

Toxicidad en peces de herbicidas formulados con glifosato Toxicity in fishes of herbicides formulated with glyphosate

Alvarez, Maria¹; Gimenez, Isabel T.²; Saitua, Hugo¹; Enriz Ricardo D.¹; Giannini Fernando A.^{1*}

¹Cátedra de Química General. Universidad Nacional de San Luis. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Chacabuco y Pedernera (5700) San Luis, Argentina. Tel.: 00-54-02664/4424689 int. 157. ²Cátedra de Bioestadística Aplicada, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis.

*fagian3@gmail.com

Recibido: 19 de octubre de 2011

Aceptado: 5 de marzo de 2012

Resumen. En nuestro país existe una gran extensión de hectáreas cultivadas con soja transgénica, la misma ha sido modificada genéticamente para soportar la acción de un herbicida denominado glifosato. Debido a la gran cantidad de formulaciones comerciales que incluyen glifosato es de importancia analizar el impacto ambiental producido por éstas.

La evaluación de la toxicidad aguda de dos herbicidas comerciales formulados con glifosato y de una solución del mismo; frente a peces de la especie *Poecilia reticulata* "lebitest" acusa que una de las soluciones produce mortalidad del 100 % de los especímenes a 100 µl/l (equivalente a 48 mg/l de principio activo); la otra a 50 µl/l (equivalente a 24 mg/l de principio activo) y la solución formulada con glifosato puro no produce mortalidad aún a concentraciones de 400 mg/l.

Utilizando dosis sub letales en función de los datos obtenidos en el ensayo de toxicidad aguda se determinó que a largo plazo especímenes de *Cyprinus carpio haematopterus* "carpa koi", manifestaron severas alteraciones hematológicas principalmente frente a una de las formulaciones evaluadas.

Palabras clave: Glifosato; Coadyuvantes; Peces; Toxicidad

Summary. Nowadays, transgenic soya, modified in order to withstand the impact of the herbicide glyphosate, in one of the main crops grown in Argentina. Due to the large number of commercial formulations that include this drug, is important to analyze both, the acute and chronic environmental impact that they cause. Here the acute toxicity of two commercial herbicides glyphosate-based toward the fish *Poecilia reticulata* "guppy" was evaluated and compared with pure glyphosate solutions. Interestingly, while commercial herbicides formulations induce a 100% of mortality at concentration ranged between 50 and 100 µl/l, the pure glyphosathe does not present mortality even at doses higher than 400 mg/l. When some long term effects toward *Cyprinus carpio haematopterus* "koi" were determined by using the sub-lethal doses already calculated it was demonstrated that one of the commercial herbicides induces severe haematological alterations.

Keywords: Glyphosate, Excipients, Fish, Toxicity

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial y desde el año 1984 se utiliza el concepto de "desarrollo sustentable", entendiéndose por esto a la vinculación del desarrollo con factores como los recursos humanos, la alimentación, las especies, los ecosistemas, la energía y la industria. En nuestro país desde hace ya bastante tiempo, investigadores del INTA y del CONICET han aconsejado plantear la producción agropecuaria en términos de agro ecosistemas mencionando la necesidad de no tratar el sistema agropecuario como algo separado del sistema ecológico.

La Argentina es un país productor y exportador de materias primas e insumos agrícolas siendo la soja uno de los más importantes.

Esta oleaginosa presenta en la actualidad un gran interés por ser un producto de gran valor económico. Gran parte de esta producción es exportada como grano, siendo los países asiáticos los principales compradores.

Para aumentar el rendimiento se emplean variedades transgénicas que son resistentes a un herbicida denominado glifosato, esto ha colaborado para que en ciertas regiones, el glifosato se transforme en un compuesto utilizado en forma extensiva con la finalidad de controlar las malezas durante el ciclo del cultivo de soja. Este empleo masivo y descontrolado ha ocasionado preocupación en las poblaciones urbanas respecto de los riesgos toxicológicos

de este plaguicida, especialmente en las áreas limítrofes con la zona rural.

