

Tesis Doctoral

# Ensayos ecotoxicológicos para la evaluación del impacto de plaguicidas en suelos agrícolas de Argentina

Piola, Lucas

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Piola, Lucas. (2011). Ensayos ecotoxicológicos para la evaluación del impacto de plaguicidas en suelos agrícolas de Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Piola, Lucas. "Ensayos ecotoxicológicos para la evaluación del impacto de plaguicidas en suelos agrícolas de Argentina". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

# **ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS PARA LA EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE PLAGUICIDAS EN SUELOS AGRÍCOLAS DE ARGENTINA**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área de Química Biológica

**Lucas Piola**

Director de Tesis: Dra. Eva M. Kesten

Director Asistente: Dra. Norma B. Casabé

Consejero de Estudios: Dra. Eva M. Kesten

Buenos Aires, 2011

# ENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS PARA LA EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE PLAGUICIDAS EN SUELOS AGRÍCOLAS DE ARGENTINA

## Resumen

Se estudió el impacto del uso de glifosato y clorpirifos en la estructura y función de suelos agrícolas de nuestro país, mediante bioensayos integrados laboratorio-campo, a través de una batería de biomarcadores, empleando un enfoque por niveles. Lombrices *Eisenia andrei* se seleccionaron como bioindicadores para ensayos de laboratorio. En estudios preliminares, éstas se expusieron a los plaguicidas en papel de filtro o suelo artificial (SA). Se optimizaron biomarcadores celulares/subcelulares, y parámetros de relevancia ecológica, que se aplicaron al monitoreo de suelos agrícolas, en cultivo de soja o trigo, rociados con los plaguicidas a las concentraciones recomendadas.

Algunos biomarcadores fueron sensibles a las bajas concentraciones de plaguicidas. Los ensayos de tiempo de retención del rojo neutro y Cometa fueron más sensibles al clorpirifos que los de reproducción y evasión. Estos últimos resultaron buenos indicadores del efecto de glifosato. La actividad alimentaria en laboratorio y campo presentó un patrón similar de respuesta.

Los bioensayos en SA suplementado con los plaguicidas a las concentraciones ambientales previstas mostraron una respuesta similar a la obtenida en campo, pudiendo resultar útiles para evaluar efectos de los plaguicidas en estos organismos no blanco. Se enfatiza la importancia de realizar ensayos laboratorio-campo en condiciones locales.

Palabras clave: Ecotoxicología del suelo, glifosato, clorpirifos, biomarcadores, *Eisenia andrei*, bioensayos de laboratorio, estudios de campo.

# ECOTOXICOLOGICAL ASSAYS FOR THE ASSESSMENT OF THE IMPACT OF PESTICIDES IN ARGENTINE AGRICULTURAL SOILS

## Abstract

We studied the impact of glyphosate and chlorpyrifos on structure and function of Argentine agricultural soils, through integrated laboratory-field bioassays. For assessing the ecotoxicological impact of both pesticides, a battery of biomarkers was studied, using a tiered approach. Earthworms *Eisenia andrei* were selected as bioindicator organisms in laboratory tests. In preliminary studies, they were exposed to both pesticides on filter paper and artificial soil (AS). Cellular/subcellular and ecologically relevant biomarkers were optimized. The selected biomarkers were applied for monitoring soya or wheat cultured agricultural soils, sprayed with the pesticides at recommended doses. Some biomarkers were responsive to the low concentrations of pesticides. Neutral red retention time (NRRT) and Comet assays were more sensitive to chlorpyrifos than reproduction and avoidance tests. The latter were good indicators of the presence of glyphosate. Laboratory and field feeding activity exhibited a similar pattern of response.

Bioassays on AS spiked with the pesticides at the predicted environmental concentrations showed a similar response to that obtained in the field, and may be useful to evaluate the effects of pesticides on these non-target organisms. We emphasize the relevance to perform laboratory-field bioassays in local conditions.

Keywords: Soil ecotoxicology, glyphosate, chlorpyrifos, biomarkers, *Eisenia andrei*, laboratory assays, field tests.

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta Tesis fue realizada con una beca de la Universidad de Buenos Aires y con una beca del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Fue financiada por los siguientes proyectos: UBACYT X208, CONICET PIP 5010, UBACYT X109.

Fue posible gracias a la ayuda y colaboración de muchas personas, sin las cuales nada de todo esto hubiera sido posible, aquí mi intento de agradecimiento.

A Eva, Norma y María Luisa, por su inmensa generosidad, por darle lugar a un biólogo en un laboratorio de químicos, por enseñarme todo lo que sé de toxicología y ecotoxicología; y por dirigirme, guiarme y ayudarme a lo largo de todos estos años.

A Silvana y Julio, gracias por su infinita colaboración durante los ensayos, por la ayuda en el campo y la escritura de esta tesis, y por todos los consejos que me dieron.

A todos en “Tóxico”, gracias por las charlas, los almuerzos, por funcionar y trabajar como una familia, con todo lo que eso implica.

A Rosana Giménez, Rubén Massaro y Juan Carlos Papa por su ayuda y guía en el campo.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y al Departamento de Química Biológica por permitirme el uso de las instalaciones y el equipamiento.

A Martín y Ayelén, gracias por la ayuda con todos los trámites, las charlas y por supuesto...por el fútbol.

Gracias a mis viejos y mis hermanos por el cariño, por enseñarme que el esfuerzo es la base de todo y por apoyarme siempre. Pa, gracias por mostrarme este camino desde chico, porque desde siempre supe lo bueno y lo malo que esta profesión tiene, por ser un modelo de científico y por los planetas dibujados en servilletas de papel. Ma, gracias por equilibrar mis intereses y por incentivar me siempre y porque el orgullo que veo en vos es la recompensa máxima. Ésto es para ustedes.

A vos Mer, gracias por todo el amor que me das, tu inmensa capacidad de comprensión, tu apoyo incondicional, por sacar lo mejor de mí y animarte a apostar una vez más. Ningún logro sería posible sin tu sostén.

A Tata, mi abuelo, la fuente de toda sabiduría, esa que no se enseña en los libros, la que se pasa de boca en boca con un vaso de vino en la mano.

A Blake, el Polaco, el Peluca, Macky, Lechu, Emi y Je mis amigos de toda la vida, por el rock, por el fútbol, el sostén impagable, los años de discusiones sin fin, por el futuro, porque mi vida sin ustedes no sería lo mismo y por seguir escuchando “che, vos que sos físico...” toda la vida.

A Rolando y Estela por aceptarme y dejarme formar parte de su familia... una vez más.

Gracias a Big Sur por darme un lugar para mi expresión, por dejarme seguir soñando con notas musicales.

A Basta de Todo por ser mi compañía en las interminables jornadas en el microscopio, y todas las otras también.

A todos los que pudiera estar olvidando, que de alguna manera me han ayudado durante estos años, gracias.

Los resultados de esta tesis figuran parcialmente en las siguientes publicaciones:

“Biomarkers for the assessment of chlorpyrifos effects on earthworms and on soil functional parameters”

Lucas Piola, Julio Fuchs, María Luisa Oneto, Silvana Basack, Rosana Gimenez, Rubén Massaro, Juan C Papa, Eva Kesten, Norma Casabé (2009). *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 44 (8), 874-880.

“Ecotoxicological Assessment of the Effects of Glyphosate and Chlorpyrifos in an Argentine Soya Field”.

Norma Casabé, Lucas Piola, Julio Fuchs, María Luisa Oneto, Laura Pamparato, Silvana Basack, Rosana Giménez, Rubén Massaro, Juan C Papa, Eva Kesten (2007). *Journal of Soils & Sediments*, 7 (4), 232-239.

“Efectos subletales en lombrices *Eisenia fetida andrei* expuestas a suelos agrícolas tratados con glifosato y clorpirifos”

Lucas Piola, Julio Fuchs, Silvana Basack, María Luisa Oneto, Laura Pamparato, Eva Kesten, Norma Casabé, (2009) *3º Libro SETAC LA* (Society of Environmental Toxicology and Chemistry-Latinoamérica).

“Impacto del uso de agroquímicos y en la actividad biológica de organismos del suelo”

Rosana Giménez, Rubén Massaro, Juan Carlos Papa, Julio Fuchs, Lucas Piola, Norma Casabé, María Luisa Oneto, Silvana Basack, Laura Pamparato, Eva Kesten, (2009) *3º Libro SETAC LA* (Society of Environmental Toxicology and Chemistry-Latinoamérica).

Además han sido presentados en 15 congresos nacionales e internacionales.

## ÍNDICE GENERAL

### Introducción

<b>1. EL SUELO Y SU PROTECCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LOS PLAGUICIDAS Y SU USO EN AGRICULTURA.....</b>	<b>1</b>
<b>3. EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE SUELOS CONTAMINADOS CON PLAGUICIDAS.....</b>	<b>3</b>
<b>4. LAS LOMBRICES COMO ORGANISMOS BIOINDICADORES.....</b>	<b>4</b>
4.1 Su distribución geográfica y clasificación.....	5
4.2 Las lombrices <i>Eisenia fetida</i> y <i>Eisenia andrei</i> .....	7
4.2.1 Aspectos básicos de la biología y ecología de lombrices.....	8
4.2.1.1 Sistemas y aparatos del organismo de las lombrices.....	10
<b>5. BIOMARCADORES.....</b>	<b>14</b>
5.1 Biomarcadores celulares/subcelulares evaluados.....	15
5.2 Biomarcadores de actividad biológica y comportamiento evaluados	16
<b>6 ARTICULACIÓN ENTRE BIOENSAYOS DE LABORATORIO Y A CAMPO...</b>	<b>17</b>
<b>7. LA PROBLEMÁTICA EN ARGENTINA.....</b>	<b>18</b>
<b>8. PLAGUICIDAS A USAR EN EL PRESENTE ESTUDIO.....</b>	<b>18</b>
8.1 Glifosato.....	20
8.1.1 Formulaciones del glifosato.....	21
8.1.2 Propiedades físico-químicas.....	23
8.1.3 Propiedades toxicológicas.....	25
8.1.4 Mecanismo de acción tóxica.....	26
8.1.5 Comportamiento ambiental.....	28
8.2 Clorpirifos.....	30

8.2.1 <i>Propiedades físico-químicas del clorpirifos</i> .....	31
8.2.2 <i>Propiedades toxicológicas</i> .....	34
8.2.3 <i>Mecanismo de acción</i> .....	35
8.2.4 <i>Comportamiento ambiental</i> .....	37
<b>HIPÓTESIS GENERAL</b> .....	40
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	40
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	40
<b>Materiales y Métodos</b> .....	43
<b>1. ORGANISMOS UTILIZADOS EN LOS BIOENSAYOS</b> .....	44
<b>2. PLAGUICIDAS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO DE TESIS</b> .....	45
2.1 <i>Clorpirifos</i> .....	45
2.2 <i>Glifosato</i> .....	45
<b>3. BIOENSAYOS DE EXPOSICIÓN</b> .....	46
3.1 <i>Exposición en papel</i> .....	46
3.2 <i>Exposición en suelo artificial (SA)</i> .....	47
3.3 <i>Evaluación de toxicidad letal de los plaguicidas: determinación de concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>)</i> .....	49
<b>4. PUESTA A PUNTO Y EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES SUBCELULARES</b> .....	50
4.1 <i>Implementación y validación de un método adecuado para la extracción de celomocitos de lombrices Eisenia andrei</i> .....	50
4.1.1 <i>Punción de la cavidad celómica</i> .....	50
4.1.2 <i>Extrusión por excitación eléctrica</i> .....	51
4.1.3 <i>Extrusión en un medio irritante</i> .....	52

4.2 Integridad de la membrana lisosomal: Tiempo de Retención del Rojo Neutro (TRRN).....	54
4.3 Daño al ADN: Ensayo Cometa (EC).....	55
4.4 Exposición de lombrices <i>Eisenia andrei</i> a papeles impregnados con concentraciones subletales de clorpirifos y glifosato para la evaluación de TRRN y Ensayo Cometa.....	58
4.4.1 Clorpirifos.....	58
4.4.2 Glifosato.....	58
4.5 Exposición de lombrices <i>Eisenia andrei</i> a suelo artificial tratado con clorpirifos y glifosato para evaluar TRRN y Ensayo Cometa.....	59
5. PUESTA A PUNTO Y EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y COMPORTAMIENTO.....	59
5.1 Ensayos de reproducción.....	59
5.2 Ensayos de comportamiento de “evasión”.....	60
5.3 Ensayos de “lámina cebo”.....	61
6. EXPOSICIÓN DE LOMBRICES <i>Eisenia andrei</i> A SUELO ARTIFICIAL TRATADO CON CLORPIRIFOS Y GLIFOSATO A CONCENTRACIÓN AMBIENTAL PREVISTA (PEC).....	65
7. ENSAYOS A CAMPO: APLICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES OPTIMIZADOS.....	66
7.1 Áreas de estudio.....	67
7.1.1 Oliveros.....	67

7.1.2 Colón.....	72
7.2 Preparación de los suelos en laboratorio.....	75
<b>8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>77</b>
<b>1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE CELOMOCITOS.....</b>	<b>78</b>
<b>2. BIOENSAYOS DE EXPOSICIÓN EN PAPEL.....</b>	<b>79</b>
2.1 Clorpirifos: Comparación entre producto técnico y formulado.....	79
2.1.1 Determinación de concentración letal 50 (CL <sub>50</sub> ).....	79
2.1.2 Ensayo del TRRN.....	79
2.1.3 Ensayo Cometa.....	80
2.2 Glifosato: Comparación entre diferentes formulaciones.....	83
2.2.1 CL <sub>50</sub> .....	83
2.2.2 Ensayo del TRRN.....	85
2.2.3 Ensayo Cometa.....	87
<b>3. BIOENSAYOS EN SUELO ARTIFICIAL.....</b>	<b>90</b>
3.1 Determinación de concentración letal 50 (CL <sub>50</sub> ): Clorpirifos – Glifosato.....	90
3.2 Estudios con clorpirifos y glifosato solos y en combinación.....	91
3.2.1 Ensayo del TRRN.....	91
3.2.2 Ensayo Cometa.....	92

<b>3.3 Exposición de lombrices <i>Eisenia andrei</i> a suelo artificial tratado con clorpirifos y glifosato a Concentración Ambiental Prevista (PEC) para evaluar distintos biomarcadores.....</b>	<b>95</b>
<b>3.3.1 Clorpirifos.....</b>	<b>95</b>
<b>3.3.1.1 Ensayo del TRRN.....</b>	<b>95</b>
<b>3.3.1.2 Ensayo Cometa.....</b>	<b>96</b>
<b>3.3.1.3 Ensayos de reproducción.....</b>	<b>98</b>
<b>3.3.1.4 Ensayos de evasión.....</b>	<b>99</b>
<b>3.3.1.5 Ensayos de lámina cebo.....</b>	<b>100</b>
<b>3.3.2 Glifosato.....</b>	<b>101</b>
<b>3.3.2.1 Ensayo del TRRN.....</b>	<b>101</b>
<b>3.3.2.2 Ensayo Cometa.....</b>	<b>102</b>
<b>3.3.2.3 Ensayos de reproducción.....</b>	<b>105</b>
<b>3.3.2.4 Ensayos de evasión.....</b>	<b>106</b>
<b>3.3.2.5 Ensayos de lámina cebo.....</b>	<b>107</b>
<b>4. ESTUDIOS CAMPO- LABORATORIO.....</b>	<b>108</b>
<b>4.1 Campaña Oliveros.....</b>	<b>108</b>
<b>4.1.1 Análisis químico de los plaguicidas.....</b>	<b>108</b>
<b>4.1.2 Bioensayos en laboratorio.....</b>	<b>109</b>
<b>4.1.2.1 Ensayo del TRRN.....</b>	<b>109</b>
<b>4.1.2.2 Ensayo Cometa.....</b>	<b>111</b>
<b>4.1.2.3 Ensayos de reproducción.....</b>	<b>113</b>
<b>4.1.2.4 Ensayos de evasión.....</b>	<b>114</b>
<b>4.1.2.5 Ensayos de lámina cebo.....</b>	<b>115</b>
<b>4.1.3 Ensayos en el campo.....</b>	<b>116</b>

4.1.3.1 <i>Descomposición de materia orgánica: Ensayos de lámina cebo</i> .....	116
4.1.3.2 <i>Abundancia relativa y diversidad de lombrices</i> .....	119
4.2 <i>Campaña Colón</i> .....	119
4.2.1 <i>Análisis químico de los plaguicidas</i> .....	119
4.2.2 <i>Bioensayos en laboratorio</i> .....	120
4.2.2.1 <i>Ensayo del TRRN</i> .....	120
4.2.2.2 <i>Ensayo Cometa</i> .....	121
4.2.2.3 <i>Ensayos de evasión</i> .....	123
4.2.2.4 <i>Ensayo de lámina cebo</i> .....	124
4.2.3 <i>Ensayos en el campo</i> .....	125
4.2.3.1 <i>Descomposición de materia orgánica: Ensayos de lámina cebo</i> .....	125
4.2.3.2 <i>Abundancia relativa y diversidad de lombrices</i> .....	128
<i>Discusión</i> .....	129
<b>1. BIOENSAYOS EN PAPEL</b> .....	130
1.1 <i>Clorpirifos: Comparación entre producto técnico y formulado</i> .....	131
1.1.1 <i>Toxicidad letal</i> .....	131
1.1.2 <i>Biomarcadores celulares/subcelulares</i> .....	132
1.2 <i>Glifosato: Comparación entre diferentes formulaciones</i> .....	134
1.2.1 <i>Toxicidad letal</i> .....	134
1.2.2 <i>Biomarcadores celulares/subcelulares</i> .....	135
<b>2. BIOENSAYOS EN SUELO ARTIFICIAL</b> .....	136
2.1 <i>Evaluación de CL<sub>50</sub>. Clorpirifos – Glifosato</i> .....	136
2.2 <i>Estudios con Glifosato y Clorpirifos, solos y en combinación</i> .....	138

2.3 Exposición suelo artificial (PEC) Glifosato-Clorpirifos.....	139
2.3.1 Biomarcadores celulares/subcelulares.....	139
2.3.2 Estudios de actividad biológica y comportamiento.....	140
2.3.2.1 Reproducción.....	141
2.3.2.2 Evasión.....	142
2.3.2.3 Descomposición de materia orgánica-Lámina cebo.....	144
<b>3. ESTUDIOS CAMPO- LABORATORIO.....</b>	<b>145</b>
3.1 Campaña Oliveros.....	146
3.1.1 Bioensayos en laboratorio.....	146
3.1.1.1 Ensayo del TRRN y Ensayo Cometa.....	146
3.1.1.2 Ensayo de reproducción.....	148
3.1.1.3 Ensayo de evasión.....	149
3.1.1.4 Descomposición de materia orgánica - Lámina cebo.....	150
3.1.2 Bioensayos a campo.....	151
3.1.2.1 Descomposición de materia orgánica.....	151
3.2 Campaña Colón.....	153
3.2.1 Bioensayos en laboratorio.....	153
3.2.1.1 Ensayo del TRRN y Ensayo Cometa.....	153
3.2.1.2 Ensayo de evasión.....	154
3.2.1.3 Ensayo de lámina cebo.....	154
3.2.2 Bioensayos a campo.....	155
<b>Conclusiones.....</b>	<b>158</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>162</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Venta de distintos formulados de glifosato en Argentina en el año 2009.....	22
<b>Tabla 2.</b> Estructura y Propiedades físico-químicas del glifosato.....	24
<b>Tabla 3.</b> Organismos potencialmente expuestos a glifosato y su ruta de exposición.....	25
<b>Tabla 4.</b> Toxicidad del glifosato en distintas especies .....	26
<b>Tabla 5.</b> Propiedades físico-químicas del clorpirifos.....	33
<b>Tabla 6.</b> Toxicidad del clorpirifos en distintas especies.....	34
<b>Tabla 7.</b> Componentes del suelo artificial.....	47
<b>Tabla 8.</b> Características físico-químicas del suelo artificial.....	48
<b>Tabla 9.</b> Análisis físico-químico de los suelos de Oliveros.....	68
<b>Tabla 10.</b> Análisis físico-químico de los suelos de Colón.....	72
<b>Tabla 11.</b> Comparación de métodos de extracción de celomocitos de <i>Eisenia andrei</i> .....	78
<b>Tabla 12.</b> Concentración letal 50 en <i>Eisenia andrei</i> expuestas a los formulados de glifosato ensayados.....	83
<b>Tabla 13.</b> Efectos del CPF PEC y 10 PEC sobre la reproducción de <i>Eisenia andrei</i> en suelo artificial.....	99
<b>Tabla 14.</b> Efectos del GLI PEC y 10 PEC sobre la reproducción de <i>Eisenia andrei</i> en suelo artificial.....	105
<b>Tabla 15.</b> Parámetros reproductivos de <i>Eisenia andrei</i> expuestas a suelos tratados con GLI y CPF.....	114

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución global de especies autóctonas e introducidas y exóticas dentro de las distintas familias de lombrices.....	5
<b>Figura 2.</b> Estrategias ecológicas de lombrices de suelo.....	7
<b>Figura 3.</b> Características generales externas de una lombriz de la familia <i>Lumbricidae</i> .....	9
<b>Figura 4.</b> Reproducción de lombrices.....	13
<b>Figura 5.</b> Biomarcadores de exposición a contaminantes tempranos y tardíos.....	14
<b>Figura 6.</b> Estructura molecular del glifosato.....	20
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de acción del glifosato en plantas.....	27
<b>Figura 8.</b> Degradación del glifosato en suelo.....	29
<b>Figura 9.</b> Estructura básica de los plaguicidas organofosforados.....	31
<b>Figura 10.</b> Estructura molecular del clorpirifos.....	32
<b>Figura 11.</b> Esquema de la hidrólisis de acetilcolina por acetilcolinesterasa (AChE) y la reacción del CPF oxón con AChE.....	36
<b>Figura 12.</b> Degradación del clorpirifos.....	38
<b>Figura 13.</b> Lombriz <i>Eisenia andrei</i> .....	45
<b>Figura 14.</b> Punción de la cavidad celómica de <i>Eisenia andrei</i> .....	51
<b>Figura 15.</b> Extrusión por excitación eléctrica en <i>Eisenia andrei</i> .....	52
<b>Figura 16.</b> Fluido celómico de <i>Eisenia andrei</i> .....	53
<b>Figura 17.</b> Ensayo de tiempo de retención de rojo neutro en celomocitos de lombriz <i>Eisenia andrei</i> .....	55
<b>Figura 18.</b> Ensayo cometa en celomocitos de <i>Eisenia andrei</i> . (A) célula sin daño; (B) célula con daño leve, clase 1; (C) célula con daño moderado, clase 2; (D) célula muy dañada, clase 3.....	57
<b>Figura 19.</b> Dibujo de una lámina de PVC y lámina con el cebo lista para utilizar.....	62
<b>Figura 20.</b> Láminas cebo en el laboratorio.....	63
<b>Figura 21.</b> Láminas en el campo formando matriz 4x4.....	64
<b>Figura 22.</b> Diseño de bloques campaña Oliveros.....	70
<b>Figura 23.</b> Parcela demarcada en el campo.....	71
<b>Figura 24.</b> Diseño de bloques campaña Colón.....	74
<b>Figura 25.</b> TRRN en celomocitos de lombrices <i>E. andrei</i> expuestas a distintas concentraciones de CPF formulado y técnico en papel durante 72 horas.....	80

<b>Figura 26.</b> Porcentaje de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de lombrices <i>Eisenia andrei</i> expuestas a distintas concentraciones de CPF técnico y formulado durante 72 horas.....	82
<b>Figura 27.</b> Índice de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de <i>Eisenia andrei</i> expuestas a distintas concentraciones de CPF técnico y formulado durante 72 horas.....	82
<b>Figura 28.</b> Variación de peso en lombrices <i>Eisenia andrei</i> expuestas a distintas concentraciones de tres formulados de GLI durante 72 horas.....	84
<b>Figura 29.</b> TRRN en celomocitos de lombrices <i>Eisenia andrei</i> expuestas a distintas concentraciones del formulado A (GLI FG) en papel durante 72 horas.....	86
<b>Figura 30.</b> TRRN en celomocitos de lombrices <i>Eisenia andrei</i> expuestas a distintas concentraciones del formulado C (Mon 8750) en papel durante 72 horas.....	86
<b>Figura 31.</b> Porcentaje de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de lombrices <i>Eisenia andrei</i> expuestas a distintas concentraciones de GLI Roundup FG en papel durante 72 horas.....	87
<b>Figura 32.</b> Índice de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de <i>Eisenia andrei</i> expuestas a distintas concentraciones de GLI Roundup FG en papel durante 72 horas.....	88
<b>Figura 33.</b> Porcentaje de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de lombrices <i>Eisenia andrei</i> expuestas a distintas concentraciones de GLI Mon 8750 en papel durante 72 horas.....	89
<b>Figura 34.</b> Índice de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de <i>Eisenia andrei</i> expuestas a distintas concentraciones de GLI Mon 8750 en papel durante 72 horas.....	89
<b>Figura 35.</b> TRRN en celomocitos de lombrices <i>Eisenia andrei</i> expuestas a distintas concentraciones de CPF y CPF + GLI en suelo artificial durante 14 días.....	92
<b>Figura 36.</b> Porcentaje de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de lombrices <i>Eisenia andrei</i> expuestas a distintas concentraciones de CPF y CPF + GLI en suelo artificial durante 14 días.....	93
<b>Figura 37.</b> Índice de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de <i>Eisenia andrei</i> expuestas a distintas concentraciones de CPF y CPF + GLI en suelo artificial durante 14 días.....	94
<b>Figura 38.</b> TRRN en celomocitos lombrices <i>Eisenia andrei</i> expuestas a CPF PEC y 10 PEC durante 7 días.....	96

<b>Figura 39.</b> Porcentaje de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de lombrices <i>Eisenia andrei</i> expuestas a CPF PEC y 10 PEC en suelo artificial durante 7 días.....	97
<b>Figura 40.</b> Índice de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de <i>Eisenia andrei</i> expuestas a CPF PEC y 10 PEC en suelo artificial durante 7 días.....	98
<b>Figura 41.</b> Evasión de <i>Eisenia andrei</i> en suelo artificial con CPF PEC y 10 PEC.....	100
<b>Figura 42.</b> Actividad alimentaria de <i>Eisenia andrei</i> en suelos con CPF PEC y 10 PEC en suelo artificial en el laboratorio.....	101
<b>Figura 43.</b> TRRN en celomocitos lombrices <i>Eisenia andrei</i> expuestas a GLI PEC y 10 PEC durante 7 días.....	102
<b>Figura 44.</b> Porcentaje de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de lombrices <i>Eisenia andrei</i> expuestas a GLI PEC y 10 PEC en suelo artificial durante 7 días.....	103
<b>Figura 45.</b> Índice de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de <i>Eisenia andrei</i> expuestas a GLI PEC y 10 PEC en suelo artificial durante 7 días.....	104
<b>Figura 46.</b> Evasión de <i>Eisenia andrei</i> en suelo artificial con GLI PEC y 10 PEC.....	106
<b>Figura 47.</b> Actividad alimentaria de <i>Eisenia andrei</i> en suelos con GLI PEC y 10 PEC en suelo artificial en el laboratorio.....	107
<b>Figura 48.</b> TRRN en celomocitos lombrices <i>Eisenia andrei</i> expuestas por 7 días a suelos tratados con GLI y CPF a $t_1$ y $t_2$ (1 y 10 días después de la siembra).....	110
<b>Figura 49.</b> TRRN en celomocitos de lombrices <i>Eisenia andrei</i> expuestas por 28 días a suelos tratados con GLI y CPF a $t_1$ y $t_2$ (1 y 10 días después de la siembra).....	111
<b>Figura 50.</b> Porcentaje de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de lombrices <i>Eisenia andrei</i> expuestas a suelos con GLI y CPF durante 7 días.....	112
<b>Figura 51.</b> Índice de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de <i>Eisenia andrei</i> expuestas a suelos con GLI y CPF durante 7 días.....	113
<b>Figura 52.</b> Ensayo de evasión. Distribución de <i>Eisenia andrei</i> en suelos tratados con GLI y CPF.....	115
<b>Figura 53.</b> Lámina cebo en laboratorio. Actividad alimentaria (3 días) de <i>Eisenia andrei</i> en suelos controles, y suelos tratados con GLI y CPF.....	116
<b>Figura 54.</b> Lámina cebo en campo. Actividad alimentaria (50 días) de macrofauna en controles, y suelos tratados con GLI y CPF.....	117

<b>Figura 55.</b> Lámina cebo en campo. Distribución vertical de agujeros vacíos en controles y suelos tratados con GLI y CPF.....	118
<b>Figura 56.</b> TRRN en celomocitos de <i>Eisenia andrei</i> expuestas por 7 días a controles y suelos tratados con dos dosis de CPF, 1 día y 14 días después de la aplicación del CPF.....	121
<b>Figura 57.</b> Porcentaje de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de lombrices <i>Eisenia andrei</i> expuestas a suelos tratados con dos dosis de CPF.....	122
<b>Figura 58.</b> Índice de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de <i>Eisenia andrei</i> expuestas a suelos tratados con dos dosis de CPF.....	123
<b>Figura 59.</b> Ensayo de evasión. Distribución de <i>Eisenia andrei</i> en suelos tratados con la mayor dosis de CPF.....	124
<b>Figura 60.</b> Lámina cebo en laboratorio. Actividad alimentaria (3 días) de <i>Eisenia andrei</i> en controles y suelos tratados con dos dosis de CPF.....	125
<b>Figura 61.</b> Lámina cebo en campo. Actividad alimentaria (14, 97 y 118 días) de macrofauna en controles, y suelos tratados con dos dosis de CPF.....	126
<b>Figura 62.</b> Lámina cebo en campo. Distribución vertical de agujeros vacíos en controles y suelos tratados con CPF DB y CPF DA.....	127

## ***Abreviaturas y algunas definiciones***

<b>%D</b>	porcentaje de daño
<b>AA</b>	actividad alimentaria
<b>ABPF</b>	agar de bajo punto de fusión
<b>AChE</b>	acetilcolinesterasa
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>AMPA</b>	ácido aminometil fosfónico
<b>ANMAT</b>	Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica
<b>APFN</b>	agar de punto de fusión normal
<b>CASAFE</b>	Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes
<b>CE</b>	concentrado emulsionable
<b>CE<sub>50</sub></b>	concentración efectiva 50: concentración que afecta al 50% de la población estudiada respecto a los controles, a lo largo de la duración del ensayo.
<b>CL<sub>50</sub></b>	concentración letal 50: concentración de una sustancia que provoca la muerte del 50% de los organismos testeados a lo largo de la duración del ensayo.
<b>CPF</b>	clorpirifos
<b>CRA</b>	capacidad de retención acuosa: capacidad del suelo de retener agua
<b>CYPs</b>	citocromo P450
<b>DA</b>	dosis alta
<b>DB</b>	dosis baja
<b>DL<sub>50</sub></b>	dosis letal 50: dosis de una sustancia que provoca la muerte del 50% de los organismos testeados a lo largo de la duración del ensayo.
<b>e.a.</b>	equivalente ácido
<b>EC</b>	Ensayo Cometa
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>EPSPS</b>	enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa
<b>FC</b>	fluido celómico
<b>GLI</b>	glifosato
<b>GT</b>	grado técnico
<b>ia</b>	ingrediente activo
<b>ID</b>	índice de daño

<b>INGEIS</b>	Instituto de Geocronología y Geología Isotópica
<b>IPA</b>	isopropilamina
<b>ISO</b>	International Organization for Standardization
<b>K<sub>oc</sub></b>	coeficiente de adsorción en carbono orgánico: describe la adsorción de una sustancia a las partículas del suelo comparado con lo que permanece disuelto en el agua. Una sustancia con alto K <sub>oc</sub> se adsorbe fuertemente al suelo.
<b>K<sub>ow</sub></b>	coeficiente de partición octanol/agua: describe el equilibrio de partición de una sustancia entre agua y octanol. Una sustancia con bajo K <sub>ow</sub> tiende a quedar en la fase acuosa.
<b>NOEC</b>	concentración de no efectos observados: la mayor concentración testada que no provoca efectos adversos observables significativos en los organismos testados, respecto de los controles.
<b>NPIC</b>	National Pesticide Information Center
<b>OECD</b>	Organization for Economic Cooperation and Development
<b>OPs</b>	organofosforados
<b>PBS</b>	buffer fosfato salino
<b>PEC</b>	concentración ambiental prevista
<b>POEA</b>	polietoxietilenamina
<b>PVC</b>	cloruro de polivinilo
<b>SA</b>	suelo artificial
<b>SENASA</b>	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
<b>TCP</b>	3,5,6-tricloro-2-piridinol
<b>TD<sub>50</sub></b>	tiempo para la desaparición del 50% de la sustancia
<b>TMP</b>	3,5,6-tricloro-2-metoxipiridina
<b>TRRN</b>	tiempo de retención de rojo neutro
<b>US EPA</b>	US Environmental Protection Agency
<b>WHO</b>	World Health Organization

# ***Introducción***

### **1. EL SUELO Y SU PROTECCIÓN**

El ecosistema terrestre constituye un recurso esencial de nuestro ambiente. Una de las principales funciones del suelo a nivel ecológico está relacionada con la descomposición de la materia orgánica y con la mineralización de nutrientes, producida por los invertebrados y microorganismos del suelo (Tarradellas *et al* 1997). La protección del suelo y sus comunidades resulta un objetivo primordial en las políticas ambientales en todo el mundo (Römbke *et al* 2005a; Filser *et al* 2008).

El incremento de la actividad agrícola demanda un mayor uso de plaguicidas, los cuales pueden afectar organismos no-blanco y provocar un daño irreversible en la estructura y función del ecosistema suelo (Muthukaruppan *et al* 2004; Reinecke y Reinecke 2007b). Estos compuestos, y a veces sus metabolitos, además de afectar los suelos pueden llegar a los cursos de agua, con potencial impacto sobre la salud humana y animal (Kördel y Römbke 2001, Römbke *et al* 2005b, Reinecke y Reinecke 2007b). Por estos motivos, el desarrollo de métodos para ensayar el potencial riesgo de los plaguicidas para la biota del suelo constituye un importante desafío actual (Schaefer 2003, Reinecke y Reinecke 2007a).

### **2. LOS PLAGUICIDAS Y SU USO EN AGRICULTURA**

La Agencia para la Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), define el término plaguicida como cualquier sustancia o mezcla de ellas destinada a prevenir, destruir, repeler o mitigar una peste. También puede ser descrito como cualquier agente físico, químico o biológico que puede matar una planta indeseable o plaga

## Introducción

---

animal. Es el nombre genérico de una variedad de agentes que usualmente se clasifican teniendo en cuenta su uso y/o el organismo blanco de su acción. Comprende a insecticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, larvicidas, moluscocidas, pediculicidas, rodenticidas, atrayentes (feromonas), defoliantes, reguladores del crecimiento, repelentes y esterilizantes.

