128	242,24

AD: agua destilada y AC: Agua Cielo®; NF: número de frondas y AF: área de la fronda. A a E: Concentraciones según plaguicida empleado.

Por otro lado, también se consideró el porcentaje de inhibición del parámetro de clorofila (CTC) para determinar la validez del ensayo. Dicho parámetro fue

uno de los factores determinantes para la elección de los dos ensayos de toxicidad individual analizados (tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento (%Ir) en *Lemna minor* según el parámetro contenido total de clorofila (CTC) en cuatro ensayos.

	Metomilo		Rotenona	
	AD	AC	AD	AC
control	-	-	-	0
A	44,74	17,49	16,02	54,30
B	30,83	42,76	30,63	52,15
C	61,47	60,88	44,96	55,69
D	66,19	63,54	90,30	50,28
E	39,55	96,84	*	41,37

AD: agua destilada y AC: Agua Cielo®. * No se midió este valor. A a E: Concentraciones según plaguicida empleado.

Puede observarse que en el caso del ensayo de rotenona AC, los valores son discordantes y no guardan relación con el incremento de las sustancias tóxicas. Caso contrario sucede en el ensayo de rotenona AD, donde fue posible determinar todos los parámetros analizados.

Toxicidad aguda individual del metomilo

Al evaluar el efecto por exposición a las cinco concentraciones, las cuales se ubicaron en un rango de 250 a 4000 mg·L⁻¹ del ingrediente activo, se encontró una disminución de nuevas frondas (NF) y el área total de las frondas (AF) a medida que aumentó la concentración del metomilo (tabla 8).

Tabla 8. Producción de nuevas frondas y área total (mm²) en *Lemna minor* expuesta al metomilo al cuarto y séptimo día de lectura.

Concentración mg·L ⁻¹	Día 4		Día 7	
	Frondas	Área	Frondas	Área
0	177	416,99	285	702,632
250	151	365,28	229	524,388
500	140	308,46	203	419,816
1000	120	206,95	149	287,251
2000	92	205,15	139	254,302
4000	71	169,73	72	162,696

Asimismo, en la segunda lectura (día 7: 168 h) se observó una mayor toxicidad del metomilo en la concentración

más alta (fig. 3), siendo mayor la necrosis respecto a las otras concentraciones (tabla 9).

Tabla 9. Necrosis total en la fronda y el área (mm²) en *Lemna minor* expuesta al metomilo al cuarto y séptimo día de lectura.

Concentración mg·L ⁻¹	Día 4		Día 7	
	Frondas	Área	Frondas	Área
0	0	0	1	1,07
250	0	0,05	5	10
500	0	0,16	1	3,08
1000	0	2,55	2	5,92
2000	3	7,72	11	27,00
4000	24	47,39	54	111,60

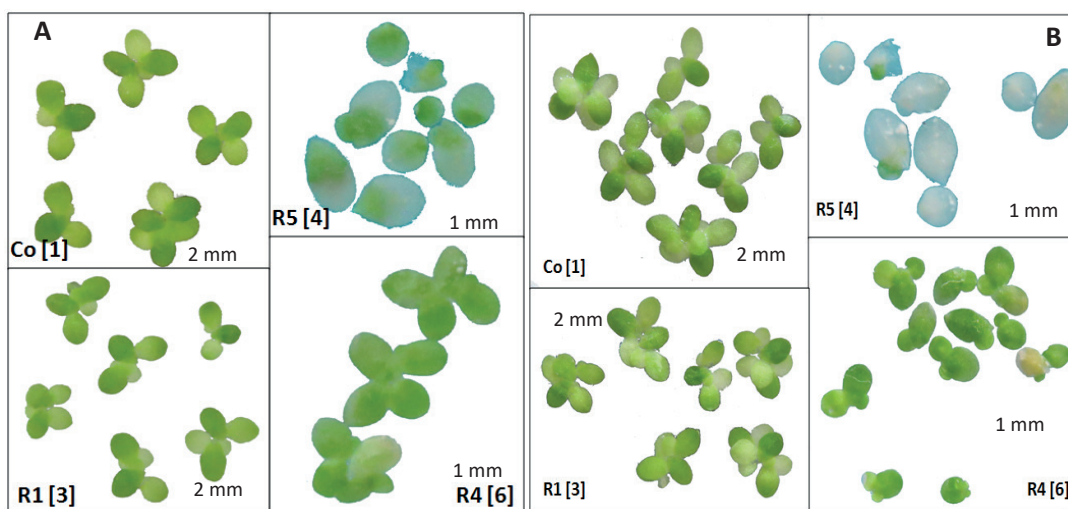


Figura 3. Número de frondas en *Lemna minor* durante las dos lecturas realizadas (metomilo).
 Co: Control; R1: 250 mg·L⁻¹; R4: 2000 mg·L⁻¹ y R5: 4000 mg·L⁻¹. A: Lectura a las 96h;
 B: Lectura a las 168h. Las imágenes no han sido capturadas a una misma distancia.

Por otro lado, la clorosis varió según el día de lectura (tabla 10), siendo la concentración de 2000 mg·L⁻¹ la que obtuvo el valor más alto al término del séptimo día.

La concentración de 4000 mg·L⁻¹ no presentó este efecto fitotóxico.

Tabla 10. Clorosis total en la fronda y el área (mm²) en *Lemna minor* expuesta al metomilo según el día de lectura.

Concentración mg·L ⁻¹	Día 4		Día 7	
	Frondas	Área	Frondas	Área
0	0	0	0	0
250	0	0	0	0
500	0	0	2	3,64
1000	0	0	5	3,56
2000	2	1	3	4,81
4000	0	0	1	0

Tasa de crecimiento e inhibición del crecimiento

El grupo control presentó una tasa de crecimiento (μ) superior a las concentraciones empleadas en el presente estudio, tanto en el parámetro NF (0,22) como en el parámetro AF (0,24), siendo el margen de variación entre ambos parámetros de 0,02. En la tabla 11 se observa que hubo una reducción gradual de la tasa de

crecimiento a medida que se aumentó la concentración del metomilo en el medio, llegando a valores cercanos a cero para la concentración más alta. Ello se corrobora con el cálculo de la inhibición de crecimiento (*I_r*), el cual es significativamente alto en la concentración de 4000 mg·L⁻¹ cuando se consideran los parámetros NF y CTC, reduciéndose levemente con los parámetros AF y PH.

Tabla 11. Determinación de la tasa de crecimiento e Inhibición del crecimiento de los parámetros evaluados en *Lemna minor* expuesta al metomilo.

C	μ NF	% Ir NF	μ AF	% Ir AF	% Ir PH	% Ir CTC
0	0,22	-	0,24	-	-	-
250	0,18	15,10	0,19	11,84	14,31	6,47
500	0,17	20,69	0,15	29,33	38,62	34,77
1000	0,14	37,19	0,15	31,37	57,12	57,77
2000	0,11	48,18	0,10	51,85	60,62	65,62
4000	0,02	90,40	0,03	86,48	80,38	98,16

C: Concentración en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; μ : tasa de crecimiento; Ir: Inhibición de la respuesta; NF: Nuevas frondas; AF: Área de la fronda; PH: Peso húmedo y CTC: Contenido total de clorofila.

Determinación de los valores del Método Punto de Referencia

Se utilizó el modelo dicotómico mencionado en la metodología, considerando las concentraciones de 0, 250,

500, 1000, 2000 y 4000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y la lectura a las 168 h. Al utilizar el parámetro NF como respuesta se observó que sólo el modelo Quantal-Linear fue adecuado para el análisis de los datos (tabla 12), siendo los valores de BMD y de BMDL fueron de 1255,28 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y 328,939 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Tabla 12. Valores BMD (punto de referencia) y BMDL (nivel inferior al punto de referencia) ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) utilizando el parámetro NF (número de frondas) como respuesta para los modelos dicotómicos en *Lemna minor* (metomilo; lectura 168 h).

Modelo	valor de p	χ^2	BMD	BMDL
Gamma	0,99	0,15	1354	1186,86
Logistic	0,72	2,08	1541,92	1404,22
Log-Logistic	0,99	0,28	1382,54	1204,22
Log-Probit	0,99	0,06	1322,72	1154,57
Multistage	0,17	7,65	1193,83	1026,59
Probit	0,91	0,95	1453,24	1311,79
Weibull	0,98	0,34	1407,26	1227,85
Quantal-Linear	0	30,85	1255,28	328,939

Cuando se analizó el parámetro AF como respuesta, los modelos Multistage, Probit, y Quantal-Linear obtuvieron los mejores resultados para el cálculo de los valores de BMD y BMDL (tabla 13). Al igual que en el parámetro anterior, se tomó en cuenta aquel modelo que tuviese un valor de p lo más

cercano a cero. No obstante, dos de los modelos presentaron dicha característica por lo que se optó por el Quantal-Linear puesto que tuvo un valor de χ^2 superior al modelo Multistage. Para el modelo elegido los valores de BMD y BMDL se situaron en 525,91 y 431,08 en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Tabla 13 Valores BMD (punto de referencia) y BMDL (nivel inferior al punto de referencia) ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) utilizando el parámetro AF (área de la fronda) como respuesta en los modelos dicotómicos en *Lemna minor* (metomilo; lectura 168 h).

Modelo	valor de p	χ^2	BMD	BMDL
Gamma	0,03	8,81	1005,61	928,35
Logistic	0,02	11,04	1038,38	977,13
Log-Logistic	0,02	9,28	1009,9	931,61
Log-Probit	0,03	8,48	1001,54	927,63
Multistage	0	43,95	730,74	681,70
Probit	0,00	17,04	939,67	883,44
Weibull	0,01	10,11	1022,93	934,96
Quantal-Linear	0	145,96	525,91	431,08

En el siguiente gráfico se incluye el rango de posibles valores de NOAEL con fines comparativos (fig.4).