El glifosato o N-(fosfonometil) glicina es una sustancia altamente soluble en agua (10.500 mg/l) con un tiempo de vida media en agua de entre 3,5 y 70 días. Su acción herbicida se debe a su capacidad para inhibir la 5-enolpiruvilshikimatofosfosintasa (Mallory-Smith y Ratzinger 2003), enzima que interviene en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en vegetales.

Además de este principio activo, las formulaciones contienen otras sustancias para aumentar su eficacia como el surfactante polioxietileno-amina (POEA); existiendo evidencias de que estos coadyuvantes son los principales responsables de las características tóxicas de los productos comerciales (Folmar y col. 1979; Domínguez Cortinas y col. 2008).

Los peces han sido utilizados desde hace mucho tiempo como modelos biológicos experimentales para medir el impacto ambiental de diferentes sustancias (Slooff y col. 1983; Ba-

llesteros y col. 2009; Lushchak y col. 2009). Puntualmente, nuestro grupo de trabajo los utiliza para evaluar la potencial toxicidad de diferentes noveles drogas de origen natural y/o sintético (Bisogno y col. 2007; Mascotti y col. 2008; Garibotto y col. 2010).

El objetivo de este trabajo ha sido determinar los efectos de la toxicidad aguda y crónica en peces de dos herbicidas comerciales formulados con glifosato y de una solución de glifosato puro. Para evaluar la toxicidad aguda se registró el parámetro "mortalidad" utilizando como modelo experimental *Poecilia reticulata* "lebetes" (Figura 1a); para el caso de la toxicidad crónica se utilizaron dosis subletales según resultados de la experiencia anterior y se evaluaron parámetros somáticos (factor de condición), histológicos (aspectos microscópicos de las branquias), biomarcadores bioquímicos (uremia y transaminasas) y hematológicos (hematocrito y extendidos) utilizando como modelo experimental *Cyprinus carpio haematopterus* "carpa koi" (Figura 1b).



Figura 1a. *Poecilia reticulata* "lebetes".



Figura 1b. *Cyprinus carpio haematopterus* "carpa koi".

MATERIALES Y MÉTODOS

Formulaciones y soluciones utilizadas

Se seleccionaron dos formulaciones comerciales de herbicidas, presentes en el mercado nacional, cuyo principio activo es glifosato. La formulación A es un herbicida utilizado en jardinería (Glacoxan®), por lo tanto de uso no extensivo; la formulación B es un herbicida de uso en agricultura (Round-Up®), por lo tanto extensivo; ambas fueron adquiridas en comercios de la provincia de San Luis y poseen una concentración del principio activo del 48% p/v. Con cada una de estas formulaciones se realizaron las correspondientes soluciones, diluyendo directamente las mismas en el agua que se les colocó a los peces. La solución C fue preparada con Glifosato puro STD (máxi-

ma pureza) 99,7% provisto por Monsanto Argentina. Se disolvieron 180 mg de principio activo en 300 ml de agua destilada para formar una solución madre, la cual se diluyó para realizar el ensayo.

Las características de estas soluciones se presentan en la *Tabla 1*.

Ensayos de toxicidad aguda

Se utilizó la técnica recomendada por la U.S. Fish and Wildlife Service (Johnson y Finley 1980) que ha sido modificada para utilizar una menor cantidad de compuestos a ensayar, según Mascotti y col. (2008). El efecto tóxico de los compuestos se evaluó en peces de la especie *Poecilia reticulata* "lebetes", criados en nuestro laboratorio, de 0,7 a 1 cm de largo y

Tabla 1. Características físico químicas de las formulaciones y soluciones evaluadas.