En comparación con otros xenobióticos, los plaguicidas presentan algunas características específicas:

- son desarrollados para controlar organismos blanco, pero pueden presentar efectos colaterales en otros organismos de la biota;
- son aplicados directamente a los campos, teóricamente a las dosis recomendadas;
- muchos plaguicidas agrícolas son usados como compuestos formulados para optimizar sus efectos. Las propiedades de los formulados pueden diferir de las de los ingredientes activos; incluso el mismo plaguicida formulado de diferentes maneras puede producir distintos efectos ecotoxicológicos;
- en la práctica agrícola es común aplicar varios plaguicidas sucesivamente, o también como mezclas de compuestos. Los efectos de los compuestos individuales pueden o no ser comparables con los del programa completo de tratamiento: aplicaciones secuenciales de los plaguicidas pueden producir efectos diferentes de los del rociado simultáneo de la mezcla.

### **3. EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE SUELOS CONTAMINADOS CON PLAGUICIDAS**

Tradicionalmente, las evaluaciones de la calidad de los suelos se basaban en el análisis de parámetros físico-químicos. Cuando se evalúan los efectos biológicos adversos asociados con suelos contaminados con plaguicidas, resulta muy difícil, si no imposible, aislar e identificar los componentes químicos individuales que provocan impacto sobre los ecosistemas locales; por otra parte, los resultados de los ensayos dependen no sólo de las propiedades físico-químicas intrínsecas del plaguicida, sino también de su biodisponibilidad, modulada por las propiedades naturales y antrópicas del suelo (Römbke *et al* 2005a, Reinecke y Reinecke 2007a). También los estudios de biodiversidad y comunidad se han usado tradicionalmente para ensayar la calidad biológica del ambiente. Éstos proveen índices que reflejan el impacto de características ecológicas, factores de estrés y actividades antropogénicas. No obstante, los disturbios sólo pueden ser diagnosticados *a posteriori*, cuando los cambios se han vuelto significativos y ya pueden haber desaparecido un número de especies, lo cual disminuye la efectividad del enfoque ecológico (Vasseur y Cossu-Leguille 2003).

Las limitaciones planteadas llevan a la necesidad de un enfoque más prospectivo, basado en el estudio de los efectos biológicos de los xenobióticos sobre especies representativas (organismos bioindicadores) mediante ensayos de toxicidad en laboratorio, que puedan usarse para extrapolación a campo (Bierkens *et al* 1998, Vasseur y Cossu-Leguille 2003, Van Gestel y Weeks 2004, Jänsch *et al* 2006). Ante la más mínima alteración de las condiciones de su entorno, algunos seres vivos

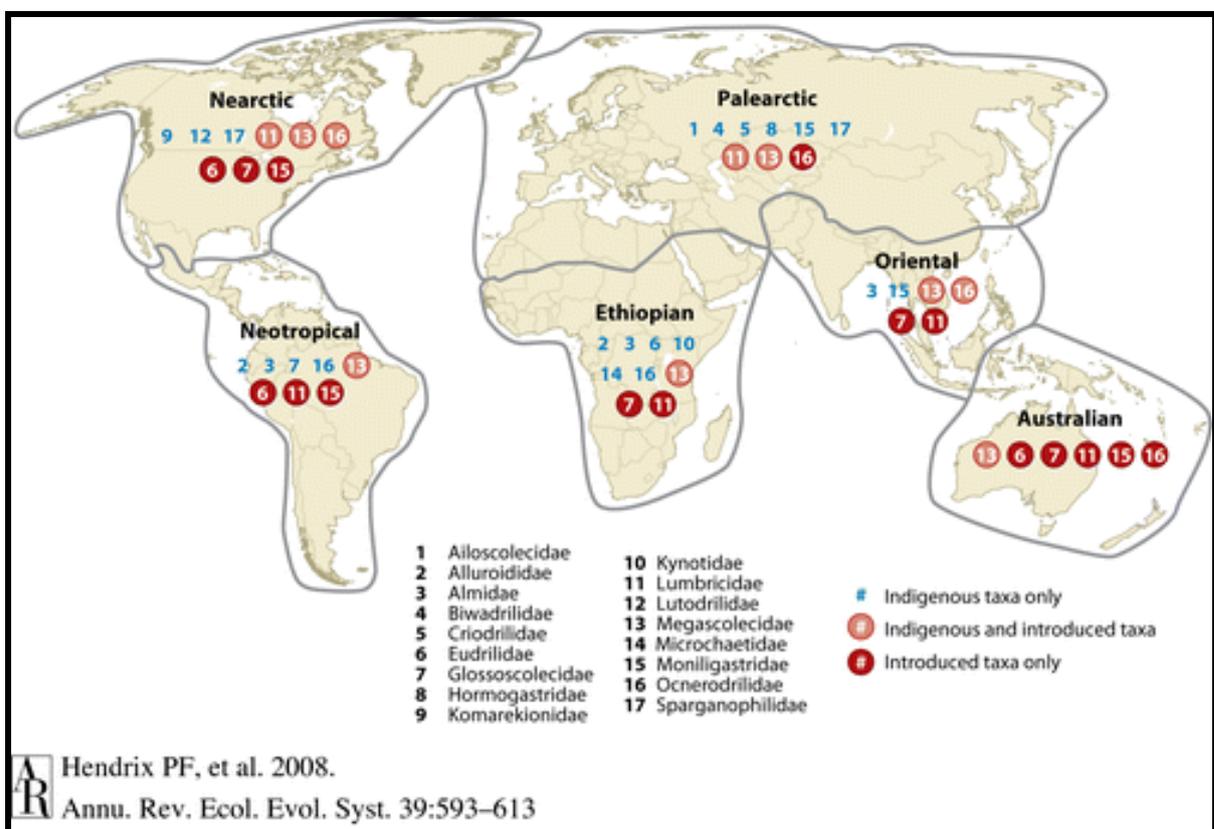
generan una determinada respuesta, cambiando sus funciones vitales y/o su composición química o genética, o incluso acumulando el agente contaminante, convirtiéndose estos organismos en posibles candidatos como bioindicadores.

#### **4. LAS LOMBRICES COMO ORGANISMOS BIOINDICADORES**

Los organismos del suelo juegan un rol crucial en agroecosistemas, por su participación en el ciclo geoquímico de los elementos y en el suministro de nutrientes a las plantas. Se debe prestar considerable atención a los efectos de las prácticas agrícolas en estos organismos. Entre ellos, las lombrices cumplen con un rol vital en los suelos; su utilidad para el mantenimiento de la salud del suelo fue ya resaltada por Darwin (1881). Por su contribución en procesos complejos como la incorporación y descomposición de materia orgánica, el ciclado de nutrientes y el desarrollo y mantenimiento de la estructura del suelo, pueden ser indicadores valiosos tanto de la contaminación como de la salud del suelo. Cuando las lombrices se entierran en el suelo crean galerías, túneles o macroporos de diversos tamaños, profundidades y orientaciones dependiendo de la especie y tipo de suelo. El diámetro de estas galerías o túneles tiende a ser similar al de las lombrices que los produjeron (Coleman *et al* 2004). Estos macroporos, que resultan estables pueden tener un rol en la infiltración de agua y en el transporte de solutos por el suelo. Además, las lombrices, son parte importante de la cadena alimentaria. Constituyen el principal componente del ecosistema suelo y son susceptibles a la acción de xenobióticos como los plaguicidas, cuyos efectos pueden sentirse a nivel de especie, población y comunidad (Edwards y Bohlen 1992, Paoletti 1999). Son ampliamente usadas como

organismos para evaluar contaminación y son consideradas indicadores sensibles del daño al ambiente (Römbke *et al* 2005c, Xiao *et al* 2006). Existe una gran diversidad y una amplia gama de adaptaciones a condiciones ambientales entre las lombrices (Fragoso *et al* 1999).

### 4.1 Su distribución geográfica y clasificación



**Figura 1.** Distribución global de especies autóctonas e introducidas o exóticas dentro de las distintas familias de lombrices (Hendrix *et al* 2008).

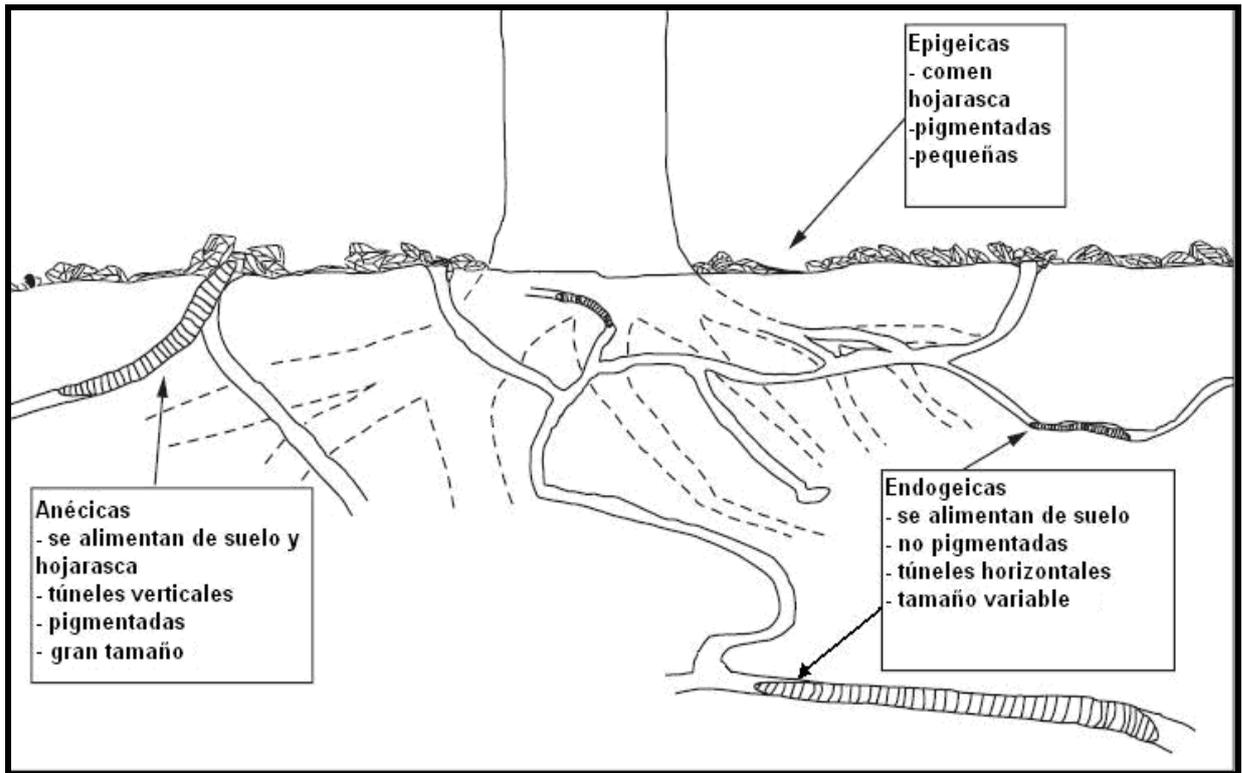
En muchas comunidades de lombrices pueden estar presentes especies exóticas invasoras (introducidas por las actividades humanas). Especies de la familia *Lumbricidae*, que son de origen europeo, se pueden encontrar dominando agroecosistemas en América (Fragoso *et al* 1999), constituyendo hasta el 92 % de la

## Introducción

---

biomasa de invertebrados del suelo (Enviroment Canada 2004). La figura 1 ilustra acerca de la distribución global de lombrices autóctonas y exóticas en las distintas regiones del planeta, de acuerdo con la clasificación zoogeográfica adoptada por Hendrix *et al* (2008).

Se suele agrupar a las lombrices en distintas categorías funcionales basadas en su morfología, su comportamiento, su alimentación y su microhábitat en el suelo. Las especies epigeicas habitan en la superficie y suelen preferir sustratos ricos en materia orgánica, alimentándose de la hojarasca que se encuentra en la superficie y capas superiores del suelo, ricas en carbono. Suelen ser de color rojo o marrón. Las especies endogeicas se ubican en suelos con contenido de carbono orgánico alto, medio y bajo, construyen túneles horizontales para poder alimentarse del suelo y generalmente son de colores pálidos, rosa, gris, verde o azules. Finalmente las especies anécicas son cavadoras de túneles verticales profundos, se alimentan de la hojarasca que se encuentra en la superficie, a la cual suben de noche, y la arrastran por sus túneles. Suelen ser las especies de mayor tamaño y generalmente son de color oscuro en el extremo anterior (rojo o marrón) y de colores pálidos en el extremo posterior (Storer 1951, Coleman *et al* 2004).



**Figura 2.** Estrategias ecológicas de lombrices de suelo (adaptado de Coleman *et al* 2004)

### 4.2 Las lombrices *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei*

Entre todas las especies de lombrices, *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei* son los organismos estándar más usados en ecotoxicología terrestre (OECD N° 207 1984; ISO 11268-1 1993, ISO 11268-3 1999). Dentro de las ventajas que presentan estas especies, está la facilidad con que se pueden criar en el laboratorio y el hecho de que se cuenta con una extensa base de datos sobre los efectos que en ellas producen numerosas sustancias químicas.

Las lombrices *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei*, conocidas también como lombrices del compost, pertenecen al phylum *Annelida*, clase *Clitellata*, subclase *Oligochaeta*, orden *Haplotaxida*, superfamilia *Lumbricoidea*, familia *Lumbricidae*. Originarias de la región Paleártica, tienen distribución mundial, en hábitats con clima favorable. Por su

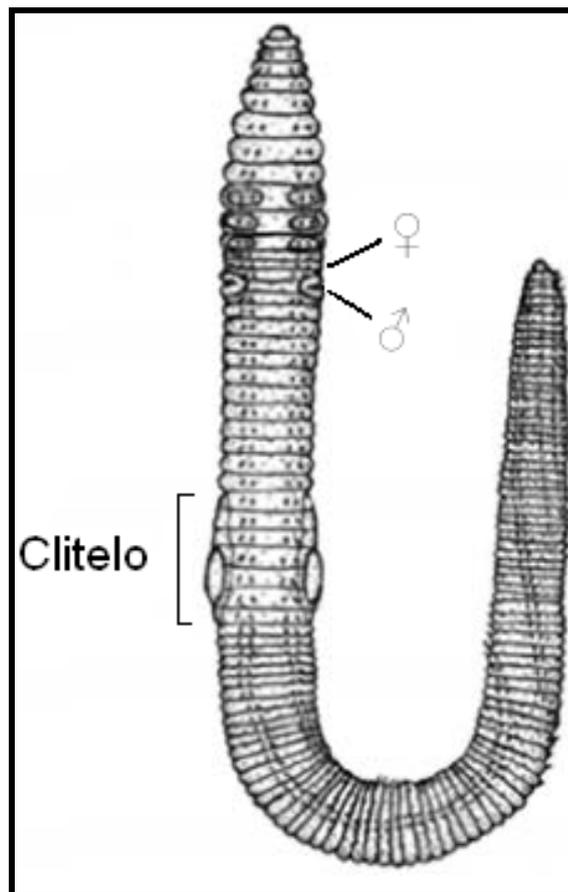
distribución poblacional en el suelo, se las considera epigeicas, ya que suelen encontrarse en las capas superiores (Storer 1951).

*Eisenia fetida* y *Eisenia andrei*, históricamente consideradas como subespecies, han sido diferenciadas como dos especies distintas, difíciles de reconocer a partir de la coloración o las bandas presentes en los segmentos por parte de los taxónomos especialistas, pero con evidencias bioquímicas, genéticas, espectroscópicas y reproductivas que apoyan esta diferenciación (Environment Canada 2004, Pérez-Losada *et al* 2005).

### **4.2.1 Aspectos básicos de la biología y ecología de lombrices**

Las lombrices son organismos de cuerpo blando y segmentado. En general el cuerpo de las lombrices podría esquematizarse como un tubo dentro de otro tubo, constituyendo el tubo externo el cuerpo propiamente dicho y funcionando el tubo interno como canal alimentario (Coleman *et al* 2004).

Lombrices *Eisenia fetida/andrei* adultas pueden medir entre 35 – 130 mm, presentando su cuerpo entre 80 y 110 segmentos (Figura 3).



**Figura 3.** Características generales externas de una lombriz de la familia *Lumbricidae* (Coleman *et al* 2004)

En ejemplares adultos puede observarse un engrosamiento en la parte anterior del animal, que recibe el nombre de clitelo. Se trata de un área glandular más o menos amplia, en forma de anillo completo, que abarca un número determinado de segmentos contiguos (de dos a varias decenas). Esta área glandular no es visible durante toda la vida del animal, ya que se desarrolla cuando la lombriz alcanza la madurez sexual o en los períodos reproductivos. Su función está relacionada con la reproducción e interviene tanto en la unión de los individuos durante el apareamiento (mediante la secreción de moco), como en la formación del cocón, capullo que contiene los huevos fecundados, y la elaboración de los fluidos que van a nutrir los huevos de su interior.

### **4.2.1.1 Sistemas y aparatos del organismo de las lombrices**

#### *Canal alimentario*

El suelo y la materia orgánica particulada ingresan por la boca en un extremo de la lombriz, pasando luego a través de la faringe hacia el esófago. El resto del canal alimentario consiste en intestino y ano (Coleman *et al* 2004). Digieren la materia nutritiva presente en el suelo y depositan los restos en la superficie o en galerías o túneles.

#### *Respiración*

Las lombrices carecen de sistema respiratorio organizado, la respiración ocurre a través de la piel. Una capa acuosa superficial actúa como los alvéolos humanos, en ella se disuelven los gases antes de ser transportados a la sangre. Las lombrices carecen de la capacidad de mantener su temperatura corporal constante (Krüger 1952, Johnson 1942, Storer 1951).

#### *Sistema nervioso*

Las lombrices poseen un ganglio suprafaríngeo, desde donde se extiende el cordón nervioso ventral. A partir de éste se desprenden nervios laterales formando una red neuronal local en cada segmento (Edwards y Lofty 1977; Storer 1951). Además, poseen un sistema nervioso entérico, dentro de la pared del intestino. Las sinapsis son más simples que las de vertebrados, pero esencialmente funcionan de manera similar.

## Introducción

---

### *Musculatura*

Las cerdas que tienen a los lados del cuerpo les sirven de gran ayuda en sus movimientos. El sistema muscular consiste en una serie de fibras externas circulares o transversas de músculo, que rodean el cuerpo, y una serie interna de fibras musculares longitudinales que sirven para mover las cerdas.

### *Aparato circulatorio*

El aparato circulatorio está formado por un vaso sanguíneo dorsal prominente y cuando menos cuatro vasos sanguíneos ventrales, que recorren de forma longitudinal el cuerpo y están conectados entre sí a intervalos regulares por medio de una serie de vasos transversales. El vaso dorsal está equipado con válvulas y es el verdadero corazón. No obstante, el bombeo de la sangre se produce sobre todo por movimientos musculares generales.

### *Excreción*

Cada segmento de la lombriz posee un par de estructuras tubulares, los nefridios, que le permiten excretar los desechos del fluido celómico a través de poros dorsales en la pared celular. Este fluido contiene diversos tipos de celomocitos: basófilos, acidófilos, neutrófilos, granulocitos y cloragógenos, que están relacionados con el sistema inmune de la lombriz. Los celomocitos remueven los desechos por fagocitosis y los depositan en el fluido celómico para su excreción (Storer 1951). No todos los desechos nitrogenados son excretados por los nefridioporos, algunos se eliminan con mucus a través de la pared del cuerpo. Estas secreciones sirven como revestimiento para los túneles que forman las lombrices (Edwards y Lofty 1977).

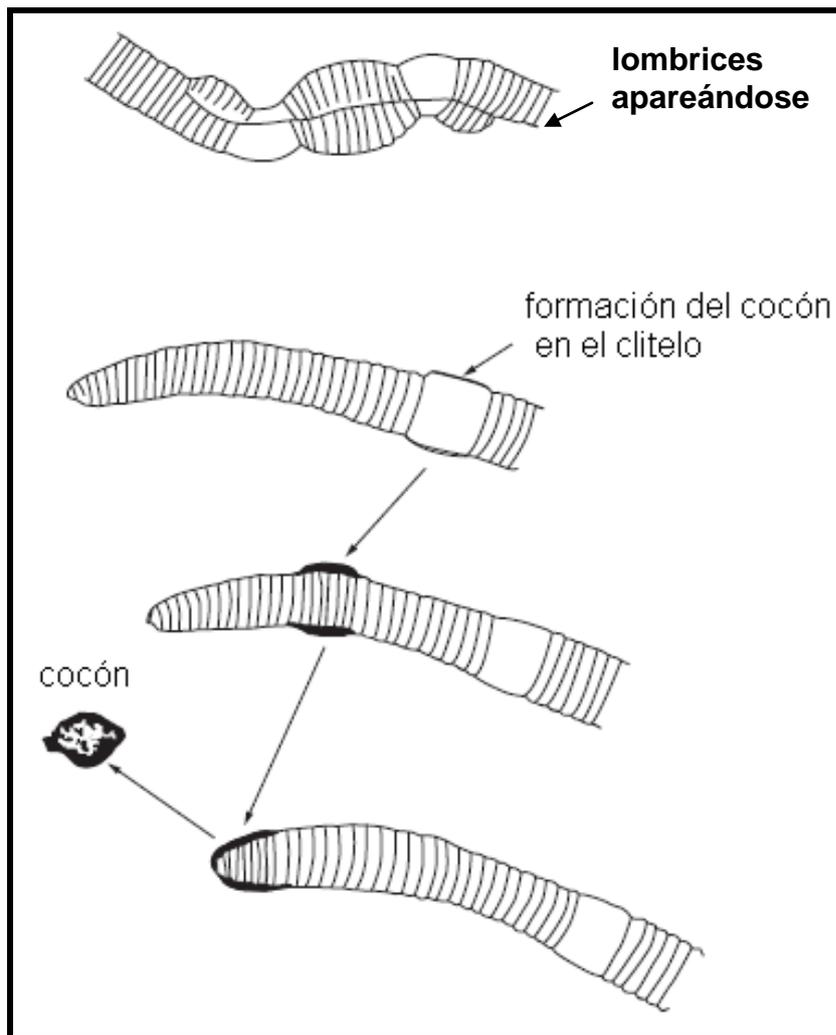
## Introducción

---

Algunos metales pueden acumularse en los nefridios de las lombrices (Prinsloo *et al* 1999).

### *Reproducción*

Las lombrices son hermafroditas, todos los individuos presentan órganos reproductivos masculinos y femeninos (testículos, ovarios y estructuras asociadas). Cuando se produce la cópula entre dos lombrices, ambas intercambian fluido seminal. Cada lombriz coloca los espermatozoides (que salen de sus vesículas seminales) en las espermatecas de la compañera. Una vez terminado el intercambio se separan. Los espermatozoides recibidos quedan latentes hasta el momento de la fertilización. Sobre el clitelo de ambas se forma una especie de capullo (cocón), formado por células mucosas. Una veintena de huevos se deslizan por un surco hacia atrás y se introducen en el cocón. Dentro de una galería, la lombriz se mueve hacia atrás haciendo que el cocón se deslice hacia delante, arrastrando en el camino los espermatozoides expulsados por los poros seminales. Cada capullo contiene entre tres y veinte huevos fecundados y contiene albúmina que alimenta a los huevos durante la incubación, periodo que dura entre 14 y 30 días según la temperatura del medio, tardando la lombriz entre 60 y 90 días en lograr su maduración y estar en condiciones de acoplarse (Coleman *et al* 2004, Storer 1951).

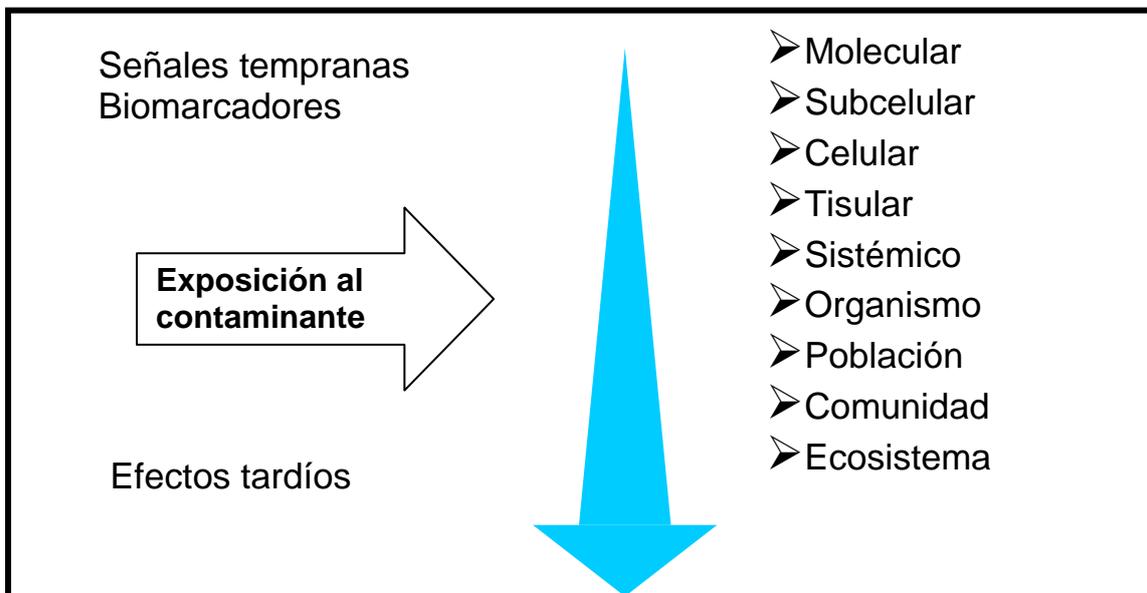


**Figura 4.** Reproducción de lombrices (adaptado de Coleman *et al* 2004)

El ciclo de vida de *Eisenia sp* puede extenderse hasta 4 o 5 años en laboratorio, aunque en la naturaleza es raro que vivan por tanto tiempo. Alcanzan la madurez sexual a partir de los primeros 2 meses de vida. En un estudio realizado por Tripathi y Bhardwaj (2004), *E. fetida* produjeron un promedio de nueve cocones por mes, y los huevos fertilizados dieron lugar a individuos adultos en un término de 4 meses.

### 5. BIOMARCADORES

Uno de los instrumentos metodológicos más desarrollados por los nuevos enfoques está representado por los biomarcadores, parámetros biológicos que reflejan cambios inducidos por xenobióticos en componentes o procesos celulares o bioquímicos, estructuras o funciones, medibles en sistemas biológicos. De acuerdo con esta definición, los biomarcadores describen efectos inducidos por diferentes estresores ambientales a cualquier nivel de organización biológica, desde nivel celular/ subcelular hasta ecosistema (Colgan *et al* 2003) (Figura 5). Al integrar los efectos de todos los polucionantes biodisponibles, pueden dar una información adicional sobre posibles efectos dañinos, que no puede ser obtenida a partir de los niveles de residuos químicos (Bierkens 1998; Radix *et al* 2000; Vasseur y Cossu-Leguille 2003).



**Figura 5.** Esquema secuencial de respuestas de distintos niveles a la exposición a un contaminante (van de Oost *et al* 2003)

En la práctica, el término biomarcadores es muchas veces usado en un sentido más restrictivo, como cambios bioquímicos a nivel suborganismo. A este nivel, las respuestas son más rápidas, sensibles, y relativamente más fáciles de interpretar, mientras que a mayores niveles el período de latencia es mayor. La evaluación de respuestas en los primeros niveles de la cadena de eventos puede resultar de utilidad como indicadores tempranos de perturbación en individuos y poblaciones (Arnaud *et al* 2000, Vasseur y Cossu-Leguille 2003).

### **5.1 Biomarcadores celulares/subcelulares evaluados**

La labilidad de la membrana lisosomal es uno de los parámetros más integradores para monitorear el impacto aditivo de los contaminantes ambientales sobre las funciones celulares. La evaluación de dicha estabilidad en celomocitos de lombrices puede realizarse por la medición del tiempo de retención del rojo neutro (TRRN), ensayo basado en la incorporación del compuesto lipofílico rojo neutro. Los lisosomas tienden a liberar hacia el citosol el colorante retenido, confiriéndole una tonalidad rosada. El tiempo al cual se pone de manifiesto este fenómeno depende de la integridad de la membrana, por lo tanto un mayor nivel de estrés se corresponde con un menor TRRN (Svendsen *et al* 2004).

Por otro lado, para evaluar daño genético, la electroforesis alcalina de células aisladas en gel de agarosa o “Ensayo Cometa” es un procedimiento de elevada sensibilidad, con el que se puede determinar la frecuencia de roturas de simple cadena y sitios modificados en el ADN, en células expuestas a la acción de un agente contaminante genotóxico (Tice *et al* 2000).

### 5.2 Biomarcadores de actividad biológica y comportamiento

Para determinar el impacto de los contaminantes sobre poblaciones expuestas a campo, es importante vincular las respuestas a nivel organismo/suborganismo con efectos a mayores niveles de organización biológica, empleando parámetros ecológicamente relevantes, de actividad biológica y comportamiento.

Concentraciones de compuestos químicos que no producen mortalidad, pueden ocasionar consecuencias adversas en la reproducción y una reducción más tardía de la densidad poblacional. Por ejemplo, la tasa y la viabilidad de cocones podrían verse afectados por la exposición a plaguicidas (Yasmin y D'Souza 2010). Sin embargo, a pesar de que se ha establecido ampliamente una correlación entre el éxito reproductivo y la calidad ambiental, en nuestro estado actual de conocimiento, en general no se ha demostrado una relación mecanística directa entre la exposición a sustancias químicas y puntos finales subletales del ciclo de vida.

Por otro lado, las lombrices, ricas en quimiorreceptores, responden a los estímulos químicos ambientales y pueden emigrar de hábitats adversos, con la consecuente pérdida de sus funciones benéficas para el suelo (Reinecke *et al* 2002). En este sentido acciones observables o medibles tales como las reacciones de un organismo (por ejemplo, movimientos, conducta alimentaria) en respuesta a un estímulo que proviene de su entorno (medio ambiente) pueden proveer técnicas promisorias, que aún requieren estandarización (Hund-Rinke *et al* 2003, Knacker *et al* 2003).

### **6 ARTICULACIÓN ENTRE BIOENSAYOS DE LABORATORIO Y A CAMPO**

Los ensayos de toxicidad empleando organismos indicadores, en condiciones controladas de laboratorio, constituyen un primer acercamiento para la evaluación del riesgo de plaguicidas en el compartimiento suelo (Environment Canada 1999). Sin embargo, cuando se compara el estrés por plaguicidas en organismos del suelo en condiciones de campo y laboratorio, los efectos a campo en algunos casos parecen ser menos serios debido a que otras influencias ecológicas pueden enmascarar las ecotoxicológicas. La toxicidad de los plaguicidas en los organismos depende de su biodisponibilidad. En general, la biodisponibilidad de los contaminantes del suelo suele ser más baja en los suelos de campo que en los contaminados en laboratorio, debido a un mayor tiempo de contacto y a un aumento de la adsorción de los tóxicos en las condiciones de campo. También puede ocurrir lo contrario, posiblemente como resultado de efectos indirectos. Además de la aplicación de plaguicidas, otras actividades como diferentes métodos de labranza y fertilización, han influenciado dramáticamente el ecosistema suelo. En condiciones de no labranza (siembra directa), las capas del suelo están más diferenciadas, el mayor contenido de carbono orgánico se encuentra a menudo cerca de la superficie, los residuos de las plantas permanecen en la superficie del suelo por un tiempo y pueden ser contaminados directamente por los plaguicidas.

Por estas razones es conveniente evaluar el efecto de xenobióticos usando una estrategia con niveles de complejidad y relevancia ecológica en aumento. Los ensayos ecológicos a campo como la determinación de biomasa y abundancia de lombrices (Suthar 2009, Paoletti 1999), de evasión y de descomposición de materia

orgánica (Hund-Rinke *et al* 2003; Knacker *et al* 2003) como herramienta para la evaluación de ambientes rurales, deben complementar los ensayos en laboratorio (Kördel y Römbke 2001, Römbke *et al* 2005a, Reinecke y Reinecke 2007a).

### **7. LA PROBLEMÁTICA EN ARGENTINA**

En nuestro país existe preocupación por la conservación de la función hábitat de los suelos (Taboada *et al* 1998, Stadler 1998). Sin embargo, hasta el momento el desarrollo científico experimental de biomarcadores y puntos finales ecológicos aplicados a la protección del recurso suelo es escaso. Hay pocos trabajos que evalúen el riesgo potencial del uso de agroquímicos en condiciones locales. Por estos motivos se consideró relevante plantear un trabajo de tesis orientado hacia el desarrollo y evaluación de herramientas para estudiar los efectos nocivos de distintos plaguicidas de uso extensivo en agroecosistemas de nuestro país, mediante la articulación de bioensayos en laboratorio y a campo.

### **8. PLAGUICIDAS A USAR EN EL PRESENTE ESTUDIO**

Dada la importancia económica de los cultivos de soja y trigo en suelos agrícolas de la región pampeana, se seleccionaron para este trabajo de tesis dos plaguicidas empleados frecuentemente en estos cultivos. A partir de la introducción de la soja transgénica RR en la Argentina en 1997, la producción de este cultivo aumentó rápidamente, con cosechas crecientes cada año. Esta expansión se acompañó con una aplicación aumentada de plaguicidas como el glifosato (GLI), que es usado intensamente para el control de malezas durante el ciclo de crecimiento de dicho

## Introducción

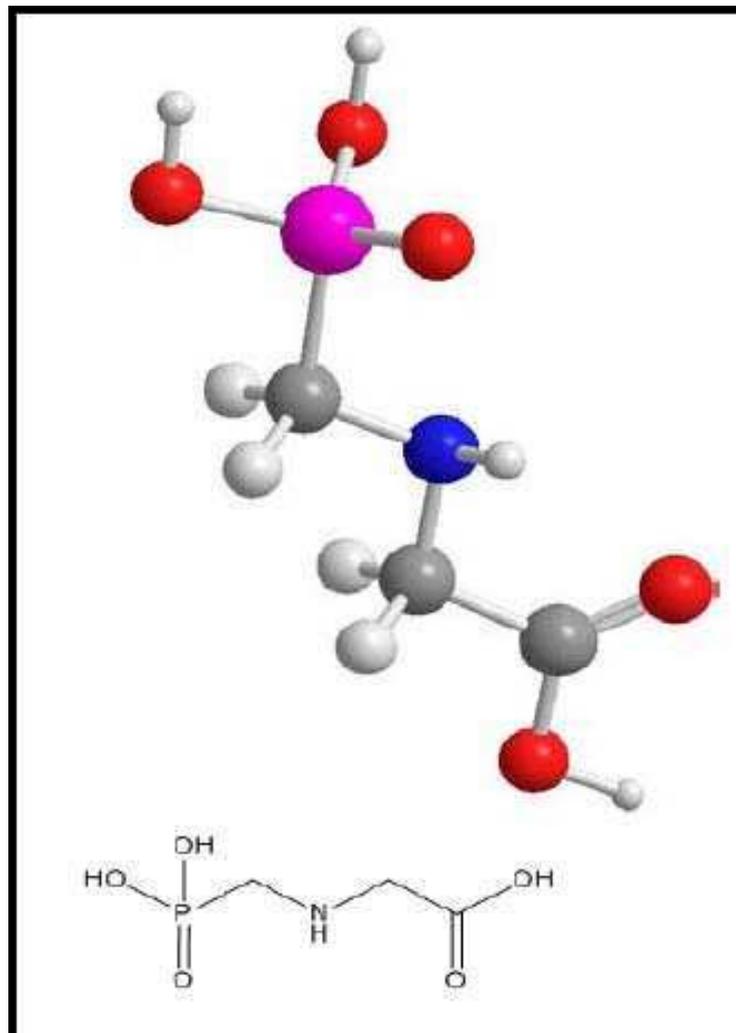
---

cultivo; o como barbecho químico. En general se ha considerado al GLI de bajo impacto ambiental (Williams *et al* 2000), aunque este punto de vista comenzó a discutirse hace ya algunos años (Arregui *et al* 2004, Marc *et al* 2005). Por otro lado, algunos insecticidas organofosforados como el clorpirifos (CPF) se siguen usando en nuestro país para combatir plagas agrícolas; se emplearon 7,5 millones de kilos en 2009, según la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes de Argentina (CASAFE). Existen diversos antecedentes de efectos negativos de plaguicidas organofosforados sobre ecosistemas (Lajmanovich *et al* 2004, Reinecke y Reinecke 2007b). Glifosato y clorpirifos son plaguicidas utilizados en sistemas bajo siembra directa en Argentina y alrededor del mundo, tanto en aplicaciones individuales como sus mezclas, y sus aplicaciones intensivas podrían producir daño irreversible sobre el agroecosistema (Jergentz *et al* 2005, Marc *et al* 2005, Sandahl *et al* 2005, Micucci y Taboada 2006).