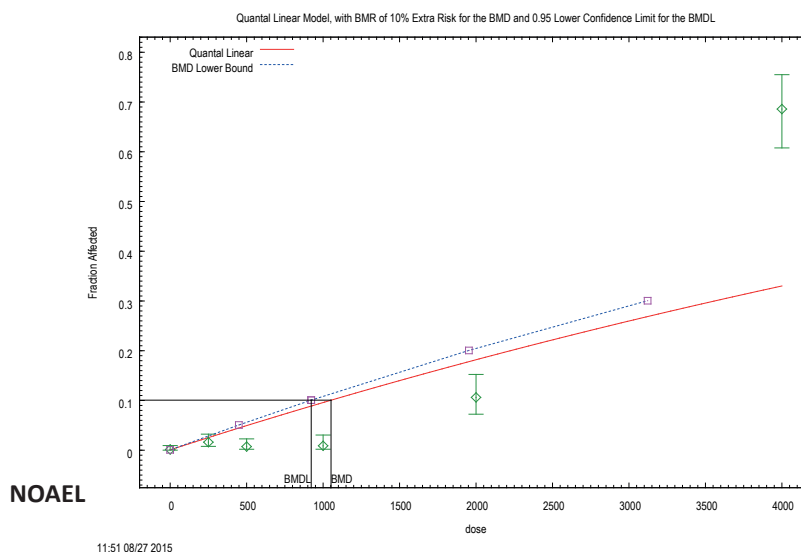


Figura 4. Curva de dosis-respuesta del modelo continuo Quantal-Linear utilizando el parámetro AF (área de la fronda) como valor de respuesta por efecto del metomilo para la determinación del BMD (punto de referencia) y BMDL (nivel inferior al punto de referencia) en *Lemna minor*.

Determinación de la CE_{50} mediante el análisis Probit

Por otro lado, no se consideró a la clorosis como fitotoxicidad debido a que su presencia fue poco significativa, encontrándose en las concentraciones de 500 71,56 mg·L⁻¹, 1000 mg·L⁻¹ y 2000 mg·L⁻¹. La cantidad de clorosis

hallada mediante el programa ImageJ no permitió su posterior análisis. La concentración efectiva media fue mayor cuando se utilizó el parámetro de frondas (NF), con 3383,54 mg·L⁻¹ aunque no hubo una variación significativa con respecto a la CE_{50} del área (AF), el cual fue de 3313,51 mg·L⁻¹ (tabla 14).

Tabla 14. Concentración Efectiva Media (CE_{50}) de dos parámetros utilizando la necrosis como respuesta fitotóxica del metomilo en *Lemna minor*. χ^2 área: 0,17; χ^2 fronda: 0,10.

Parámetro	EC_{10}		EC_{50}	
	área	fronda	área	fronda
Estimación mg·L ⁻¹	1992,01	2193,63	3313,51	3383,54
Inferior 95%	1457,67	1299,07	2872,47	2762,25
Superior 95%	2350,43	2697,61	4037,31	4627,03

Al comparar el valor intermedio que existe entre los límites inferior y superior de las concentraciones halladas, se encuentra que cuando se utiliza el área se reduce la variación entre ambos límites.

Toxicidad aguda individual de la rotenona

Al evaluar el efecto por exposición a las cinco

concentraciones entre los 250 y 2000 mg·L⁻¹ del ingrediente activo durante el ensayo final, se observó una mortalidad total en las dos concentraciones más altas (1000 mg·L⁻¹ y 2000 mg·L⁻¹) a partir del cuarto día (lectura 96h), lo cual que sugiere una alta toxicidad del plaguicida (tabla 15).

Tabla 15. Producción de nuevas frondas y área total (mm²) en *Lemna minor* expuesta a la rotenona según el día de lectura.

Concentración mg·L ⁻¹	día 4		día 7	
	frondas	área	frondas	área
0	100	178,95	165	275,48
125	78	144,10	114	200,56
250	89	131,48	123	197,17
500	76	121,52	100	160,07
1000	59	117,47	59	117,47
2000	56	111,27	56	111,27

Por otro lado, la clorosis no guardó una relación de dependencia con las concentraciones utilizadas. En la

siguiente tabla se muestran los resultados de la clorosis obtenida (tabla 16).

Tabla 16. Clorosis total en la fronda y el área (mm²) en *Lemna minor* expuesta a la rotenona según el día de lectura.

Concentración	día 4		día 7	
	frondas	área	frondas	área
0	6	7,63	24	24,89
125	5	8,09	9	18,58
250	6	12,42	10	21,85
500	4	2,70	6	3,31
1000	4	5,07	2	2,59
2000	0	0	0	0

Caso contrario sucedió con la necrosis, cuyos valores guardaron relación con el nivel de concentración utilizado (tabla 17). En el caso de la concentración más alta (2000

mg·L⁻¹), el área total corresponde a la cantidad de tejido necrótico. En la concentración de 1000 mg·L⁻¹ la necrosis fue predominante aunque hubo presencia de tejido vivo.

Tabla 17. Necrosis total en la fronda y el área (mm²) en *Lemna minor* expuesta a la rotenona según el día de lectura.

Concentración	día 4		día 7	
	frondas	área	frondas	área
0	2	1	7	11,30
125	0	0,7	3	9,68
250	3	3,85	6	17,26
500	4	9,89	6	12,16
1000	43	73,49	43	105,73
2000	55	109,42	56	111,27

En la siguiente figura 5 se observa el comportamiento de las colonias sometidas a las diferentes concentraciones en

dos intervalos de tiempo.

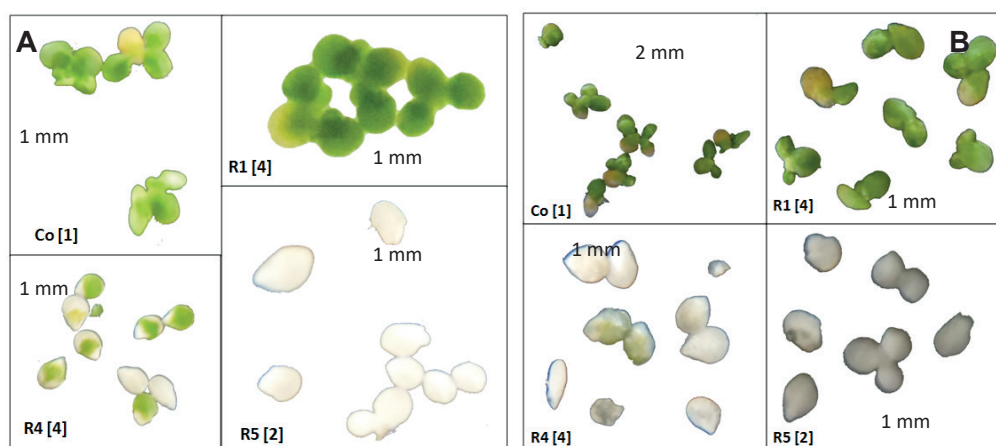


Figura 5. Número de frondas en *Lemna minor* expuesta a la rotenona durante las dos lecturas realizadas. Co: Control; R₁: 125 mg·L⁻¹; R₄: 1000 mg·L⁻¹ y R₅: 2000 mg·L⁻¹. A: Lectura a las 96h; B: Lectura a las 168h. Las imágenes no han sido capturadas a una misma distancia.

Además, en la figura mostrada se observa la presencia de clorosis en el control desde la segunda lectura, lo cual puede deberse al uso de agua destilada pura como medio para el ensayo. Asimismo, puede observarse que la mortalidad en la concentración de 1000 mg·L⁻¹ fue progresiva hasta alcanzar la necrosis total.

Tasa de crecimiento e inhibición del crecimiento

En cuanto la tasa de crecimiento (μ) del control, se encontraron diferencias entre el parámetro NF (0,16)

y el parámetro AF (0,12), siendo el primer parámetro el que mostró mayor variación entre el dato control y la concentración más alta (tabla 18). Este resultado fue similar en la inhibición del crecimiento, donde la medición a través de la fronda mostró mayor sensibilidad en la concentración más alta, con un 96,74% de inhibición de nuevas frondas frente al 84,61% de inhibición del área. El caso del peso húmedo (PH) fue menos sensible, mostrando un 77,53% de inhibición en la concentración más alta.

Tabla 18. Determinación de la tasa de crecimiento e Inhibición del crecimiento de los parámetros evaluados en *Lemna minor* expuesta a la rotenona.

C	μ NF	% Ir NF	μ AF	% Ir AF	% Ir PH	% Ir CTC
0	0,16	-	0,12	-	-	-
125	0,10	33,10	0,07	45,18	34,45	16,01
250	0,11	26,30	0,08	36,92	33,33	30,63
500	0,08	46,48	0,05	59,88	45,31	44,95
1000	0,01	92,07	0,01	85,89	66,29	90,30
2000	0,00	96,74	0,02	84,61	77,52	*

C: Concentración en mg·L⁻¹; μ : tasa de crecimiento; Ir: Inhibición de la respuesta; NF: Nuevas frondas; AF: Área de la fronda; PH: Peso húmedo y CTC: Contenido total de clorofila. *No se efectuó la medición de este dato.

Determinación de los valores del Método Punto de Referencia

Al evaluar el parámetro NF como respuesta se encontró que, con excepción de los modelos Log-Logistic, Log-

Probit y Weibull, todos los demás fueron favorables para el cálculo del BMD y el BMDL con los datos utilizados (tabla 19), siendo el modelo Quantal-Linear el escogido para la determinación de estos valores, los cuales fueron de 164,04 mg·L⁻¹ para BMD y 139,38 mg·L⁻¹ para el BMDL.