Propiedad	Herbicida A	Herbicida B	Solución C
Concentración de glifosato	48 % (480 g/l)	48 % (480 g/l)	0,6 % (6 g/l)
Principio activo Informado	Sal isopropilamina	Sal isopropilamina	glifosato
Excipientes	posee; no informado	POEA isopropilamina Ac. orgánicos	no posee
pH	5,5	6	7
Color	ambar	ambar	incolore
Transparencia	transparente	transparente	transparente

de 15 a 20 días de vida. Diez peces se expusieron a cada concentración del compuesto a ensayar, usando cinco concentraciones por cada prueba de toxicidad (en un rango de 100 µl/l a 6,25 µl/l). Las soluciones y los organismos se colocaron en un recipiente de 1 litro donde se mantuvieron hasta el final de las evaluaciones. Se contabilizó el número de organismos muertos en cada recipiente que se retiraron cada 24 hs. El porcentaje de mortalidad se evaluó cada 96 h. Se determinó para cada formulación comercial evaluada la mínima concentración de formulado que produjo el 100% de mortalidad (MC100%M) y la máxima concentración que no produjo mortalidad (MC0%M).

Ensayos de toxicidad crónica

Especímenes criados en cautiverio de *Cyprinus carpio haematopterus* "carpa koi" de 5-6 meses de vida fueron colocados en recipientes de 12 litros durante un período de 45 días. Se colocaron 2-3 especímenes por recipiente (relación de 1 espécimen por cada 4-6 litros de agua) y se mantuvieron a temperatura ambiente con aireación controlada y alimentación estandarizada. Cada grupo se expuso a dosis subletales considerando tales a la máxima concentración que no produjo mortalidad (MC0%M) en los ensayos de toxicidad aguda. Se utilizó además un grupo control no expuesto a ningún herbicida. Al finalizar el período de evaluación se determinaron los siguientes parámetros:

a- Variación del factor de condición (FC): se determinó según la expresión matemática: $FC = P/L^3$ donde P es el peso en gramos y L la longitud en cm. Las variables peso y longitud se determinaron con balanza electrónica y ca-

libre digital.

b- Parámetros bioquímicos: se utilizó un método enzimático específico para la determinación cuantitativa de urea en sangre (Uremia, Wiener) y un método colorimétrico para la determinación de la actividad de Transaminasa Glutámico Pirúvica (GPT) en suero utilizando kits enzimáticos comerciales (Transaminasas 200, Wiener).

c- Parámetros hematológicos (hematocrito) y estudio morfológico de las células sanguíneas por extendido:

c₁ - Hematocrito: se determinó por centrifugación de sangre heparinizada, en un tubo capilar, a 10.000 rpm durante cinco minutos.

c₂ - Extendidos: para la realización del extendido de sangre, ésta fue obtenida por lesión de las branquias. Se aplicó la coloración de May Grunwald-Giemsa, la cual se efectuó de la siguiente forma: a cada extendido se lo cubrió con el colorante May-Grunwald puro durante 3 minutos, luego se lo enjuagó con agua destilada 1 minuto y se lo cubrió con colorante de Giemsa diluido al décimo en agua destilada durante 90 minutos y finalmente se lo enjuagó con agua destilada.

d- Parámetros histológicos

Se evaluó el estado de las branquias por medio de imágenes microscópicas tomadas por fotografía digital inmediatamente después de haber sacrificado a los especímenes; las imágenes fueron tomadas con un microscopio Digital SuperEyes, Modelo A002.

En todos los casos los resultados obtenidos fueron comparados con los del grupo control.

Análisis estadísticos

Para los resultados de toxicidad aguda se aplicó el método *Chi* cuadrado para analizar y comparar las frecuencias entre los porcentajes de mortalidad provenientes de las tablas de toxicidad aguda de las soluciones A y B frente a peces.

Para las comparaciones entre las mínimas dosis que producen mortalidad del 100% y las máximas dosis que no produce mortalidad se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, ya que los resultados no se distribuyeron en forma normal.

Sobre los resultados de toxicidad crónica se aplicó una estadística no paramétrica, mediante los test de Kruskal Wallis y posterior comparación mediante el test de Dunn para un grado de significancia del 95%. Se utilizó el software estadístico Statistx 8.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Toxicidad aguda de las formulaciones A, B y C frente a peces

Se evaluaron concentraciones decrecientes de las dos formulaciones comerciales (A y B) partiendo de una concentración de 100 µl/l de la formulaciones comerciales y diluyendo las mismas hasta encontrar la concentración que no producía mortalidad. La solución de glifosato técnico pura (solución C) se evaluó a partir de una concentración de principio activo de 100 mg/l y se fue aumentando hasta 400 mg/l. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla 2*.