Como parte de este trabajo de tesis, se realizaron ensayos integrados laboratorio-campo en suelos agrícolas rociados con los plaguicidas seleccionados, en condiciones controladas, en cultivos de soja y trigo en siembra directa, según las prácticas corrientes en la región pampásica en nuestro país.

### 8.1 Glifosato

Las propiedades herbicidas del glifosato fueron descubiertas en 1970, y las formulaciones comerciales para el control de malezas fueron desarrolladas en 1974 (Giesy *et al* 2000). Es un herbicida post-emergente, sistémico, no selectivo, con fitotoxicidad sobre plantas anuales y perennes. En la agricultura, el empleo de glifosato fue aumentando en los últimos años y su uso resultó significativamente mayor desde la introducción de semillas de soja tolerantes a dicho herbicida (Solomon *et al* 2007).



**Figura 6.** Estructura molecular del glifosato (Miller *et al* 2010)

### **8.1.1 Formulaciones del glifosato**

El glifosato es un ácido orgánico débil, formado por glicina y un grupo fosfometilo. Su estructura química se halla representada en la Figura 6. Se encuentra usualmente formulado como una sal del ácido deprotonado y un catión, por ejemplo isopropilamina (IPA), monoamina, diamina o trimetilsulfonio, a la que se le agregan surfactantes, “inertes” y agua. Las distintas formulaciones pueden variar en la cantidad de glifosato y en la cantidad y tipo de surfactante utilizado. La solubilidad relativamente alta en agua y la naturaleza iónica del glifosato, retardan su pasaje a través de la cera presente en las cutículas de las hojas de las plantas. Los surfactantes cumplen con la función de reducir la tensión superficial de la solución, aumentando la permeabilidad y la penetrabilidad en los tejidos de la planta (Solomon *et al* 2007). Uno de los surfactantes más estudiados es el POEA (polietoxietilenamina), mezcla de alquilaminas polietoxiladas de cadena larga sintetizadas a partir de ácidos grasos de origen animal. Entre las distintas formulaciones que contienen POEA encontradas en el mercado, la más utilizada es la que presenta el Roundup, con 480 g/litro de la sal isopropilamina como ingrediente activo (ia).

Una formulación conocida como Rodeo® utilizada en cuerpos de agua en los Estados Unidos no contiene surfactantes. Sin embargo, para el correcto control de malezas debe agregarse algún surfactante, como por ejemplo el POEA.

## Introducción

---

En Argentina hay 214 marcas comerciales aprobadas por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), que corresponden a empresas argentinas y extranjeras. De ellas, las marcas Roundup, asociadas a Monsanto, abarcan solo el 3,3% de las comercializadas (Informe Universidad Nacional del Litoral 2010). Según la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) en el año 2009 se aplicaron aproximadamente 165 millones de kilos o litros de glifosato, en sus distintas formulaciones (Tabla 1).

**Tabla 1.** Venta de distintos formulados de glifosato en Argentina en el año 2009. CASAFE 2010.

<b>PRODUCTO</b>	<b>CANTIDAD (kg o l) 2009</b>
GLIFOSATO 48%	69.826.067
GLIFOSATO 40%	21.080.108
GLIFOSATO 62%	18.929.700
GLIFOSATO 75%	14.738.416
GLIFOSATO 66%	12.374.927
GLIFOSATO 65%	11.712.203
GLIFOSATO 43%	8.382.640
GLIFOSATO 41%	7.952.330

Las formulaciones presentes en el mercado tienen como activos a distintas concentraciones:

- sal isopropilamina (48 y 62%)
- sal dimetilamina (61%)
- sal potásica (43, 62 y 66 %)
- sal amónica (40, 75, 78 y 79%).

### ***8.1.2 Propiedades físico-químicas***

Las características físico-químicas del glifosato están resumidas en la Tabla 2.

## Introducción

**Tabla 2.** Estructura y propiedades físico-químicas del glifosato (WHO 1994, Miller *et al* 2010).

<b>Ingrediente Activo</b>	<b>Glifosato ácido</b>	<b>Glifosato sal isopropilamina</b>	<b>Glifosato sal amónica</b>
<b>Nombre químico</b>	N –(fosfometil) glicina	Sal isopropilamina de N-(fosfometil) glicina	Sal de amonio de N-(fosfometil) glicina
<b>Formula molecular</b>	$C_3H_8NO_5P$	$C_6H_{17}N_2O_5P$	$(NH_4)C_3H_7NO_5P$
<b>Peso molecular (g/mol)</b>	169,1	228,2	186,1
<b>Punto de fusión</b>	184,5°C	-	200°C
<b>Punto de ebullición</b>	Se descompone a 200°C	Se descompone a 200°C	-
<b>Presión de vapor (mm Hg)</b>	$1,84 \times 10^{-7}$ (45 °C)	$1,58 \times 10^{-8}$ (25 °C)	$6,75 \times 10^{-8}$ (25 °C)
<b>Solubilidad en agua (g/l)</b>	pH 2: 10,5 pH 7: 15,7	pH 4: 786	pH 3: 144
<b>Coefficiente de partición octanol/agua (log <math>K_{ow}</math>)</b>	< -3,2	-3,87 o -5,4	-3,7 o -5,32
<b>Coefficiente de adsorción en C orgánico <math>K_{oc}</math> (ml/g)</b>	300-20100	300-20100	300-20100

### 8.1.3 Propiedades toxicológicas

Los herbicidas que contienen glifosato se utilizan principalmente para el control de malezas en agricultura, sin embargo también tienen usos industriales, en jardines ornamentales y residenciales, y para el control de malezas acuáticas. Debido a sus amplios usos, los organismos de ambientes acuáticos, del suelo y otros organismos terrestres pueden estar potencialmente expuestos (Tabla 3) (Giesy *et al* 2000).

**Tabla 3.** Organismos potencialmente expuestos a glifosato y su ruta de exposición (Giesy *et al* 2000).

Compartimiento ambiental	Grupos de organismos potencialmente expuestos	Principal ruta de exposición ambiental
Acuático	Microorganismos	agua
	Macrófitas	agua
	Invertebrados	agua
	Anfibios	agua
	Peces	agua
Suelo	Microorganismos del suelo	suelo
	Invertebrados del suelo	suelo
Terrestre	Artrópodos	contacto directo
	Plantas no blanco	deriva
	Aves	dieta
	Mamíferos	dieta

## Introducción

---

En la tabla 4 se presentan algunos valores de toxicidad para el glifosato, formulado como Roundup.

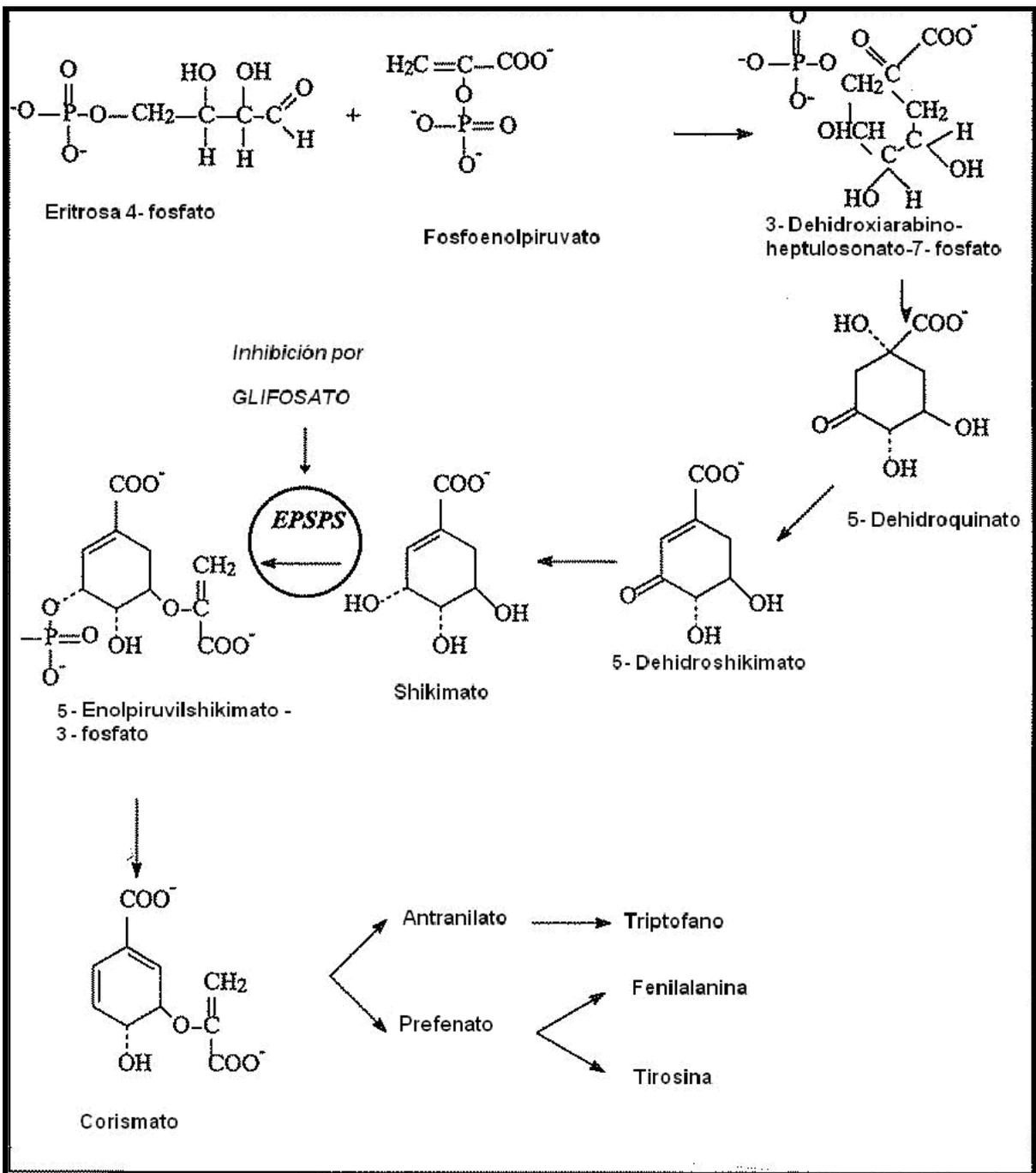
**Tabla 4.** Toxicidad del glifosato en distintas especies (WHO 1994).

DL <sub>50</sub> oral aguda en ratas (i. a.)	> 5600 mg/kg
DL <sub>50</sub> dérmica en conejos (i. a.)	> 5000 mg/kg
NOEC macrófitas 14 días (Roundup)	2,4-56 mg /l
CE <sub>50</sub> <i>Daphnia magna</i> 2 días (Roundup)	5,3-5600 mg/l
DL <sub>50</sub> peces 4 días (Roundup)	2,4 a > 1000 mg/l
DL <sub>50</sub> abejas 2 días oral (Roundup)	> 100 µg/ abeja
NOEC lombriz de tierra 14 días (Roundup)	500 mg/kg peso seco
DL <sub>50</sub> aves 8 días oral (Roundup)	5620 mg/kg

### 8.1.4 Mecanismo de acción tóxica

En las plantas se absorbe por vía foliar y luego se trasloca por el floema, propiedad que determina su actividad como herbicida sistémico. El crecimiento de las plantas se ve afectado ya que actúa inhibiendo la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), sobre la vía del ácido shikímico, clave para la síntesis de aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina y tirosina), resultando en una alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos y la síntesis proteica (Amrhein *et al* 1980) (Figura 7). Esta ruta bioquímica se halla presente sólo en plantas y algunos microorganismos (Giesy *et al* 2000).

## Introducción



**Figura 7.** Mecanismo de acción del glifosato en plantas (Giesy *et al* 2000)

El mecanismo de acción tóxica en mamíferos no está claro, pero se cree que puede actuar como desacoplante de la fosforilación oxidativa (Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos, CONICET 2009).

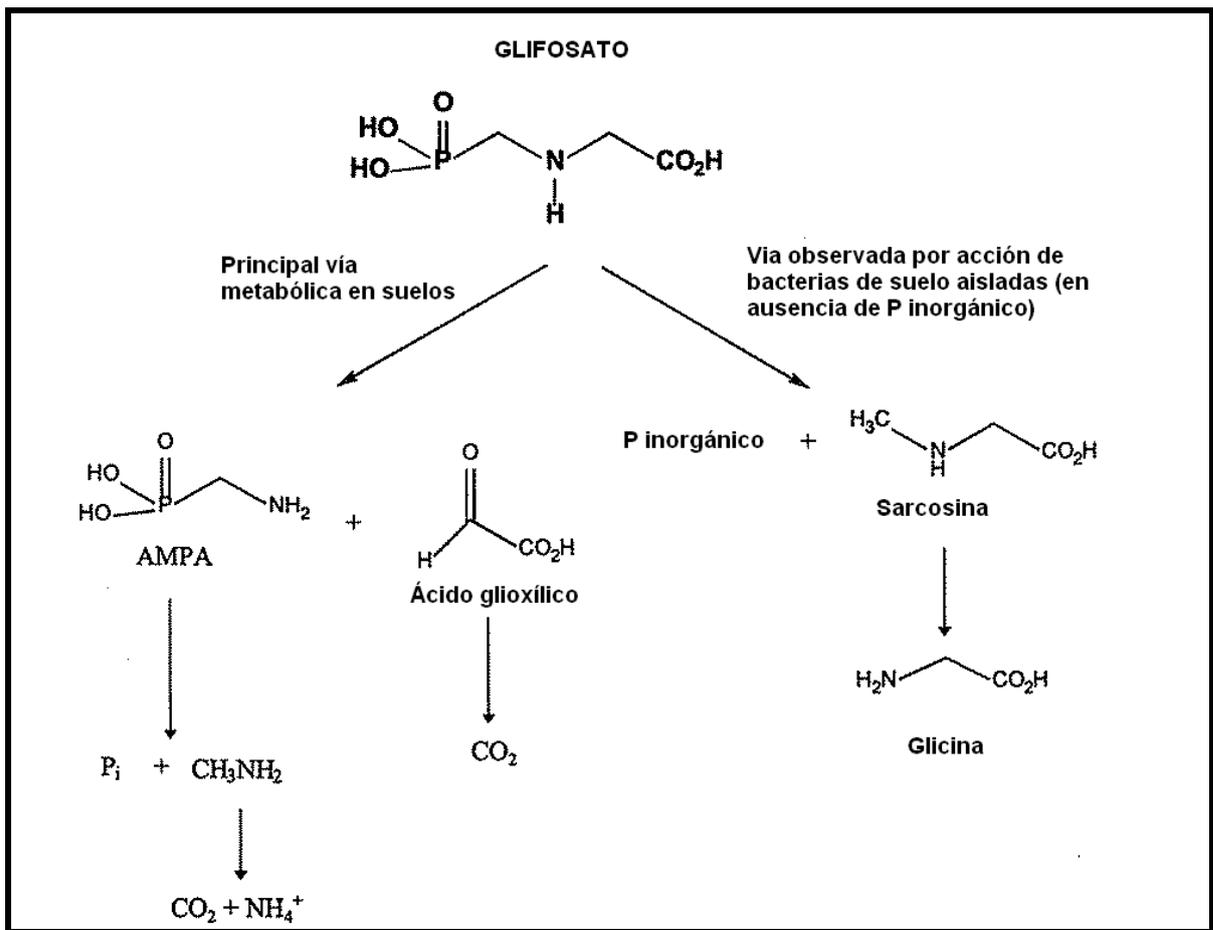
### **8.1.5 Comportamiento ambiental**

El glifosato se ioniza fácilmente y, como anión, se adsorbe fuertemente a materia orgánica en los suelos. Por esta razón cuando se aplica al suelo muestra poca actividad. Asimismo tiene poca movilidad en suelos aunque ésta varía según el tipo de suelos (Solomon *et al* 2007, Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos, CONICET 2009). Sin embargo, estudios de lixiviación y escurrimiento a campo indican que el glifosato puede ser transportado hacia las capas profundas del suelo debido al flujo preferencial por macroporos, o hacia cursos de agua superficiales, cuando se aplica en momentos anteriores a lluvias intensas o riego (Sasal *et al* 2010). Este riesgo está aumentado por el uso de fertilizantes fosfatados, ya que el fosfato compite por los sitios de adsorción (Universidad Nacional del Litoral 2010). Se han informado valores de vida media en suelos entre 2 y 197 días (Miller *et al* 2010).

El glifosato es relativamente estable a la foto- o quimio- descomposición. Se biodegrada principalmente por la acción de microorganismos presentes en el suelo, a ácido aminometil fosfónico (AMPA; Figura 8) y ácido glioxílico, y posteriormente ambos son degradados a CO<sub>2</sub> (Miller *et al* 2010).

El metabolito del glifosato (AMPA), es algo más móvil en el suelo, pero rápidamente se degrada, causando la lixiviación de cantidades mínimas en suelos agrícolas normales. Se han informado otras vías metabólicas tales como el pasaje vía sarcosina a glicina, productos que tampoco se consideran tóxicos (Giesy *et al* 2000).

## Introducción



**Figura 8.** Degradación del glifosato en suelo (Giesy *et al* 2000).

En el agua, la vida media varía entre pocos días a 91 días. Los dos caminos principales de disipación son degradación microbiológica y unión a sedimentos. El glifosato no se degrada rápidamente en el agua estéril, pero en presencia de microflora (bacteriana y hongos) pasa a AMPA y posteriormente éste también se descompone.

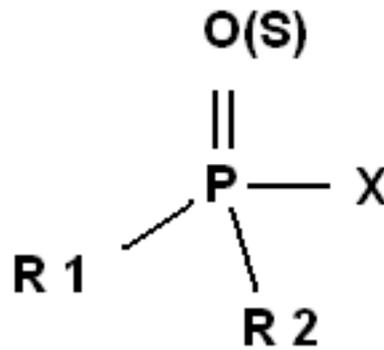
La mayor parte del glifosato rociado sobre las plantas penetra en los tejidos de las mismas, pero parte estará disponible para ser disipado durante varios días después de la aplicación. Se acumula en meristemas, hojas inmaduras y tejidos subterráneos,

donde es poco metabolizado, siendo el AMPA el único producto de degradación significativo. Los residuos de glifosato en desechos de hojas se disipan rápidamente con un tiempo para la desaparición del 50% (TD<sub>50</sub>) de 8-9 días en condiciones de clima templado (Solomon *et al* 2007).

### 8.2 Clorpirifos

El clorpirifos pertenece a la familia de los insecticidas organofosforados (OPs), los cuales son diseñados para atacar plagas que puedan ser perjudiciales para las cosechas. Aunque en los años 1800 se sintetizaron un número de compuestos organofosforados, su desarrollo como insecticidas ocurrió recién hacia fines de los años 30 y comienzos de los 40, en el siglo XX. Al químico alemán Gerhard Schrader se le atribuye el conocimiento de la estructura general de los compuestos organofosforados anticolinesterásicos y la síntesis del primero (tetraetilpirofosfato, TEPP), introducido en el mercado en 1944. Esa información permitió el desarrollo de compuestos mucho más tóxicos, como el sarin, tabun y soman, sintetizados como potenciales gases de guerra (Casarett *et al* 2008, Pflingsten 2003).

Los plaguicidas organofosforados, o sus metabolitos activos, son inhibidores de serina esterasas, entre ellas acetilcolinesterasa, una enzima presente en el sistema nervioso de mamíferos y de invertebrados, con la consecuente acumulación de acetilcolina en sinapsis nerviosas. Estos plaguicidas presentan una estructura básica, generalmente ésteres, amidas o tioles derivados del ácido fosfórico (Figura 9) (WHO 1986).



**Figura 9.** Estructura básica de los plaguicidas organofosforados.

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son generalmente grupos alcoxi, alquilamino o tioderivados. El grupo X (“grupo saliente”), un grupo acilo unido al P a través de una unión de tipo -O- o -S- (WHO 1986), es un grupo electrofílico, muy lábil a la hidrólisis alcalina. Cuando el átomo que se une al fósforo con doble enlace es un oxígeno, los compuestos resultantes (oxones) son buenos inhibidores de la colinesterasa. Los fosforotioatos (P=S), son pobres inhibidores de la colinesterasa, pero son bioactivados a sus análogos oxigenados (P=O) por desulfuración oxidativa, cuando son ingeridos o absorbidos por los animales, resultando en un aumento de la toxicidad (Fukuto 1990).

### **8.2.1 Propiedades físico-químicas del clorpirifos**

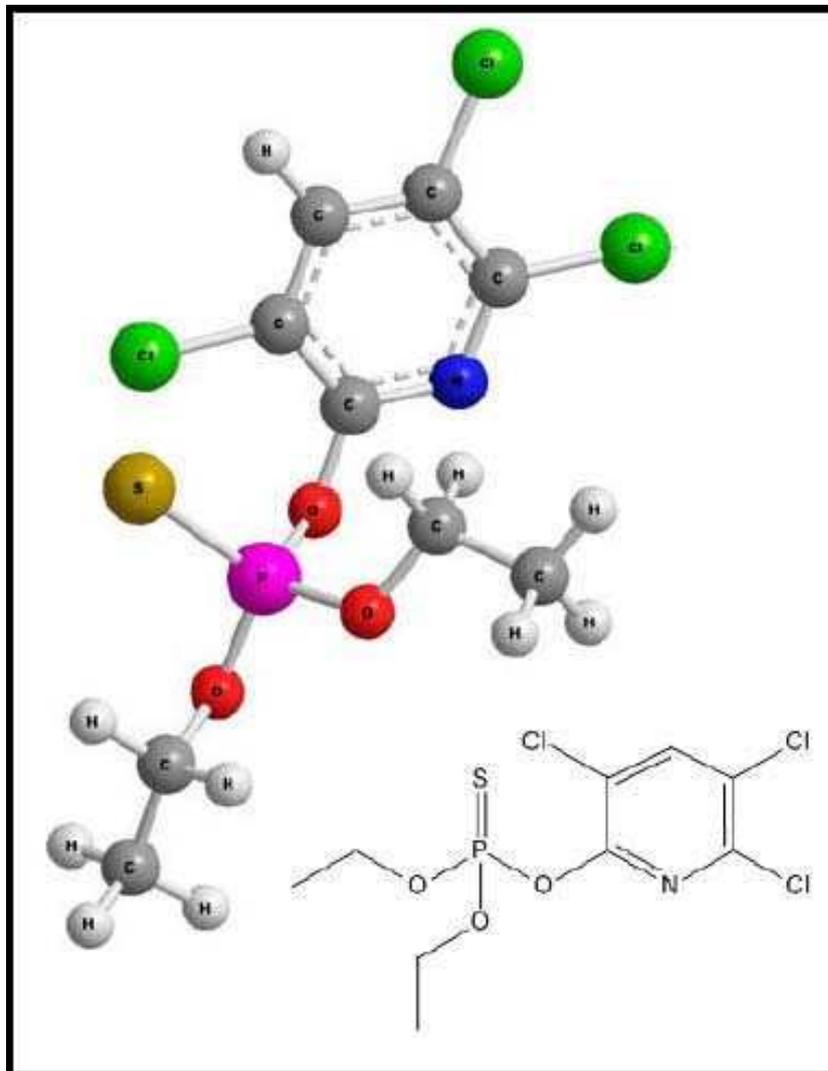
El clorpirifos es un insecticida y acaricida de amplio espectro, no sistémico, usado tanto para controlar plagas presentes en cultivos así como para uso hogareño. Fue

## Introducción

---

descubierto en 1962 por Dow Chemical. Su persistencia es considerada corta en los cultivos, sin embargo en el suelo puede permanecer varias semanas (WHO 1975).

En nuestro país, la Administración Nacional de Alimentos, Medicamentos y Tecnología Médica (ANMAT), por Disposición 2659/2008, prohibió el uso del principio activo clorpirifos en formulaciones de productos desinfectantes domisanitarios, a excepción de cebos matacucarachas que posean cierre a prueba de niños.



**Figura 10.** Estructura molecular del clorpirifos (NPIC 2010).

## Introducción

Algunas de las características físico-químicas más importantes del clorpirifos están resumidas en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Propiedades físico-químicas del clorpirifos.

<b>Nombre común</b>	Clorpirifos
<b>Nombre químico</b>	O,O-Dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS
<b>Estructura molecular</b>	
<b>Peso molecular</b>	350,5 g/mol
<b>Punto de fusión</b>	42-43,5 °C
<b>Punto de ebullición</b>	> 300°C
<b>Presión de vapor</b>	1,87 × 10 <sup>-5</sup> mm Hg (25°C)
<b>Solubilidad en agua</b>	1,4 mg/l
<b>Solubilidad en solventes orgánicos</b>	Benceno: 7900 g/kg, acetona: 6500 g/kg, metanol: 460 g/kg
<b>Coef. de partición octanol/agua (log Kow)</b>	4,7
<b>Coeficiente de adsorción en C orgánico K<sub>oc</sub> (ml/g)</b>	360-31000

WHO 1975.

## Introducción

---

Su liposolubilidad hace que atraviese fácilmente las barreras biológicas (piel, mucosas), incluyendo la barrera hematoencefálica.

### 8.2.2 Propiedades toxicológicas

Algunos de los valores de toxicidad del clorpirifos están resumidos en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Toxicidad del clorpirifos en distintas especies.

DL <sub>50</sub> oral aguda en ratas (i. a.)	155 mg/kg
DL <sub>50</sub> dérmica en conejos (i. a.)	2000 mg/kg
DL <sub>50</sub> peces 4 días	0,051- 0,54 mg/L
DL <sub>50</sub> abejas 2 días oral	360 ng/abeja
DL <sub>50</sub> aves oral	50-100 mg/kg

WHO 1975

De acuerdo con valores tabulados de categorías de toxicidad aguda, el clorpirifos y los productos que contienen clorpirifos en su formulación, son altamente tóxicos para peces y moderadamente a altamente tóxicos para aves. Como insecticida, además de ser eficaz para controlar las plagas, resulta tóxico para insectos no blanco. En general es poco tóxico para los microorganismos del suelo.

### **8.2.3 Mecanismo de acción**

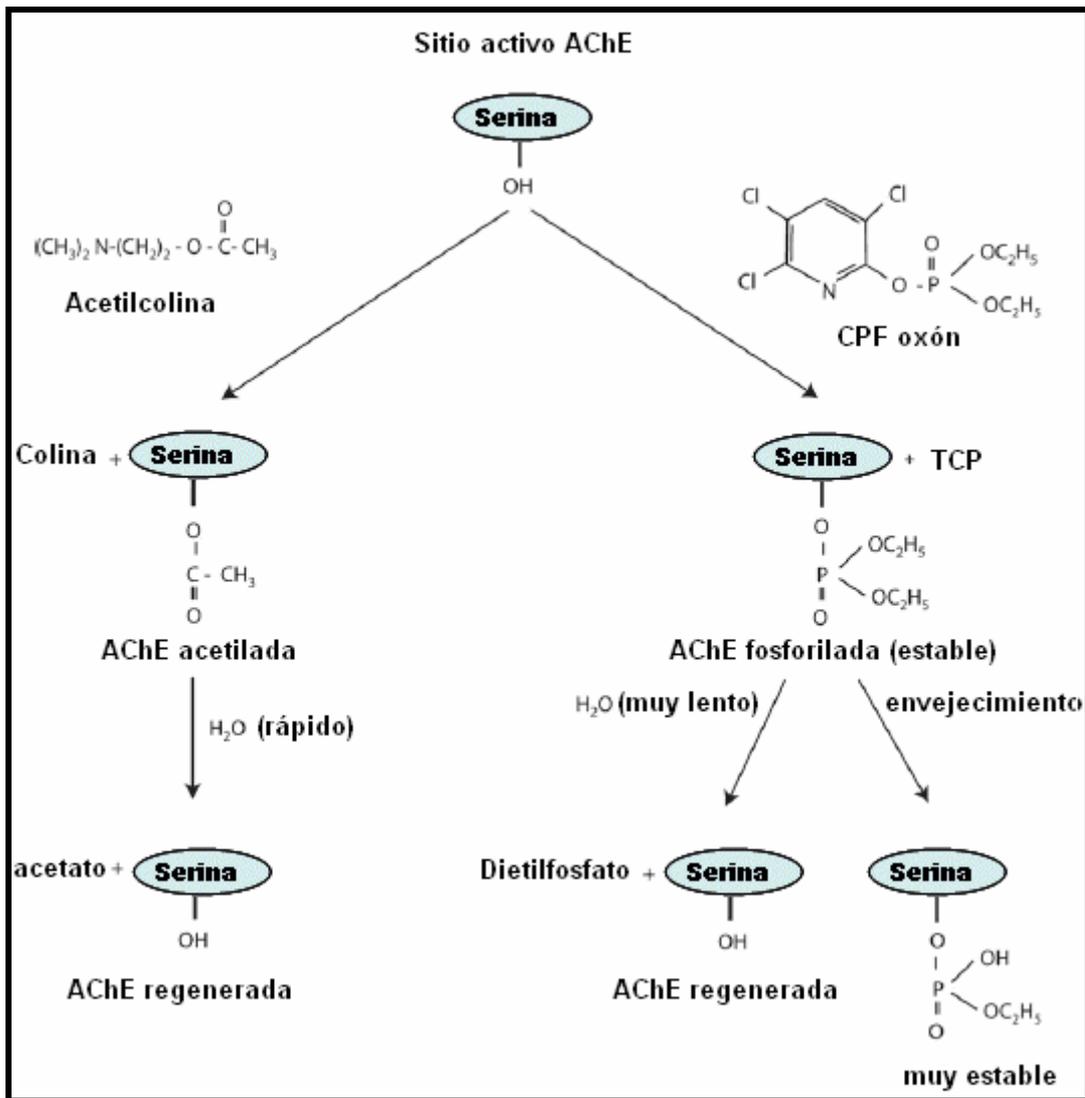
El modo de acción del clorpirifos es similar para organismos blanco y no-blanco. Sin embargo, su nivel de toxicidad en invertebrados no parece ser similar al de vertebrados, y requiere ser estudiado.

El principal blanco es la enzima acetilcolinesterasa, responsable de la destrucción y terminación de la actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina, produciendo una acumulación de dicho neurotransmisor en las terminales nerviosas colinérgicas. Esto da como resultado alteraciones en el funcionamiento normal del sistema nervioso y eventualmente muerte. Los insecticidas OP actúan como inhibidores competitivos: se unen a través del P electrofílico a un residuo de serina en el sitio activo de la enzima en forma irreversible, impidiendo la entrada de otros sustratos (Figura 11) (Casarett *et al* 2008). En mamíferos, la acetilcolinesterasa está presente en tejido nervioso y en los glóbulos rojos, sin embargo la inhibición de esta última no estaría relacionada con la acción tóxica del clorpirifos. Además de esta colinesterasa, en mamíferos se encuentra una butirilcolinesterasa plasmática que también es inhibida por insecticidas organofosforados. La actividad de estas enzimas ha sido utilizada como biomarcador para ciertos plaguicidas organofosforados en vertebrados y también para algunos invertebrados acuáticos (Costa 2008).

En los últimos años, se han acumulado pruebas que sugieren que la exposición perinatal a OPs puede causar neurotoxicidad del desarrollo. Estudios en roedores indican que los OPs pueden afectar varios procesos celulares (replicación de ADN, supervivencia neuronal, crecimiento de neuritas y caminos no colinérgicos

## Introducción

(funciones sinápticas serotoninérgicas, el sistema de adenilato ciclasa) y causar varias anomalías conductuales a concentraciones a las cuales no producen inhibición de las colinesterasas (Jett y Lein 2006, Costa 2008).



**Figura 11.** Esquema de la hidrólisis de acetilcolina por acetilcolinesterasa (AChE) y la reacción del CPF oxón con AChE (adaptado de Costa 2008).

### **8.2.4 Comportamiento ambiental**

Por su alto  $K_{OC}$ , el clorpirifos tiene una fuerte tendencia a ser adsorbido por la materia orgánica del suelo, previniendo su lixiviación hacia aguas subterráneas. En el suelo se ha establecido una vida media entre 60 y 120 días, pero en ocasiones puede permanecer hasta un año dependiendo del tipo de suelo y el clima. Se degrada por la exposición a luz UV, por la hidrólisis química y por acción de microorganismos. Con el aumento del pH del suelo, la persistencia del clorpirifos disminuye debido a la predominancia de la hidrólisis alcalina abiótica (Baskaran *et al* 1999). Estas características de fuerte adsorción y rápida degradación resultan en limitado escurrimiento superficial potencial.

En ambientes acuáticos, la hidrólisis del clorpirifos aumenta con la temperatura y alcalinidad. En ensayos de laboratorio, se han informado vidas medias de entre 35 y 78 días a pH 7 y 25 °C. En ecosistemas acuáticos, sin embargo, la degradación suele ser más rápida. Son típicas vidas medias de pocos días, debido a la combinación de degradación, volatilización y partición agua-sedimento.

Las plantas no muestran tendencia a tomar el clorpirifos o sus metabolitos del suelo a través de las raíces. En la superficie de las hojas, ocurre rápida disipación por volatilización, siendo la fotodegradación menos importante. Después de su aplicación pueden absorberse pequeñas cantidades en los tejidos, pero son rápidamente detoxificados.

## Introducción

El clorpirifos es un fosforotioato, por lo tanto para ejercer su acción tóxica debe ser activado al oxón. Este paso es mediado por el sistema de enzimas del P450 (CYPs) (Costa 2008). La dearilación oxidativa del clorpirifos produce 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), principal metabolito en plantas y animales, y principal producto de degradación en suelos, y dietiltiofosfato, en un paso competitivo de detoxificación también mediado por CYPs. Una ruta alternativa es la hidrólisis de una unión P-O-R, resultando en desetilclorpirifos, posteriormente metabolizado a TCP. La hidrólisis del clorpirifos-oxón por A-esterasas resulta en la formación de dietilfosfato y TCP. Este compuesto puede metabolizarse a 3,5,6-tricloro-2-metoxipiridina (TMP), o conjugarse y excretarse.

