

Trabajo Original

Ecotoxicología

Toxicidad Aguda por Contacto del Bioenraiz en abejas (*Apis mellifera*).

**Odette Beiro Castro, María Elena Echevarría Martínez, Roxana Fraga Álvarez,
Anay Martínez Suárez, Yordanka Domínguez Linares, José Trujillo Hernández,
Onelio Carballo Hondal.**

**Vicedirección de Evaluaciones Toxicológicas y Medio Ambiente. Centro Nacional
de Toxicología.**

Avenida 31 y 114. Marianao. Ciudad de la Habana. Cuba.

Correspondencia a:

ecotox@infomed.sld.cu

odettebeiro@infomed.sld.cu

Resumen

Introducción. El Bioenraiz es una fitohormona cuyo ingrediente activo es el ácido indolacético (AIA), auxina promotora del crecimiento vegetal, su aspecto más trascendental es que regula el crecimiento al inducir la síntesis de ácido ribonucleico (ARN) o enzimas específicas, vinculándose a un nivel central (genético) como moduladores biológicos.

Objetivo. Evaluar la posible toxicidad que sobre las abejas pudiera tener la aplicación del Bioenraiz.

Método. El producto se aplicó a dosis única y tópicamente a razón de 0.650 µg/ abeja correspondiente a una concentración de 130 mg/ L. Se utilizaron un total de 200 abejas de la especie *Apis mellifera*, distribuidas en dos grupos experimentales: un control (no tratado) y un grupo con el Bioenraiz. Las variables analizadas fueron la mortalidad de las abejas y la aparición de signos de toxicidad a las 4, 24 y 48 horas del ensayo.

Resultados y Discusión. El Bioenraiz produjo un 2 por ciento de mortalidad; valor biológica y estadísticamente no significativo, según los criterios de validación del ensayo. Respecto a las observaciones clínicas realizadas, los animales no presentaron signos tóxicos ni alteraciones en el comportamiento que puedan atribuirse a la administración del producto de ensayo.

Conclusiones. Según los resultados obtenidos para esta especie con alta sensibilidad en ensayos ecotoxicológicos, el producto no provocó mortalidad, ni toxicidad para la abeja *Apis mellifera*.

Palabras claves: Bioenraiz, ácido indolacético, abeja, *Apis mellifera*, toxicidad, mortalidad.

Abstract.

Topic acute toxicity of Bioenraiz in honey bees (*Apis mellifera*).

Introduction. Bioenraiz is a phytohormone which active ingredient is indolacetic acid (AIA), an auxina that promotes vegetable growth. The most important feature is that it regulates growth by inducing the synthesis of ribonucleic acid (RNA) or specific enzymes, which in turn are linked into a central genetic as biological modulators.

Objective. To evaluate the potential toxicity of Bioenraiz when is administered to honey bees. *Method.* The product was applied in single and topic doses of 0.650 µg/ bee; equivalent to a concentration of 130 mg/ L. Two hundred honey bees of the *Apis mellifera* specie were used and distributed in two experimental groups: a control one (non treated) and a group treated with Bioenraiz. The mortality of the bee and the appearance of toxicity signs at the 4, 24 and 48 hours of the test, were the variables analyzed. *Results and Discussion.* Bioenraiz caused a 2 percent of mortality, a non biological and statistical significant value according to the validation criteria of the test. Concerning clinical observations, the animals did not show toxic signs nor alterations in their behavior attribute to the administration of the test substance. *Conclusions.* According to the results obtained in this highly sensitive specie for ecotoxicological tests, this product did not provoke neither mortality, nor toxicity for the *Apis mellifera* bee.

Key words: Bioenraiz, *Apis mellifera* bee, mortality, toxicity.

Introducción

El empleo de fertilizantes en la agricultura fue un importante paso en el mejoramiento de las condiciones físico químicas de los suelos contribuyendo al aumento de la capacidad de retención del agua así como a la obtención de suelos con una mejor textura y estructura.