Tabla 19. Valores BMD (punto de referencia) y BMDL (nivel inferior al punto de referencia) ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) utilizando el parámetro NF (número de frondas) como respuesta en los modelos dicotómicos (rotenona; lectura 168 h).

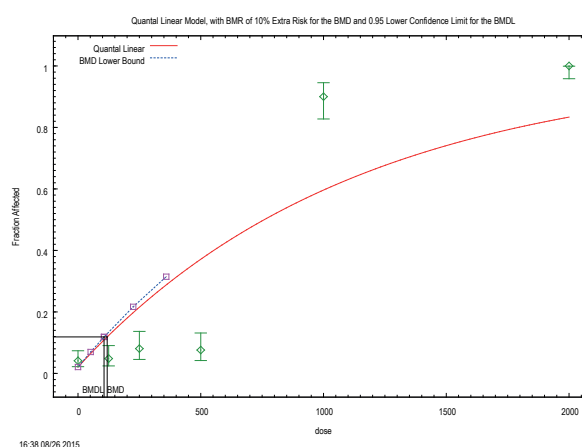
Modelo	valor de p	χ^2	BMD	BMDL
Gamma	0	83,41	164,04	139,38
Logistic	0,00	16,01	439,30	391,45
Log-Logistic	0,84	0,99	650,91	545,82
Log-Probit	0,83	0,87	614,09	534,89
Multistage	0,00	24,67	349,13	316,22
Probit	0,00	22,37	394,43	350,80
Weibull	0,84	0,81	653,39	538,06
Quantal-Linear	0	83,41	164,04	139,38

Del mismo modo, el análisis del parámetro AF mostró valores de p adecuados en los modelos Logistic, Multistage, Probit y Quantal-Linear (tabla 20). Debido a que todos los modelos mencionados arrojaron valores de p semejantes se optó por escoger el modelo Quantal-Linear, que obtuvo el valor más alto en el χ^2 . Los valores

obtenidos para BMD de $118,893 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y para BMDL de $106,137 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Por otro lado, se representan los valores de BMD y BMDL (figura 6) de manera gráfica. Se ha utilizado el modelo Quantal-Linear del parámetro AF, incluyendo además el valor de NOAEL con fines comparativos.

Tabla 20. Valores BMD (punto de referencia) y BMDL (nivel inferior al punto de referencia) utilizando el parámetro AF (área de la fronda) como respuesta en los modelos dicotómicos en *Lemna minor* (rotenona; lectura 168 h).

Modelo	valor de p	χ^2	BMD	BMDL
Gamma	0,34	4,47	554,76	521,80
Logistic	0	36,04	365,08	333,29
Log-Logistic	0,34	3,34	599,36	532,26
Log-Probit	0,34	3,32	580,78	527,63
Multistage	0	57,09	289,69	269,09
Probit	0	47,1	321,92	293,89
Weibull	0,35	3,28	622,91	537,34
Quantal-Linear	0	160,48	118,89	106,13

**Figura 6.** Curva de dosis-respuesta del modelo continuo Log-Logistic utilizando el parámetro AF (área de la fronda) y el área con necrosis como valores de respuesta por efecto de la rotenona para la determinación del BMD (punto de referencia) y BMDL (nivel inferior al punto de referencia) en *Lemna minor*.

Determinación de la CE₅₀ mediante el análisis Probit

Al estimar la concentración efectiva media para ambos parámetros (tabla 21) se observa una gran diferencia

entre la EC₅₀ del área (769,03 mg·L⁻¹) y la fronda (858,63 mg·L⁻¹). Ello puede deberse al valor de x² establecido para cada parámetro, siendo más alto en el área.

Tabla 21. Concentración Efectiva Media (EC₅₀) de dos parámetros utilizando la necrosis como respuesta fitotóxica de la rotenona en *Lemna minor*. Chi² del área: 3,757; Chi² de la fronda: 0.839.

Parámetro	EC ₁₀		EC ₅₀	
	área	fronda	área	fronda
Estimación mg·L ⁻¹	587,32	614,11	769,03	858,63
Inferior 95%	471,90	448,78	685,96	756,87
Superior 95%	664,00	710,38	827,78	937,07

Toxicidad binaria de la Rotenona y el Metomilo

Al evaluar los parámetros de NF y AF se encontró que todas las concentraciones presentaron efectos similares al término del ensayo (tabla 22), donde la concentración

más baja (B) tuvo una diferencia de 10 frondas con respecto a la concentración más alta (F) en el séptimo día. No obstante, el parámetro AF permitió observar una mayor variabilidad en ambas lecturas.

Tabla 22. Producción de nuevas frondas y área total (mm²) en *Lemna minor* expuesta a la mezcla de metomilo y rotenona según el día de lectura. Den.: Denominación de la concentración; Met.: metomilo; Rot.: rotenona.

Concentración en mg·L ⁻¹			día 4		día 7	
Den.	Met.	Rot.	frondas	área	frondas	área
A	0	0	65	172,96	103	267,32
B	250	125	55	183,97	65	201,01
C	500	250	57	178,06	60	188,21
D	1000	500	54	165,50	57	179,12
E	2000	1000	55	164,65	55	164,65
F	4000	2000	55	170,87	55	170,87

La incidencia de la clorosis fue poco pronunciada y estuvo ausente en las dos concentraciones más altas (tabla 23). Además, se evidencia la reducción de la clorosis total en la

concentración C, lo que puede deberse a un aumento de la necrosis en dicha concentración. La misma situación se da con el control (figura 7).

Tabla 23. Clorosis total en la fronda y el área (mm²) en *Lemna minor* expuesta a la mezcla de metomilo y rotenona según el día de lectura. Den.: Denominación de la concentración; Met.: metomilo; Rot.: rotenona.

Concentración en mg·L ⁻¹			día 4		día 7	
Den.	Met.	Rot.	frondas	área	frondas	área
A	0	0	3	7,03	0	0
B	250	125	2	4,42	4	5,93
C	500	250	2	8,84	4	0
D	1000	500	2	2,89	0	0,34
E	2000	1000	0	0	0	0
F	4000	2000	0	0	0	0

En este ensayo se observó que se tornaron cloróticas al cuarto día se tornaron necróticas para el séptimo día.

A continuación se muestra el comportamiento de las colonias de una repetición del control (fig. 7).

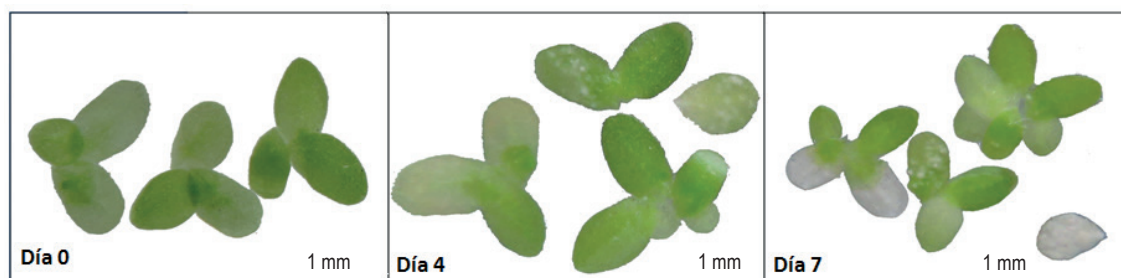


Figura 7. Efectos fitotóxicos en el control en *Lemna minor*. Repetición n°6.

Por otro lado, la necrosis tuvo un gran efecto en todas las concentraciones empleadas, existiendo un aumento

desde el día al día 7 (segunda lectura). En la tabla 24 se muestran los valores obtenidos en cada concentración.

Tabla 24. Necrosis total en la fronda y el área total (mm²) en *Lemna minor* expuesta a la mezcla de metomilo y rotenona según el día de lectura. Den.: Denominación de la concentración; Met.: metomilo; Rot.: rotenona.

Concentración en mg·L ⁻¹			día 4		día 7	
Den.	Met.	Rot.	frondas	área	frondas	área
A	0	0	2	4,25	10	28,53
B	250	125	3	16,89	20	55,35
C	500	250	4	15,52	27	83,33
D	1000	500	19	31,74	39	126,41
E	2000	1000	36	97,78	54	164,65
F	4000	2000	41	107,35	55	170,87

En la figura 8 se observa que la concentración F tiene un color distinto a la concentración de E a pesar de que ambos son tejidos necróticos. Ello puede deberse a que la cantidad de tóxico empleado podría inducir a una degeneración de la fronda. La respuesta de la concentración más baja (B)

fue similar a la respuesta del control, el cual no presentó efectos fitotóxicos pronunciados en *L. minor*. No obstante, se destaca que la producción de nuevas frondas tanto para el grupo control como para las demás concentraciones fue muy limitada hasta el cuarto día de iniciado el ensayo.

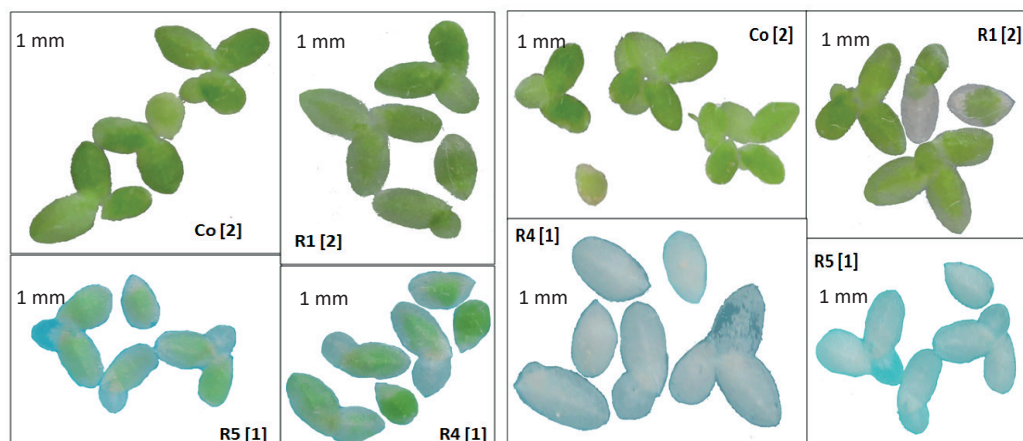


Figura 8. Efectos fitotóxicos de la mezcla binaria en *Lemna minor* a las 96h y 168h. Co: Control; R₁: B mg·L⁻¹; R₄: E mg·L⁻¹ y R₅: F mg·L⁻¹. A: Lectura a las 96h; B: Lectura a las 168h. Las imágenes no han sido capturadas a una misma distancia.