Se determinó que el herbicida B es, al menos, cuatro veces más tóxico que el herbicida A y que la solución del principio activo no resultó tóxica, aun a valores de hasta 400 mg/l; estos

Tabla 2. Toxicidad aguda de las formulaciones comerciales evaluadas y de la solución de sal técnica de glifosato.

Tubo	Concentración formulación (µl/l)	Concentración principio activo (mg/l)	Mortalidad 96 h (%)
A1	100	48	100
A2	50	24	0
B1	100	48	100
B2	50	24	100
B3	25	12	100
B4	12,5	6,25	0
C1	-	100	0
C2	-	200	0
C3	-	400	0
Control	-	-	-

A1: dilución inicial B1: dilución inicial

resultados concuerdan con estudios reportados que demuestran la implicancia de los excipientes de las formulaciones comerciales en los efectos de la toxicidad de las mismas (Servizi y col. 1987).

Análisis estadísticos

La diferencia en la toxicidad aguda frente a peces es altamente significativa entre las concentraciones de 100 µl/l y 50 µl/l para la solución preparada de la formulación A con un $P \leq 0,0001$.

Toxicidad crónica de las formulaciones A, B y C frente a peces

Muchos efectos tóxicos producidos por diversas sustancias sobre los organismos no se manifiestan de forma inmediata; pero son suficientes para modificar la biología de éstos llegando incluso a condicionar su posibilidad de sobrevivir. Estos efectos se pueden evaluar utilizando diferentes biomarcadores

Para analizar estos efectos fue necesario un cambio de modelo biológico experimental debido a la necesidad de disponer de especímenes de tamaño mayor para poder evaluar

los parámetros bioquímicos y hematológicos propuestos.

Variación del factor de condición (FC)

Este factor puede indicar el estado nutricional de los organismos y es útil para comparar y cuantificar numéricamente la condición o estado en que el pez se encuentra. En una primera etapa se determinó para cada espécimen su FC (FC día 0) y al finalizar la experiencia se

determinó nuevamente (FC día 45). Se determinaron cuantitativamente las diferencias obtenidas; los resultados se presentan en la *Tabla 3*. En líneas generales y observando los valores de FC al día 0 vs. día 45 pudo observarse que todos los individuos habían desmejorado su condición; estando en estas condiciones los del grupo control no se pudo atribuir este déficit a algún efecto de las soluciones, quizás se debió a variaciones individuales.

Tabla 3. Variación del FC en peces y de las variables que lo determinan al inicio y final de la experiencia.

Control						
Espécimen	Peso en g		Longitud en cm		FC	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
1	37,5	37,3	10,4	11,73	0,0333	0,0231
2	38,9	38,7	11,5	11,88	0,0255	0,0230

Solución A						
Espécimen	Peso en g		Longitud en cm		FC	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
1	19,37	19,54	8,05	8,129	0,0371	0,0363
2	41,05	38,10	11,25	12,1	0,0288	0,0215
3	13,88	14,67	7,6	8,121	0,0316	0,0273

Solución B						
Espécimen	Peso en g		Longitud en cm		FC	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
1	23,46	24,96	9,1	9,5	0,0311	0,0291
2	56,99	57,40	13,4	13,5	0,0236	0,0233

Solución C						
Espécimen	Peso en g		Longitud en cm		FC	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
1	36,86	34,59	11,2	11,7	0,0262	0,0215
2	46,27	45,41	12,6	13,9	0,0231	0,0169

Analizando un comparativo del parámetro peso se vio que en todos los casos disminuyó, contrario a lo que sucede con la longitud. Los valores de FC se analizaron mediante metodología indicada, no encontrándose diferencias significativas entre ellos para un grado de significación del 95%.

Parámetros bioquímicos (urea y GPT en sangre) y hematológicos

Los resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros bioquímicos se presentan en la *Tabla 4*.