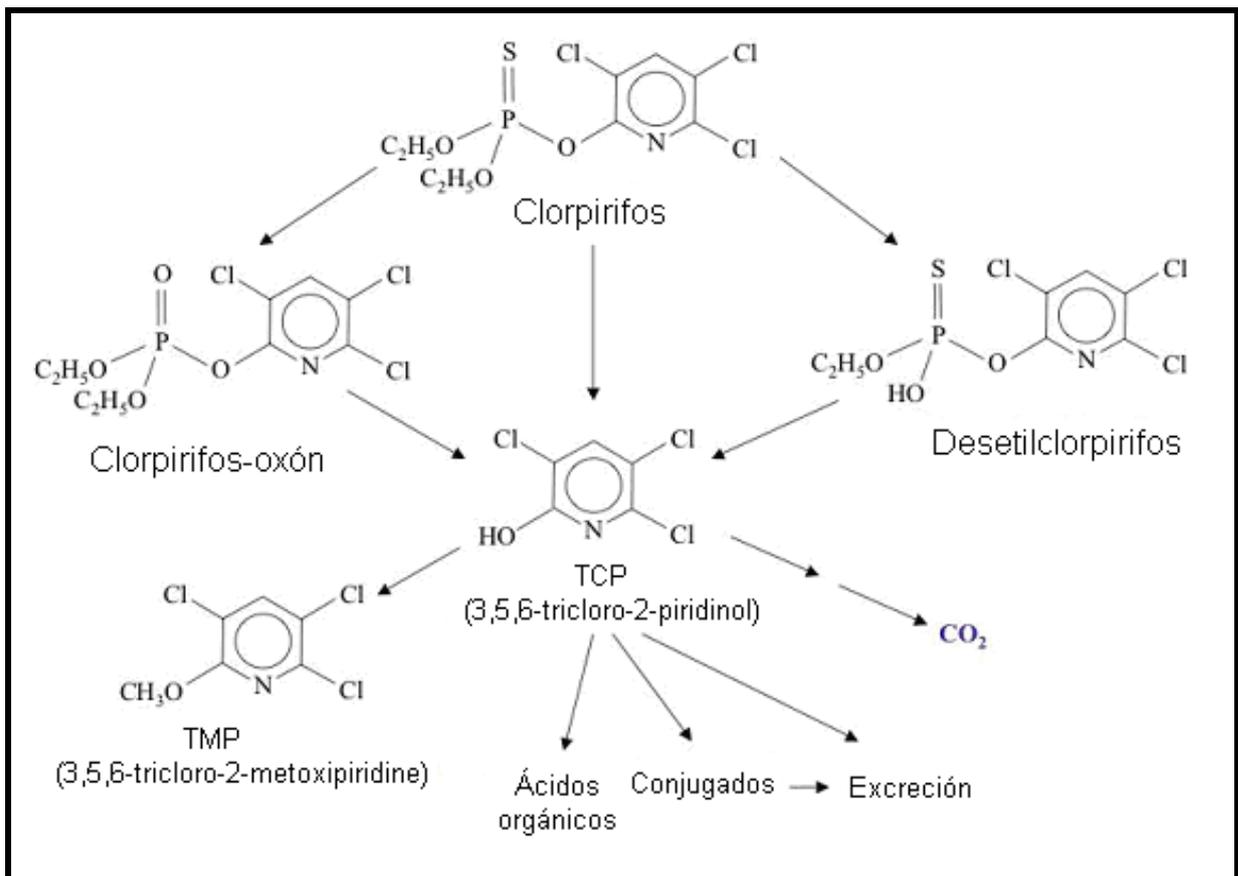


Figura 12. Degradación del clorpirifos (adaptado WHO 1975).

## Introducción

---

El TCP, metabolito primario del clorpirifos, no se une al suelo y puede tener acceso a aguas subterráneas (NPIC 2010). TCP posee menor toxicidad aguda que el clorpirifos, por ese motivo cuando el plaguicida se degrada disminuiría el riesgo para peces y fauna silvestre (US EPA 2006). Sin embargo, cabe comentar que se ha observado un rol del TCP en relación con efectos del clorpirifos no relacionados con la inhibición de las colinesterasas (Schuh *et al* 2002).

### ***HIPÓTESIS GENERAL***

Los plaguicidas de uso agrícola afectan la biota no blanco y el ecosistema.

### ***OBJETIVO GENERAL***

Estudiar el impacto del uso de plaguicidas en agroecosistemas de nuestro país, a través de bioensayos integrados laboratorio-campo. El objetivo final de estos estudios es impulsar una agricultura más responsable, donde el costo ecológico sea tenido en cuenta junto con otros costos de producción.

### ***OBJETIVOS ESPECÍFICOS***

- Evaluar biomarcadores a nivel organismo y suborganismo, usando lombrices como modelo de invertebrados de suelo.
- Relacionar con efectos a mayores niveles de organización biológica, empleando parámetros ecológicamente relevantes (actividad biológica, comportamiento).
- Vincular con ensayos biológicos a campo, con el objeto de:
- Estudiar cuáles biomarcadores son aplicables al monitoreo de suelos agrícolas.

Para su cumplimiento se propone:

### ***1. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UNA BATERÍA DE BIOENSAYOS Y DE BIOMARCADORES***

#### ***1.1 Bioensayos en papel de filtro o suelo artificial (SA)***

- Implementación de técnicas de exposición de lombrices a papeles de filtro o a suelo artificial.

- Evaluación de toxicidad aguda de plaguicidas.
- Bioensayos en suelo artificial, para diferenciar entre productos técnicos y formulados.

### **1.2 Puesta a punto y evaluación de biomarcadores:**

#### **1.2.1 Biomarcadores subcelulares**

- Implementación y validación de un método adecuado para la extracción de celomocitos de lombrices *Eisenia andrei*.
- Integridad de la membrana lisosomal, determinando el Tiempo de Retención de Rojo Neutro (TRRN).
- Daño al ADN, a través del Ensayo Cometa.

#### **1.2.2 Biomarcadores de actividad biológica y comportamiento**

En lombrices expuestas a SA:

- Ensayos de reproducción.
- Ensayos de comportamiento de “evasión”.
- Ensayos de actividad alimentaria: “lámina cebo”.

#### **1.2.3 Selección de biomarcadores adecuados**

## **2. ESTUDIOS INTEGRADOS CAMPO- LABORATORIO**

Realización de campañas en terrenos de la región pampeana. Aplicación de plaguicidas seleccionados a las concentraciones recomendadas. Toma de muestras de suelo a distintos tiempos.

### **2.1 Bioensayos en laboratorio:**

- Determinación de las propiedades físico químicas del suelo.
- Determinación de las concentraciones de plaguicidas presentes en los suelos.
- Procesamiento de suelos para bioensayos en el laboratorio de acuerdo con los protocolos preestablecidos.
- Estudio de los biomarcadores subcelulares optimizados, en lombrices expuestas a muestras de suelo provenientes del campo.
- Realización de los ensayos de actividad biológica y comportamiento en el laboratorio exponiendo lombrices *Eisenia andrei* a muestras de suelos provenientes del campo.

### **2.2 Bioensayos en campo:**

- Estudios de actividad alimentaria de la macrofauna y su distribución en profundidad en las matrices de láminas cebo expuestas en el campo.
- Densidad y diversidad de lombrices.

## **3. EVALUACIÓN DE RESULTADOS PARA LA SELECCIÓN DE BIOMARCADORES A SER APLICADOS AL MONITOREO DE SUELOS AGRÍCOLAS.**

# ***Materiales y Métodos***

### 1. ORGANISMOS UTILIZADOS EN LOS BIOENSAYOS

De acuerdo con lo señalado en la Introducción, organizaciones de estandarización internacionales han seleccionado las lombrices *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei* como organismos apropiados para el monitoreo de ecosistemas terrestres (OECD 1984, ISO 11268-1 1993, OECD 2004).

Para el cumplimiento de los objetivos planteados en este trabajo, se consideró de suma importancia contar con animales de experimentación confiables en cuanto a su homogeneidad y capacidad de respuesta. Para implementar una batería de biomarcadores en los bioensayos en laboratorio, se emplearon lombrices de la especie *Eisenia andrei* pertenecientes a una colonia que se mantiene desde 1997 en los laboratorios de Toxicología y Química Legal, FCEN-UBA, en condiciones controladas de temperatura y humedad.

La susceptibilidad de la población se controló periódicamente realizando la  $CL_{50}$  de 2- cloroacetamida, tal como lo recomiendan los protocolos de la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD). Cada vez que haya un cultivo nuevo, se debe realizar este ensayo de referencia, previamente a la exposición de la lombriz a la sustancia de prueba.

En todos los bioensayos realizados se utilizaron lombrices adultas, con el clitelo desarrollado, de al menos tres meses de edad, con un peso individual de 250 - 600 mg (OECD 1984). Antes de los ensayos, las lombrices se dejaron estar por un

mínimo de 3 horas sobre papel de filtro húmedo, para permitirles evacuar su contenido intestinal.



**Figura 13.** Lombriz *Eisenia andrei*.

## **2. PLAGUICIDAS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO DE TESIS**

A lo largo de este trabajo de tesis se efectuaron estudios en laboratorio o campo con los siguientes plaguicidas:

### **2.1 Clorpirifos**

Clorpirifos (CPF) grado técnico, provisto por Cheminova (GT; 98% p/p).

Clorpirifos formulado Atanor 48 CE (48 % ia, concentrado emulsionable).

### **2.2 Glifosato**

A-Roundup FG, sal monoamónica (72 % de equivalente ácido (e.a.)).

B-Roundup 48 %, sal isopropilamina (concentrado emulsionable, 36 % e.a.).

C-Mon 8750, sal monoamónica (gránulos solubles, 85,4 % e.a.).

Los tres formulados fueron provistos por Monsanto Argentina.

No se realizaron ensayos con glifosato (GLI) grado técnico por no contar con el producto.

### **3. BIOENSAYOS DE EXPOSICIÓN**

#### **3.1 Exposición en papel**

Se desarrolló una metodología por adaptación de la Norma OECD 207 (1984). Las lombrices se ponen en viales de vidrio recubiertos con papeles de filtro Whatman Nº 1 de 60 cm<sup>2</sup>, impregnados con distintas concentraciones de las sustancias a investigar, quedando en contacto por 24, 48 o 72 horas. Cuando se emplean solventes orgánicos para disolver los plaguicidas, se dejan evaporar los mismos bajo campana, y, una vez introducidos los papeles en los viales, se humedecen con 1 ml de agua destilada. Se coloca una lombriz en cada vial, se tapa con una tela que permite la entrada de oxígeno. Para cada concentración se realizan entre 5 y 10 replicados. Los viales, colocados en posición horizontal para forzar a la lombriz a tener contacto con el papel, se mantienen en oscuridad durante el período de exposición, en un ambiente climatizado a  $22 \pm 2$  °C. En paralelo se realizan dos tipos de controles: uno con papel impregnado con solvente, evaporado y humedecido en forma similar al procedimiento empleado para los tóxicos, y otro con papel de filtro humedecido con agua.

En todos los bioensayos, los solventes usados son de grado analítico marca Merck y el agua es bidestilada.

### 3.2 Exposición en suelo artificial (SA)

El SA ha sido utilizado en numerosos estudios ecotoxicológicos. Es un sustrato ideal para tener un enfoque más real de la exposición de los organismos del suelo a los compuestos seleccionados.

Las distintas normas OECD que han sido redactadas para la evaluación de sustancias químicas en lombrices *Eisenia fetida/andrei* (OECD 1984 y OECD 2004) han sido desarrolladas para países de climas templados. En nuestro laboratorio, el SA fue preparado siguiendo la norma OECD (2004) con algunas modificaciones, de manera que el contenido de materia orgánica del suelo se asemejara más a las condiciones naturales que se pueden encontrar en suelos de la región agrícola pampeana argentina.

Los componentes básicos del SA son arena, caolín y una fuente de materia orgánica (turba).

**Tabla 7.** Componentes del SA (OECD 2004).

Componente	% de masa seca (p/p)
Turba sin restos de plantas visibles	10
Caolín (conteniendo no menos del 30 % de arcilla coloidal de caolinita)	20
Arena industrial de cuarzo (con más del 50 %, en peso, de partículas entre 0,05-0,2 mm)	70
CaCO <sub>3</sub> (grado analítico, pulverizado, hasta obtener un pH inicial de 6,0 ± 0,5)	0,3 - 1

## Materiales y Métodos

---

Los componentes secos del suelo se mezclaron utilizando una procesadora eléctrica, preparando siempre cantidades de suelo suficientes para completar un experimento en su totalidad. Los suelos se pasan por un tamiz de 2 mm. Antes de ser utilizados, se determina la humedad y la CRA (cantidad de agua que retiene el suelo después de saturación completa, en porcentaje de masa seca).

La Tabla 8 muestra los resultados de los análisis físico-químicos de los suelos artificiales preparados, realizados en el Instituto de Geocronología y Geología Isotópica (INGEIS) (CONICET-FCEN, UBA), Buenos Aires.

**Tabla 8.** Características físico-químicas del SA.

pH	6,5
Conductividad (ds/m)	0,57
Fósforo (ppm)	6,18
% C Org	2,44
% N org	0,25
Relación C/N	9,76
Materia Orgánica (%)	4,2

Las lombrices adultas se exponen a diferentes concentraciones de la sustancia a ensayar, mezclada con el SA. La serie de concentraciones se escoge para abarcar probables efectos letales y subletales, en un período de exposición de 2 a 8 semanas, dependiendo del punto final elegido. Las sustancias solubles en agua son mezcladas directamente con el SA. En el caso de sustancias solubles en

solventes orgánicos, se disuelven en un volumen pequeño de solvente grado analítico, que se mezcla con una pequeña cantidad de arena. El solvente es evaporado bajo campana y la arena tratada se mezcla con el resto del SA.

Al iniciarse los ensayos, el contenido de humedad se ajusta al 40-60 % de la CRA. Durante los ensayos, el contenido de humedad del suelo se mantiene constante mediante el agregado de agua destilada, y el pH se mide al principio y al final de los mismos. Las lombrices escogidas se aclimatan previamente durante 1-3 días en SA. Los ensayos se llevan a cabo bajo ciclos controlados de luz-oscuridad (16h/8h), a  $22 \pm 2$  °C. Para cada sustancia a evaluar se realiza un control con SA humedecido, o uno de SA impregnado con solvente (evaporado y humedecido con agua, en forma similar a las muestras).

### **3.3 Evaluación de toxicidad letal de los plaguicidas: determinación de concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>)**

Para la determinación de la CL<sub>50</sub> (concentración de una sustancia a estudiar que mata al 50 % de los organismos expuestos durante un período determinado de tiempo) las lombrices se exponen, en papel o SA, a concentraciones crecientes de soluciones de plaguicidas, según se describe en 3.1 y 3.2. Transcurrido el período de exposición, se cuenta el número de animales sobrevivientes, probando su reacción ante un estímulo mecánico. La masa húmeda de cada lombriz se registra al comienzo del ensayo y después de la exposición. A partir de las curvas concentración-respuesta, se determina la CL<sub>50</sub> y la mayor concentración ensayada

a la que no se observa mortalidad, para la selección de concentraciones para la evaluación de biomarcadores.

#### **4. PUESTA A PUNTO Y EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES SUBCELULARES**

##### **4.1 Implementación y validación de un método adecuado para la extracción de celomocitos de lombrices *Eisenia andrei***

Los ensayos del TRRN y Cometa requieren la obtención de celomocitos en forma no destructiva. En la literatura se plantean varias técnicas para la extrusión de los celomocitos (Hendawi *et al* 2004). Se efectuó un estudio comparativo de tres métodos alternativos para la obtención de celomocitos de las lombrices:

###### **4.1.1 Punción de la cavidad celómica**

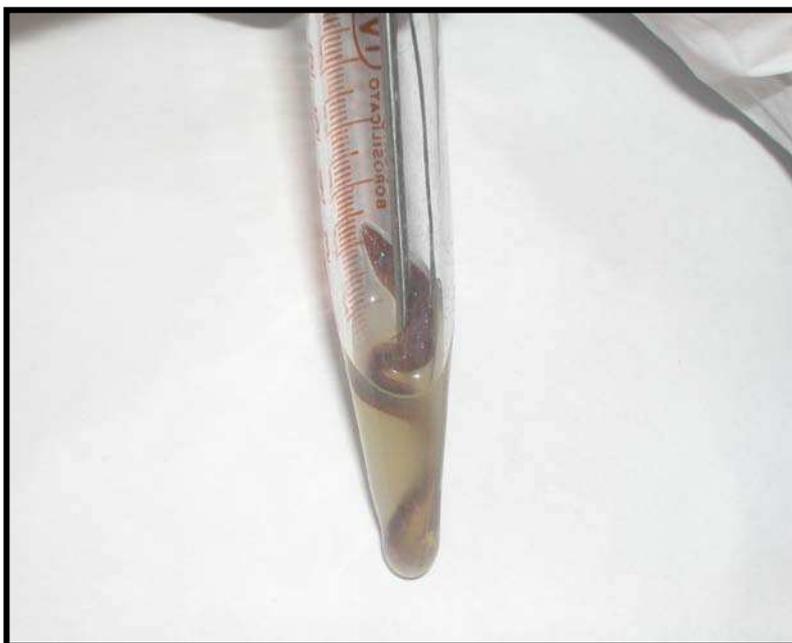
El fluido celómico (FC) se obtiene con una jeringa de 1 ml que contiene 50 µl de buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4, insertando una aguja hipodérmica de 25-g en la cavidad celómica de la lombriz, en la región posterior al clitelo. Se retira la aguja de la jeringa y se toma directamente una alícuota de la mezcla de PBS-FC para su evaluación (Figura 14).



**Figura 14.** Punción de la cavidad celómica de *Eisenia andrei*.

### **4.1.2 Extrusión por excitación eléctrica**

Cada lombriz se coloca en un tubo de vidrio con 1,5 ml de PBS pH 7,4. El FC conteniendo los celomocitos es extruído por estimulación eléctrica, a una diferencia de potencial de 6 V, 3 veces durante menos de 15 segundos cada vez. El shock eléctrico estimula la contracción muscular, resultando en la salida de fluido y células a través de los poros dorsales. Se agita suavemente el tubo y se trasvasa el FC a un tubo eppendoff (Kobayashi *et al* 2001) (Figura 15).



**Figura 15.** Extrusión por excitación eléctrica en *Eisenia andrei*.

### **4.1.3 Extrusión en un medio irritante**

Cada lombriz se coloca en un tubo de vidrio con 1,5 ml del medio irritante, durante 1 min. El medio irritante está compuesto por solución salina, conteniendo 5% de etanol, 2,5 mg/ml de EDTA y 10 mg/ml de guayacol glicerol éter; el pH se ajusta a 7,3-7,6 con NaOH 1N. El etanol actúa como agente irritante, el guayacol glicerol éter es un mucolítico que facilita la disolución del FC, el EDTA facilita la disgregación de los acúmulos de celomocitos (Figura 16).



**Figura 16.** Fluido celómico de *Eisenia andrei*.

Para la selección se tuvieron en cuenta la viabilidad celular, el número de células obtenidas y la utilidad práctica de cada método para los ensayos posteriores. La viabilidad se verificó colocando 10  $\mu\text{l}$  de FC en una cámara de Neubauer, seguido de 10  $\mu\text{l}$  de Azul de Tripán (0,4 %). Las células vivas se mantienen sin tinción, mientras que las muertas se tiñen de color azul, expresándose la viabilidad de los celomocitos como el porcentaje de células vivas.

Para el conteo del número de celomocitos, se consideró que la cantidad de células presentes en un cuadrante de la cámara corresponde al N<sup>o</sup> de células en 0,1  $\mu\text{l}$  de FC.

*Soluciones utilizadas:*

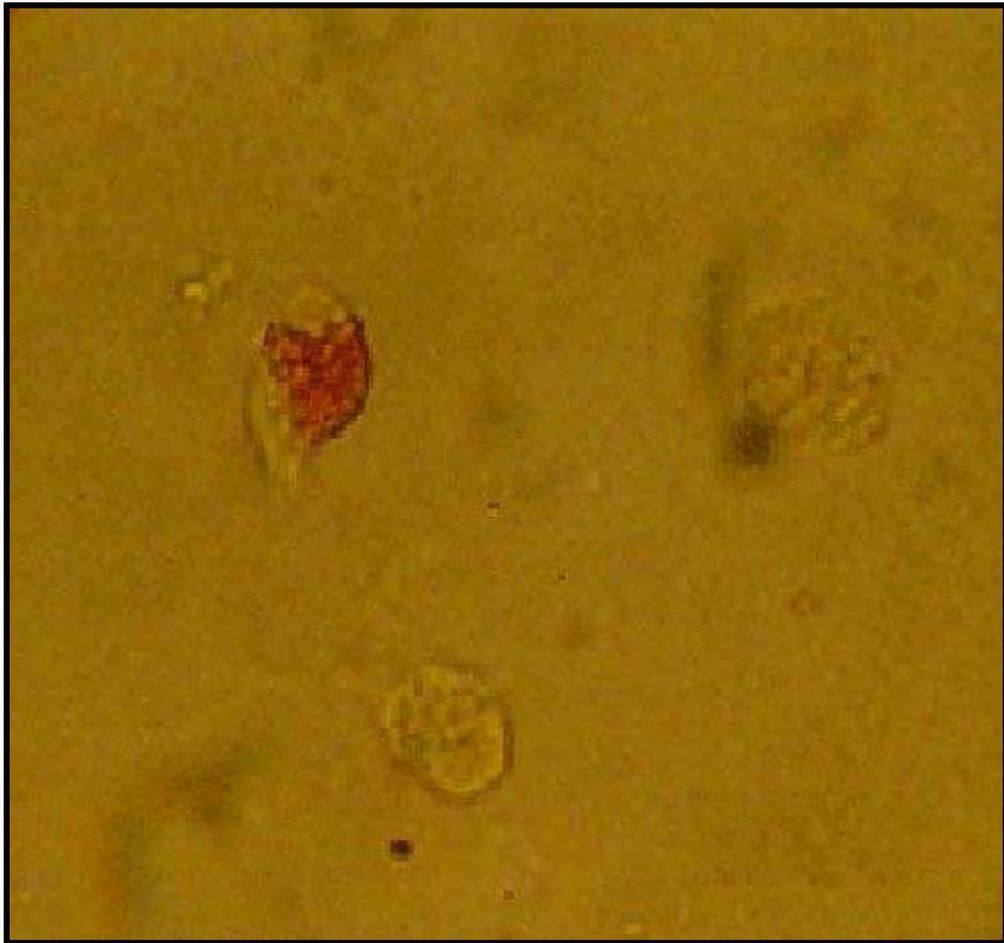
- Buffer fosfato salino (PBS), libre de  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ , pH = 7,4.
- Colorante Azul de Tripán.

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico, de marca Sigma.

### **4.2 Integridad de la membrana lisosomal: Tiempo de Retención del Rojo Neutro (TRRN)**

Este ensayo se aplicó luego de adaptación de la técnica desarrollada por Weeks y Svendsen (1996). Se colocan sobre un portaobjetos 20  $\mu$ l de fluido celómico, dejando adherir los celomocitos por 30 segundos a la superficie de éste, previamente a la aplicación de solución de rojo neutro (80  $\mu$ g/ml). Los portaobjetos son escaneados por un lapso de 2 minutos en un microscopio con luz visible (400x), a lo largo de los cuales se cuenta la cantidad de células con el citoplasma teñido de rojo y la cantidad de células con el citoplasma sin teñir (Figura 17). Pasados los 2 minutos los portaobjetos se colocan en una cámara húmeda por 3 minutos y luego vuelven a escanearse por otros 2 minutos. La observación se continúa hasta que la relación de células con citosol teñido/total de células contadas sea mayor del 50 %. El tiempo transcurrido hasta el inicio de ese intervalo se registra como el TRRN. Si el tiempo excede los 60 minutos se considera que no hay daño y se deja de contar. La viabilidad de los celomocitos se ensaya utilizando el colorante Azul de Tripán, según se describió.

Todos los reactivos empleados, fueron de grado analítico, de marca Sigma.



**Figura 17.** Ensayo de tiempo de retención de rojo neutro en celomocitos de lombriz *Eisenia andrei*.

### 4.3 Daño al ADN: Ensayo Cometa (EC)

El ensayo se llevó a cabo por adaptación de la técnica descrita por Singh *et al* (1988). Debido a que la técnica fue originalmente desarrollada para evaluar daño en células de mamíferos, la puesta a punto para su aplicación en celomocitos de lombriz necesitó de varios ensayos y modificaciones.

Luego de la obtención de los celomocitos, 10  $\mu$ l de la suspensión de células se mezclan con 75  $\mu$ l de agar de bajo punto de fusión (ABPF) 0,75% a 37° C; la mezcla se aplica sobre un portaobjetos previamente cubierto con 165  $\mu$ l de agar de

## Materiales y Métodos

---

punto de fusión normal (APFN) 1%. Luego de 5 minutos de solidificación a 4° C, se coloca una nueva capa de ABPF sobre los portaobjetos, dejando solidificar a 4° C. Los portaobjetos así preparados se sumergen en una solución de lisis alcalina durante toda la noche, a 4° C. Luego de la lisis, los portaobjetos se lavan con buffer de neutralización y se colocan en una cuba electroforética cubiertos por la solución alcalina de electroforesis recientemente preparada, a 4 ° C, durante 12 minutos, permitiendo el desenrollamiento del ADN. Una vez transcurrido este tiempo, se lleva a cabo la electroforesis durante 20 minutos a 25 V (1 V/cm) y una corriente inicial de 250 mA. Finalizada la electroforesis, los portaobjetos se lavan con buffer de neutralización y agua destilada. Finalmente son fijados en metanol y guardados secos para su observación (Klaude *et al* 1996).

Los núcleos de los celomocitos se tiñen con bromuro de etidio (20 µg/ml) y se observan en un microscopio de fluorescencia Axioplan (Zeiss, Alemania). Las células en cada portaobjetos se analizan visualmente como pertenecientes a alguno de cuatro niveles de daño, de acuerdo con la cantidad de ADN en la “cola” del cometa (largo e intensidad) (Figura 18).

Clase 0: < 5 % de ADN en la cola

Clase 1: 5-30 % de ADN en la cola

Clase 2: 30-75 % de ADN en la cola

Clase 3: >75 % de ADN en la cola

Cometas con una cabeza pequeña o no visible y colas largas y difusas son clasificados como “nubes”, y no se incluyen en el conteo (Burlison *et al* 2007).

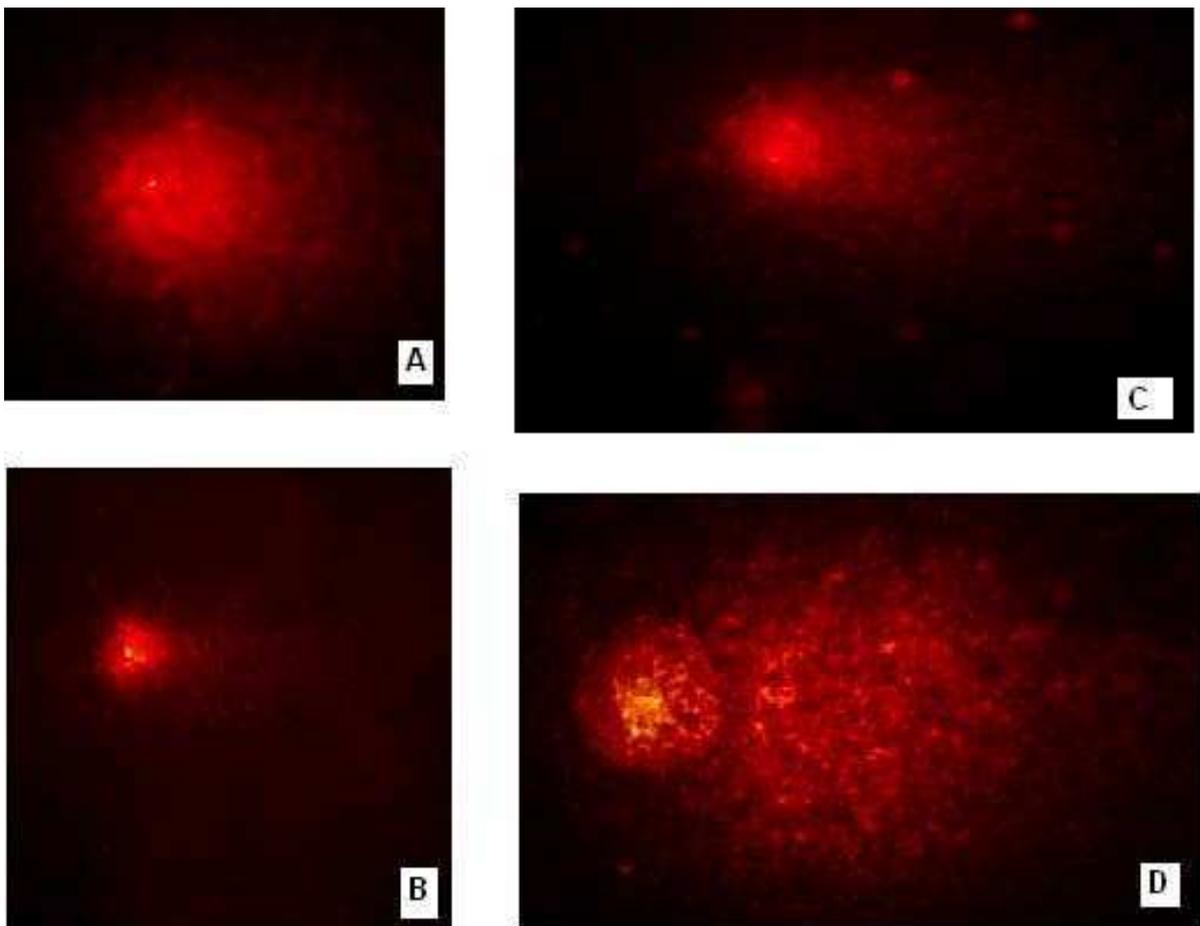
## Materiales y Métodos

---

Para cada organismo se leen 100 células por replicado (2 replicados) seleccionadas al azar. Todo el procedimiento fue realizado bajo luz tenue, para evitar daño espúreo al ADN. La visualización de los portaobjetos fue ciega, utilizando códigos de manera que se desconociera a que tratamiento pertenecían. Se calcula el porcentaje de células dañadas (%D) y el índice ponderado de daño (ID) según:

$$ID = \sum_{i=0}^3 N_i \times i$$

N= Número de células;  $i$ = clase de daño



**Figura 18.** Ensayo Cometa en celomocitos de *Eisenia andrei*. (A) célula sin daño; (B) célula con daño leve, clase 1; (C) célula con daño moderado, clase 2; (D) célula muy dañada, clase 3.

*Soluciones utilizadas:*

- Lisis: NaCl 2,5 M, Na<sub>2</sub>EDTA 100 mM, Tris 10 mM, N-lauril sarcosinato 1%, DMSO 10%, Triton X-100 1%, pH 10.
- Neutralización: Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5.
- Electroforesis: NaOH 300 mM , Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, pH > 13.

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico de marca Sigma.

#### **4.4 Exposición de lombrices *Eisenia andrei* a papeles impregnados con concentraciones subletales de clorpirifos y glifosato para la evaluación de TRRN y Ensayo Cometa**

##### **4.4.1 Clorpirifos**

Las lombrices se expusieron durante 72 h a CPF técnico y formulado 48 % en concentraciones de 0,5 y 1,0 µg/cm<sup>2</sup>, según lo descrito en 3.1. Las soluciones se prepararon en acetona; en forma paralela se llevaron controles con acetona.

##### **4.4.2 Glifosato**

Para los bioensayos de biomarcadores, los organismos se expusieron a concentraciones subletales de 7,5; 15,0 y 30,0 µg/cm<sup>2</sup> para el formulado A y 60; 120 y 240 µg/cm<sup>2</sup> para el formulado C.

### **4.5 Exposición de lombrices *Eisenia andrei* a SA tratado con clorpirifos y glifosato para evaluar TRRN y Ensayo Cometa**

Para la evaluación de los biomarcadores subcelulares, se utilizaron potes con 300 g de SA seco, suplementados con CPF GT (200 mg/kg y 300 mg/kg) ó CPF + GLI (GT, 200 mg/kg y Mon 8750, 500 mg/kg, respectivamente), según lo descrito en 3.2, usando 6 lombrices/replicado (3 replicados/tratamiento). El CPF se disolvió en un volumen de solvente, que se mezcló con una pequeña cantidad de arena. El solvente se evaporó bajo campana, y la arena tratada se mezcló con el resto del SA. El GLI se agregó como solución acuosa. Luego de 14 días de exposición, las lombrices fueron removidas, lavadas con agua de clorada y secadas. El fluido celómico de cada lombriz es extraído por extrusión eléctrica. Se determinaron: viabilidad, TRRN y Ensayo Cometa.

## **5. PUESTA A PUNTO Y EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y COMPORTAMIENTO**

### **5.1 Ensayos de reproducción**

Para los ensayos se procedió por adaptación de las normas OECD (2004) e ISO DIS 11268-2.2 (1996). El procedimiento fue similar tanto cuando se realizó en SA como con suelos de campo.

En los ensayos se colocan 300 g de suelo, llevados al 60% de la CRA y 6 lombrices adultas por replicado. Se agregan 2 g de cereal como alimento al comienzo del ensayo, y luego 1 vez por semana. En todos los casos se realizaron

al menos 4 replicados por tratamiento. A lo largo de todo el experimento, con un fotoperíodo de 16:8 h (luz: oscuridad), la humedad del suelo se mantuvo constante mediante el agregado periódico de agua y se mantiene. Luego de 28 días, las lombrices adultas son removidas de los pots contenedores, registrando la tasa de supervivencia y el peso de las mismas. El suelo, con los cocones puestos por las adultas, se vuelve a colocar en su respectivo pote contenedor por otros 28 días, durante los cuales no se agrega alimento, manteniendo la humedad relativa constante. De esta manera la exposición a los distintos suelos tratados continúa para los cocones y los juveniles. Al final del ensayo (56 días desde el comienzo), se registra el número de cocones eclosionados, de cocones sin eclosionar y de juveniles, para cada suelo estudiado.

Para determinar el número de juveniles, los pots contenedores se colocan en un baño de agua a 40 °C y se aumenta la temperatura gradualmente hasta llegar a 60 °C. Luego de unos 20 - 30 minutos los juveniles comienzan a salir a la superficie y de esa manera es más sencillo removerlos del pote. Una vez que han dejado de aparecer, el suelo con los cocones que queda en el pote se lava y se pasa a través de un tamiz de 2 mm, donde son retenidos los cocones eclosionados y no eclosionados.