Tasa de crecimiento e inhibición del crecimiento

La tasa de crecimiento se redujo drásticamente en todas las concentraciones y los dos parámetros evaluados (tabla 25), existiendo una diferencia de 0,08 puntos entre el control y la menor concentración utilizada (B) para el parámetro NF y 0,07 puntos para el parámetro AF. Respecto a la inhibición del crecimiento, los valores son similares en el parámetro NF y AF, superando el 90% en ambos a

partir de la concentración D para el primer parámetro y desde la concentración C para el segundo. No obstante, el parámetro CTC refleja una mayor correlación con la concentración utilizada, existiendo una inhibición del 39,69% en la menor concentración (B) y una inhibición del 93,71% en la concentración más alta (F). Por otro lado, el parámetro PH muestra una inhibición similar en todas las concentraciones.

Tabla 25. Determinación de la tasa de crecimiento e Inhibición del crecimiento de los parámetros evaluados en *Lemma minor* expuesta a la mezcla de metomilo y rotenona.

Concentración en mg·L ⁻¹			μ NF	% Ir NF	μ AF	% Ir AF	% Ir PH	% Ir CTC
Den.	met.	rot.						
A	0	0	0,09	-	0,08	-	-	-
B	250	125	0,02	71,28	0,01	83,66	59,55	39,69
C	500	250	0,01	83,68	0,006	93,00	70,74	56,83
D	1000	500	0,008	91,62	0,007	91,72	61,44	61,33
E	2000	1000	0,003	97,15	0,002	97,72	69,79	90,07
F	4000	2000	0,003	97,15	0,002	97,89	75,21	93,71

Den.: Denominación de la concentración; met.: metomilo; rot.: rotenona; C: Concentración en mg·L⁻¹; μ: tasa de crecimiento; Ir: Inhibición de la respuesta; NF: Nuevas frondas; AF; Área de la fronda; PH: Peso húmedo y CTC: Contenido total de clorofila.

Determinación de los valores del Método Punto de Referencia

Al evaluar el parámetro NF se encontró que el modelo Log-Logistic fue el que mejor respondió a los datos analizados (Tabla 26). En el caso del metomilo, el valor

de BMD calculado fue de 210,05 mg·L⁻¹, mientras que el BMDL fue de 139,12 mg·L⁻¹. En contraste con este plaguicida, la rotenona presentó un nivel de BMD y BMDL inferior, situándose en 105,01 mg·L⁻¹ y 69,56 mg·L⁻¹, respectivamente.

Tabla 26. Valores de BMD (punto de referencia) y BMDL (nivel inferior al punto de referencia) (en mg·L⁻¹) utilizando el parámetro NF (número de frondas) y las frondas necróticas como respuesta en los modelos dicotómicos en *Lemma minor* (Mezcla binaria; lectura 168 h).

Modelo	valor de p	X ²	Metomilo		Rotenona	
			BMD	BMDL	BMD	BMDL
Gamma	0,01	10,67	159,75	87,30	79,87	43,65
Logistic	0,06	8,81	207,20	177,91	103,60	88,95
Log-Logistic	0	23,64	210,05	139,12	105,01	69,56
Log-Probit	0,00	20,17	206,87	141,72	103,43	70,86
Multistage	0,14	5,36	131,96	88,98	65,98	44,49
Probit	0,21	5,83	200,07	173,87	100,03	86,93
Weibull	0,04	8,14	156,42	92,81	78,21	46,40
Quantal-Linear	0,00	23,34	85,25	72,04	42,62	36,02

Asimismo, en el parámetro AF se evidenció una respuesta favorable en tres modelos, destacando el modelo

de Log-Logistic para el cálculo de los valores de BMD y BMDL (Tabla 27). En el metomilo dichos valores se

situaron en 258,47 mg·L⁻¹ y 205,65 mg·L⁻¹ respectivamente; en el caso del plaguicida rotenona estos valores

fueron de 129,23 mg·L⁻¹ y 102,82 mg·L⁻¹, respectivamente.

Tabla 27. Valores de BMD (punto de referencia) y BMDL (nivel inferior al punto de referencia) (en mg·L⁻¹) utilizando el parámetro AF (área de la fronda) como respuesta en los modelos dicotómicos en *Lemna minor* (Mezcla binaria; lectura 168 h).

Modelo	valor de p	X ²	Metomilo		Rotenona	
			BMD	BMDL	BMD	BMDL
Gamma	0,01	10,67	206,68	156,09	103,34	78,04
Logistic	0,06	8,81	202,55	185,44	101,27	92,72
Log-Logistic	0	23,64	258,47	205,65	129,23	102,82
Log-Probit	0,00	20,17	250,08	202,61	125,04	101,30
Multistage	0,14	5,36	168,51	126,71	84,25	63,35
Probit	0,21	5,83	192,29	177,16	96,14	88,57
Weibull	0,04	8,14	202,74	155,00	101,37	77,50
Quantal-Linear	0,00	23,34	83,79	76,02	41,89	38,01

En la figura 9 se realiza una comparación del NOAEL versus el valor de BMDL. Se ha utilizado el modelo continuo

Log-Logistic del parámetro AF con las concentraciones empleadas del plaguicida metomilo durante la mezcla binaria.

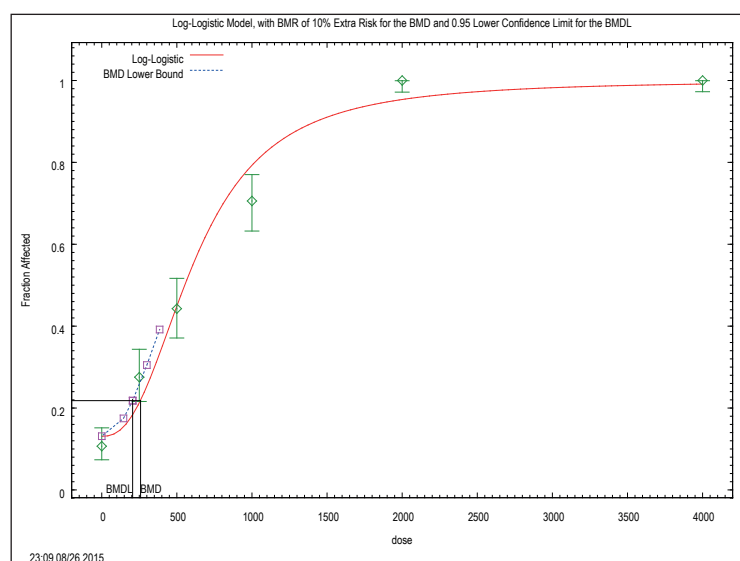


Figura 9. Curva dosis-respuesta del modelo continuo Multistage utilizando el parámetro AF (área de la fronda) como valor de respuesta a la mezcla de metomilo y rotenona para la determinación del BMD (punto de referencia) y BMDL (nivel inferior al punto de referencia) en *Lemna minor*.

Determinación de la CE₅₀ mediante el análisis Probit

Con respecto a la concentración efectiva media, el parámetro NF presentó una menor variación entre el límite inferior y superior frente al parámetro AF (Tabla

28). Para el caso del primer parámetro, se estimó una CE₅₀ de 587,72 mg·L⁻¹ (metomilo) y 293,86 mg·L⁻¹ (rotenona) la cual fue ligeramente menor que la CE₅₀ estimada para el parámetro AF: 616,02 mg·L⁻¹ (metomilo) y 308,00 mg·L⁻¹ (rotenona).

Tabla 28. Concentración Efectiva Media (EC_{50}) de dos parámetros utilizando la necrosis como respuesta fitotóxica de la mezcla de metomilo y rotenona en *Lemna minor*.

Parámetro	$EC_{50 \text{ met}}$		$EC_{50 \text{ rot}}$	
	área	fronda	área	fronda
Estimación $mg \cdot L^{-1}$	616,02	587,72	308,00	293,86
Inferior 95%	279,82	467,67	139,92	233,84
Superior 95%	942,61	710,27	471,30	355,13

met.: metomilo; rot.: rotenona. χ^2 del área met: 19,281; χ^2 de la fronda met: 6,477; χ^2 de la fronda rot: 6,477, χ^2 del área rot: 19,283.

Determinación del efecto sinérgico

Se utilizó el modelo de Concentración – Adición para determinar el efecto causado por la mezcla de ambos plaguicidas. Para ello, la CE_{50} estimada se obtuvo de la suma de las concentraciones efectivas medias halladas en

los ensayos de toxicidad individual. Para el parámetro NF ambos plaguicidas mostraron valores de CA mayores a 1, lo cual indica un efecto sinérgico (tabla 29). Dicho efecto, es mayor en la rotenona que en el metomilo puesto que en el primer plaguicida se registran valores más elevados de CA.

Tabla 29. Concentración Efectiva Media (EC_{50}) estimada y experimental del parámetro NF (número de frondas) para el cálculo del valor concentración-adición de la mezcla de metomilo y rotenona en *Lemna minor*.