La contaminación por fertilizantes se produce cuando éstos se utilizan en mayor cantidad de la que pueden absorber los cultivos, o cuando se eliminan por acción del agua o del viento de la superficie del suelo antes de que puedan ser absorbidos, por lo que es imprescindible estimar el efecto que sobre el hombre y el ecosistema pueda tener la introducción de los fertilizantes en el mismo.¹

El aporte de fertilizantes tanto químicos como biológicos modifica en cierta medida el micro hábitat de la flora edáfica y con ello se promueven cambios sustanciales en la misma. La aplicación de fertilizantes ha provocado la introducción masiva al suelo de compuestos que pueden en alguna medida modificar su estado biológico y que en ocasiones se consideran una de las principales causas de contaminación de las aguas.

En los últimos años se han incrementado las investigaciones relacionadas con la producción y formulación de productos mediante procesos biotecnológicos novedosos dentro de los que se destacan las fitohormonas.

Los mecanismos de acción hormonal² se caracterizan por su expresión en dos niveles jerárquicos distintos, los cuales son:

- Nivel central, de respuesta mediata, vinculado a la expresión genética.
- Nivel periférico, de respuesta corta, asociados a las respuestas en la membrana celular, proceso del metabolismo, transporte, etc.^{3,4}

Un ejemplo de fitohormona es el Bioenraiz, cuyo ingrediente activo es el AIA, promotor del crecimiento vegetal (auxina). Las auxinas estimulan y regulan el alargamiento celular, por medio del incremento entre otros del contenido osmótico de la célula y de la permeabilidad al agua de la pared celular. Su aspecto más trascendental es su acción sobre la regulación del crecimiento al inducir la síntesis de ARN o enzimas específicas, vinculándose a un nivel central (genético) como moduladores biológicos.

El ingrediente activo del fertilizante Bioenraiz AIA y su forma de presentación es a una concentración de 130 mg/L.² Este producto tiene propuestas numerosas indicaciones de uso, cada una con sus respectivas dosificaciones, de las cuales la de mayor concentración corresponde a 100 mg/L, que se emplea específicamente para el incremento de índices de multiplicación y enraizamiento en flores ornamentales.²

En este estudio se procederá a estimar las características tóxicas del Bioenraiz luego de su administración por contacto y a dosis única en abejas *Apis mellifera*. Se analizarán la mortalidad y la aparición de signos clínicos, como parte de la evaluación de los efectos que sobre el ecosistema pueda causar la introducción de este producto. Dichas pruebas corresponden con lo estipulado por la Oficina de Prevención, Plaguicidas y Sustancias Tóxicas de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos, en las guías para la evaluación de la toxicidad de plaguicidas en abejas (EPA, 1996).^{5,6}

Método

Las abejas provinieron de una colonia "in situ" de la Estación Experimental Apícola, perteneciente al Ministerio de la Agricultura, de Cuba; se emplearon un total de 200, de la especie *Apis mellifera*, con una edad comprendida entre 1 y 7 días de edad.^{5,6}

Para la alimentación de las abejas se empleó una solución azucarada al 50 %, suministrada "ad libitum". Las condiciones de estabulación se caracterizaron por temperaturas entre 25 y 35 ° C y humedad relativa entre 50 y 80 %. Las abejas se mantuvieron en la oscuridad exceptuando cuando se dosificaron y observaron, así como se protegieron de una excesiva actividad y otros disturbios.^{5,6}

Como método de inmovilización de los organismos de ensayo se utilizó la administración de CO₂. Las abejas se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos experimentales a razón de 100 por grupo, divididas en cuatro réplicas. En la **Tabla I** se muestran los grupos de tratamientos con sus respectivas concentraciones, dosis y volúmenes de aplicación.

En las guías que regulan los estudios para los plaguicidas de origen químico se plantean utilizar niveles de dosis límites de 25 µg / abeja. En este estudio se probó el producto tal

como se presenta debido a la imposibilidad de llegar a la dosis antes referida, es decir, se utilizó el nivel de dosis 130 mg/L.

Respecto a los controles, hemos confrontado dificultad al encontrar el dimetoato que es el control positivo recomendado por las guías de la OECD, ya que las de la EPA no recomiendan alguno en específico. Aunque consideramos innecesario la inclusión de un control positivo en el estudio al no ser el objetivo del mismo.