### **5.2 Ensayos de comportamiento de “evasión”**

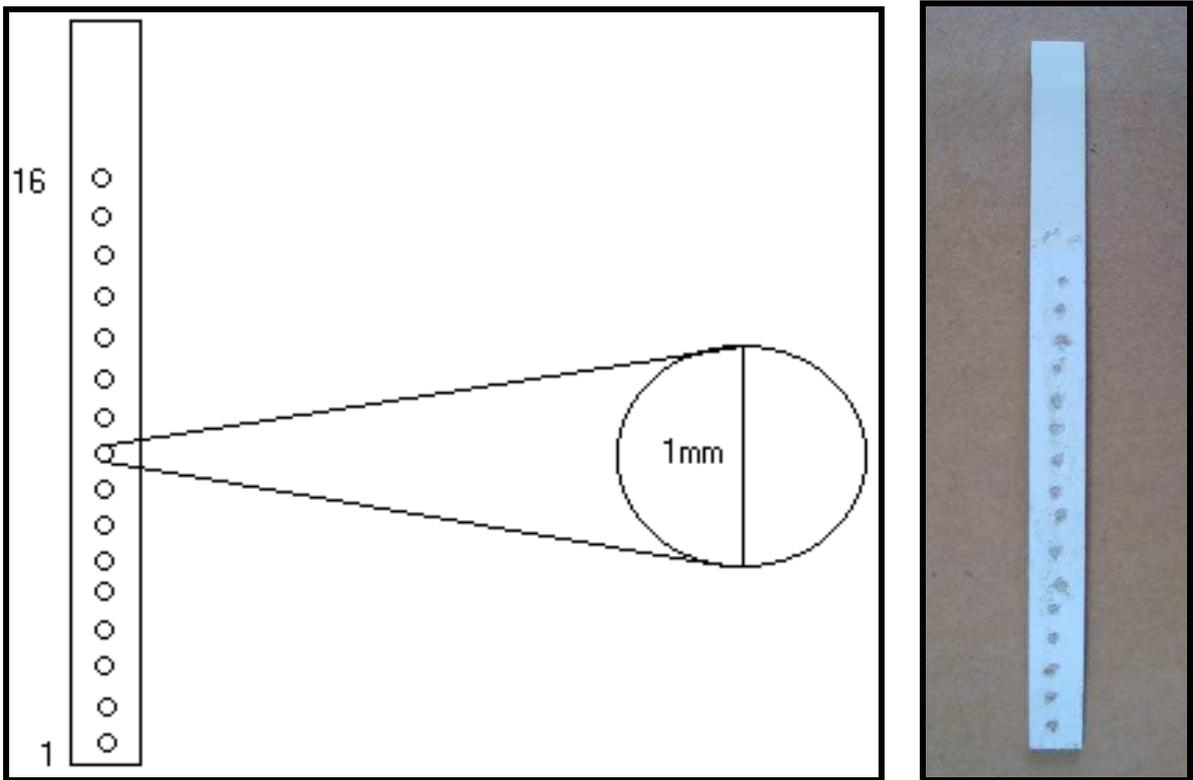
El ensayo se llevó a cabo según una versión preliminar (2005) de la norma ISO/DIS 17512-1, tanto para ensayos con SA como en los ensayos donde se utilizó suelo tratado y control del campo. Se emplearon recipientes plásticos rectangulares de acrílico (20 x 10 x 10 cm) diseñados en el laboratorio. Los recipientes son divididos

en dos secciones utilizando un tabique plástico; se colocan 520 g de suelo control en una sección y 520 g de suelo tratado en la otra. En cada experimento se incluyen recipientes con el mismo suelo control en ambas secciones (control dual) para validar el ensayo.

El tabique es posteriormente removido y se colocan 10 lombrices adultas en la línea central de la superficie de los suelos, dejando que penetren en el suelo. Los contenedores son cubiertos con film con pequeños agujeros, permitiendo suficiente aireación. Al cabo de 3 días, los tabiques son reinsertados en el suelo y se cuenta la cantidad de lombrices en cada compartimiento. En todos los casos se realizaron 5 replicados, tanto de los ensayos control- tratado como de los ensayos control-control.

### **5.3 Ensayos de “lámina cebo”**

Para los ensayos de lámina cebo se utilizan láminas de cloruro de polivinilo (PVC) de 12 cm de largo, 1 cm de ancho y 1 mm de espesor. Dichas láminas tienen 16 perforaciones de 1 mm de diámetro, separadas cada 5 mm. Esos agujeros se llenan con una sustancia cebo adecuada; en este caso se usó una mezcla formada por celulosa (69%), salvado de trigo (30%) y carbón activado (1%) (van Gestel *et al* 2001) (Figura 19).



**Figura 19.** Dibujo de una lámina de PVC y lámina con el cebo lista para utilizar.

En los ensayos de laboratorio, se determinó la actividad alimentaria (AA) de *Eisenia andrei*, luego de su incorporación a muestras de suelos defaunados, según Helling *et al* (1998). El ensayo consiste en la colocación de 350-400 gramos de suelo en vasos contenedores, cada vaso con 4 láminas con cebo colocadas verticalmente y 6 lombrices adultas (Figura 20). Se hicieron 4 replicados por cada tratamiento. Al cabo de 3 días, se retiraron las láminas, se contó la cantidad de agujeros vacíos en las láminas de cada vaso. La AA se evaluó como el porcentaje promedio de orificios total o parcialmente vacíos para cada uno de los tratamientos.



**Figura 20.** Láminas cebo en el laboratorio.

## Materiales y Métodos

---

La evaluación a campo de la actividad biológica de la fauna del suelo, como una medida del proceso de descomposición de la materia orgánica (DMO), se ensayó según von Törne (1990). Las láminas se enterraron superficialmente en forma vertical en los entresurcos. El diseño difiere del de laboratorio en cuanto a que se forman matrices de 16 láminas (4 x 4) separadas 10 cm entre ellas, para cada tratamiento (Figura 21). Se colocaron varias matrices en cada tratamiento, de manera de evaluar la actividad alimentaria a lo largo del tiempo, retirándose las láminas de cada una de las matrices a distintos tiempos desde el inicio del experimento. Una vez retiradas las láminas, se observaron los agujeros vacíos y la distribución de los mismos.



**Figura 21.** Láminas en el campo formando matriz 4x4.

### **6. EXPOSICIÓN DE LOMBRICES *Eisenia andrei* A SA TRATADO CON CLORPIRIFOS Y GLIFOSATO A CONCENTRACIÓN AMBIENTAL PREVISTA (PEC)**

Para poder comparar los resultados de laboratorio con las observaciones en campo (detalladas en el punto 7), se expusieron lombrices a SA suplementado con formulados de los plaguicidas en concentraciones ambientalmente relevantes. Se calcula la Concentración Ambiental Prevista (PEC), considerando la aplicación de los plaguicidas a campo (kg/ha), con una distribución homogénea en los primeros 5 cm de suelo, sin intercepción por el cultivo, y una densidad del suelo de 1100 kg/m<sup>3</sup>.

$PEC_5 = F \times D / \Delta z / \delta$  donde:

$PEC_5$  es la concentración de plaguicida esperada en los 5 cm superiores de suelo (mg/kg); F es el factor de conversión de kg/ha a mg/m<sup>2</sup> (100 mg/m<sup>2</sup>/kg x ha); D es la concentración de plaguicida rociada a campo (kg/ha);  $\Delta z$  es el espesor de la capa de suelo (0,05 m);  $\delta$  es la densidad del suelo (kg/m<sup>3</sup>). En nuestro caso, considerando una densidad de suelo de 1100 kg/m<sup>3</sup>, se obtuvo:

$\text{Concentración Ambiental Prevista (PEC)} = \text{Dosis Campo recomendada} \times 1,8$
---

Las concentraciones ensayadas fueron:

CPF: 1,73 mg/kg (PEC, correspondiente a 960 g ia/ha) y 17,3 mg/kg (10 PEC).

GLI FG: 2,6 mg/kg (PEC, correspondiente a 1440 g equivalente ácido/ha) y 26 mg/kg (10 PEC).

Se evaluaron biomarcadores subcelulares como el TRRN y el Ensayo Cometa, y se incluyeron además puntos finales ecológicamente relevantes como los ensayos de actividad biológica y comportamiento (reproducción, evasión y lámina cebo).

### **7. ENSAYOS A CAMPO: APLICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES OPTIMIZADOS**

Los tratamientos de campo constituyen una mejor aproximación a las condiciones reales de los cultivos, aunque se hallan limitados por la disponibilidad de terrenos libres de tratamientos previos y la laboriosidad y el alto costo de las operaciones a efectuar (Römbke *et al* 2005c). A pesar de estas dificultades, se han podido llevar a cabo campañas en terrenos de la zona pampeana de nuestro país, luego de la siembra de soja tolerante a GLI o trigo. Los terrenos fueron rociados con formulados de plaguicidas a las dosis recomendadas para controlar plagas de estos cultivos (CASAFE 2003). Para la selección de los terrenos y de los plaguicidas a estudiar y para la realización de los tratamientos de campo, se contó con la colaboración de los Ing. Agr. R. Massaro y J.C. Papa de la Estación Agrícola Experimental EEA, INTA, Oliveros, y la Ing. Agr. Rosana Giménez, de la Facultad de Agronomía, UBA.

### 7.1 Áreas de estudio

#### 7.1.1 Oliveros

En noviembre de 2004 se realizó la primera campaña en un terreno lindero a la Estación Experimental Agropecuaria Oliveros (EEA Oliveros), del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). La EEA Oliveros se encuentra a 50 km al norte de la ciudad de Rosario, sobre la ruta nacional 11, Provincia de Santa Fe, Argentina (32° 32' S, 60° 51' O).

El suelo de esta zona se caracteriza por ser arcillo-limoso (Argiudol Maciel típico, INTA 1985), que ha sufrido moderada pérdida de la capa superficial, con escasa cobertura de rastrojo observable al inicio del ensayo. Este tipo de suelos desarrollados a partir de sedimentos minerales en climas templado-húmedos se caracterizan por ser de color negro o pardo. La incorporación sistemática de los residuos vegetales y su mezcla con la parte mineral ha generado en el transcurso del tiempo un proceso de oscurecimiento del suelo por la incorporación de materia orgánica, que se refleja más profundamente en la parte superficial. Estos suelos muy difundidos en todas las provincias del centro-este del país. Prácticamente casi todos se encuentran bajo cultivos diversos como trigo, soja, maíz, girasol o papa. Los Argiudoles son muy extensos en las provincias de la Región Pampeana: Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos, Chaco y Santa Fe, aunque también se encuentran en sectores de las provincias del nordeste como Corrientes, Misiones y Formosa y muy localizados en Santiago del Estero y Tucumán (Moscatelli y Pazos, 2000).

## Materiales y Métodos

---

Las determinaciones físico-químicas de los suelos fueron realizadas por el Instituto de Geocronología y Geología Isotópica (INGEIS) (CONICET-FCEN, UBA), Buenos Aires. Las muestras se tomaron en la capa más superficial del terreno (0-10 cm de profundidad) (Tabla 9).

**Tabla 9.** Análisis físico-químico de los suelos de Oliveros (INGEIS).

pH	5,64-5,79
Conductividad (ds/m)	0,054-0,07
P (mg/kg)	14,7-26,3
Mg <sup>++</sup> (cmol <sub>e</sub> /kg)	1,5
% C org	1,56-1,60
K <sup>+</sup> (cmol <sub>e</sub> /kg)	0,7-0,8
% N org	0,134-0,136
Relación C/N	11,6-11,9
Ca <sup>++</sup> (cmol <sub>e</sub> /kg)	6,2-6,5

La precipitación anual promedio en el área de estudio es de 1006 mm, mientras que la temperatura anual promedio es de 17,7 °C. El suelo presentaba una estructura compacta, debido al uso continuo en agricultura, principalmente con siembra directa. Se sembró soja RR, resistente a GLI (variedad Don Mario) separada a 52 cm, en siembra directa. Los tratamientos se realizaron siguiendo un diseño de bloques completamente aleatorizados con 3 replicados (Figura 22). Cada bloque consistió en 3 parcelas de 13 x 5 metros (Figura 23). Dentro de cada uno de

## Materiales y Métodos

---

los bloques, el tratamiento en cada parcela se asignó previamente por sorteo. Las aplicaciones se realizaron con una pulverizadora manual calibrada. Las parcelas control se rociaron con agua; para CPF se realizó una única aplicación de formulado Atanor 48 CE (48 % ia, concentrado emulsionable, 620 g ia/ha), 30 días después de la siembra ( $t_0$ ); para GLI se realizaron dos aplicaciones con Roundup FG (sal monoamónica, 72,0 % e.a, formulación granulada), 1440 g e.a./ha, 24 h después de la siembra y en  $t_0$ . Las dosis aplicadas fueron las recomendadas en la bibliografía para este tipo de cultivos, en algunos casos modificadas teniendo en cuenta la experiencia previa de los ingenieros agrónomos que colaboraron con las evaluaciones a campo.

BLOQUE 3	Glifosato
	Control
	Clorpirifos
	250 m
BLOQUE 2	Clorpirifos
	Control
	Glifosato
	250 m
BLOQUE 1	Control
	Clorpirifos
	Glifosato

**Figura 22.** Diseño de bloques campaña Oliveros.



**Figura 23.** Parcela demarcada en el campo.

Para los bioensayos de laboratorio se tomaron muestras de suelo, aproximadamente 10- 15 kg, de la capa superior (0-10 cm de profundidad), de cada una de las parcelas. Las muestras se tomaron de los entresurcos de la soja un día ( $t_1$ ) y 10 días ( $t_2$ ) después de después de la primera aplicación de los plaguicidas. Las concentraciones de plaguicidas en los suelos fueron determinadas en muestras de dos profundidades (0-3 cm y 0-10 cm), que se mantuvieron refrigeradas hasta su análisis. El CPF se determinó en el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), por cromatografía gaseosa (CGL) y detector fotométrico de llama.

Las determinaciones de GLI se realizaron en el Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC), Santa Fe, por medio de técnicas de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), con derivatización post-columna y detección por fluorescencia.

### 7.1.2 Colón

En el invierno/primavera del año 2005 se realizó una campaña, en un terreno cedido por productores, en el sur de la provincia de Santa Fe (33°55'24"S, 61°16'42" O), cercano a la ciudad de Colón, Provincia de Buenos Aires, en un suelo franco arcilloso (Argiudol Maciel típico, INTA 1985), con abundante cobertura de rastrojo. Las evaluaciones físico-químicas del suelo se realizaron en el mismo Instituto que las de Oliveros, sobre muestras tomadas en la capa superficial del terreno (0-10 cm de profundidad) (Tabla 10).

**Tabla 10.** Análisis físico-químico de los suelos de Colón (INGEIS)

pH	5,8-5,9
Conductividad (ds/m)	0,33-0,47
P mg/kg	10,0-20,3
Mg <sup>++</sup> (cmol <sub>o</sub> /kg)	1,8-2,1
% C Org	2,04-2,45
K <sup>+</sup> (cmol <sub>o</sub> /kg)	1,6-1,8
% N org	0,165-0,181
Relación C/N	12,2-13,5
Ca <sup>++</sup> (cmol <sub>o</sub> /kg)	8,3-9,0

La precipitación anual promedio en el área donde se llevó a cabo esta campaña es de 726 mm, mientras que la temperatura promedio es de 16, 5 °C. El campo se sembró con trigo, y en este caso se decidió evaluar el impacto de distintas

## Materiales y Métodos

---

concentraciones de CPF. Los tratamientos se realizaron siguiendo un diseño de bloques completamente aleatorizados con 3 replicados. Cada bloque consistió de 3 parcelas de 13 x 5 metros. Dentro de cada uno de los bloques, el tratamiento en cada parcela se asignó previamente por sorteo (Figura 24). Las aplicaciones se realizaron con una pulverizadora manual calibrada; las parcelas control se rociaron con agua. El formulado de CPF Atanor 48 % (CE) se aplicó en dos concentraciones: 240 g ia/ha (dosis baja - DB) y 960 g ia/ha (dosis alta - DA), en una única aplicación 30 días después de la siembra ( $t_0$ ).

BLOQUE 3	CPF 960 g ia/ha
	Control
	CPF 240 g ia/ha
	250 m
BLOQUE 2	Control
	CPF 240 g ia/ha
	CPF 960 g ia/ha
	250 m
BLOQUE 1	CPF 240 g ia/ha
	CPF 960 g ia/ha
	Control

**Figura 24.** Diseño de bloques campaña Colón

Se tomaron muestras de suelo para las determinaciones de CPF, que fueron refrigeradas y llevadas al laboratorio. Los análisis se realizaron en el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), Buenos Aires, por cromatografía gaseosa (CGL) y detector fotométrico de llama.

Para los bioensayos de laboratorio se tomaron muestras de suelo, aproximadamente 10-15 kg de la capa superior (0-10 cm de profundidad), de cada una de las parcelas. Las muestras se tomaron un día ( $t_1$ ) y 14 días ( $t_2$ ) después de la aplicación de CPF ( $t_0$ ).

### **7.2 Preparación de los suelos en laboratorio**

Los suelos provenientes de los ensayos de campo se tamizaron por malla de 2 mm; se determinó el porcentaje de humedad y CRA. Al iniciarse los ensayos, la humedad se ajustó al 60 % de la CRA. Las lombrices se expusieron entre 3 días y 8 semanas, dependiendo del punto final elegido, según lo descrito para SA. Durante los ensayos, el contenido de humedad del suelo se mantuvo constante por agregado de agua destilada, y se midió el pH al principio y al final.

## **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Los resultados fueron analizados con el programa GraphPad InStat 3 (GraphPad Software, San Diego, USA). Los datos fueron testeados para normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de las varianzas (Bartlett). Según estos resultados, las medias entre grupos fueron comparadas por análisis de varianza de una vía (ANOVA), o test no paramétrico de Kruskal- Wallis. Cuando se demostró

## Materiales y Métodos

---

significancia ( $p < 0,05$ ), las medias fueron comparadas por el método de Tukey-Kramer o el no paramétrico de Dunn, según correspondiera. Las correlaciones lineales se analizaron usando el test de Pearson. Las  $CL_{50}$  fueron calculadas por el método probit empleando el programa estadístico US EPA Probit 1.5 (1992). En los experimentos de evasión, para el análisis estadístico de los resultados se usó el Test  $t$  de Student para muestras apareadas. Para los experimentos control-tratamiento se aplicó un test de una cola, mientras que para los experimentos control-control se usó un test de dos colas (Natal Da Luz *et al* 2004).

# ***Resultados***

## Resultados

### 1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE CELOMOCITOS

La Tabla 11 resume los resultados del estudio comparativo de los métodos alternativos para la extracción de los celomocitos de lombrices *Eisenia andrei*.

La viabilidad de las células obtenidas por los distintos métodos no mostró diferencias significativas, superando en los tres casos el 90 %. En cuanto al número total de células por lombriz, las diferencias entre los métodos fueron significativas ( $p < 0,05$ ). Si bien el número de células obtenidas por extrusión con medio irritante fue el más alto ( $(4,0 \pm 0,7) \times 10^4$ ), el método de excitación eléctrica presenta la ventaja de producir suspensiones con menor cantidad de sustancias químicas agregadas, que podrían interferir en ensayos posteriores. Además por ser más sencillo, rápido y económico, resultó la alternativa más útil y por ello fue seleccionado para la obtención de celomocitos de *Eisenia andrei* para realizar los ensayos de TRRN y Cometa.

**Tabla 11.** Comparación de métodos de extracción de celomocitos de *Eisenia andrei*.

<b>Método de obtención</b>	<b>Punción celómica</b>	<b>Excitación eléctrica</b>	<b>Medio irritante</b>
<b>Parámetros</b>			
Viabilidad celular (%)	$95,4 \pm 2,3^{(a)}$	$97,3 \pm 0,4^{(a)}$	$98,5 \pm 1,0^{(a)}$
Nº células/10 $\mu$ l	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^4^{(a)}$	$(1,7 \pm 0,4) \times 10^4^{(a)}$	$(4,0 \pm 0,7) \times 10^4^{(b)}$
Nº células/lombriz	$(8,9 \pm 1,6) \times 10^4^{(a)}$	$(2,5 \pm 0,5) \times 10^6^{(b)}$	$(6,0 \pm 1,1) \times 10^6^{(c)}$

Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar. Diferentes supraíndices indican diferencias significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ).

### **2. BIOENSAYOS DE EXPOSICIÓN EN PAPEL**

#### **2.1 Clorpirifos: Comparación entre producto técnico y formulado**

Teniendo en cuenta que el producto técnico puede diferir marcadamente del formulado en numerosas propiedades, se realizaron bioensayos para la evaluación en forma comparativa de la toxicidad letal y de biomarcadores de exposición y/o efecto por exposición a papeles impregnados, en condiciones de laboratorio.

##### **2.1.1 Determinación de concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>)**

En lombrices expuestas durante 72 horas a concentraciones crecientes de CPF formulado 48 % (Atanor 48 CE) y grado técnico (98% p/p), se determinó la CL<sub>50</sub> por método probit, según lo descrito en Materiales y Métodos 3.3.

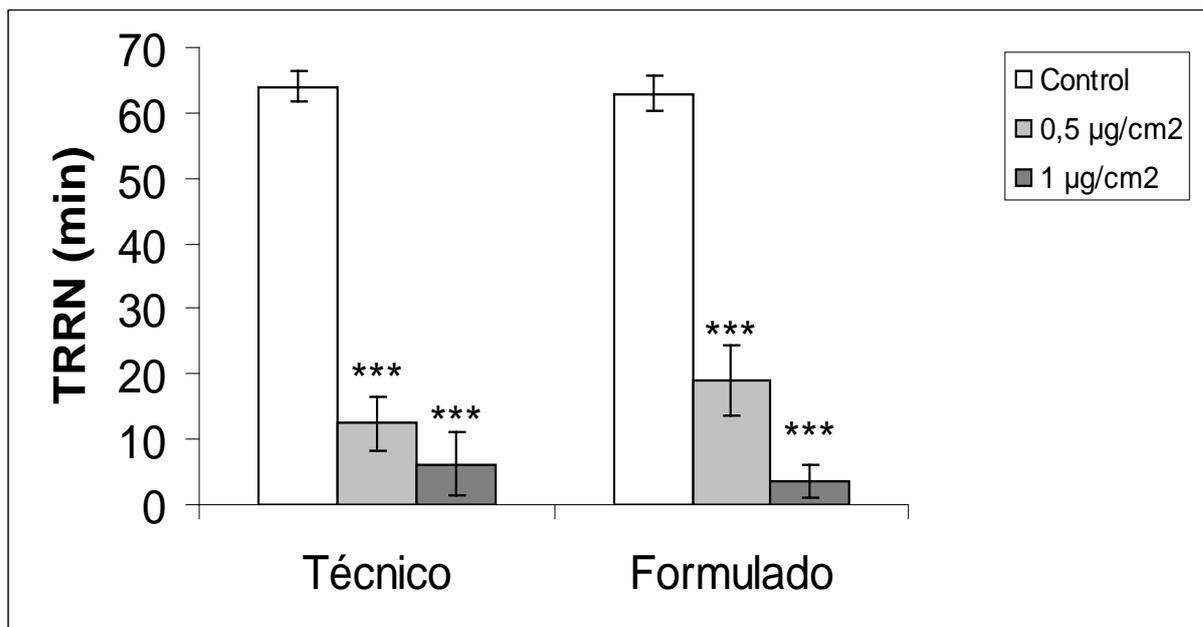
Para CPF técnico, se obtuvo una CL<sub>50</sub> = 2,20 µg/cm<sup>2</sup> (intervalo de confianza 95 %: 1,20-6,76 µg/cm<sup>2</sup>). Para el formulado, la CL<sub>50</sub> fue de 2,80 µg/cm<sup>2</sup> (IC: 1,31-7,63 µg/cm<sup>2</sup>). La superposición de los intervalos de confianza estaría indicando que la toxicidad letal de ambos productos es semejante.

##### **2.1.2 Ensayo del TRRN**

En celomocitos de lombrices controles y expuestas a papeles impregnados con concentraciones subletales (0,5 y 1,0 µg/cm<sup>2</sup>) de CPF técnico (98 %) y formulado (CE 48 %), durante 72 horas, se evaluó TRRN. Éstos mostraron una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) con respecto a los valores obtenidos para los controles, concentración-dependiente, para ambos productos (Figura 25). Para los controles el TRRN excedió los 60 minutos, indicando buen estado de la membrana lisosomal. Para CPF técnico los TRRN fueron de  $12,50 \pm 4,20$  y  $6,25 \pm 4,80$  minutos

## Resultados

respectivamente; para el formulado, de  $19,00 \pm 5,50$  y  $3,75 \pm 2,50$  minutos respectivamente, sin diferencias significativas entre ambos, indicando que el efecto sobre la membrana lisosomal es debido al CPF y no a los coadyuvantes de la formulación.



**Figura 25.** TRRN en celomocitos de lombrices *Eisenia andrei* expuestas a distintas concentraciones de CPF formulado y técnico en papel durante 72 horas. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desvío estándar (5 lombrices/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

### 2.1.3 Ensayo Cometa

El daño al ADN se expresa como porcentaje de células dañadas (%D), que incluye todas las células con bajo, moderado y alto nivel de daño. Además, para evaluar el daño global de c/u de los tratamientos y asignar a cada nivel de daño su importancia relativa, se utilizó el Índice de Daño (ID) ponderado, según se define en Materiales y Métodos 4.3.

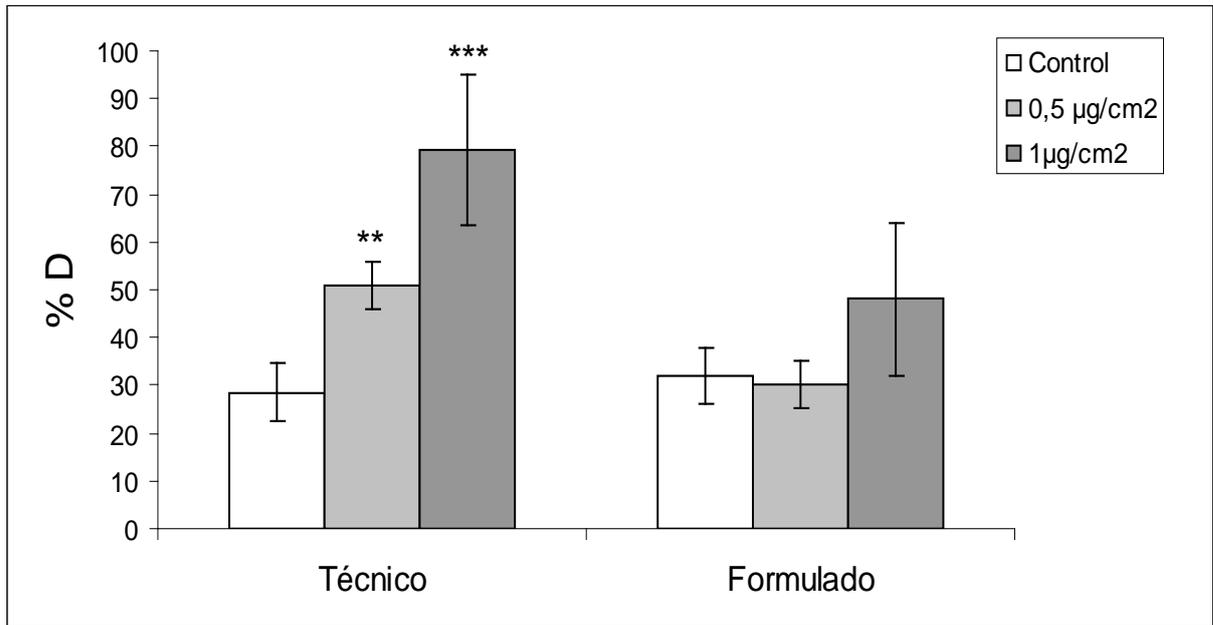
## Resultados

---

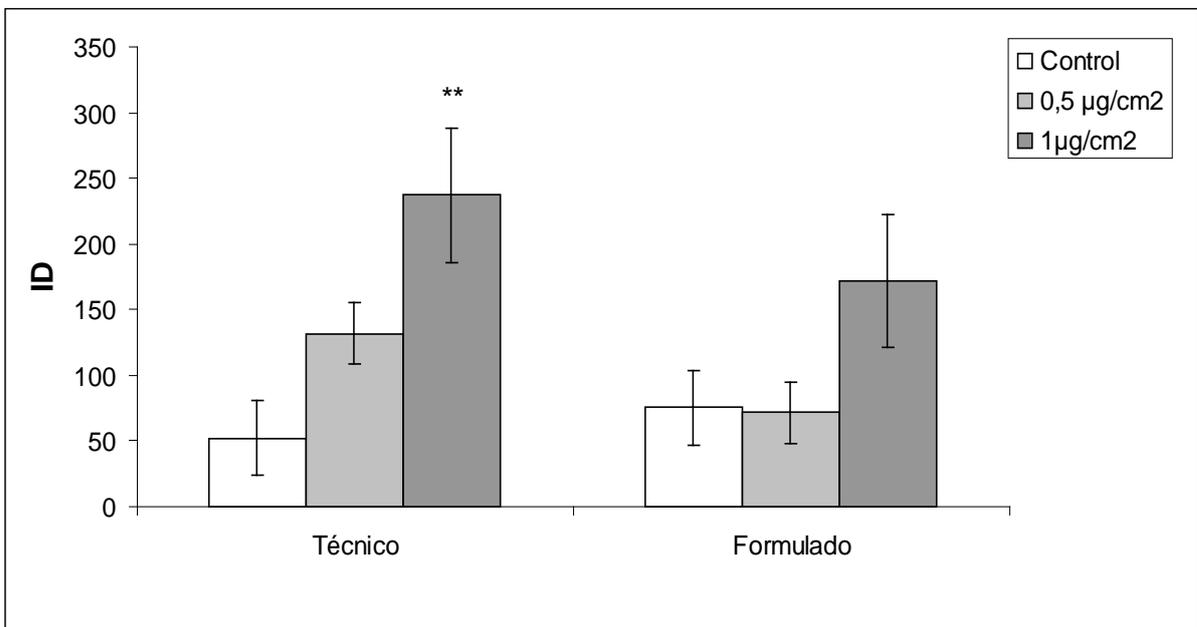
El CPF formulado no presentó diferencias significativas para ninguna de las concentraciones estudiadas, ni en el ID (Control:  $75,3 \pm 28,0$ ;  $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ :  $71,5 \pm 23,8$  y  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ :  $172,5 \pm 51,3$ ) ni en el % D (C:  $32,0 \pm 8,9$ ;  $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ :  $30,0 \pm 10,0$  y  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ :  $48,0 \pm 15,9$ ) (Figuras 26 y 27).

En la exposición a clorpirifos grado técnico, para el % D se encontraron diferencias significativas con los controles ( $28,5 \pm 6,8$ ) para las dos concentraciones estudiadas:  $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $50,9 \pm 5,1$ ;  $p < 0,01$ ) y  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $79,3 \pm 12,4$ ;  $p < 0,001$ ). Al estudiar el ID, no se registraron diferencias entre los controles ( $52,3 \pm 13,6$ ) y la menor concentración estudiada ( $132,0 \pm 20,7$ ) pero sí con la concentración de  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $237,1 \pm 60,6$ ;  $p < 0,01$ ). Esto indica que a la menor concentración hay muchas células con nivel de daño bajo o medio, mientras que para  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  es mayor el número de células con nivel de daño alto, lo que se confirma cuando se analiza el número de cometas por nivel de daño (datos no presentados).

## Resultados



**Figura 26.** Porcentaje de daño al ADN obtenido mediante el Ensayo Cometa en celomocitos de lombrices *Eisenia andrei* expuestas a distintas concentraciones de CPF técnico y formulado durante 72 horas. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (4 lombrices/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



**Figura 27.** Índice de daño al ADN obtenido mediante el Ensayo Cometa en celomocitos de *Eisenia andrei* expuestas a distintas concentraciones de CPF técnico y formulado durante 72 horas. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (4 lombrices/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\* $p < 0,01$ ).

## Resultados

### 2.2 Glifosato: Comparación entre diferentes formulaciones

#### 2.2.1 Determinación de la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>)

El ensayo de toxicidad aguda en lombrices empleando el método del papel impregnado es una herramienta útil para comparar la toxicidad de diferentes formulaciones de un plaguicida.

Se expusieron lombrices a papeles de filtro impregnados con concentraciones crecientes de tres formulados de glifosato de uso en agricultura, según lo descrito en Materiales y Métodos 3.3, evaluando el porcentaje de mortalidad y la pérdida de peso para cada concentración. De las curvas concentración-mortalidad, se calcularon las CL<sub>50</sub> por el método probit. En la Tabla 12 se muestran las características de los formulados y los valores de CL<sub>50</sub> obtenidos.

**Tabla 12.** Concentración letal 50 en *Eisenia andrei* expuestas a los formulados de glifosato ensayados.

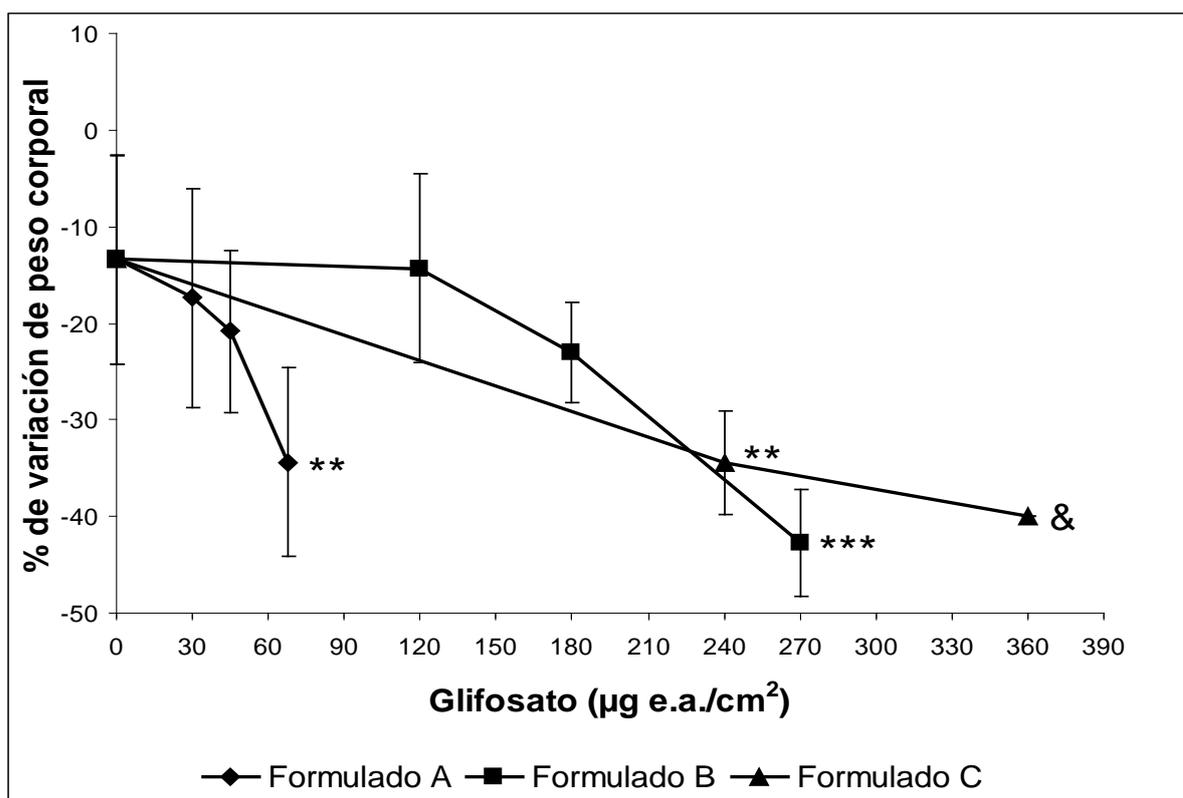
Formulado	Ingrediente activo (ia) equivalente ácido (% e.a.)	CL <sub>50</sub> µg/cm <sup>2</sup> (intervalo de confianza 95 %)
A (Roundup FG)	Glifosato, sal monoamónica (72,0)	66,0 (54,6 – 82,1)
B (Roundup 48%)	Glifosato, sal isopropilamina (36,0)	276,4 (232,5 – 330,4)
C (Mon 8750)	Glifosato, sal monoamónica (85,4)	293,9 (254,0 – 339,8)

Las formulaciones A y C son sales monoamónicas de GLI, con 72 % y 85,4 % de e. a., respectivamente. Sin embargo el formulado A es notoriamente más tóxico que el

## Resultados

formulado C ( $CL_{50}$  de 66,0 y 293,9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente). El formulado B, sal isopropilamina de GLI, que contiene POEA, presentó una  $CL_{50}$  similar a la del formulado C.