Parámetro	CE_{50} estimada	CE_{50} experimental		CA	
		met.	rot.	met.	rot.
Estimación $mg \cdot L^{-1}$	4242,17	587,72	293,86	7,22	14,44
Inferior 95%	3519,13	467,68	233,84	7,52	15,05
Superior 95%	5564,10	710,27	355,14	7,83	15,67

met.: metomilo; rot.: rotenona; CA: Concentración-adición.

Lo mismo sucede al analizar el parámetro AF para determinar el valor de CA (Tabla 30), donde se destaca la alta

variación de dicho valor para el plaguicida rotenona.

Tabla 30. Concentración Efectiva Media (EC_{50}) estimada y experimental del parámetro AF (área de la fronda) para el cálculo del valor concentración-adición de la mezcla de metomilo y rotenona en *Lemna minor*.

Parámetro	CE_{50} estimada	CE_{50} experimental		CA	
		met.	rot.	met.	rot.
Estimación $mg \cdot L^{-1}$	4082,54	616,02	308,00	6,63	13,25
Inferior 95%	3558,44	279,82	139,92	12,72	25,43
Superior 95%	4865,09	942,62	471,31	5,16	10,32

met.: metomilo; rot.: rotenona; CA: Concentración-adición.

Empleo de los valores del Método Punto de Referencia para la determinación de la concentración efectiva

Debido a que el cálculo de los valores de BMD y BMDL son novedosos en su aplicación para estudios con *L. minor*, se utilizaron dos métodos para el análisis de los parámetros NF y AF. En el primer método, aplicado en el

presente estudio, se consideró como dato la suma de todos los resultados obtenidos en una misma concentración para calcular los valores de BMD y BMDL (método A). Por otro lado, en el método B se consideró cada dato como el promedio de las respuestas de cada concentración. La diferencia entre ambos métodos fue notoria en todos los ensayos analizados puesto que en el método B muchos de

los valores de p fueron superiores a 0,005. Por ejemplo, en el parámetro AF del ensayo de toxicidad binaria, se encontró que ningún modelo fue adecuado cuando se empleó el método B (tabla 31).

Tabla 31. Valores BMD (punto de referencia) y BMDL (nivel inferior al punto de referencia) ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) utilizando como dato al promedio de las respuestas por cada concentración en el parámetro AF (área de la fronda) en *Lemna minor* (mezcla binaria; lectura 168 h).

Modelo	valor de p	X ²	BMD	BMDL
Gamma	0,67	1,52	155,01	65,59
Logistic	0,86	1,26	151,91	120,31
Log-Logistic	0,33	3,38	193,85	104,28
Log-Probit	0,41	2,88	187,56	105,84
Multistage	0,85	0,77	126,38	64,67
Probit	0,93	0,83	144,21	116,26
Weibull	0,76	1,16	152,06	70,34
Quantal-Linear	0,50	3,33	62,84	48,84

En todos los ensayos analizados ambos métodos arrojaron el mismo modelo de regresión (tabla 32), destacando el hecho de que en el método B los valores de x² fueron inferiores que en el método A.

Tabla 32. Valores BMD (punto de referencia) y BMDL (nivel inferior al punto de referencia) ($\text{m}\cdot\text{L}^{-1}$) en el parámetro AF (área de la fronda) en *Lemna minor* según el método empleado (mezcla binaria).

Ensayo	Modelo	Método	Valor de p	X ²	BMD	BMDL
Rot	Quantal-Linear	A	0	160,48	118,89	106,13
		B	0,004	15,01	87,04	62,72
Met	Quantal-Linear	A	0	145,96	525,91	431,08
		B	0	30,63	1323,99	899,33
Mezcla Met	Log-Logistic	A	0	23,64	629,51	564,82
		B	0,33	3,38	629,50	475,73
Mezcla Rot	Log-Logistic	A	0	23,64	314,75	282,41
		B	0,33	3,38	314,75	237,86

rot: rotenona; met: metomilo; Mezcla: toxicidad binaria de ambos plaguicidas. A: promedio de las respuestas obtenidas en cada concentración; B: suma de las respuestas obtenidas en cada concentración.

Asimismo, los valores de BMDL tienen una gran variación en los ensayos de toxicidad individual. Caso contrario sucede en el ensayo de toxicidad binaria, donde los valores obtenidos para BMD son similares en ambos métodos. Por otro lado, el valor de BMD utilizado en el presente estudio se calculó con un 10% de respuesta del efecto observado (necrosis), por lo que puede compararse con la

concentración efectiva al 10% - EC_{10} obtenido del análisis Probit durante el cálculo de la concentración efectiva media. Al realizar esta comparación en el parámetro AF, se observa que el valor de BMD se encuentra entre los límites superior e inferior en el ensayo de toxicidad binaria (tabla 33).

Tabla 33. Valores de la EC₁₀ y del BMD (punto de referencia) (mg·L⁻¹) en el parámetro AF (área de la fronda) en *Lemna minor*.

	met	rot	Mezcla met	Mezcla rot
EC ₁₀	1992,01	587,32	249,93	124,20
EC ₁₀ lim. inf.	1457,67	471,90	33,08	23,41
EC ₁₀ lim. sup.	2350,43	664,00	442,25	211,50
BMD	525,91	118,89	258,47	129,23

EC₁₀: Concentración efectiva al 10%; lim. sup.: límite superior; lim. inf.: límite inferior; met: metomilo; rot: rotenona.

El valor de BMD también puede ser utilizado para el cálculo de la CE₅₀ si es que se modifica el valor de respuesta al 50%. Por ello, se utilizó el modelo dicotómico del programa estadístico BMDS[®] (tabla 34). Al comparar

los valores de BMD₅₀ con los valores de CE₅₀ obtenidos mediante el análisis Probit se observa una variación significativa en el ensayo de toxicidad individual con el plaguicida metomilo.

Tabla 34. Estimación de la CE₅₀ (concentración efectiva media) (mg·L⁻¹) en *Lemna minor* utilizando el paquete estadístico BMDS[®].

Ensayo	Modelo	Parámetro	valor de p	X ²	CE ₅₀
rot	Quantal-Linear	NF	0	83,41	1079,22
		AF	0	160,48	782,17
met	Quantal-Linear	NF	0	89,92	7147,42
		AF	0	145,96	6919,79
Mezcla met.	Log-Logistic	NF	0,048	7,88	597,90
		AF	0	23,64	629,51
Mezcla rot.	Log-Logistic	NF	0,048	7,88	298,93
		AF	0	23,64	314,75

rot: rotenona; met: metomilo; Mezcla: toxicidad binaria de ambos plaguicidas. NF: número de frondas; AF: Área de frondas.

Por ejemplo, los valores de CE₅₀ calculados mediante el análisis Probit para los parámetros AF y NF en el plaguicida metomilo fueron de 3313,51 mg·L⁻¹ y 3383,54 mg·L⁻¹, respectivamente (tabla 14). Mientras que los

valores de CE₅₀ para el mismo plaguicida y calculados mediante el análisis del paquete estadístico BMDS[®] se ubican por encima del límite superior (tabla 35).

Tabla 35. Valores comparados de la EC₅₀ (concentración efectiva media) (mg·L⁻¹) en *Lemna minor* con los programas estadísticos Probit y BMDS[®] utilizando el parámetro AF.

Valores	met.	rot.	Mezcla met.	Mezcla rot.
EC ₅₀	3313,51	769,03	615,84	301,16
EC ₅₀ lim. inf.	2872,47	685,96	279,79	154,12
EC ₅₀ lim. sup.	4037,31	827,78	942,34	444,31
EC ₅₀ (BMD)	6919,79	782,17	629,51	314,75

EC₅₀: Concentración efectiva al 50%; lim. sup.: límite superior; lim. inf.: límite inferior; met: metomilo; rot.: rotenona.

Con respecto al efecto sinérgico, pudo comprobarse el resultado obtenido en el modelo de Concentración-Adición al reemplazar los valores por la EC_{50} por los

valores de BMD_{50} del programa $BMD5^*$, no encontrando diferencias significativas para el resultado de la CA en el parámetro AF (tabla 36).

Tabla 36. Comparación de los valores de la Concentración Adición (CA) entre la EC_{50} (concentración efectiva media) ($mg \cdot L^{-1}$) en *Lemna minor* con los programas estadísticos Probit y $BMD5^*$. Parámetro AF (área de la fronda).

Parámetro	CE_{50} estimada	CE_{50} experimental		CA	
		met.	rot.	met.	rot.
EC_{50} (BMD)	7701,96	629,51	314,75	12,23	24,46
EC_{50} (Probit)	4082,54	616,02	308,00	6,63	13,25

met.: metomilo; rot.: rotenona; CA: Concentración-adición.

Una situación similar sucedió con el parámetro NF (tabla 37). En ambos parámetros se observa que el valor de CA

es mayor cuando se utiliza el valor de BMD como cálculo para la EC_{50} .

Tabla 37. Comparación de los valores de la Concentración Adición (CA) entre la EC_{50} (concentración efectiva media) ($mg \cdot L^{-1}$) en *Lemna minor* con los programas estadísticos Probit y $BMD5^*$. Parámetro NF (número de frondas).

Parámetro	CE_{50} estimada	CE_{50} experimental		CA	
		met.	rot.	met.	rot.
EC_{50} (BMD)	8226,64	597,90	298,93	13,76	27,52
EC_{50} (Probit)	4242,17	587,72	293,86	7,22	14,44

met.: metomilo; rot.: rotenona; CA: Concentración-adición.

De este modo, pudo comprobarse el efecto sinérgico causado por la interacción de los plaguicidas metomilo

y rotenona.