Urea en sangre

La urea es el resultado final del metabolismo

de las proteínas. Se forma en el hígado y es eliminada por la orina o sistema excretor. Un aumento indica mal funcionamiento del sistema excretor y una disminución está asociada a una incorrecta absorción de nutrientes proteicos (Henry 1993).

Los resultados muestran que los grupos de especímenes sometidos a soluciones de herbicidas comerciales formulados con Glifosato (A y B) presentaron valores bajos de uremia, comparados con el grupo control; esto podría estar indicando una deficiente absorción fun-

Tabla 4. Parámetros hematológicos y bioquímicos obtenidos en peces luego de 45 días de exposición frente a las soluciones evaluadas.

Control			
Espécimen	Hematocrito	Uremia (g/l)	Transaminasa (U/l)
1	32 %	0,19	98
2	30 %	0,17	96
Solución A			
Espécimen	Hematocrito	Uremia (g/l)	Transaminasa (U/l)
1	20 %	0,091	101
2	21,5 %	0,082	108
Solución B			
Espécimen	Hematocrito	Uremia (g/l)	Transaminasa (U/l)
1	31 %	0,064	91
2	33 %	0,052	84
Solución C			
Espécimen	Hematocrito	Uremia (g/l)	Transaminasa (U/l)
1	24 %	0,17	104
2	24 %	0,21	129

damentalmente de las proteínas del alimento. El grupo sometido a la Solución C no presentó diferencias significativas respecto del grupo control.

Los valores de uremia se analizaron mediante la metodología indicada, encontrándose diferencias significativas entre los grupos de ensayo sometidos a las soluciones A y B versus el grupo control ($p \leq 0.001$). Por comparaciones posteriores por el test de Dunn se encontró que los valores correspondientes a la solución C no difirieron del control; pero si existieron diferencias entre los valores de la solución A y B respecto del control y fueron semejantes entre ellos.

Transaminasa glutámico pirúvica (GPT)

Las transaminasas son enzimas ampliamente difundidas en el organismo. La actividad sérica en condiciones normales es baja o nula. Una destrucción en los tejidos en los cuales están presentes conduce a un aumento en los niveles séricos. Puntualmente, la pirúvico transaminasa o GPT es una enzima utilizada para evaluar el funcionamiento hepático. Su concentración elevada en sangre le confiere cierta especificidad en el diagnóstico de daños tóxicos hepáticos (Ióvine Selva 1990)

Los resultados mostraron que no existieron diferencias significativas entre los grupos evaluados.

Los valores de transaminasa se analizaron mediante metodología indicada, no encontrándose diferencias significativas para un grado de significación del 95%.

Hematocrito

Es el porcentaje del volumen total de sangre compuesto de glóbulos rojos. Es una medición determinada por el tamaño y número de glóbulos rojos.

En los resultados se pudo observar cómo el valor de hematocrito disminuyó en presencia de la solución A y de la solución C; esto podría deberse a un mal funcionamiento en la génesis de glóbulos rojos.

Los valores de hematocrito se analizaron mediante la metodología indicada, encontrándose diferencias significativas. Por comparaciones posteriores por el test de Dunn se encontró que los valores correspondientes a la solución preparada con la formulación B no difirieron del control; pero si existieron diferencias entre los valores de la solución preparada con

la formulación A y la solución C respecto del control y fueron semejantes entre ellos.

Extendido de sangre

El estudio de la morfología y estructura de células sanguíneas ha sido utilizado e informado por diferentes autores como indicador de los efectos tóxicos de la acción de diversos herbicidas formulados con glifosato (Tolga y Konec 2007). Este estudio se realiza por medio de la observación microscópica de las preparaciones coloreadas, con el objetivo de distinguir estructuras citoplásmicas (generalmente de aspecto granular, como vacuolas y lisosomas) que por sus características bioquímicas se tiñen diferencialmente.

La *Figura 2* corresponde a extendidos de individuos sometidos a la solución A, donde se observaron eritrocitos con regular cantidad de vacuolas citoplásmicas siendo éstas indicadores de toxicidad hematológica. El resto de los grupos evaluados no presentó estas características, al igual que el grupo control.