Por su parte, la variación de peso de las lombrices expuestas a GLI muestra una disminución concentración-dependiente, alcanzando un 40% para el Formulado B, significativa para las mayores concentraciones ensayadas de los tres formulados, evidenciando un efecto subletal de los mismos (Figura 28). En los controles, la pérdida de peso fue inferior al 20 %, asegurando la validez del ensayo, ya que valores superiores indicarían un deterioro en la salud de las lombrices o que el sustrato fue inadecuado.



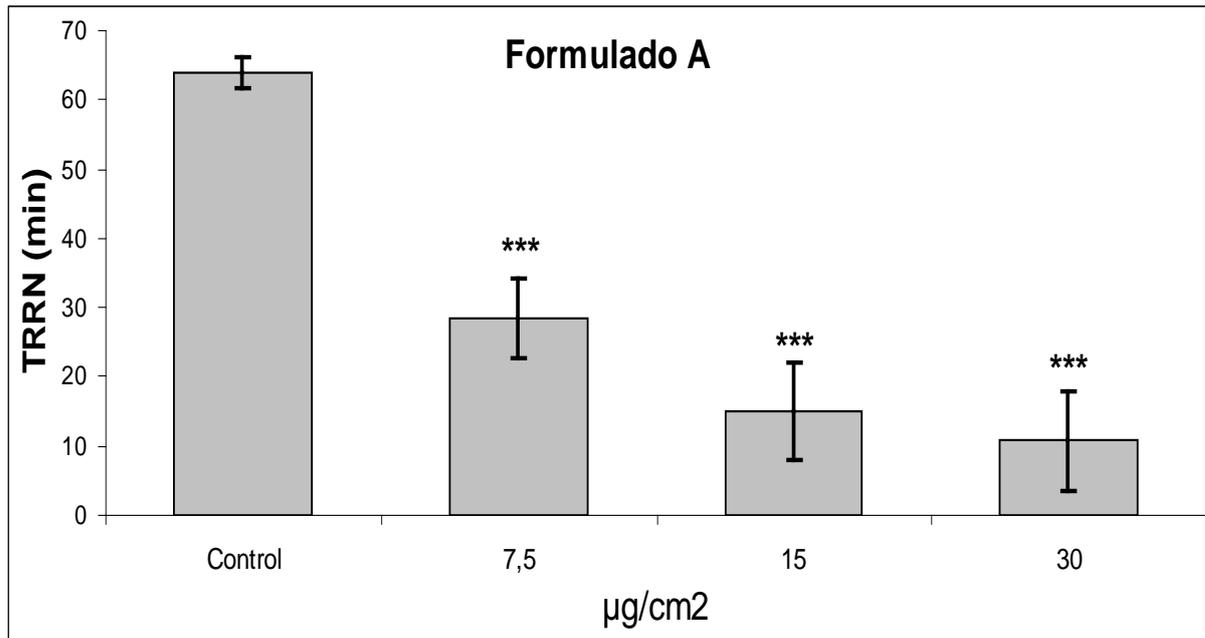
**Figura 28.** Variación de peso en lombrices *Eisenia andrei* expuestas a distintas concentraciones de tres formulados de GLI durante 72 horas. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desvío estándar (4 lombrices/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; &, una lombriz sobreviviente).

### **2.2.2 Ensayo del TRRN**

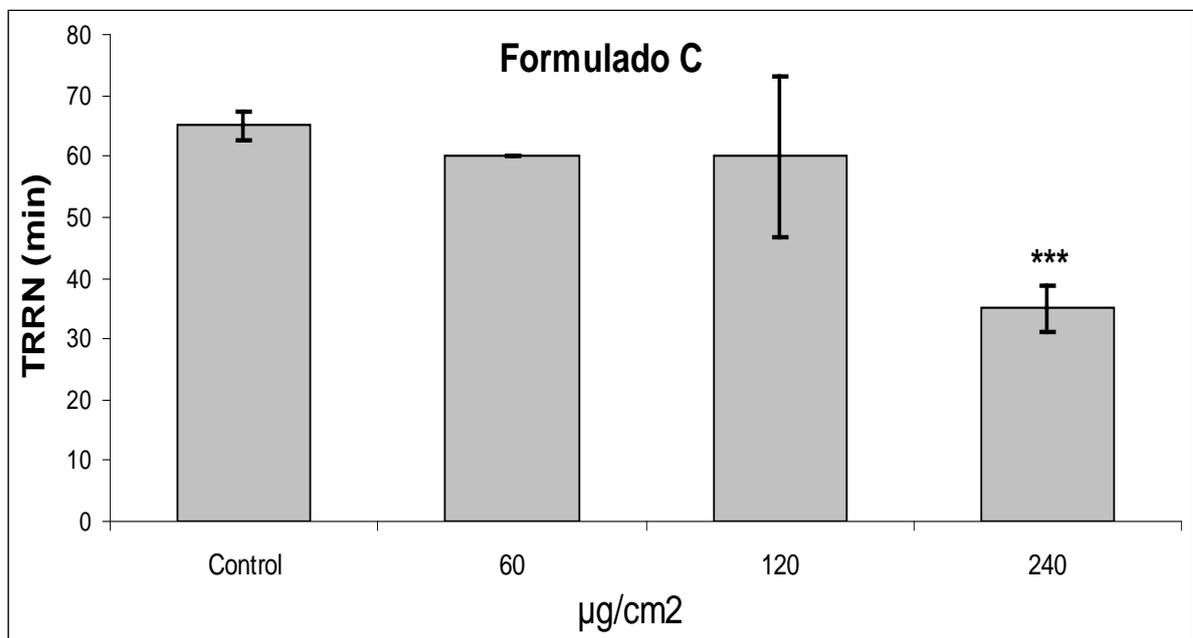
Se evaluó el TRRN en celomocitos de lombrices expuestas a concentraciones subletales de los compuestos A y C, ambos sales monoamónicas de glifosato, con diferencias en la formulación. El producto C, de mayor pureza, es usado para manufactura y formulación. En las figuras 29 y 30 se muestran los resultados obtenidos.

Los TRRN mostraron una disminución significativa, concentración-dependiente, a todas las concentraciones ensayadas para el formulado A; 7,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $28,3 \pm 5,8$  minutos,  $p < 0,001$ ), 15  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $15,0 \pm 7,1$  minutos,  $p < 0,001$ ), y 30  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $10,7 \pm 7,3$  minutos,  $p < 0,001$ ) respecto de los controles ( $64,0 \pm 2,2$  minutos). Para el formulado C, sólo se observó un descenso significativo respecto del control ( $65,0 \pm 2,2$  minutos) a la mayor concentración ensayada, 240  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $35,0 \pm 3,8$  minutos,  $p < 0,001$ ). Estos resultados concuerdan con la mayor toxicidad observada para el formulado A en el ensayo de  $\text{CL}_{50}$ .

## Resultados



**Figura 29.** TRRN en celomocitos de lombrices *Eisenia andrei* expuestas a distintas concentraciones del formulado A (GLI FG) en papel durante 72 horas. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (5 lombrices/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\*\*p<0,001).

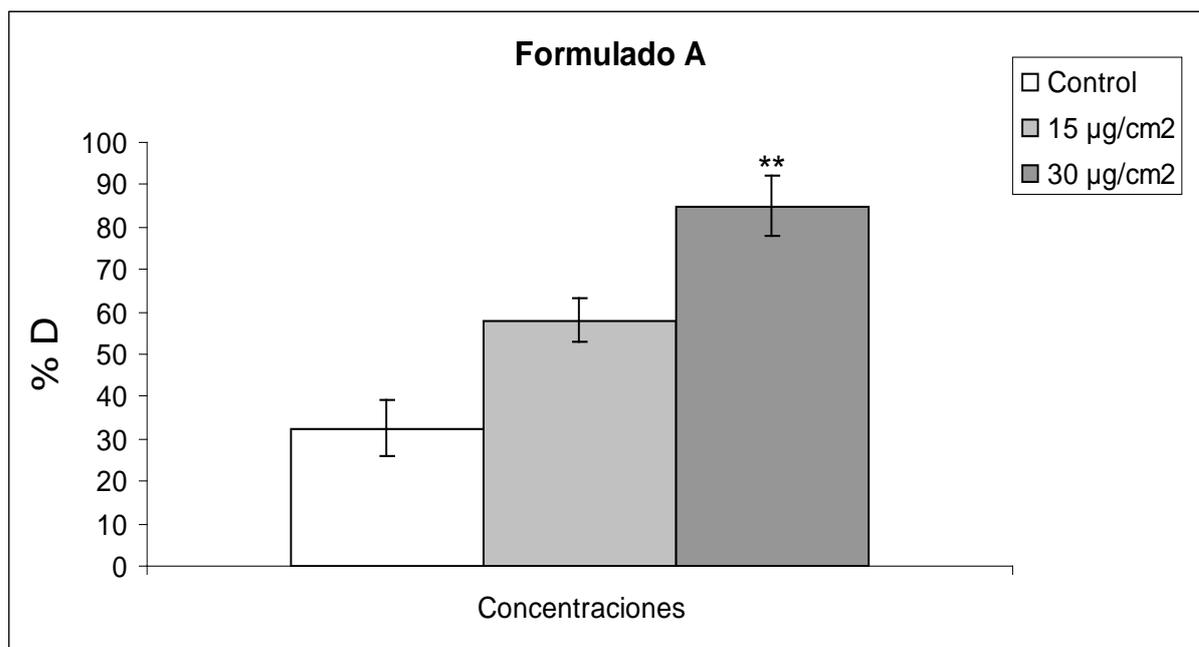


**Figura 30.** TRRN en celomocitos de lombrices *Eisenia andrei* expuestas a distintas concentraciones del formulado C (Mon 8750) en papel durante 72 horas. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (5 lombrices/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\*\*p<0,001).

### 2.2.3 Ensayo Cometa

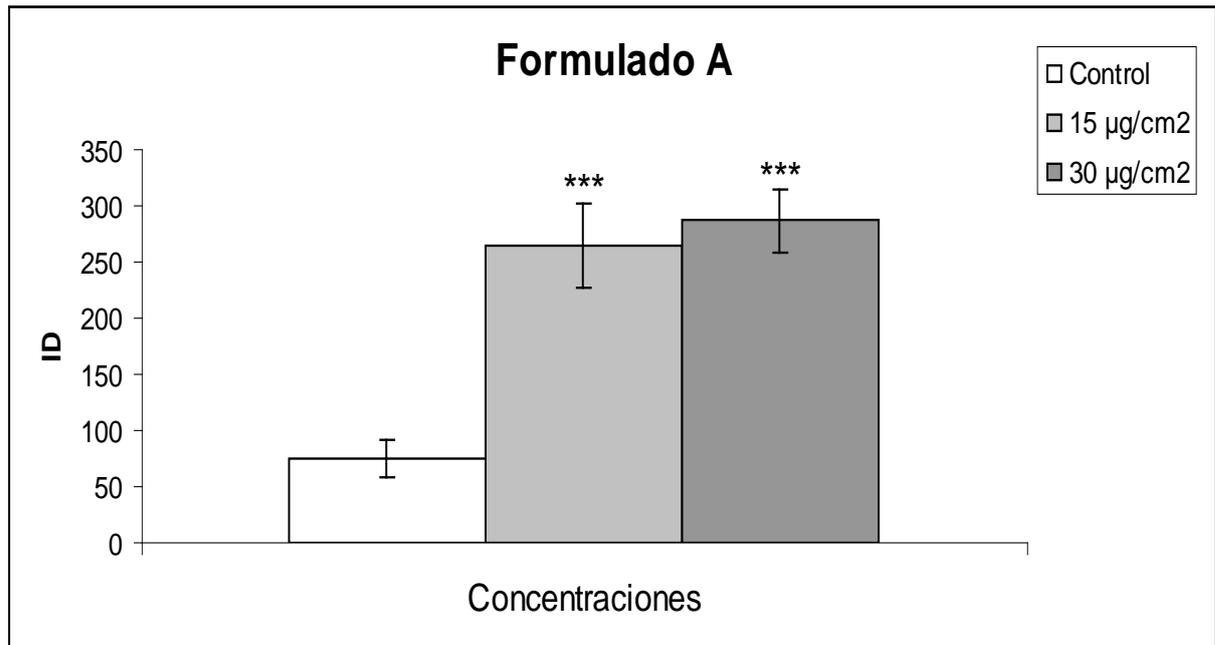
En celomocitos de lombrices expuestas a los formulados A y C, se ensayó daño al ADN a través del Ensayo Cometa.

En las figuras 31 y 32 se muestran los resultados obtenidos con el formulado A. Se observaron diferencias significativas para el % de daño, sólo a la mayor concentración estudiada ( $85,0 \pm 7,1$ ;  $p < 0,01$ ), mientras que en el ID las diferencias entre los controles ( $75,5 \pm 16,7$ ) y los tratados fueron muy significativas para ambas concentraciones,  $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $264,7 \pm 38,1$ ;  $p < 0,001$ ) y  $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $287,0 \pm 28,3$ ;  $p < 0,001$ ).



**Figura 31.** Porcentaje de daño al ADN obtenido mediante el Ensayo Cometa en celomocitos de lombrices *Eisenia andrei* expuestas a distintas concentraciones de GLI Roundup FG en papel durante 72 horas. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (5 lombrices/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\* $p < 0,01$ ).

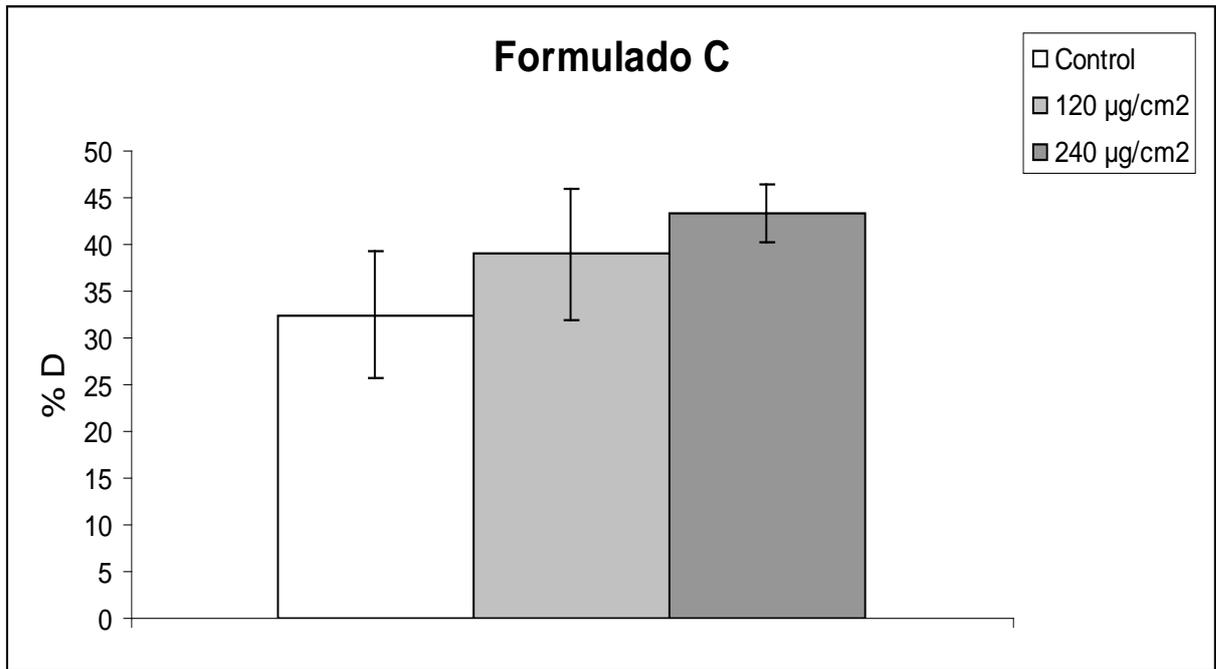
## Resultados



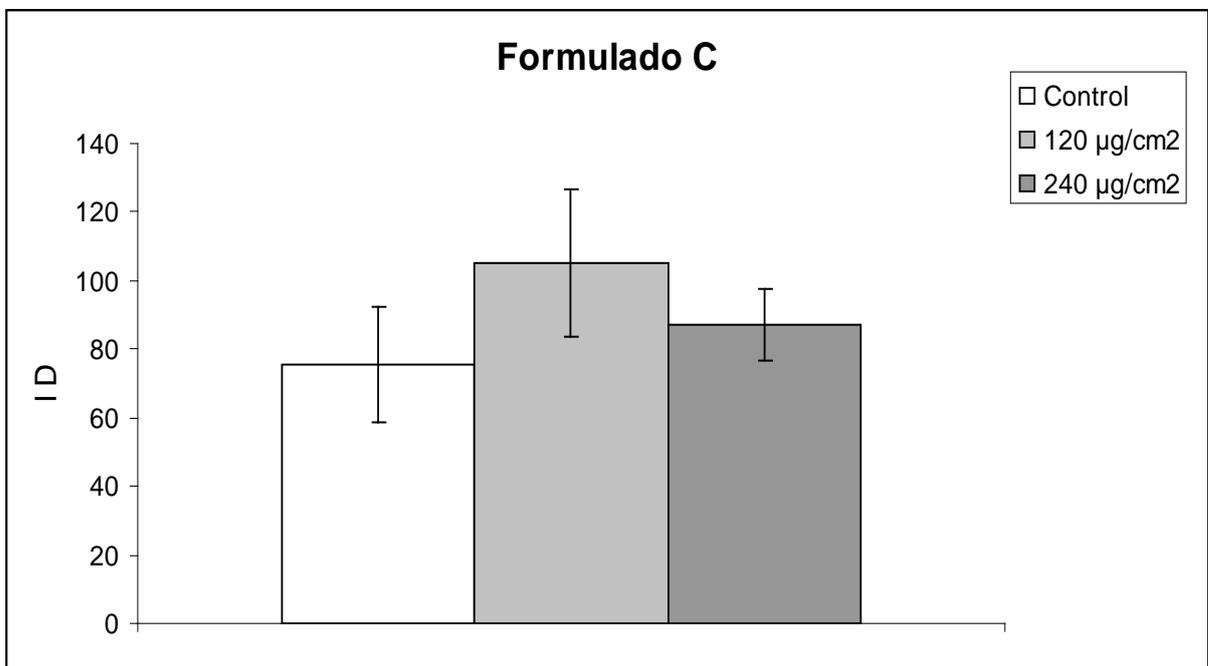
**Figura 32.** Índice de daño al ADN obtenido mediante el Ensayo Cometa en celomocitos de *Eisenia andrei* expuestas a distintas concentraciones de GLI Roundup FG en papel durante 72 horas. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desvío estándar (5 lombrices/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\* $p < 0,001$ ).

En el caso del formulado C, los resultados están representados en las figuras 33 y 34. El % daño no mostró diferencias entre los controles y ambas concentraciones estudiadas (C:  $32,5 \pm 6,8$ ;  $120 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ :  $39,0 \pm 7,0$ ;  $240 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ :  $43,3 \pm 3,2$ ), igual resultado se obtuvo al comparar el ID de los celomocitos obtenidos de lombrices expuestas a ambas concentraciones del formulado C y el control (C:  $75,5 \pm 19,7$ ;  $120 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ :  $105,3 \pm 21,4$ ;  $240 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ :  $87,0 \pm 10,4$ ).

## Resultados



**Figura 33.** Porcentaje de daño al ADN obtenido mediante el Ensayo Cometa en celomocitos de lombrices *Eisenia andrei* expuestas a distintas concentraciones de GLI Mon 8750 en papel durante 72 horas. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (5 lombrices/concentración).



**Figura 34.** Índice de daño al ADN obtenido mediante el Ensayo Cometa en celomocitos de *Eisenia andrei* expuestas a distintas concentraciones de GLI Mon 8750 en papel durante 72 horas. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (5 lombrices/concentración).

Los bioensayos en celomocitos, TRRN y Cometa, resultaron métodos simples para evaluar toxicidad de plaguicidas en lombrices. Estos potenciales biomarcadores fueron seleccionados para posteriores bioensayos de mayor nivel de complejidad.

### **3. BIOENSAYOS EN SUELO ARTIFICIAL**

#### **3.1 Determinación de concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>): Clorpirifos - Glifosato**

A través de bioensayos de concentración-respuesta, por exposición en suelo artificial, se evaluó la CL<sub>50</sub> para clorpirifos técnico (GT-98% p/p) y formulado y formulados de glifosato A, B, C (Resultados 2.2.1). En todos los casos, en los controles no hubo mortalidad y la pérdida de masa fue inferior al 20 %, validando los resultados del ensayo.

Para GLI, no hubo mortalidad a concentraciones de 1000 mg/kg, para ninguno de los formulados. Por lo tanto, de acuerdo con la norma ISO 11268-1 (1993), la CL<sub>50</sub> se expresa como mayor a 1000 mg/kg peso seco de suelo artificial.

Las normas internacionales establecen que en casos en que una relación entre dos concentraciones sucesivas igual o menor a 1,8 den 100 % y 0 % de mortalidad respectivamente, se deben indicar la mayor concentración ensayada que causa 0 % y la menor que causa 100 %. En el caso del CPF, tanto el producto técnico como el formulado mostraron una curva concentración-respuesta con mucha pendiente, con un porcentaje de mortalidad de 0 % para 300 mg/kg, y de 100 % para 450 mg/kg, por tanto la CL<sub>50</sub> se expresa entre 300 mg/kg- 450 mg/kg. Cabe aclarar que ya a una concentración de 200 mg/kg se observan alteraciones comportamentales

evidentes, tales como agitación, enrollamiento y excesiva secreción mucosa, y una pérdida de peso mayor al 30 %.

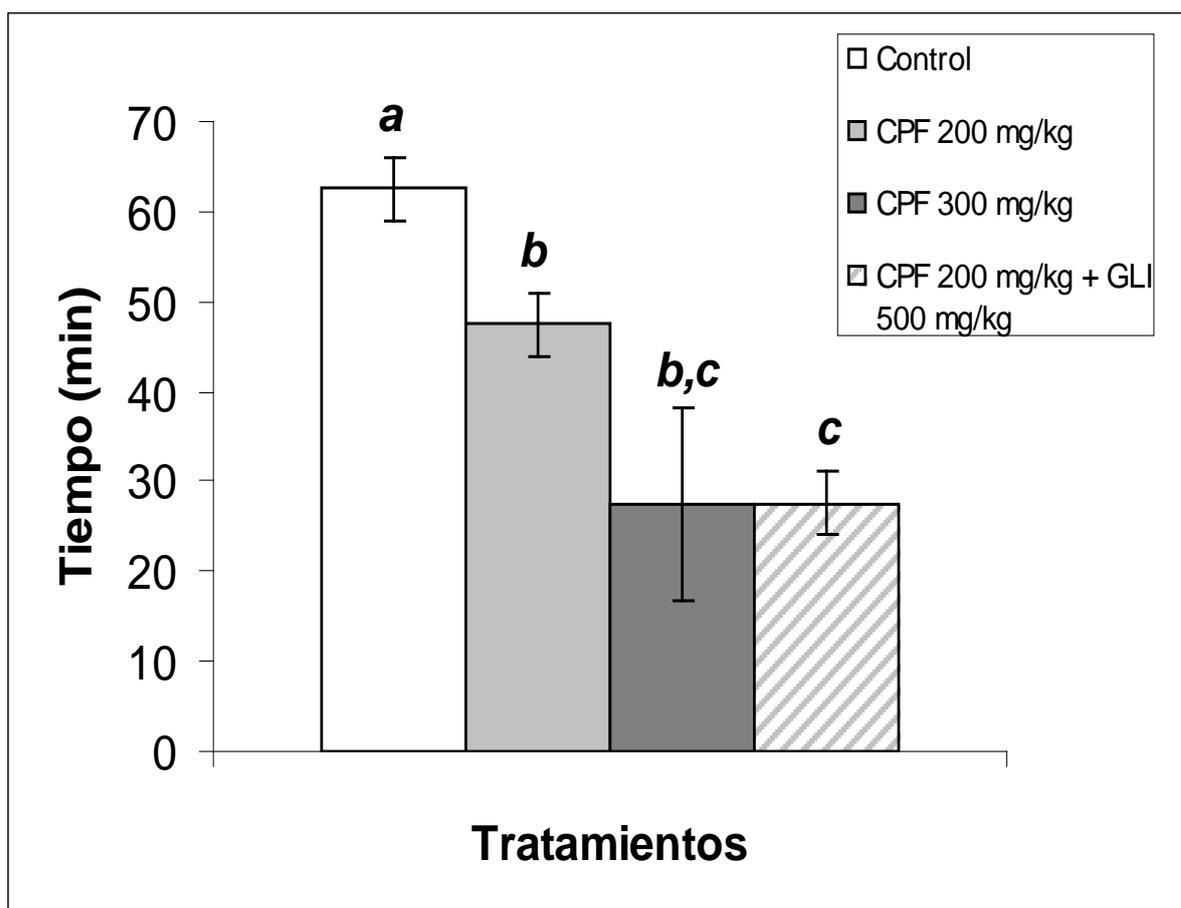
### **3.2 Estudios con clorpirifos y glifosato solos y en combinación**

En celomocitos de lombrices expuestas a concentraciones subletales de CPF (GT 98 % p/p, 200 y 300 mg/kg de suelo artificial), a la mezcla CPF (200 mg/kg) + GLI (sal monoamónica, 85,4 % e.a., 500 mg/kg de suelo artificial) y controles, se evaluaron TRRN y el Ensayo Cometa.

#### **3.2.1 Ensayo del TRRN**

En la figura 35 se muestran los resultados obtenidos. La exposición a CPF disminuyó significativamente el TRRN para las dos concentraciones estudiadas (200 mg/kg:  $47,5 \pm 3,5$  min;  $p < 0,05$ ; 300 mg/kg:  $27,5 \pm 10,6$  min;  $p < 0,01$ ). Cuando se estudiaron los efectos de la mezcla de CPF + GLI, el TRRN fue significativamente menor tanto respecto del control como respecto de CPF 200 mg/kg ( $27,5 \pm 3,5$  minutos;  $p < 0,01$ ).

## Resultados



**Figura 35.** TRRN en celomocitos de lombrices *Eisenia andrei* expuestas a distintas concentraciones de CPF y CPF + GLI en suelo artificial durante 14 días). Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (5 lombrices/concentración). Letras distintas indican diferencias significativas entre sí.

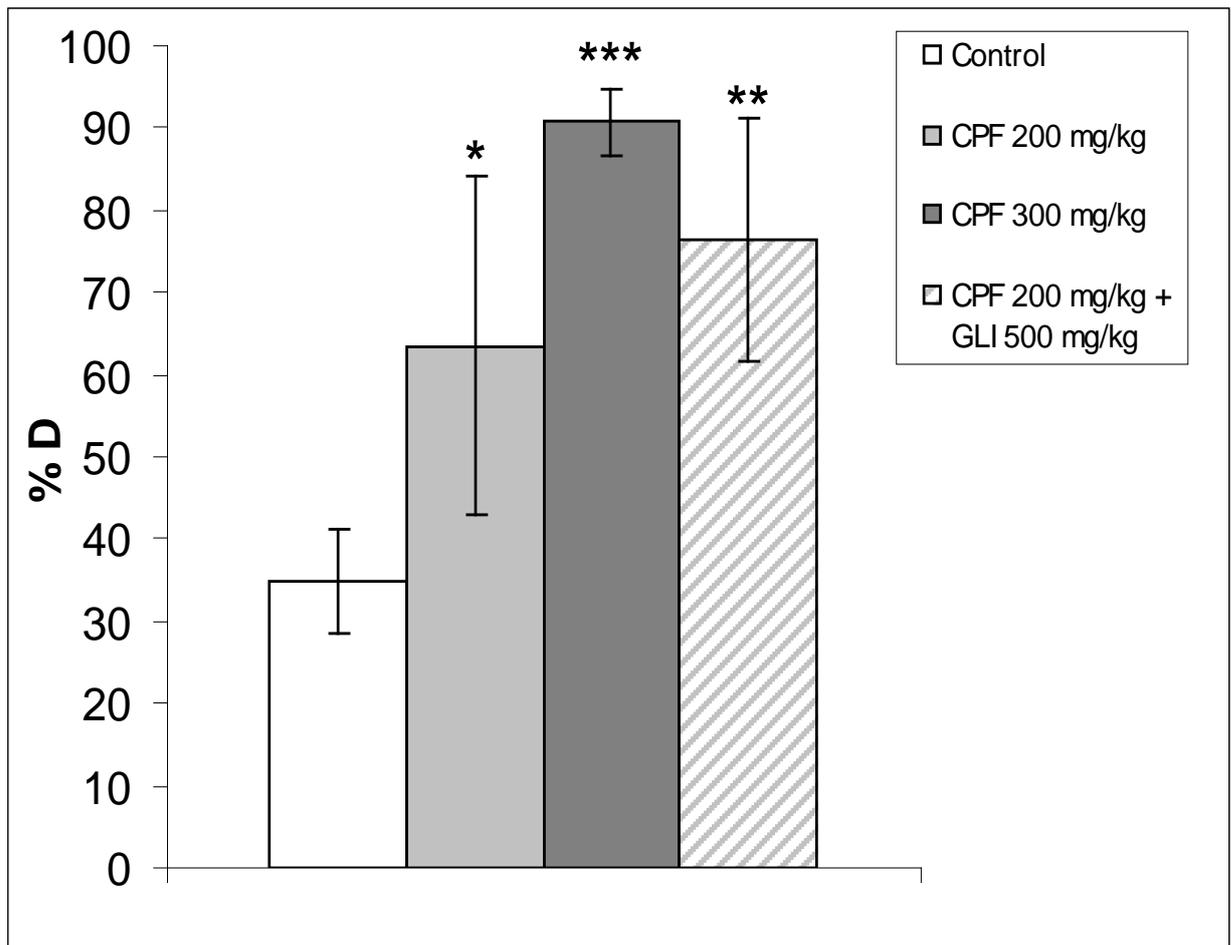
### 3.2.2 Ensayo Cometa

El CPF produjo un aumento en la migración del ADN (medida como porcentaje de daño e índice de daño) concentración-dependiente. Ambos parámetros mostraron diferencias significativas entre todos los tratamientos y los controles. Sin embargo la exposición a la mezcla CPF+GLI no modificó significativamente dichos parámetros, no observándose efectos combinados de los plaguicidas.

## Resultados

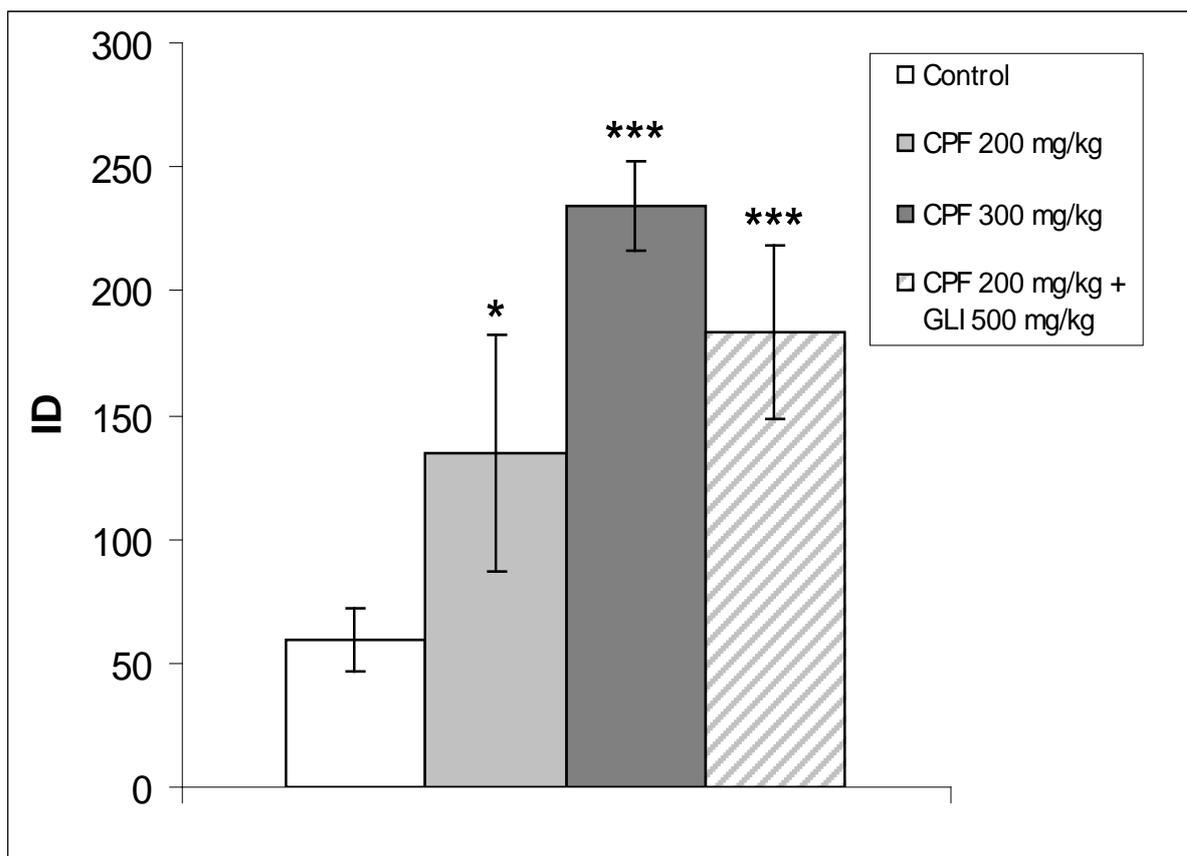
Para el % D, los valores obtenidos fueron: Control:  $34,7 \pm 6,3$ ; 200 mg/kg:  $63,5 \pm 20,7$ ;  $p < 0,05$ ; 300 mg/kg:  $90,7 \pm 4,0$ ;  $p < 0,001$ ; CPF 200 + GLI 300 mg/kg:  $76,5 \pm 14,73$ ;  $p < 0,01$ .