DISCUSIÓN

Condiciones del ensayo

El análisis de los resultados debe abordarse considerando las diversas variables que confluyen en la realización de un ensayo. En este caso, el primer parámetro a tomar en cuenta es la clase de agua utilizada en los ensayos de toxicidad individual. En el presente estudio se realizaron dos ensayos de toxicidad individual por cada plaguicida; tanto para el caso del metomilo y la rotenona. En el primer ensayo se consideró el empleo de agua destilada (AD) como medio, mientras que en el segundo ensayo se utilizó agua embotella Cielo[®] (AC). De este modo, los resultados serían discriminados y analizados por grupos (AD versus AC). No obstante, una indagación previa de las respuestas obtenidas reveló que solo un ensayo por cada plaguicida presentó una consistencia adecuada para su análisis.

En el caso del metomilo fue el ensayo en donde se utilizó agua Cielo[®] y, en el caso de la rotenona, el ensayo donde se utilizó agua destilada como medio. Por ello, una de las características más notorias en los resultados fue la cantidad de frondas producidas en el ensayo donde se empleó agua Cielo[®] (metomilo), la cual fue mayor al ensayo donde se empleó agua destilada (rotenona).

La diferencia radica en el tipo y calidad de agua empleada. Por ejemplo se sabe que una concentración adecuada de calcio y magnesio en el medio promueve una óptima absorción de sales, traducándose en el crecimiento de la planta (Stiles & Jörgensen, 1914). Considerando que el agua destilada carece de cualquier tipo de minerales, era esperable que los parámetros de NF y AF presentaran un mayor aumento en aquellos ensayos donde se empleó agua Cielo como medio[®], deduciendo que el agua empleada fue un factor determinante en la cantidad obtenida en ambos parámetros.

Por otro lado, una de las ventajas de utilizar a la macrofito *Lemna* como un organismo bioindicador, es la presencia de signos de fitotoxicidad (necrosis y clorosis), los cuales son visibles y fáciles de registrar. Se destaca que en el ensayo donde se utilizó agua destilada como medio (rotenona), se acentuaron dichos signos de fitotoxicidad en el grupo control (necrosis: 11,30 mm²; clorosis: 24,89 mm²).

Merrill (1915) ya discutía sobre los efectos de utilizar agua destilada en organismos acuáticos, los cuales simulaban a la toxicidad. Entre los factores que menciona el autor, se encuentra la ausencia de calcio como un rol fundamental para el correcto metabolismo de la planta. Asimismo, la falta de nutrientes esenciales conduce al deterioro de la planta, tal como se evidencia en los resultados. Otro de los efectos registrados por el uso de agua destilada fue identificado por Halaban & Hillman (1970), quienes reportan la inhibición de la floración en la macrofito *Lemna perpusilla* (Torrey, 1843).

El efecto causado por el uso de agua destilada y agua Cielo[®] no parece estar relacionado con la cantidad utilizada por cada unidad de ensayo (50 mL), aun cuando la OECD (2006) recomienda un mínimo de 100 mL para dichas unidades. No obstante, debe considerarse este factor para futuras pruebas. Otra variable que influye en el crecimiento de *Lemna* es la intensidad de luz utilizada para los ensayos. Aun cuando la OECD (2006) estableció un rango que oscila entre los 6500 a 10000 lux para asegurar una máxima producción de frondas. En el presente estudio la intensidad de luz fue de 3556,5 lux (equivalente a 48,013 $\mu\text{m}^2\text{S}^{-1}$). Como ello afectaría al crecimiento teórico esperado, se optó por someter el cultivo y los ensayos a un fotoperiodo de 24:0 horas luz:oscuridad.

Yin *et al.* (2015) reportan un aumento de la densidad poblacional en la macrofito *Lemna aequinoctialis* (Welwitsch, 1860) cuando fue sometida a un fotoperiodo de 24:0 h luz:oscuridad y a intensidades de luz de 20, 50, 80 y 110 $\mu\text{m}^2\text{S}^{-1}$, siendo la última la que produjo mejores resultados. Debido a que la intensidad utilizada se encuentra dentro del rango que promueve un óptimo desarrollo de nuevas frondas en *Lemna*, se asume que esta variable no causa un efecto adverso en el crecimiento de las frondas. No obstante, se observó que en el ensayo de toxicidad binaria la producción de nuevas frondas fue escasa en el grupo control, aun cuando se empleó agua Cielo[®] por lo que deben considerarse otros factores que influyeron en dicho resultado.

Si bien se utilizó una cámara de cultivo en todos los ensayos, esta no provee el aislamiento necesario, quedando

sometida a factores ambientales (luz, temperatura y humedad). Por ello, el ambiente donde se encontraba fue fundamental para controlar estos parámetros. No obstante, el ensayo de toxicidad binaria se realizó en un ambiente distinto a las pruebas de toxicidad individual, por lo que puede haberse producido un efecto negativo en el cultivo madre y sus colonias al no haber considerado un tiempo de adaptación para el nuevo ambiente.

Inhibición del crecimiento

Durante el análisis se descartó el uso de agua destilada como un efecto causal de la sensibilidad de los parámetros utilizados para medir la inhibición del crecimiento; ello se estableció al comparar los parámetros de inhibición en los cuatro ensayos de toxicidad individual realizados. Tal es el caso del CTC, donde se muestra que los ensayos escogidos para el análisis presentaron una mayor inhibición cuando se sometieron a concentraciones más elevadas del tóxico.

Se observa que los valores obtenidos en los ensayos descartados (metomilo AD y rotenona AC) no necesariamente responden a la concentración empleada. Por ejemplo, los resultados de la inhibición de clorofila en el ensayo de rotenona con agua Cielo[®] mostraron poca variación en todas las concentraciones empleadas, impidiendo su utilización para establecer el valor de la concentración efectiva media.

Los demás parámetros utilizados para medir la inhibición del crecimiento varían en cuanto a sensibilidad, siendo el menos específico el peso húmedo (PH) y el más específico el CTC para todos los ensayos. Asimismo, la producción de nuevas frondas (NF) mostró gran sensibilidad para los ensayos de toxicidad individual; aunque Valenzuela (2013), en un estudio realizado en *Lemna valdiviana* (Philippi, 1864), ubica a los parámetros NF y PH como los menos sensibles para determinar la inhibición del crecimiento.

Se concuerda con Valenzuela (2013) en cuanto al parámetro PH, el cual tiene una gran variación según el protocolo que se emplee para el pesado. En este estudio, no se estableció un protocolo para efectuar dichos cálculos, siendo necesaria una estandarización del proceso para futuros ensayos.

Por otro lado, el parámetro del área de la fronda (AF) mostró mayor sensibilidad en el estudio de la mezcla binaria, seguido por el parámetro NF y CTC respectivamente. Este resultado se debe a una mejor interacción del autor con la interfaz del programa Image J[®], el cual amplía las posibilidades en el estudio de las

imágenes digitales. Abràmoff *et al.* (2014) mencionan que este software (de código abierto) es utilizado para el análisis de imágenes biomédicas, aunque recientemente se han incorporado investigaciones con la macrofita *Lemna* sp. (Hrušková, 2012; Valenzuela, 2013; Van Hoeck *et al.*, 2015, entre otros).

Debido a que las investigaciones con este programa son escasas en el área de toxicología utilizando la macrofita *Lemna*, aún no se han establecido parámetros de medición específicos para detectar el área necrótica y clorótica, quedando a la libre interpretación del investigador (Zhou *et al.*, 2020).

Tangou *et al.* (2013) utilizaron el software Image Pro-Plus[®] para el análisis fotográfico de *L. minor*. En este estudio, establecen ciertas pautas para optimizar el análisis de las fotografías, donde se destaca el hecho de mantener una misma distancia entre la cámara y las lentejitas de agua para la toma de fotografías, pauta que no fue considerada en este estudio. De este modo, estandarizaron el reconocimiento del color a diferentes intensidades de RGB (Red-Green-Blue) y clasificaron al tejido vivo y necrótico entre rangos de 100 a 255 y de 200 a 255, respectivamente. No obstante, el reconocimiento de la intensidad de color dependió de los investigadores.

Aunque existen programas especializados para la determinación del área y del porcentaje de clorosis y necrosis (Eberius, 2001), el uso de programas gratuitos para el análisis de imágenes otorga a cualquier investigador la posibilidad de incrementar la especificidad de sus datos, por lo que una estandarización en la metodología se vuelve imprescindible.

Empleo de los valores del Método Punto de Referencia

Tradicionalmente se han utilizado los valores del nivel de efecto no observable (NOAEL) y bajo nivel de efecto observable (LOAEL) para determinar el riesgo de la sustancia estudiada y su efecto crítico (Barlow *et al.*, 2009). Sin embargo, el uso del punto de referencia (BMD) y el nivel por debajo del punto de referencia (BMDL) son científicamente más avanzados que el método de NOAEL, el cual sólo deriva de los datos obtenidos y no considera la relación existente en la curva de la dosis y la respuesta.

El paquete estadístico utilizado para el cálculo de estos valores cuenta con varios modelos y su utilización varía según la especie y el tipo de estudio realizado. Asimismo, el punto de referencia se ha utilizado en diferentes áreas de la toxicología, la medicina y farmacología por lo que su

aplicación está ampliamente difundida en otras áreas. No obstante, la aplicación del modelo en *Lemna* sp. aún es novedosa y carece de un protocolo estandarizado (Zhou *et al.*, 2019).

La decisión de utilizar el modelo dicotómico responde a la factibilidad de relacionar dos variables respuesta (tejido vivo versus tejido muerto) y a la fácil interpretación de los resultados a través del valor de p y el χ^2 . Aunque existen otros modelos como el de tóxico-difusión, donde se comparan las respuestas obtenidas de un mismo organismo en varios intervalos de tiempo a una concentración determinada. No se consideró este modelo debido que posee una gran complejidad a nivel estadístico. Sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de su aplicabilidad para futuros estudios con *L. minor*.