Al no poseer la base del formulado, y debido a la imposibilidad de llegar a la dosis referida en las guías dada las características del producto, consideramos improcedente diluir aún más el producto mediante el empleo de otro solvente como acetona o agua, razón por las cuales no se incluyó el control de solvente.

La sustancia de ensayo se administró tópicamente, luego se determinó la mortalidad a las 4, 24 y 48 horas, además de cualquier variación en el comportamiento o signos de toxicidad como: ataxia, letargo, hipersensibilidad, temblores, pérdida de orientación, diarreas.

Para el procesamiento estadístico se utilizó el Test de Dunnet Versión 1.5,⁷ mediante el cual se compararon las medias del número de abejas sobrevivientes en los distintos tiempos de muestreo para un nivel de significación del 0.5 %.

Resultados

Dentro de los criterios para la validación de los ensayos de toxicidad aguda por contacto en abejas se encuentra, que la mortalidad del grupo control negativo no exceda el 20 % del total de las abejas correspondientes a dicho grupo. En este estudio los valores de mortalidad para el grupo control negativo correspondieron a un valor de 2 %, rango aceptable para ese tipo de ensayo (**Tabla No. II**).

Para los dos grupos los porcentajes de mortalidad alcanzaron el mismo valor y estuvieron comprendidos dentro de los criterios de validación del ensayo mencionados anteriormente. Durante el estudio se observó mortalidad en los grupos experimentales (**Tabla No. III**) aún en el grupo no tratado con el producto de ensayo (control negativo).

Respecto a los signos clínicos, en todos los grupos experimentales se observaron ataxia, letargo y diarreas.

Discusión

En el estudio y como se plantea en su título, se pretende evaluar la posible toxicidad que sobre las abejas pudiera tener la aplicación del Bioenraiz, cuyo principio activo es el ácido indolacético, que sirvió además como base para los cálculos de las dosis, siguiendo lo estipulado en la guía de la EPA, en dependencia con los resultados obtenidos en nuestro estudio el Bioenraiz produjo un 2 % de mortalidad a la dosis de 0.650 µg / abeja, que es la máxima dosis posible a lograr debido a las características del producto.

Durante el estudio se observó mortalidad en los grupos experimentales aún en el grupo no tratado con el producto de ensayo (control negativo) por lo que no se atribuyó dicha mortalidad a la administración del producto de ensayo, sino a la ocurrencia normal de este evento en el modelo experimental empleado.^{3,4}

El hecho de que indistintamente, durante el estudio, en todos los grupos experimentales administrados o no con el producto de ensayo se observaron signos como ataxia, letargo y diarreas, descarta la idea de que los mismos sean atribuibles a la administración del producto de ensayo.

Cuando las abejas se someten a situaciones de estrés, la acumulación de materia no digerida en el recto provoca disentería que puede causar la muerte prematura en abejas maduras. Consiste en el cambio de la consistencia de las heces, heces pastosas. El hecho de sacar las abejas de la colmena directamente como se plantea en la guía de la EPA, para realizar las pruebas de ensayo, independientemente de que se sometieron a los parámetros ambientales de temperatura, humedad relativa y oscuridad requeridos, además de haber sido sometidas a la anestesia, provocan cierto estrés en las abejas, y aquí es donde el investigador debe saber discernir entre si estos efectos son provocados por el compuesto de ensayo o no.

Las etapas pre- mortem en las abejas se caracterizan entre otros aspectos por:

Letargo: Signo que forma parte de la fase crítica y que se caracteriza por la imposibilidad de movimientos en las abejas.

Ataxia: Ya en la cuarta fase de nombre adinámica, disminuyen ostensiblemente los movimientos reaccionando sólo las abejas a los impulsos térmicos o mecánicos.

También hay que tener en consideración que tanto el letargo como la ataxia fueron observados en aquellas abejas que murieron durante el ensayo; pero cabe recordar que el porcentaje de mortalidad del grupo control negativo no excedió el 20 % del total de las abejas correspondientes a dicho grupo, como criterio de validez para el ensayo.