Para el ID: Control:  $59,5 \pm 12,5$ ; 200 mg/kg:  $134,3 \pm 47,6$ ;  $p < 0,05$ ; 300 mg/kg:  $234,5 \pm 17,7$ ;  $p < 0,001$ ; CPF 200 + GLI 300 mg/kg:  $183,3 \pm 34,9$  (Figuras 36 y 37).



**Figura 36.** Porcentaje de daño al ADN obtenido mediante el Ensayo Cometa en celomocitos de lombrices *Eisenia andrei* expuestas a distintas concentraciones de CPF y CPF + GLI en suelo artificial durante 14 días. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (4 lombrices/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

## Resultados



**Figura 37.** Índice de daño al ADN obtenido mediante el Ensayo Cometa en celomocitos de *Eisenia andrei* expuestas a distintas concentraciones de CPF y CPF + GLI en suelo artificial durante 14 días. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (4 lombrices/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

### **3.3 Exposición de lombrices *Eisenia andrei* a suelo artificial tratado con clorpirifos y glifosato a Concentración Ambiental Prevista (PEC) para evaluar distintos biomarcadores**

Para poder extrapolar los resultados de laboratorio con las observaciones en campo, se evaluaron los biomarcadores optimizados, luego de exposición de las lombrices a SA suplementado con formulados de los plaguicidas en concentraciones PEC y 10 PEC.

Las concentraciones ensayadas fueron:

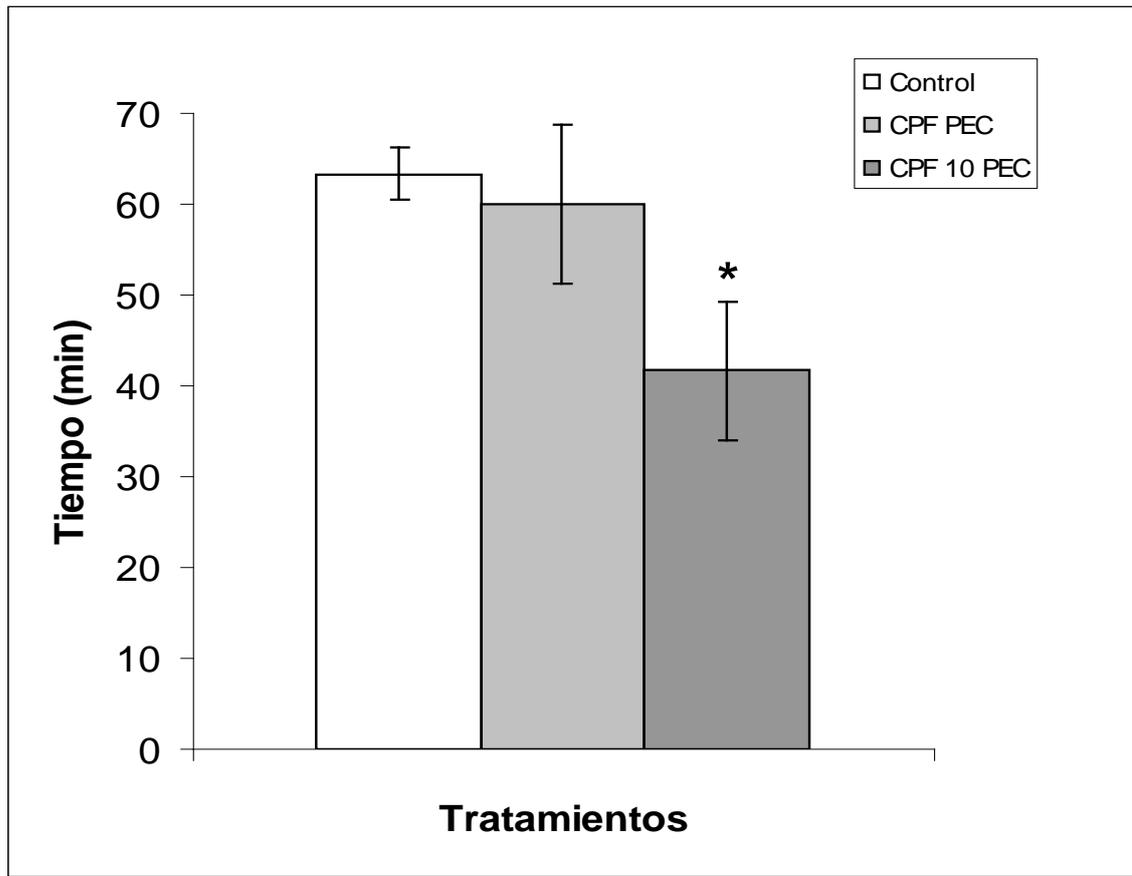
CPF: 1,73 mg/kg (PEC) y 17,3 mg/kg (10 PEC).

GLI FG: 2,6 mg/kg (PEC) y 26 mg/kg (10 PEC).

#### **3.3.1 Clorpirifos**

##### **3.3.1.1 Ensayo del TRRN**

Luego de una semana de exposición, se registró un TRRN significativamente menor en los celomocitos de lombrices expuestas a 10 PEC (Figura 38). El tiempo registrado para los celomocitos obtenidos de lombrices control superó en todos los casos los 60 minutos ( $63,3 \pm 2,9$  minutos), mientras que los de las lombrices expuestas a CPF PEC registraron una media de  $60,0 \pm 8,7$  minutos. En las lombrices expuestas a 10 PEC, la membrana lisosomal de los celomocitos mostró mayor inestabilidad (TRRN:  $41,7 \pm 7,6$  minutos,  $p < 0,05$ ).

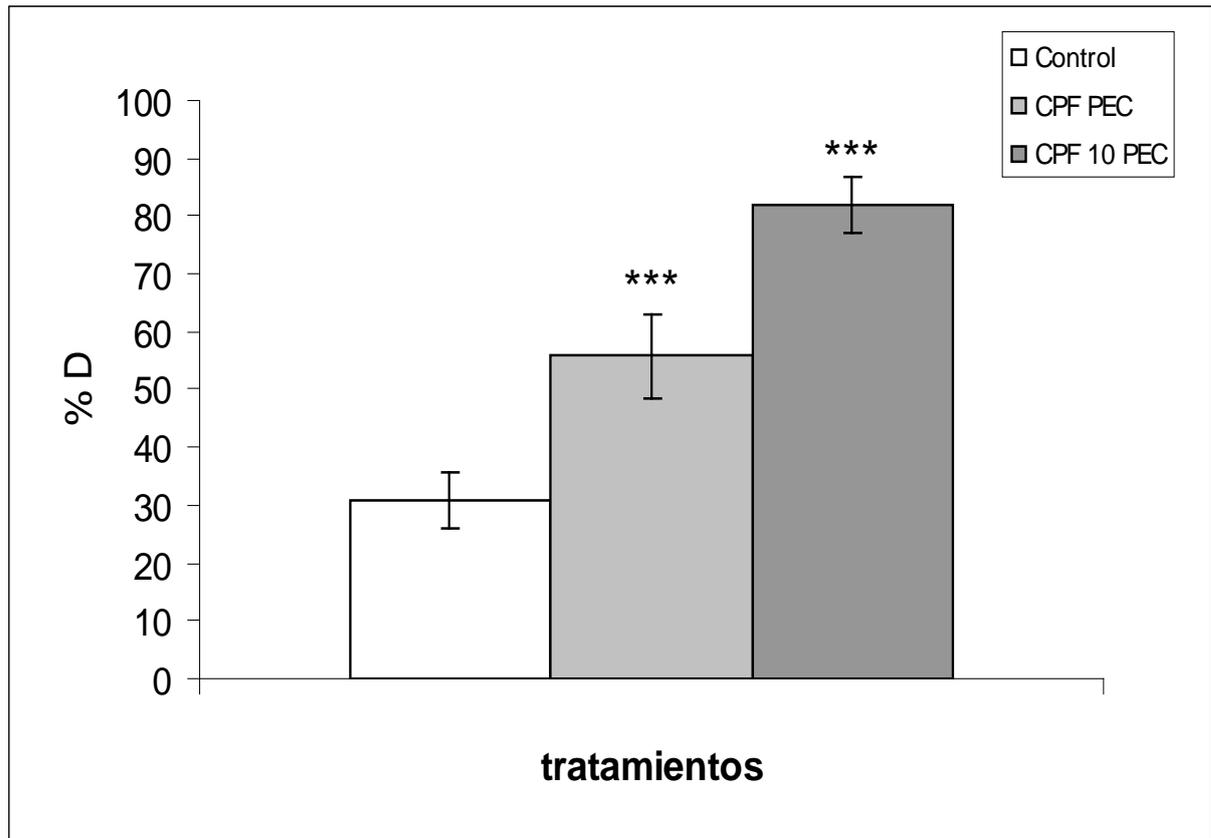


**Figura 38.** TRRN en celomocitos lombrices *Eisenia andrei* expuestas a CPF PEC y 10 PEC durante 7 días. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desvío estándar (4 lombrices/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\* $p < 0,05$ ).

### 3.3.1.2 Ensayo Cometa

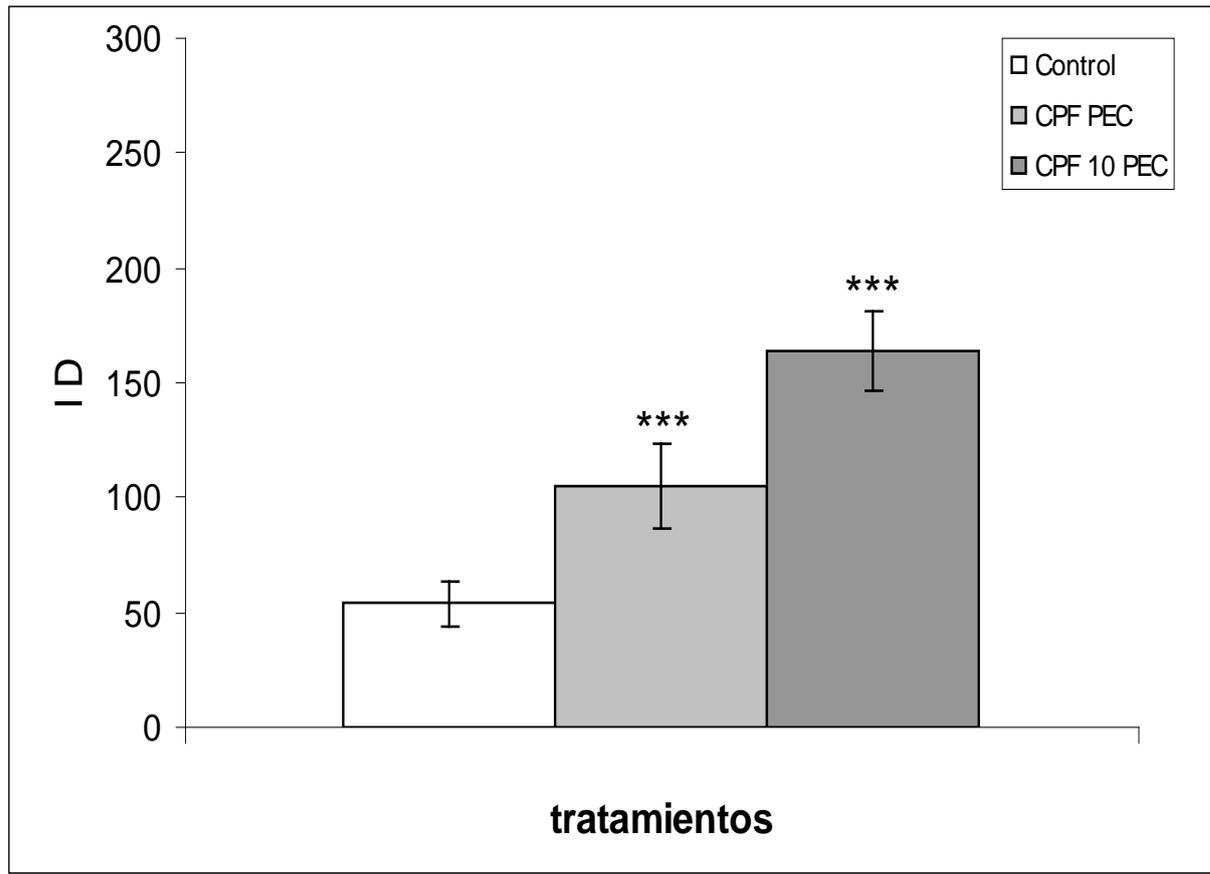
El CPF produjo un aumento en la migración del ADN (medida como porcentaje de daño e índice de daño;  $p < 0,001$ ) concentración-dependiente, observándose gráficos similares para ambos parámetros de daño genético estudiados (Figuras 39 y 40). En cuanto al porcentaje de daño, las células de los tratamientos control alcanzaron el  $30,8 \pm 5,0$  %. Al analizar los cometas de las células de lombrices expuestas a CPF, los resultados mostraron un daño significativo (PEC:  $55,7 \pm 7,3$ ,  $p < 0,001$ ; 10 PEC:  $82,0 \pm 5,0$ ;  $p < 0,001$ ).

## Resultados



**Figura 39.** Porcentaje de daño al ADN obtenido mediante el Ensayo Cometa en celomocitos de lombrices *Eisenia andrei* expuestas a CPF PEC y 10 PEC en suelo artificial durante 7 días. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (4 lombrices/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\*\*) $p < 0,001$ ).

El índice de daño presentó resultados similares en cuanto a la significancia. El daño ponderado según este índice fue de  $53,8 \pm 9,9$  para las células de las lombrices control, mientras que para los dos tratamientos las diferencias fueron altamente significativas ( $p < 0,001$ ), (PEC:  $105,0 \pm 18,1$ ; 10 PEC:  $163,7 \pm 17,4$ ).



**Figura 40.** Índice de daño al ADN obtenido mediante el Ensayo Cometa en celomocitos de *Eisenia andrei* expuestas a CPF PEC y 10 PEC en suelo artificial durante 7 días. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (4 lombrices/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ).

### 3.1.3.3 Ensayos de reproducción

La importancia de la reproducción como un parámetro clave del ciclo de vida que determina el estado a largo plazo de poblaciones de lombrices, ha llevado a la formulación de normas relativas al uso de los bioensayos de reproducción de lombrices, para la evaluación del riesgo de sustancias químicas. La exposición a CPF en concentraciones equivalentes a campo no mostró alteraciones significativas en los parámetros de reproducción evaluados, aunque a 10 PEC se encontró una

## Resultados

disminución no significativa en la producción de juveniles, cocones eclosionados, cocones totales y un aumento en la cantidad de cocones sin eclosionar. Se observó una disminución en el aumento del peso en las lombrices adultas expuestas a 10 PEC respecto de los controles, luego de 28 días de exposición (Tabla 13).

**Tabla 13.** Efectos del CPF PEC y 10 PEC sobre la reproducción de *Eisenia andrei* en suelo artificial.

	Control	PEC	10 PEC
<b>Cocones sin eclosionar</b>	2,60 ± 0,55	2,20 ± 1,30	4,20 ± 2,95
<b>Cocones eclosionados</b>	11,4 ± 6,1	13,2 ± 8,8	6,0 ± 3,4
<b>Total cocones</b>	14,0 ± 6,4	15,4 ± 8,4	10,2 ± 3,7
<b>Cocones eclosionados/cocones total (%)</b>	79 ± 6	82 ± 11	57 ± 23
<b>Juveniles</b>	24,8 ± 15,6	28,4 ± 20,1	8 ± 3,4
<b>Juveniles/cocones eclosionados</b>	2,18 ± 0,60	2,05 ± 0,38	1,48 ± 0,43
<b>Variación de peso 28 días</b>	0,99 ± 0,28	0,83 ± 0,10	0,45 ± 0,23 (**)

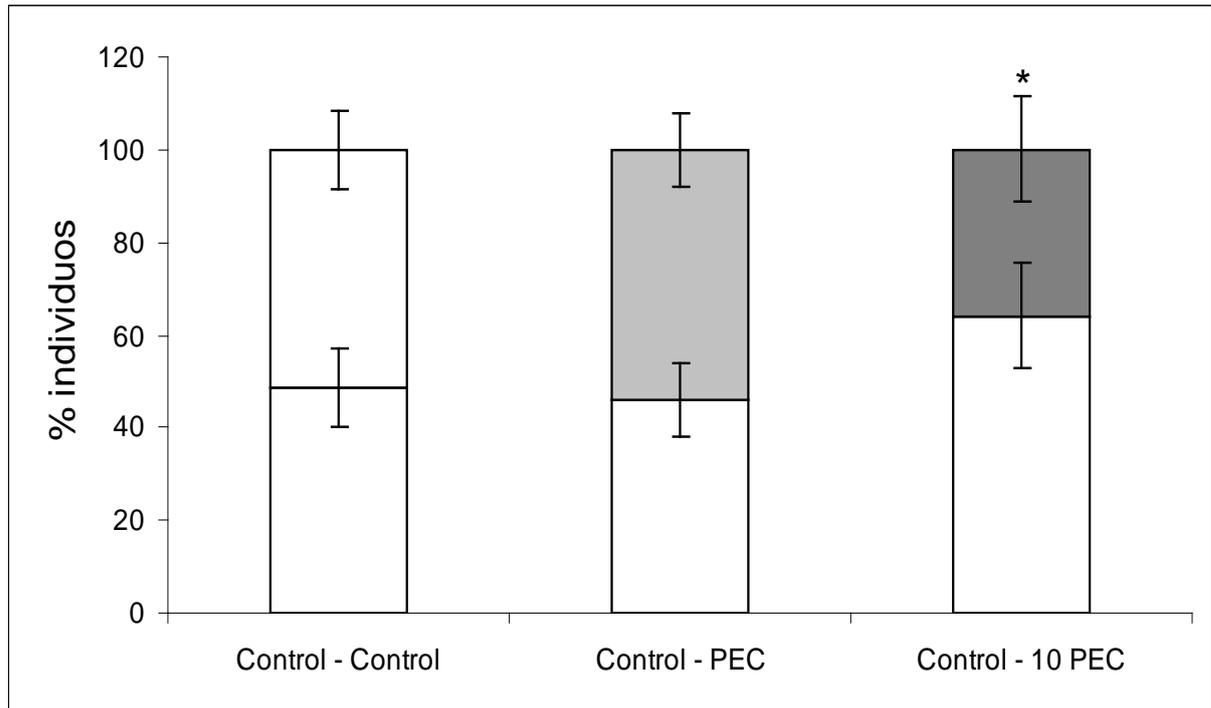
Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (4 replicados/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\*p<0,01).

### 3.1.3.4 Ensayos de evasión

Los ensayos de evasión o repelencia reflejan la propiedad de las lombrices de evitar suelos contaminados.

Los resultados obtenidos cuando se enfrenta a las lombrices a suelo control y tratado con CPF (Figura 41) mostraron una tendencia a evitar el SA tratado, significativa a 10 PEC (p<0,05): Control – Control: 51,2 ± 8,5 % - 48,8 ± 8,5 %; Control – CPF PEC: 45,8 ± 8,0 % - 54,2 ± 8,0 %; Control – CPF 10 PEC: 64,0 ± 11,4 % - 36,0 ± 11,4 %, p<0,05.

## Resultados

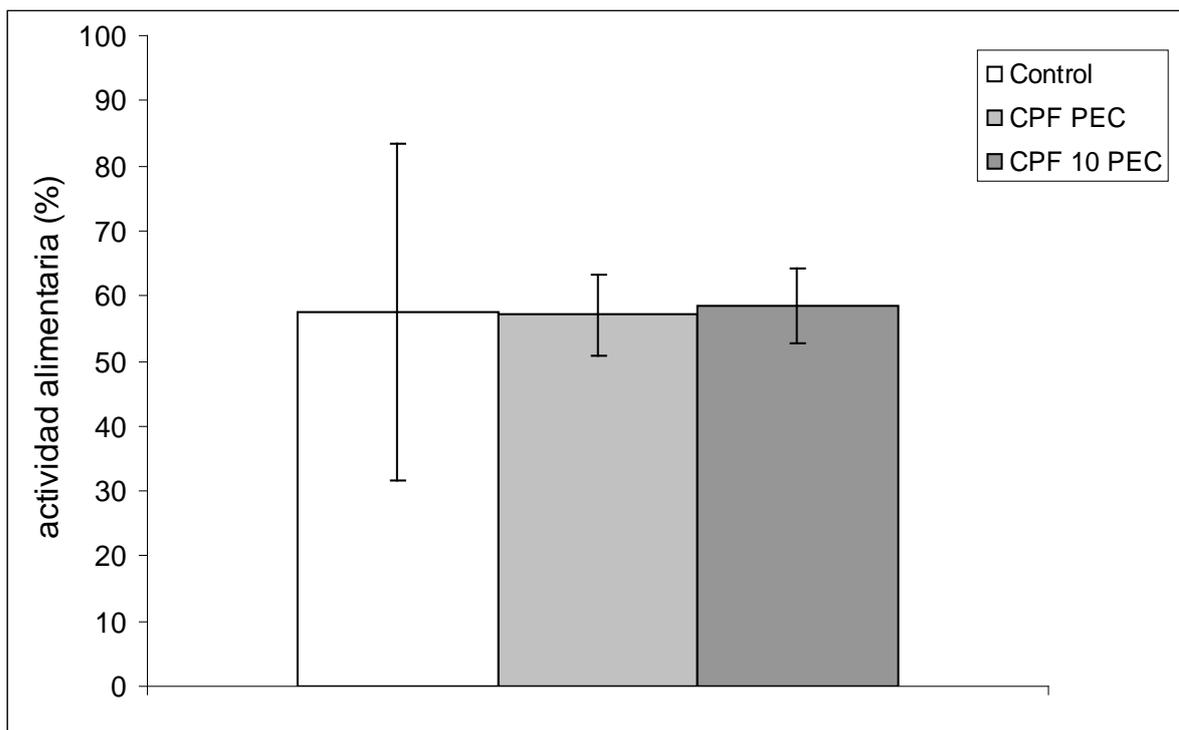


**Figura 41.** Ensayo de evasión de *Eisenia andrei* en suelo artificial suplementado con CPF PEC y 10 PEC (3 días de exposición). Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (3 replicados/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\* $p < 0,05$ ).

### 3.3.1.5 Ensayos de lámina cebo

En nuestros ensayos en laboratorio, la exposición a CPF PEC y 10 PEC no mostró diferencias significativas en la actividad alimentaria de lombrices expuestas a SA control y tratado (Figura 42). La AA de las lombrices fue cercana al 60% en todos los casos (Control:  $57,4 \pm 25,9$  %; CPF PEC:  $57,0 \pm 6,3$  %; CPF 10 PEC:  $58,6 \pm 5,8$  %).

## Resultados



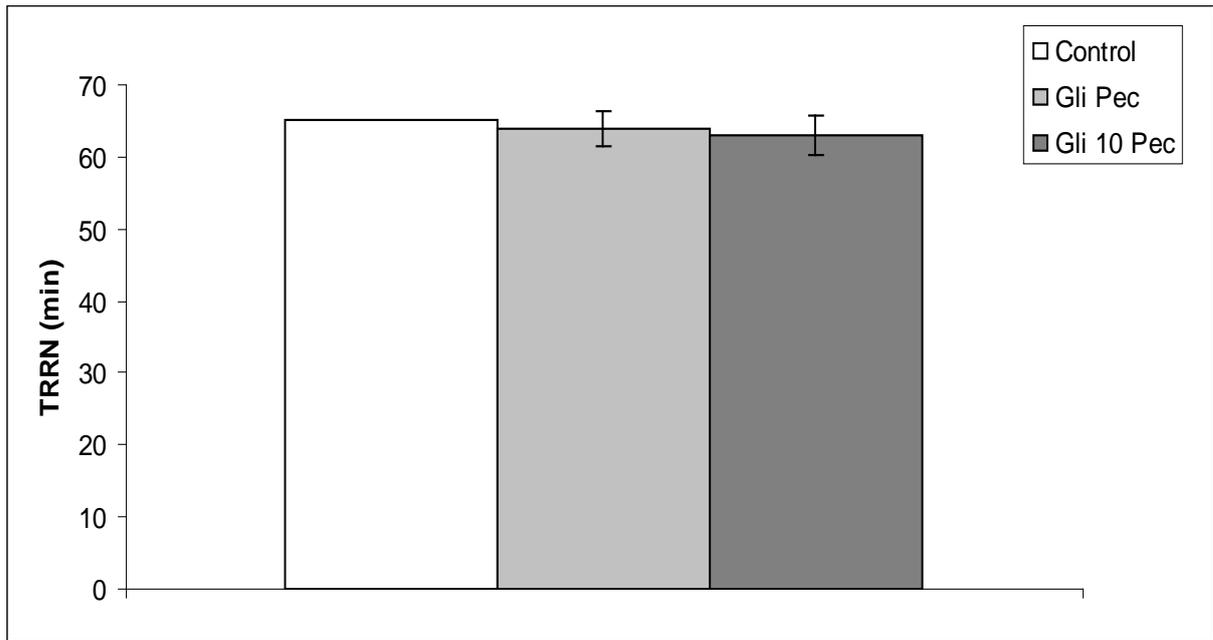
**Figura 42.** Actividad alimentaria de *Eisenia andrei* en suelo artificial suplementado con CPF PEC y 10 PEC en el laboratorio (72 horas). Los resultados se expresan como media  $\pm$  desvío estándar (4 replicados/concentración).

### 3.3.2 Glifosato

#### 3.3.2.1 Ensayo del TRRN

Luego de una semana de exposición a GLI FG PEC y 10 PEC, el ensayo de TRRN no mostró diferencias entre tratamientos y controles. En todos los casos los tiempos registrados fueron superiores a los 60 minutos (Control: 65,0 min; GLI PEC:  $64,0 \pm 2,5$  min; GLI 10 PEC:  $63,0 \pm 2,9$  min) (Figura 43).

## Resultados



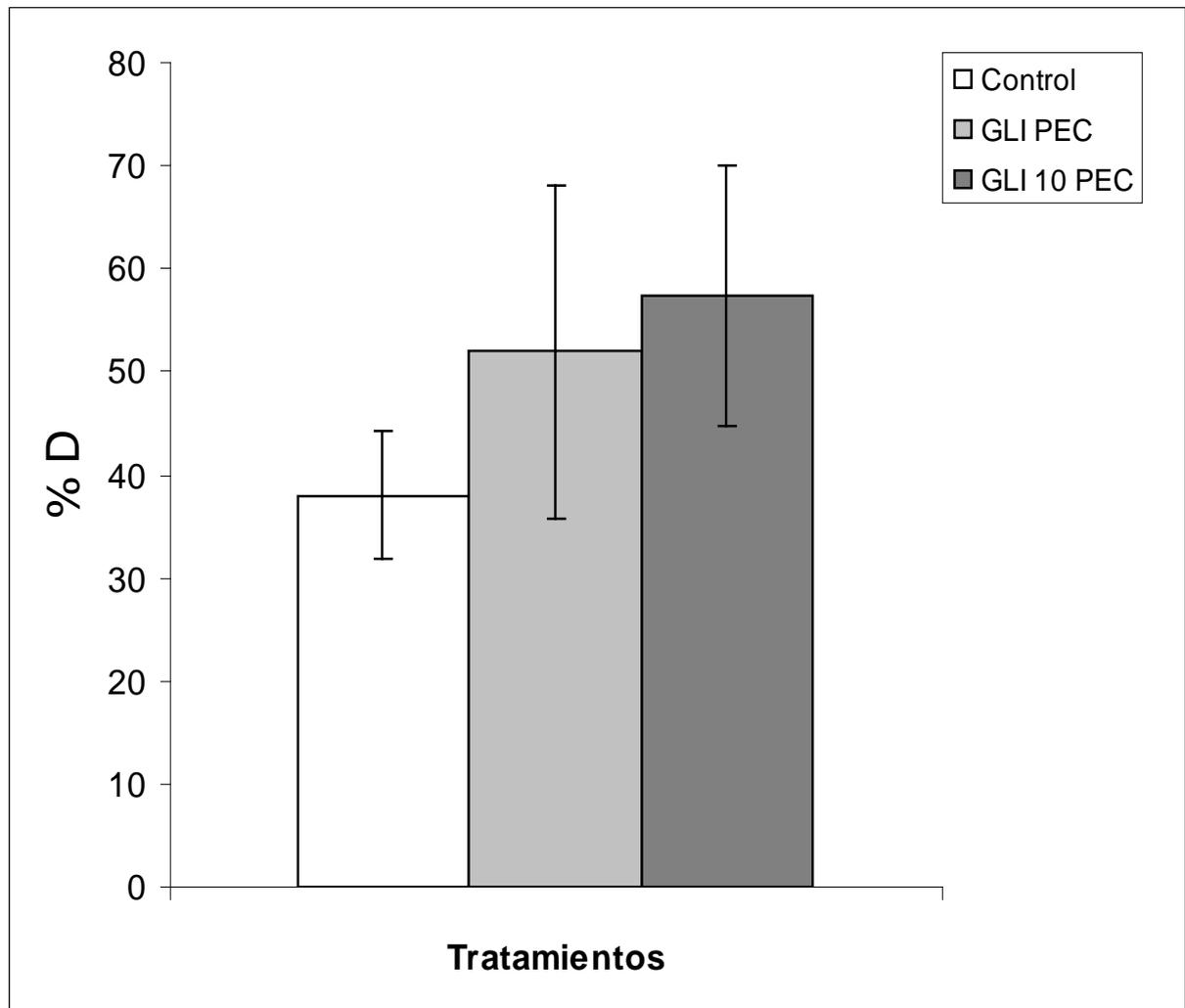
**Figura 43.** TRRN en celomocitos lombrices *Eisenia andrei* expuestas a GLI PEC y 10 PEC durante 7 días. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (5 lombrices/concentración).

### 3.3.2.2 Ensayo Cometa

El Ensayo Cometa no mostró diferencias en el daño al ADN de los celomocitos de lombrices expuestas a las distintas concentraciones de glifosato, respecto de las lombrices expuestas a suelo artificial control (Figuras 44 y 45).

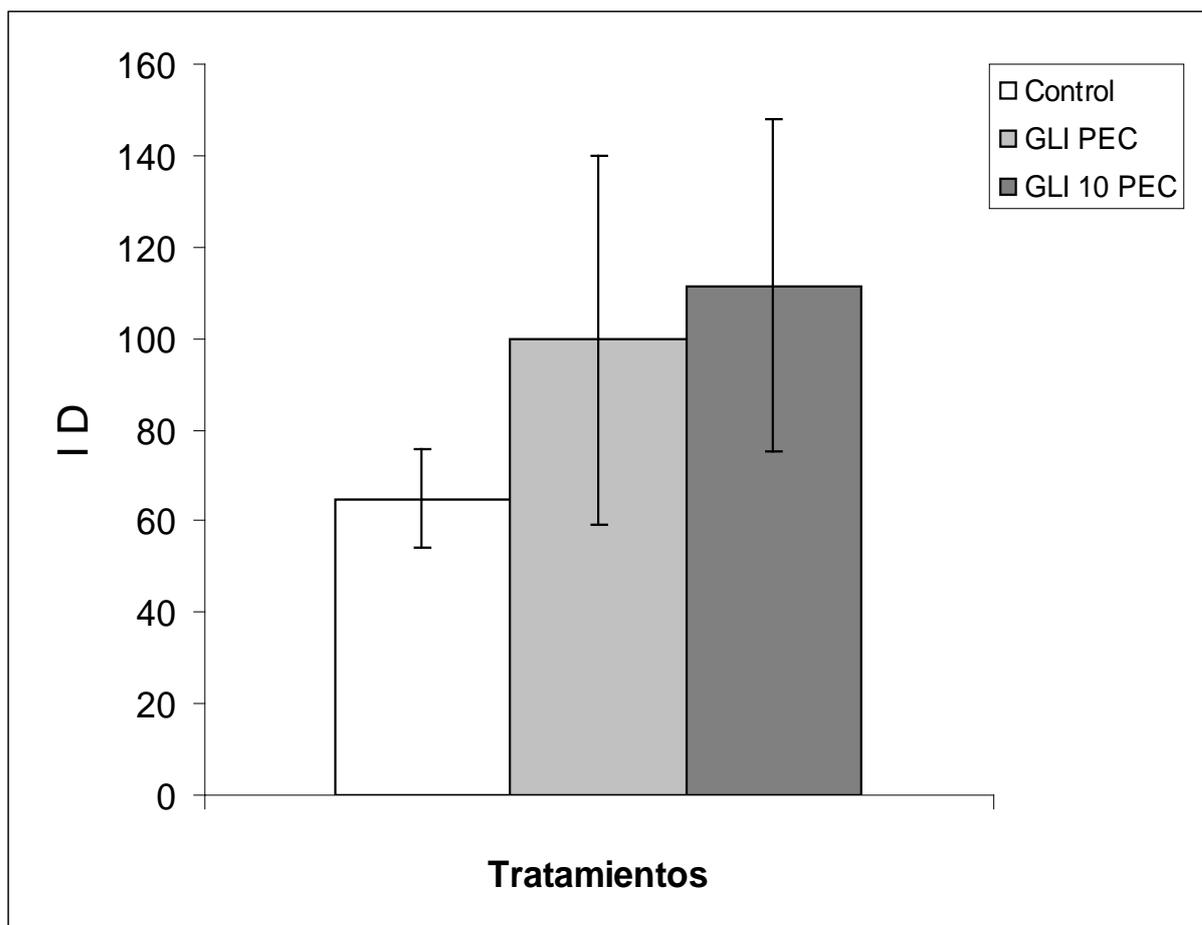
El porcentaje de daño mostró una tendencia creciente con la concentración, sin ser significativa (Control:  $38,0 \pm 6,2$  %; GLI PEC:  $52,0 \pm 16,2$  %; GLI 10 PEC:  $57,4 \pm 12,6$  %). La misma tendencia se encontró al evaluar el índice de daño (Control:  $64,8 \pm 10,8$ ; GLI PEC:  $99,7 \pm 40,3$ ; GLI 10 PEC:  $111,6 \pm 36,5$ ).

## Resultados



**Figura 44.** Porcentaje de daño al ADN obtenido mediante el Ensayo Cometa en celomocitos de lombrices *Eisenia andrei* expuestas a GLI PEC y 10 PEC en suelo artificial durante 7 días. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (5 lombrices/concentración).

## Resultados



**Figura 45.** Índice de daño al ADN obtenido mediante el Ensayo Cometa en celomocitos de *Eisenia andrei* expuestas a GLI PEC y 10 PEC en suelo artificial durante 7 días. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (5 lombrices/concentración).

TRRN y Cometa no respondieron a la exposición a GLI en suelo artificial, a las bajas concentraciones equivalentes a campo.