Del mismo modo, al ser un modelo novedoso para ensayos con *L. minor*, aún deben considerarse investigaciones adicionales que permitan establecer un protocolo adecuado para trabajar con la data obtenida (Zhou *et al.*, 2020). Cabe señalar que observaciones posteriores permitieron establecer que el manejo de los datos puede ser un factor importante al momento de determinar los valores de BMD y BMDL.

En el presente estudio y en ambos parámetros (NF y AF) se consideró como dato la suma de todos los resultados obtenidos en una misma concentración para calcular los valores de BMD y BMDL (método A). No obstante, cuando el dato analizado fue el promedio de las respuestas de cada concentración (método B), los resultados variaron en ambos valores y en todos los ensayos.

El empleo del método A para hallar los valores de BMD y BMDL ha mostrado tener una mayor certeza que la utilización del método B. Además, aunque los modelos de regresión con mejores resultados son los mismos en ambos métodos, debe recalarse la diferencia existente en los valores de BMD y BMDL. Ello puede interpretarse como un ajuste para reflejar mayor exactitud de los resultados en el método A.

Por otro lado, el empleo del valor de BMD como equivalente de la EC_{10} arrojó valores por debajo del límite inferior de la EC_{10} . Lo mismo sucedió al calcular el valor de BMD con una respuesta del 50% para realizar un análisis comparativo entre las EC_{50} obtenidas en los ensayos. Ello puede sugerir una mayor especificidad puesto que el método del punto de referencia (BMD) nos permite trabajar con varios modelos para encontrar el que mejor se adapte a los datos obtenidos.

No obstante, debido a que los valores de BMD y BMDL son novedosos para trabajos toxicológicos con *Lemna*, es necesario realizar más estudios que permitan una estandarización del protocolo (Zhou *et al.*, 2019).

Efecto sinérgico

Como se mencionó anteriormente, el metomilo es un carbamato que inhibe la acetilcolinesterasa, una enzima encargada de hidrolizar la acetilcolina, el cual es un neurotransmisor de la sinapsis presente en animales e insectos (Lin *et al.*, 2020). No obstante, Wessler *et al.* (2001) han reportado la presencia de este neurotransmisor en un amplio rango de organismos tales como bacterias, algas, protozoos y plantas. En este último grupo, Odjakova & Hadjiivanova (1997) refieren que la acetilcolina puede estar involucrada en una serie de procesos de regulación fisiológica, tales como la germinación, floración, morfogénesis, la fotosíntesis y la elongación de la planta.

Diversas investigaciones en células animales han permitido establecer el ciclo de la acetilcolina. Cuando esta es producida para encontrarse con sus receptores, la acetilcolinesterasa la degrada inmediatamente en dos productos inactivos: el acetato y la colina, siendo la colina el que completa el ciclo de vida de la acetilcolina (Rosenjack & Rosenthal, 2015). Aunque existen estudios que han establecido la biosíntesis de la colina en las plantas a través de la vía etanolamina (Subbarao *et al.*, 2001), también se ha demostrado la presencia de acetilcolina en el tejido de las plantas, además de la existencia de las enzimas involucradas en su síntesis. Bajo esta vía, la colina es transformada por dos transferasas en fosfatidilcolina, el cual es uno de los mayores fosfolípidos en las membranas biológicas (Tretyn, 1991).

Ello guarda relación con los resultados obtenidos por Kandeler *et al.* (1974), quienes estudiaron la respuesta de la acetilcolina en *Lemna gibba* (Linnaeus, 1753). Sus resultados mostraron que la acetilcolina parece alterar la permeabilidad de la membrana cuando el medio está acidificado, alterando su metabolismo y produciendo un intercambio de iones de hidrógeno por iones de potasio.

Debido a que la colinesterasa presente en las plantas es sensible a los derivados del ácido carbámico y los compuestos organofosforados (Roshchina, 2004), la exposición al plaguicida metomilo puede producir un desequilibrio en el intercambio de iones Ca – K de la membrana y por ende, la ruptura y muerte celular. Moussa *et al.* (1989) mencionan que este plaguicida causa un incremento en la permeabilidad de la membrana, lo

que corroboraría su acción al inhibir la colinesterasa (Lin *et al.*, 2020).

El hecho de que los resultados del presente estudio mostraran una baja sensibilidad de *L. minor* frente al metomilo, puede sugerir que existe una mayor síntesis de la colina por medio de la vía etanolamina, lo que reduciría el efecto fitotóxico. Otra posibilidad nos lleva a mencionar la capacidad de respuesta del organismo frente al agente xenobiótico, la cual sería efectiva con concentraciones inferiores a 1637,31 mg·L⁻¹ (BMD: parámetro AF). Ello hace necesario contar con estudios específicos que evalúen la respuesta de la membrana celular en *L. minor* cuando es sometida a concentraciones de metomilo.

Por otro lado, la alta fitotoxicidad de *L. minor* al ser sometida a la rotenona, responde al hecho de que este plaguicida causa daños directos en la mitocondria, específicamente en la cadena respiratoria a través del complejo I y despolimerizando los microtúbulos de esta organela. Cabe señalar que en la mitocondria se producen las especies reactivas al oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) o moléculas derivadas de la utilización del oxígeno en la célula. Las ROS como el superóxido, es detoxificado y transformado a peróxido de hidrógeno por medio de otras moléculas, el cual es un importante regulador de la actividad celular (Bolisetty & Jaimes, 2013; Wu *et al.*, 2020).

Este proceso es realizado, en su mayoría, en los complejos I y II de la cadena respiratoria (Wu *et al.*, 2020). Asimismo, otro aspecto importante a mencionar, es la relación que tiene la mitocondria con el proceso apoptótico de la célula (Li, 2003). Los cambios que producen la presencia de moléculas de rotenona en el complejo I, alteran el equilibrio de la producción de las moléculas ROS, ocasionando la estimulación de la mitocondria a respuestas pro-apoptóticas y un cambio letal en la permeabilización de la membrana mitocondrial con una subsecuente ruptura de la membrana externa y muerte celular (Le Bras *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2020).

Debido a que la rotenona causa daños significativos en la célula (Wu *et al.*, 2020), se asume que la macrofitas *L. minor* es incapaz de reducir el efecto causado por el segundo plaguicida (metomilo), lo que se traduce en un aumento del efecto fitotóxico y una mayor sensibilidad a la acción combinada de ambos plaguicidas.

Lemna minor es un sistema ideal para el estudio combinado de la fitotoxicidad que podría ser usado como monitoreo de rutina para la salud ambiental de los ecosistemas

acuáticos (Tagun & Boxall, 2018; Kostopoulou *et al.*, 2020).

Se concluye que la sensibilidad de la macrofitas *L. minor* varió en los ensayos de toxicidad individual, siendo menor cuando se utilizó el plaguicida metomilo (EC_{50} ; Parámetro AF: 6919,79 $mg \cdot L^{-1}$ y parámetro NF: 7147,42 $mg \cdot L^{-1}$) en comparación con la rotenona (EC_{50} ; Parámetro AF: 782,17 $mg \cdot L^{-1}$ y parámetro NF: 1079,22 $mg \cdot L^{-1}$). La evaluación del parámetro área total (AF) mostró mayor sensibilidad frente al parámetro nuevas frondas (NF) al momento de determinar la concentración efectiva al 10% y 50% (EC_{10} y EC_{50} , respectivamente) en todos los ensayos. El modelo de Concentración-Adición mostró un efecto sinérgico en los parámetros evaluados (AF y NF) puesto que los valores obtenidos fueron mayores a uno. Dicho efecto sinérgico fue mayor en el parámetro NF (27,52 rotenona y 13,76 metomilo) que en el parámetro AF (24,46 rotenona y 12,23 metomilo). El parámetro de CTC fue el más sensible al momento de determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento en los ensayos de toxicidad individual (65,62% en 2000 $mg \cdot L^{-1}$ de metomilo y 90,30% en 2000 $mg \cdot L^{-1}$ de rotenona). En el caso del ensayo de toxicidad binaria, el parámetro AF presentó mayor sensibilidad (la combinación 2000 $mg \cdot L^{-1}$ de rotenona y 4000 $mg \cdot L^{-1}$ de metomilo causan una inhibición del 97,89%). Asimismo, el parámetro de peso húmedo (PH) fue el menos sensible en todos los ensayos. El modelo Punto de Referencia (BMD – Benchmark dose) utilizado a través del programa estadístico BMD^S, resultó tener una mayor especificidad para el cálculo de la concentración efectiva media – EC_{50} que el programa computarizado Probit, con el cual se obtuvieron valores de EC_{50} con grandes márgenes de variación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abràmoff, M.; Magalhaes, P. & Ram, S. 2014. Image Processing with ImageJ. Biophotonics International, 11: 36–42.
- Barlow, S.; Chesson, A.; Collins, J.; Flynn, A.; Hardy, A.; Klaus-Dieter, J. & Vannier, P. 2009. Use of the benchmark dose approach in risk assessment. European Food Safety Authority Journal, 1150: 1–72.
- Bolisetty, S. & Jaimes, E. 2013. Mitochondria and Reactive Oxygen Species: Physiology and Pathophysiology. International Journal of Molecular Sciences, 14: 6306 – 6344.
- Daubs, E.H. 1965. *A monograph of Lemnaceae*. University of Illinois, Ed. Primera Ed. Illinois: University of Illinois Press.
- Dias de Alkimin, G.; Paisio, C.; Agostini, E. & Nunes, B. 2020. Phytoremediation processes of domestic and textile effluents: evaluation of the efficacy and toxicological effects in *Lemna minor* and *Daphnia magna*. Environmental Science and Pollution Research, 27: 4423-4441.
- Eberius, M. 2001. *Observation parameters of the Duckweed growth inhibition test. Frond number - Total Frond Area - Dry weight*. Retrieved July 18, 2015.
- Gaete, H. & Chávez, C. 2008. Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsenico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1874) (Cladocera, Crustacea). Limnetica, 27: 1–9.
- Halaban, R. & Hillman, W. 1970. Response of *Lemna perpusilla* to periodic transfer to distilled water. Plant Physiology, 46: 641–644.
- Hrušková, Z. 2012. *Fyziologické odpovědi okřehku Lemna minor na zatížení prostředí fluoranthemem*. Mendelova univerzita v Brně.
- Iannacone, J. & Alvarino, L. 2005. Selectividad del insecticida Cartap empleando bioensayos con organismos no destinatarios. Ecología Aplicada, 4: 91–104.
- Iannacone, J. & Alvarino, L. 2008. Efecto ecotoxicológico del metomilo en *Corydoras Lacépède*, 1803 (Siluriformes: Callichthyidae) y su caracterización leucocitaria. Ecología Aplicada, 7: 55–61.
- Iannacone, J.; Alvarino, L. & Mamani, N. 2011. Estimación de la Toxicidad Combinada de Mezclas de Furdán 4F® y Monofos® sobre *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, 6: 23–29.
- Iannacone, J.; Alvarino, L.; La Rosa, R. & La Torre, M.I. 2014. Acute and chronic toxicity of Methomyl and Lantana camara (Verbenaceae) to five biological control agents of agriculture pest in Peru. Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego, 8: 169–183.