En este estudio se utilizó el nivel de dosis 130 mg/L (0.650 µg / abeja), debido a la imposibilidad de lograr concentraciones superiores, dosis que independientemente de ser 38 veces inferior a la planteada en las guías que regulan los estudios para los plaguicidas de origen químico (25 µg / abeja),^{5,6} es 1.3 veces superior a la mayor concentración alcanzada entre las diferentes indicaciones de uso propuesto que corresponde a 100 mg/L,² aspectos que avalan la seguridad del producto, ya que bajo las condiciones del presente ensayo, no provocó mortalidad, ni toxicidad para la abeja *Apis mellifera*, según los resultados obtenidos para esta especie con alta sensibilidad en ensayos ecotoxicológicos.

Conclusiones

- En las condiciones del presente ensayo y de acuerdo a los resultados obtenidos, el Bioenraiz produjo un 2 por ciento de mortalidad; valor no significativo biológico y estadísticamente, según los criterios de validación del ensayo, (porcentaje de mortalidad \leq 20 %).
- En las observaciones clínicas realizadas, los animales no presentaron signos tóxicos ni alteraciones en el comportamiento que puedan atribuirse a la administración del producto de ensayo.

Bibliografía

- 1) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Agricultura mundial hacia los años 2015/2030. Estudio de la FAO. Roma: FAO; 2002.
- 2) Instituto de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. Expediente del Bioenraiz. La Habana: Registro Central de Fertilizante; 2002.
- 3) Pozo L. Los reguladores del crecimiento vegetal. Conferencia. La Habana: ICIDCA; 1998.
- 4) Armas T de, Ortega E, Rodás R. 1988. Fisiología vegetal. 262-272.
- 5) Environmental Protection Agency. Ecological Effects Test Guidelines 850.3020. Honey Bee Acute Contact Toxicity. /s.l./:. EPA; 1996.
- 6) Environmental Protection Agency. Microbiological Pesticide Test Guidelines 885.4380. Honey Bee Testing, Tier I. /s.l./:. EPA; 1996.
- 7) Environmental Protection Agency: Dunnet Program Version 1.5. Ecological Monitoring Research Division. Environmental Monitoring Systems Laboratory. Ohio: EPA; / s.a/.

Tablas

Tabla I. Grupos de tratamientos con sus respectivas concentraciones, dosis y volúmenes de aplicación.

| Grupo | Tratamiento | Concentración | Dosis | Volumen |
|---------------------|--------------------|----------------------|------------------------|-------------------------------------|
| experimental | | (mg/ L) | (µg/ abeja) | administrado (µL)/ abeja |
| 1 | Control negativo | 0 | 0 | 0 |
| 2 | Bioenraiz | 130 | 0.650 | 5 |

Tabla No. II. Requisitos para la aceptación de los ensayos de toxicidad aguda por contacto en abejas.

| <i>Estudio válido</i> | <i>Estudio no válido</i> |
|--|---|
| <i>Mortalidad del grupo control negativo $\leq 20\%$</i> | <i>Mortalidad del grupo control negativo $> 20\%$</i> |
| <i>Estudio de toxicidad aguda por contacto del Bioenraiz</i> <i>20 % mortalidad = 20 abejas muertas</i> | |
| <i>Mortalidad del grupo control negativo = 2 % (2 abejas muertas)</i> | |

Tabla No. III. Mortalidad en los diferentes tiempos de observación para cada grupo experimental, por réplicas.

| Grupos experimentales | Réplica | Tiempo (horas) | | | Total |
|----------------------------------|----------------|-----------------------|--------------|-------------|--------------|
| | | 4 | 24 | 48 | |
| 1 | 1 | 0/25 | 0/25 | 1/24 | 1/24 |
| | 2 | 0/25 | 0/25 | 0/25 | 0/25 |
| | 3 | 0/25 | 0/25 | 0/25 | 0/25 |
| | 4 | 0/25 | 0/25 | 1/24 | 1/24 |
| | Total | 0/100 | 0/100 | 2/98 | 2/98 |
| 2 | 1 | 0/25 | 0/25 | 0/25 | 0/25 |
| | 2 | 0/25 | 0/25 | 0/25 | 0/25 |
| | 3 | 1/24 | 0/24 | 0/24 | 1/24 |
| | 4 | 1/24 | 0/24 | 0/24 | 1/24 |
| | Total | 2/98 | 0/98 | 0/98 | 2/98 |

Recibida: 01/03/2007

Aceptada: 31/05/2007