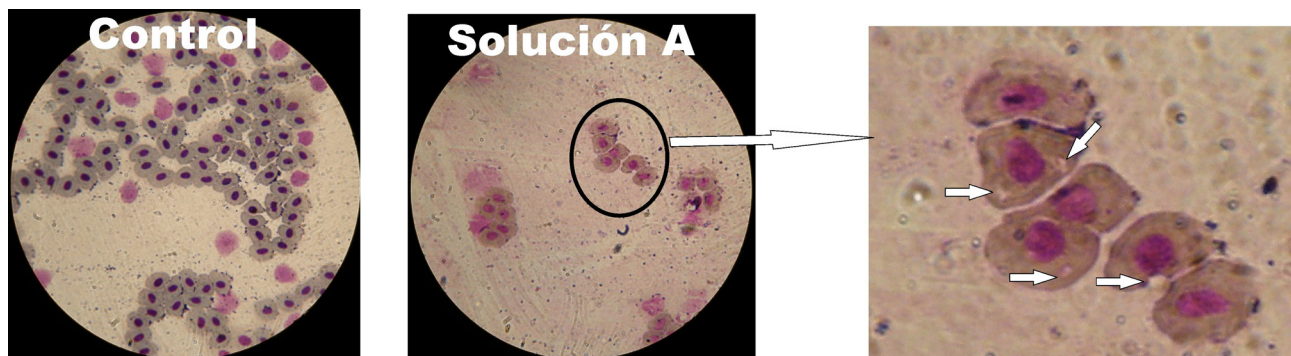


Figura 2. Extendidos del grupo control y del grupo sometido a dosis subletales de formulación A, presencia de vacuolas citoplásmicas indicada por las flechas.

Imágenes microscópicas de las branquias

Los efectos observados en células y tejidos constituyen un importante parámetro a ser considerado en la evaluación de un potencial tóxico sobre los organismos vivos (Fent 1996). Las características histopatológicas de algunos órganos como las branquias pueden reflejar condiciones ambientales y tiempos de exposición de los especímenes frente a determinados tóxicos (Schmalz y col. 2002). Las branquias de los peces están formadas por capilares a través de los cuales se produce el intercambio gaseoso que permite la respira-

ción de los peces. La histopatología de ella es un importante biomarcador, debido a que al estar en contacto directo y constante con el medio se considera un tejido vulnerable a la calidad del medio ambiente.

En la *Figura 3* se presentan imágenes seleccionadas de un individuo de cada grupo de ensayo. Se observan alteraciones importantes en las branquias del grupo sometido a la solución A, pudiendo observarse coágulos internos; estos no están presentes en el grupo sometido a la solución B, a la solución C ni en el grupo control.