- Iannacone, J. & Lamas, G. 2003. Efectos toxicológicos del nim, rotenona y cartap sobre tres microavispa parasitoides de plagas agrícolas en el Perú. *Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas*, 29: 123–142.
- Kandeler, R.; Hügel, B. & Rottenburg, T. 1974. *Relations between photosynthesis and flowering in Lemnaceae*. In: Marcelle, R. (Ed.), *Environmental and Biological control of Photosynthesis*. pp. 161–169. Belgium.
- Khellaf, N. & Zerdaoui, M. 2010. Growth response of the duckweed *Lemna gibba* L. to copper and nickel phytoaccumulation. *Ecotoxicology*, 19: 1363–1368.
- Kostopoulou S.; Ntatsi, G.; Arapis, G. & Aliferis, K.A. 2020. Assessment of the effects of metribuzin, glyphosate, and their mixtures on the metabolism of the model plant *Lemna minor* L. applying metabolomics. *Chemosphere*, 239: 124582.
- Le Bras, M.; Clément, M.; Pervaiz, S. & Brenner, C. 2005. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histology and Histopathology. Cellular and Molecular Biology*, 20: 205–220.
- Li, N. 2003. Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 8516–8525.
- Lin, Z.; Zhang, W.; Pang, S.; Huang, Y.; Mishra, S.; Bhatt, P. & Chen, S. 2020. Current approaches to and future perspectives on methomyl degradation in contaminated soil/water environments. *Molecules*, 25: 738.
- Martinez, R.S.; Sáenz, M.E.; Alberdi, J.L. & Di Marzio, W.D. 2019. Comparative ecotoxicity of single and binary mixtures exposures of nickel and zinc on growth and biomarkers of *Lemna gibba*. *Ecotoxicology*, 28: 686–697.
- Martinez, S.; Sáenz, M.E.; Alberdi, J.L. & Di Marzio, W.D. 2020. Comparative ecotoxicity of single and binary mixtures exposures of cadmium and zinc on growth and biomarkers of *Lemna gibba*. *Ecotoxicology*, 29: 571–583.
- Merrill, M.C. 1915. Some relations of plants to distilled water and certain dilute toxic solutions. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 2: 459–498.
- Moussa, I.; Ouazzani, C.; Bonavent, J.; Bervillé, A. & Ghazi, A. 1989. *Maize mitochondria F1-ATPase inhibition by the Cochliobolus heterostrophus race T-toxin and methomyl*. In: Graniti, A.; Durbin, R.D. & Ballio, A. (Eds.). *Advance Research on Phytotoxins and Plant Pathogenesis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Napán, K.; Llanos, C. & Paredes, C. 2010. Toxicidad aguda de metomilo en *Poecilia latipinna* (Lesueur, 1821) (Poeciliidae). *The Biologist (Lima)*, 8: 21–28.
- Odjakova, M. & Hadjiivanova, C. 1997. Animal neurotransmitter substances in plants. *Bulgarian Journal Plant Physiology*, 23: 94–102.
- OECD. 2006. *Test N°221: Lemna sp. Growth Inhibition Test*. Paris: OECD Publishing.
- Park, J.; Brown, M.T.; Depuydt, S.; Kim, J.K.; Won, D.S. & Han, T. 2017. Comparing the acute sensitivity of growth and photosynthetic endpoints in three *Lemna* species exposed to four herbicides. *Environmental Pollution*, 220: 818–827.
- Radić, S.; Stipanicev, D.; Cvjetko, P.; Mikelić, I. L.; Rajčić, M.M.; Sirac, S.; Pevalek-Kozlina, B. & Pavlica, M. 2010. Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (*Lemna minor* L.) as a test organism. *Ecotoxicology*, 19: 216–222.
- Rosenjack, J. & Rosenthal, L. 2015. *Lehne's Pharmacology for Nursing Care*. 9th ed. China: Elsevier.
- Roshchina, V. 2004. *Plant cholinesterase activity as a biosensor: cellular models*. In: Silman, I.; Soreq, H.; Anglister, L.; Michaelson, D. & Fisher, A. (Eds.), *Cholinergic Mechanisms. Function and dysfunction*. pp. 679–680. London, UK: Taylor & Francis.
- SENASA. 2014. *Disponen la publicación del Procedimiento: Importación, Vigilancia y Control de Plaguicidas de uso agrícola para consumo propio* (v.01) en el portal del SENASA. *El Peruano*, p. 1. Lima, Peru.

- Stiles, W. & Jörgensen, I. 1914. The antagonism between ions in the absorption of salts by plants. *The New Phytologist*, 13: 253–268.
- Subbarao, G.; He Levine, L. & Stutte, G. 2001. *Glycine betaine accumulation: its role in stress resistance in crop plants*. In: Pessarakli, M. (Ed.), *Handbook of Plant and Crop Physiology*. 2nd ed. pp. 881–907. New York: Marcel Dekker Inc.
- Suman, H. & Venu, P. 2012. The taxonomy and report of flowering in *Lemna* L. (Lemnaceae) in India. *Current Science*, 102: 1629–1632.
- Swanson, S.; Collen, R.; Freemark, K. & MacQuarrie, P. 1991. *Testing for pesticide toxicity to aquatic plants: Recommendations for test species*. In: American Society for Testing and Materials (Ed.), *Plants for Toxicity Assessment. 2nd Volumen*. pp. 77–97. Philadelphia: Ann Arbor, MI.
- Tagun, R. & Boxall, A.B.A. 2018. The response of *Lemna minor* to mixtures of pesticides that are commonly used in Thailand. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100: 516–523
- Tangou, T.; Baya, D.T.; Musbono, D. & Vassel, J.L. 2013. *Monitoring the influence of light intensity on the growth and mortality of duckweed (Lemna minor) through digital images processing*. Conference: 10th IWA specialist group conference on pond technology. Cartagena, Colombia.
- Thron, J.; Weaver, V. & Baker, J. 1995. Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration. *Journal of Economic Entomology*, 88: 1510–1512.
- Tretyn, A. 1991. Acetylcholine in Plants: presence, metabolism and mechanism of action. *The Botanical Review*, 57: 33–73.
- USEPA. 2015. *Benchmark Dose Software (BMDS)*. Washington: Environmental Agency Protection.
- Valenzuela, J. 2013. *Calibración y estimación de la sensibilidad toxicológica de Lemna valdiviana Phil (Araceae) en la realización de bioensayos de toxicidad crónica mediante dicromato de potasio y sulfato de cobre como tóxicos de referencia*. Universidad Austral de Chile.
- Van Hoeck, A.; Horemans, N.; Van Hees, M.; Nauts, R.; Knapen, D.; Vandenhove, H. & Blust, R. 2015. β -Radiation stress responses on growth and antioxidative defense system in plants: A study with Strontium-90 in *Lemna minor*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 15309–15327.
- Van Scoy, A.; Yue, M.; Deng, X. & Tjeerdema, R. 2013. Environmental fate and toxicology of methomyl. *Review Environmental Contamination Toxicology*, 222: 93–109.
- Velazco, J. & Velazco, J. 2012. *Características del empleo agrícola en el Perú*. In: *Empleo y Protección Social*. pp. 161–211. Lima, Peru. Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Wessler, I.; Kilbinger, H.; Bittinger, F. & Kirkpatrick, C.J. 2001. The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. *Japanese Journal of Pharmacology*, 85: 2–10.
- Wu, A.P.; He, Y.; Ye, S.Y.; Qi, L.Y.; Liu, L.; Zhong, W.; Wang, Y.H. & Fu, H. 2020. Negative effects of a piscicide, rotenone, on the growth and metabolism of three submerged macrophytes. *Chemosphere*, 250: 126246.
- Yanggen, D.; Crissman, C. & Espinosa, P. 2003. *Los Plaguicidas: Impactos en producción, salud y medio ambiente en Carchi, Ecuador*. Centro Internacional de la Papa & Instituto Nacional Autónomo de investigaciones (Eds.). Quito: Ed. Abya-Yala.
- Yin, Y.; Yu, C.; Yu, L.; Zhao, J.; Sun, C.; Ma, Y. & Zhou, G. 2015. The influence of light intensity and photoperiod on duckweed biomass and starch accumulation for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 187: 84–90.
- Zhou, J.; Wu, Z.; Yu, D. & Yang, L. 2020. Toxicity of the herbicide flurochloridone to the aquatic plants *Ceratophyllum demersum* and *Lemna minor*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27: 3923–3932.

Received February, 8, 2020.

Accepted June 11, 2020.