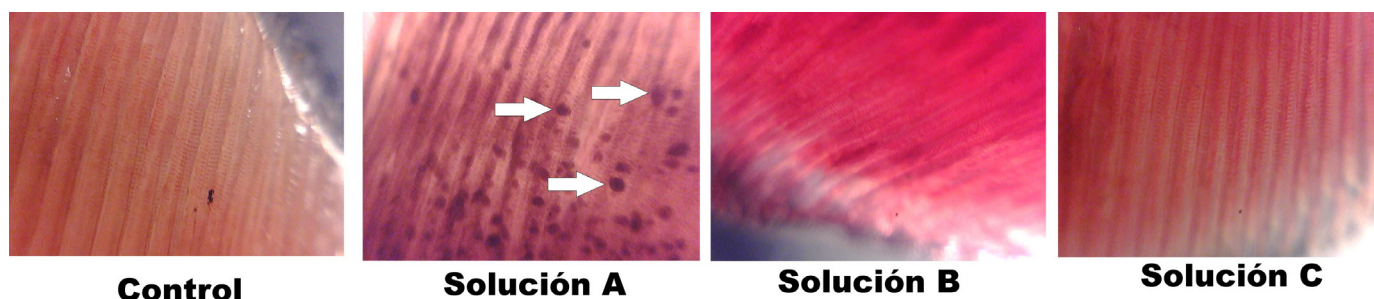


Figura 3. Imágenes de las branquias correspondientes a individuos de cada grupo evaluado, presencia de coágulos indicados por las flechas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad aguda demostraron que las formulaciones comerciales evaluadas son tóxicas aun a bajas concentraciones, siendo la formulación B la más tóxica, provocando un 100% de mortalidad aún a valores de 25 $\mu\text{l/l}$ de formulación comercial, equivalente a 12 mg/l de sal de glifosato. Se determinó también que, aún a concentraciones altas (hasta 400 mg/l), el glifosato puro no presentó estos efectos. En función del análisis comparativo de los valores de mortalidad obtenidos en el test utilizado queda demostrado que los excipientes juegan un rol fundamental en la toxicidad aguda.

Las dosis subletales también produjeron efectos tóxicos principalmente a nivel hematológico. Acusaron, además, alteraciones bioquímicas. La formulación A fue la que produjo mayores efectos en los parámetros mencionados. Esta misma solución fue la responsable de la formación de microcoágulos en las branquias (nivel histológico). La solución C no produjo alteraciones hematológicas e histológicas pero sí bioquímicas. Esto permite suponer que las dosis subletales de herbicidas formulados con glifosato tienen efectos a largo plazo, principalmente a nivel hematológico e histológico frente al modelo experimental utilizado.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Ballesteros M.L., Wunderlin D.A., Bistonía M.A. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotox. Environ. Safe.* 2009;72:199-205.

Bisogno F., Mascotti L., Sanchez C., Garibotto F., Giannini F., Kurina-Sanz M., Enriz R. Structure-antifungal activity relationship of related cinnamic acid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 2007;55 (26):10635-10640.

Domínguez Cortinas G., Mejía Saavedra J., Santos Medrano G.E., Martínez R.R. Analysis of the toxicity of glyphosate and Faena® using the freshwater invertebrates *Daphnia magna* and *Lecane quadridentata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2008;90(2):377-384.

Fent K. Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical Reviews in Toxicology.* 1996;26(1):3-10.

Folmar L.C., Sanders H.O., Julin A.M. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1979;8:269-278.

Garibotto F.M., Garro A.D., Masman M.F., Rodríguez A.M., Luiten P.G.M., Raimondi M., Zacchino S.A., Somlai C., Penke B., Enriz R.D. New small-size peptides possessing antifungal activity. *Bioorg. Med. Chem.* 2010;18:158-167.

Henry J.B. Diagnóstico y Tratamientos Clínicos. 9°ed. Nueva York: Masson- Salvat Medicina, 1993.

Ióvine Selva- Ióvine. El laboratorio en el diagnóstico de la enfermedad. 6° ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1990.

Johnson W.W., Finley M.T. Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates. Washington D.C.: United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service. Resource Publication 137, 1980.

Lushchak O.V., Kubrak O.I., Storey J.M, Storey K.B., Lushchak V.I. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish

tissues. *Chemosphere*. 2009;76:932-937.

Mallory-Smith C.A., Ratzinger E.J.Jr. Revised classification of herbicides by sites of action for weed resistance management Strategies. *Weed Technol.* 2003;17(3):605-619.

Mascotti M.L., Enriz R.D., Giannini F.A. Acute toxicity study of commercial antifungal drugs using *Poecilia reticulata*. *Lat. Am. J. Pharm.* 2008;27(6):904-905.

Schmalz W.F., Hernandez A.D., Weis P. Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Mar. Environ. Res.* 2002;54:539-542.

Servizi J.A., Gordon R.W., Martens D.W. Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, daphnia and trout. *Environ. Contam. Toxicol.* 1995;33:355 - 361.

Slooff W., De Zwart D., Van de Kerkhoff J. Monitoring the rivers rhine and meuse in the Netherlands for toxicity. *Aquat. Toxicol.* 1983;4(2):189-198.

Tolga C. Konen S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis.* 2007;22(4):263-268.