## Resultados

### 3.3.2.3 Ensayos de reproducción

El ensayo de reproducción de lombrices *Eisenia andrei* expuestas a glifosato registró diferencias significativas en los suelos tratados con GLI 10 PEC, respecto de los controles, en la producción de juveniles ( $p < 0,05$ ), cocones eclosionados ( $p < 0,05$ ), juveniles por cada cocón eclosionado ( $p < 0,01$ ) y porcentaje de cocones eclosionados en relación al total de cocones encontrados ( $p < 0,05$ ) (Tabla 14). No se registraron diferencias en cuanto al aumento de peso.

**Tabla 14.** Efectos del GLI PEC y 10 PEC sobre la reproducción de *Eisenia andrei* en suelo artificial.

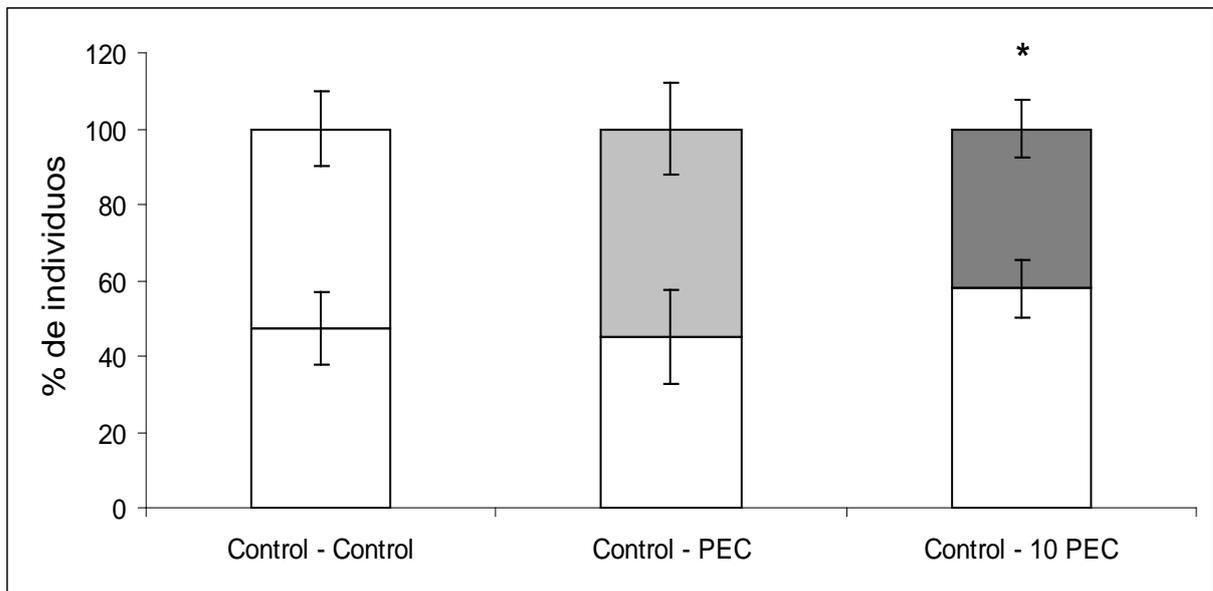
	Control	PEC	10 PEC
<b>Cocones sin eclosionar</b>	13,60 ± 5,81	14,20 ± 3,42	19,00 ± 5,24
<b>Cocones eclosionados</b>	5,6 ± 4,4	2,8 ± 2,0	0,4 ± 0,9 (*)
<b>Total cocones</b>	19,2 ± 2,3	17,0 ± 3,3	19,4 ± 5,2
<b>Cocones eclosionados/cocones total (%)</b>	29,2 ± 25,0	16,4 ± 11,0	2,1 ± 4,0 (*)
<b>Juveniles</b>	7,8 ± 6,4	4,8 ± 5,0	0,4 ± 0,9 (*)
<b>Juveniles/cocones eclosionados</b>	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,6	0,2 ± 0,4 (**)
<b>Variación de peso 28 días</b>	0,85 ± 0,21	0,56 ± 0,23	0,62 ± 0,22

Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (4 replicados/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

## Resultados

### 3.3.2.4 Ensayos de evasión

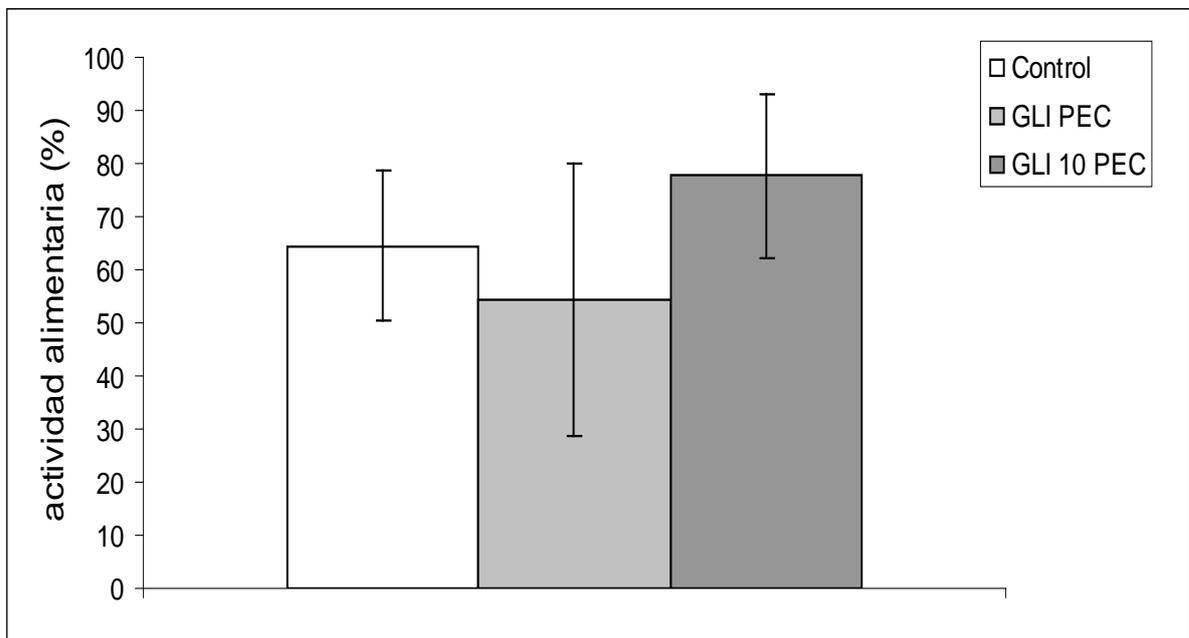
Al igual que en el SA tratado con CPF, en el caso del tratado con GLI, se observó una tendencia significativa a la evasión cuando se trabajó a 10 PEC (Control – Control:  $47,5 \pm 9,6 \%$  -  $52,5 \pm 9,6 \%$ ; Control – GLI PEC:  $45,0 \pm 12,2 \%$  -  $55,0 \pm 12,2 \%$ ; Control – GLI 10 PEC:  $58,0 \pm 7,6 \%$  -  $42,0 \pm 7,6 \%$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 46).



**Figura 46.** Evasión de *Eisenia andrei* en suelo artificial con GLI PEC y 10 PEC (3 días de exposición). Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (3 replicados/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\* $p < 0,05$ ).

### 3.3.2.5 Ensayos de lámina cebo

El ensayo de lámina cebo no presentó diferencias en la actividad alimentaria de las lombrices expuestas a SA control y a suelos tratados con GLI PEC y 10 PEC (Control:  $64,4 \pm 14,2$  %; GLI PEC:  $54,3 \pm 25,5$  %; GLI 10 PEC:  $77,7 \pm 15,5$  %) (Figura 47).



**Figura 47.** Actividad alimentaria de *Eisenia andrei* expuestas a suelo artificial suplementado con GLI PEC y 10 PEC en el laboratorio (72 horas). Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (4 replicados/concentración).

### **4. ESTUDIOS CAMPO- LABORATORIO**

Los biomarcadores optimizados anteriormente se aplicaron al monitoreo de suelos agrícolas, en cultivo de soja o trigo, tratados con clorpirifos o glifosato a las concentraciones recomendadas para estos cultivos, para explorar su potencial utilidad en la evaluación del efecto de estos plaguicidas.

#### **4.1 Campaña Oliveros**

##### **4.1.1 Análisis químico de los plaguicidas**

Los suelos tratados con CPF presentaron una concentración promedio de  $0,14 \pm 0,02$  ppm en la capa de 0-3 cm y de  $0,04 \pm 0,01$  ppm en la capa de 0-10 cm a 24 horas ( $t_1$ ). No se detectó CPF en los suelos tratados con GLI ni en los controles. Al cabo de 10 días ( $t_2$ ), las concentraciones de CPF decayeron a  $0,02 \text{ ppm} \pm 0,01 \text{ ppm}$  en la capa superior y no fue detectado en la capa de 0-10 cm. 50 días después del tratamiento, no pudo detectarse CPF (límite de detección: 0,01 ppm).

La concentración de GLI estuvo por debajo del límite de detección (0,05 ppm) en todas las muestras analizadas. Dos características especiales de las parcelas tratadas con GLI indicaron la eficacia de la aplicación del herbicida: la ausencia de malezas en los entresurcos de la soja y el rendimiento significativamente mayor de la soja al finalizar el ciclo. Éstos fueron de  $3146 \pm 93$  kg/ha en las parcelas tratadas con GLI,  $1453 \pm 13$  kg/ha en las parcelas tratadas con CPF, y  $1248 \pm 17$  kg/ha en las parcelas control.

### **4.1.2 Bioensayos en laboratorio**

Se aplican sobre las muestras de suelo provenientes del campo, obtenidas y procesadas según se describe en Materiales y Métodos 7.2.

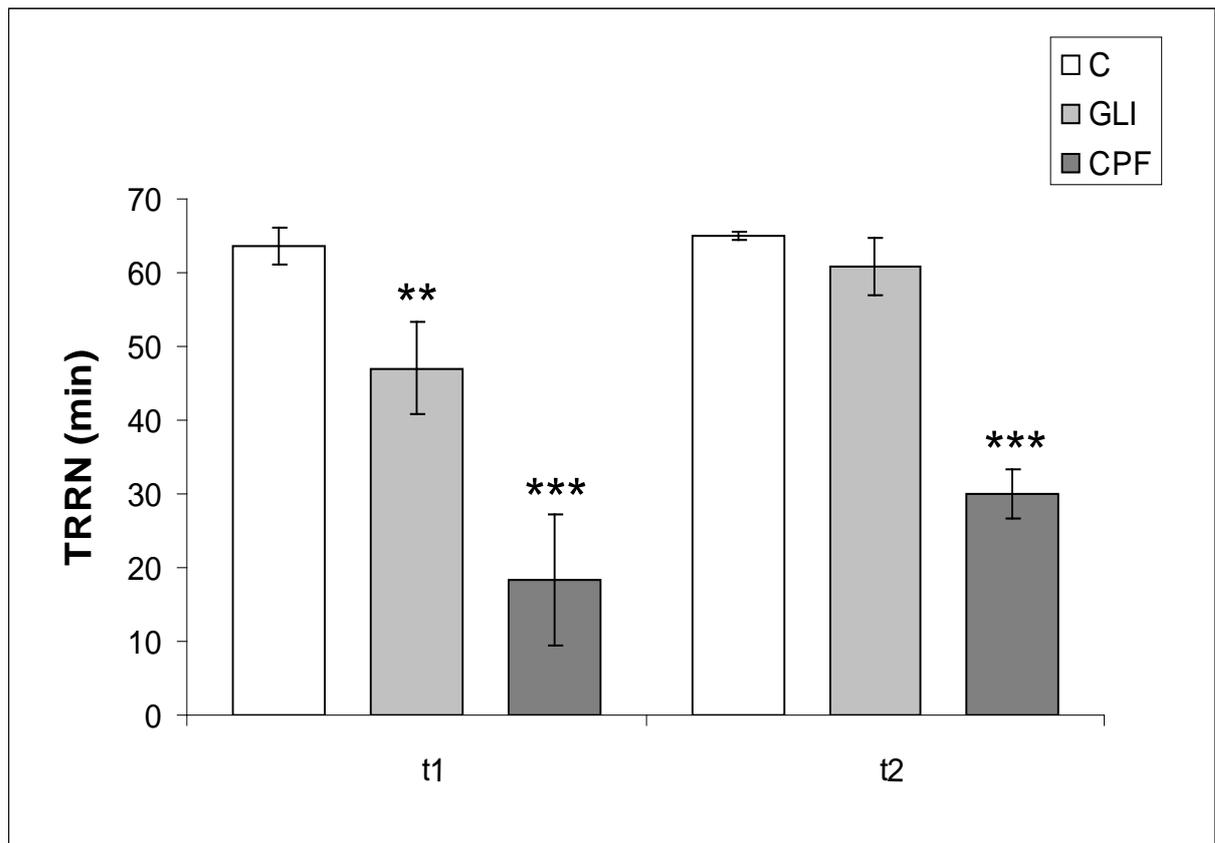
#### **4.1.2.1 Ensayo del TRRN**

Las figuras 48 y 49 muestran los resultados obtenidos en lombrices expuestas durante 7 o 28 días a muestras tomadas a  $t_1$  y  $t_2$ . Los TRRN para los controles, en lombrices expuestas durante 7 días, fueron superiores a los 60 minutos, mientras que luego de 28 días de exposición disminuyeron a 45 minutos, mostrando cierto grado de estrés probablemente debido al mayor tiempo de exposición.

Después de 7 días de exposición, los TRRN de lombrices expuestas a suelos colectados en  $t_1$  que contenían GLI se redujeron significativamente ( $47,0 \pm 6,3$  minutos,  $p < 0,01$ ); lo mismo pudo observarse con las lombrices expuestas a CPF ( $18,3 \pm 8,8$  minutos,  $p < 0,001$ ), al compararlos con los controles ( $63,7 \pm 2,5$  minutos). Cuando las lombrices se expusieron a suelos muestreados en  $t_2$ , la reducción del TRRN pudo observarse sólo con los suelos tratados con CPF ( $30,0 \pm 3,2$  minutos,  $p < 0,001$ ), mientras que el efecto se revirtió para GLI.

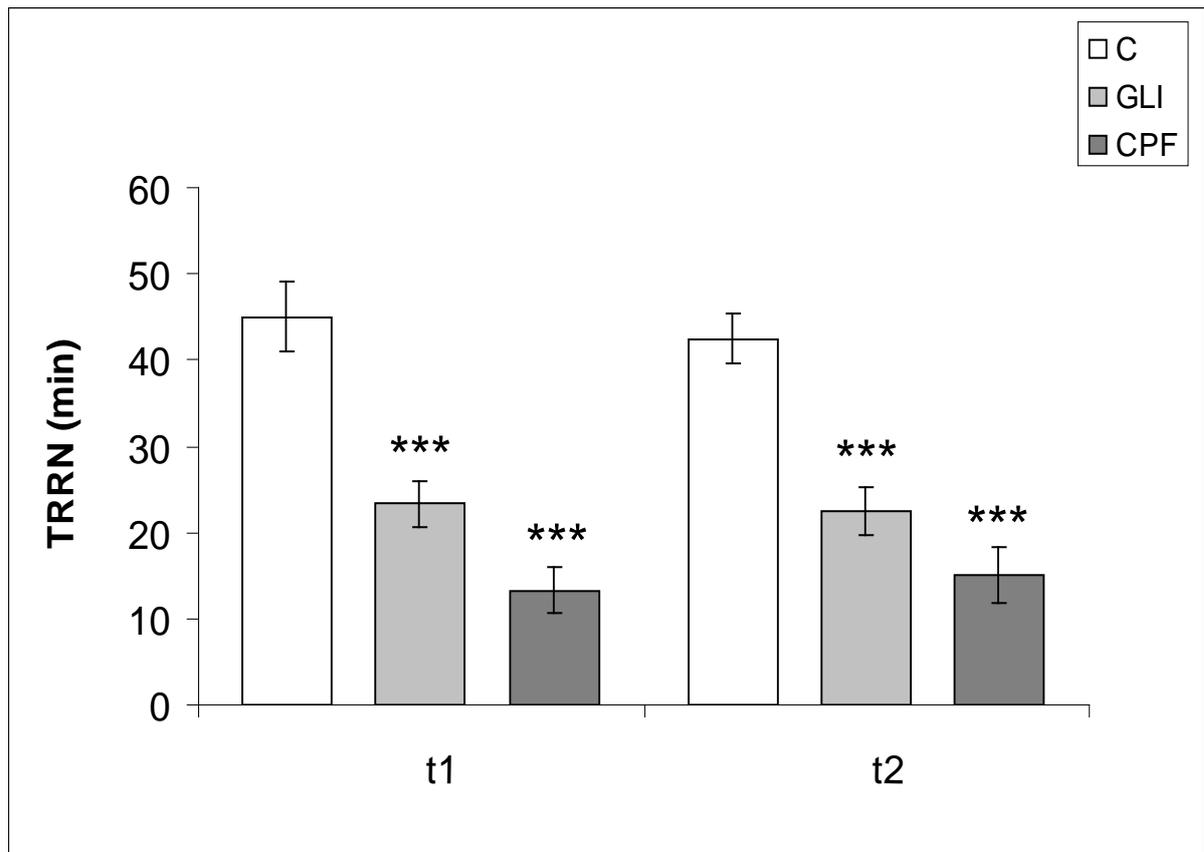
Luego de 28 días de exposición en laboratorio, el TRRN disminuyó significativamente en suelos tratados con GLI y CPF, tanto en los muestreados a  $t_1$  (C:  $45,0 \pm 4,1$  min, GLI:  $23,3 \pm 2,6$  min, CPF:  $13,3 \pm 2,6$  min) como en los muestreados a  $t_2$  (C:  $42,5 \pm 2,9$  min, GLI:  $22,5 \pm 2,7$  min, CPF:  $15,0 \pm 3,2$  min).

## Resultados



**Figura 48.** TRRN en celomocitos lombrices *Eisenia andrei* expuestas por 7 días a suelos tratados con GLI y CPF a  $t_1$  y  $t_2$  (1 y 10 días después de  $t_0$ ). Los resultados se expresan como media  $\pm$  desvío estándar (4 lombrices/tratamiento/bloque). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

## Resultados



**Figura 49.** TRRN en celomocitos de lombrices *Eisenia andrei* expuestas por 28 días a suelos tratados con GLI y CPF a  $t_1$  y  $t_2$  (1 y 10 días después de  $t_0$ ). Los resultados se expresan como media  $\pm$  desvío estándar (4 lombrices/tratamiento/bloque). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

### 4.1.2.2 Ensayo Cometa

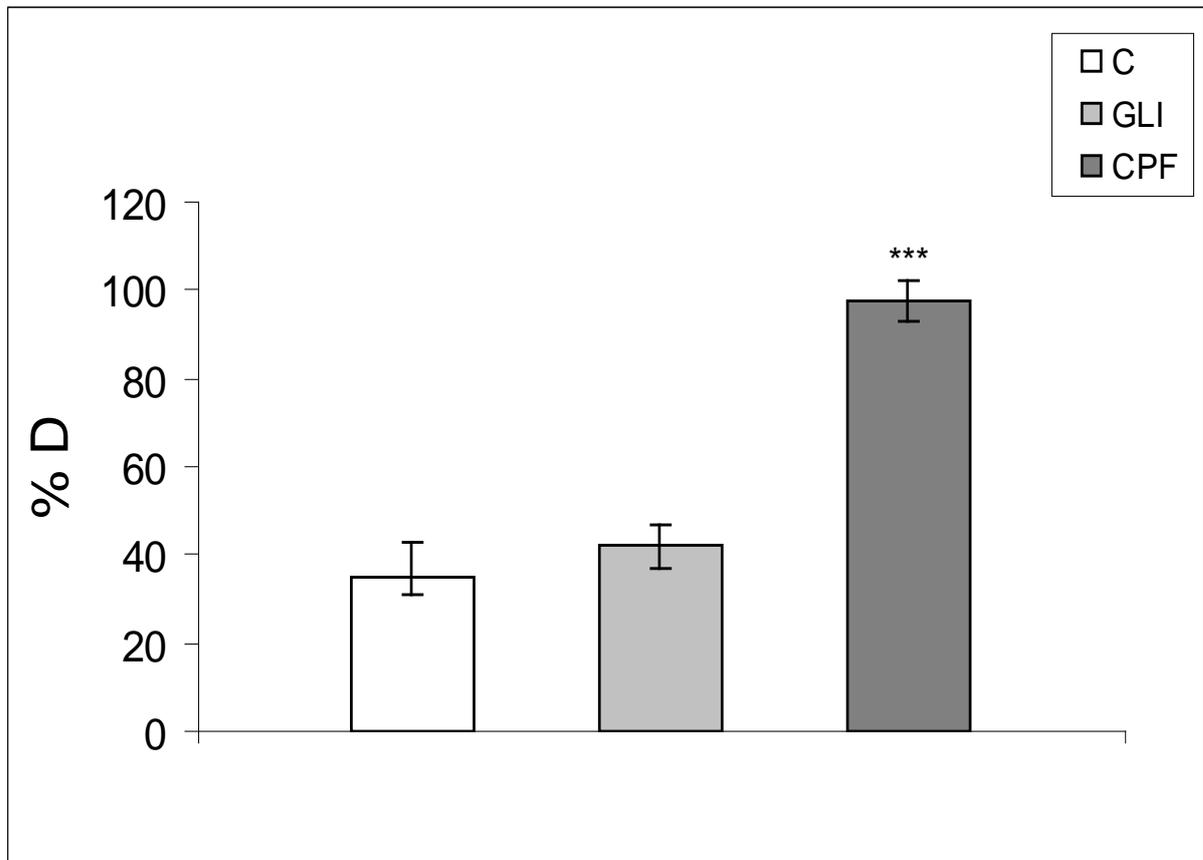
Se evaluó porcentaje de daño y el índice de daño en celomocitos de *Eisenia andrei* expuestas a muestras de suelo tomadas a  $t_1$ . En todos los experimentos, la viabilidad de las células superó el 95%.

En las lombrices expuestas a suelos tratados con CPF, se produjo un aumento significativo en el % D ( $97,4 \pm 4,6$  %;  $p < 0,001$ ) y en ID ( $260,9 \pm 31,8$ ;  $p < 0,001$ ) con respecto a los controles (% D:  $35,3 \pm 7,4$  %; ID:  $82,9 \pm 20,0$ ), indicando un posible

## Resultados

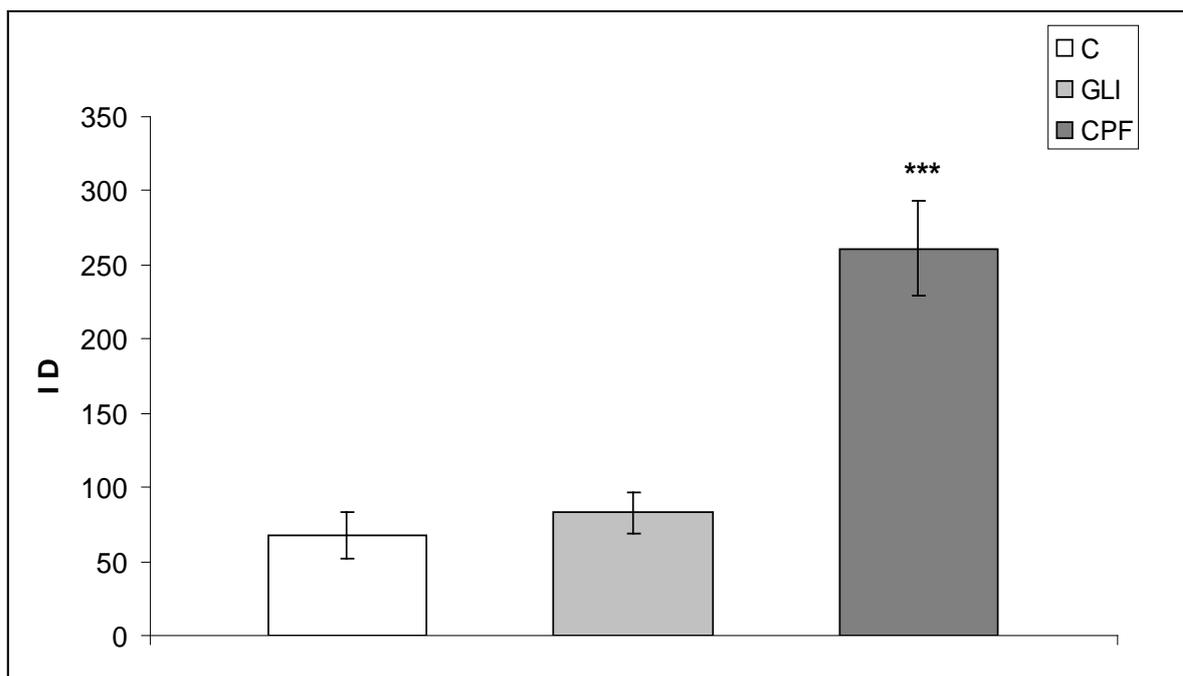
efecto genotóxico en la exposición a los suelos tratados con el formulado empleado (Figuras 50 y 51).

Por otra parte, al igual que en los bioensayos en SA PEC, no se encontraron diferencias significativas en la migración del ADN en lombrices expuestas a suelos tratados con GLI (% D:  $42,0 \pm 4,8$  %, ID:  $104,2 \pm 19,0$ ; Figuras 50 y 51).



**Figura 50.** Porcentaje de daño al ADN obtenido mediante el Ensayo Cometa en celomocitos de lombrices *Eisenia andrei* expuestas a suelos con GLI y CPF durante 7 días. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desvío estándar (3 lombrices/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\*\*) $p < 0,001$ .

## Resultados



**Figura 51.** Índice de daño al ADN obtenido mediante el Ensayo Cometa en celomocitos de *Eisenia andrei* expuestas a suelos con GLI y CPF durante 7 días. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desvío estándar (3 lombrices/concentración). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\*\*) $p < 0,001$ ).

### 4.1.2.3 Ensayos de reproducción

En los ensayos de reproducción, luego de 28 días de exposición a los suelos muestreados en  $t_2$ , sobrevivieron el 100% de las lombrices para todos los tratamientos. No se observaron diferencias significativas en la producción de cocones entre las lombrices expuestas a los suelos tratados y los suelos control. Sin embargo el número de cocones eclosionados se vio significativamente reducido ( $p < 0,01$ ) en las lombrices expuestas a suelos tratados con GLI (41 % del valor encontrado para el control). El número de juveniles producidos también fue significativamente menor al registrado en los suelos control ( $p < 0,05$ ), sin observarse una disminución en la relación juveniles/cocones eclosionados,

## Resultados

indicando un efecto deletéreo sobre la viabilidad de los cocones. No se observaron efectos estadísticamente significativos sobre la reproducción en lombrices expuestas a suelos con CPF, aunque algunos de los parámetros estudiados se vieron reducidos (Tabla 15).

**Tabla 15.** Parámetros reproductivos de *Eisenia andrei* expuestas a suelos tratados con GLI y CPF.

	Control	Glifosato	Clorpirifos
<b>Mortalidad % (28 días)</b>	0	0	0
<b>Nº de cocones (56 días)</b>	11,2 ± 4,3	8,2 ± 3,0	11,3 ± 5,1
<b>Nº de cocones sin eclosionar (56 días)</b>	3,0 ± 1,0	5,6 ± 2,1	4,3 ± 2,1
<b>Eclosionabilidad % (eclosionados x 100 /Nº cocones total)</b>	71 ± 12	29 ± 23 *	55 ± 28
<b>Nº de juveniles (56 días)</b>	7,6 ± 3,6	1,1 ± 1,7 *	3,4 ± 3,7
<b>Nº de juveniles/cocones eclosionados</b>	1,1 ± 0,3	0,4 ± 0,7	0,5 ± 0,4

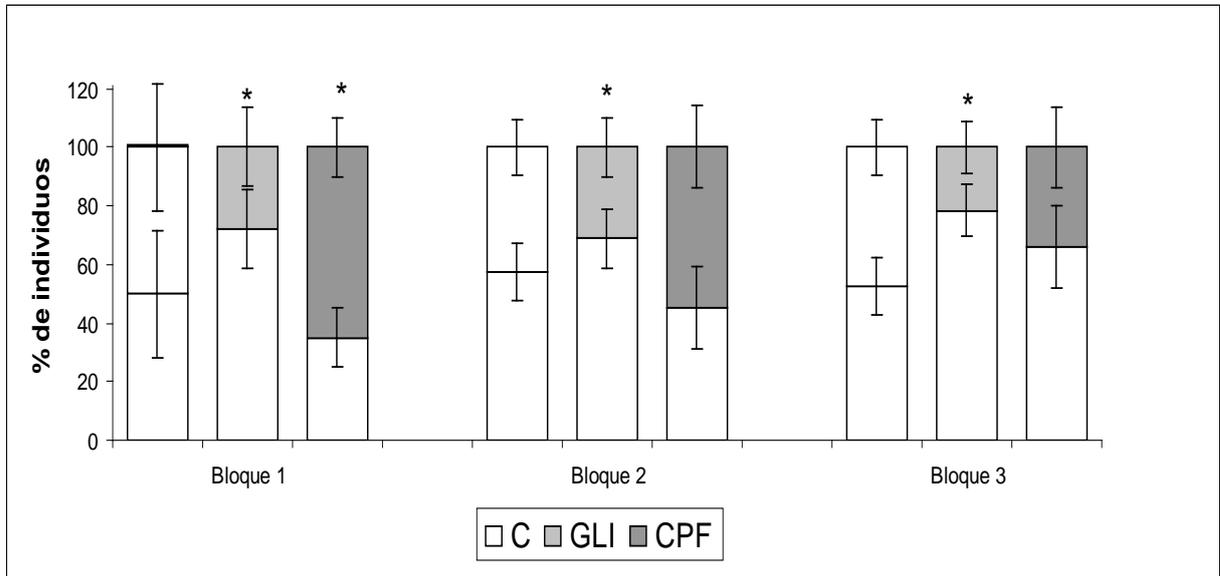
Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (3 replicados//tratamiento/bloque). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*p< 0,05).

### 4.1.2.4 Ensayos de evasión

La preferencia o rechazo de los suelos tratados frente a suelos control se ensayó luego de 3 días de exposición de ejemplares de *Eisenia andrei* en recipientes "ad hoc", según se describe en Materiales y Métodos 5.2. En los controles duales, no se encontraron diferencias significativas en la distribución de las lombrices ( $p>0,05$ ). Las lombrices expuestas a GLI mostraron un comportamiento de evasión significativo ( $p<0,05$ ). Con respecto a los suelos tratados con CPF, el

## Resultados

comportamiento de las lombrices fue ambiguo. Para los bloques 1 y 2, las lombrices prefirieron los suelos tratados ( $p < 0,05$ ). En el bloque 3, en cambio, las lombrices tuvieron una tendencia a evitar el suelo tratado (Figura 52).

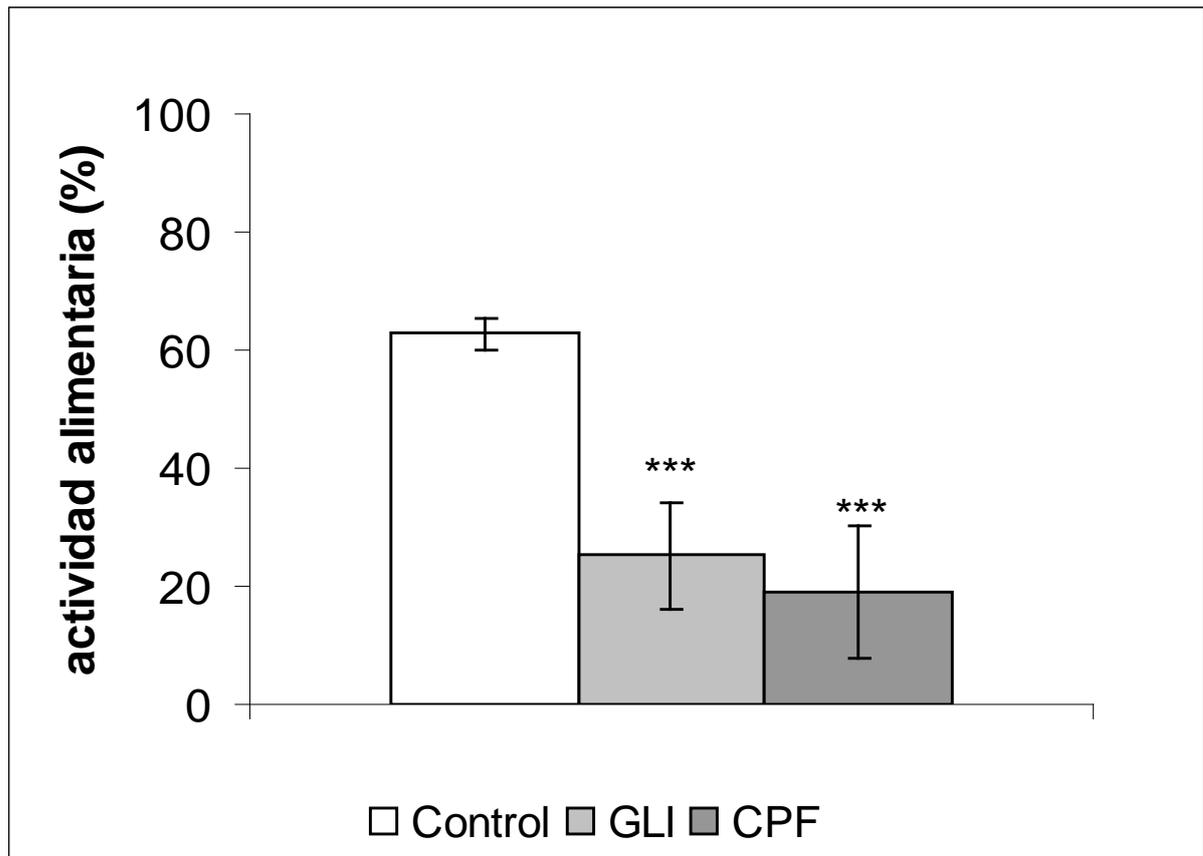


**Figura 52.** Ensayo de evasión. Distribución de *Eisenia andrei* en suelos tratados con GLI y CPF. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desvío estándar (4 replicados/tratamiento/bloque). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control ( $*p < 0,05$ ).

### 4.1.2.5 Ensayos de lámina cebo

El efecto sobre la actividad alimentaria se evaluó en laboratorio y a campo.

En laboratorio, la observación se realizó 3 días después de la incorporación de ejemplares de *Eisenia andrei* a muestras de suelos defaunados. Las tasas de consumo, medidas como el porcentaje de perforaciones en las láminas cebo, resultaron ser significativamente menores en los suelos tratados con GLI y CPF ( $p < 0,001$ ). El consumo promedio en los controles fue de  $68,2 \pm 2,7$  %, mientras que para los suelos tratados con GLI y CPF fue de  $25,1 \pm 11,3$  % y  $19,0 \pm 8,9$  % respectivamente (Figura 53).



**Figura 53.** Lámina cebo en laboratorio. Actividad alimentaria (3 días) de *Eisenia andrei* en suelos controles, y suelos tratados con GLI y CPF. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (4 replicados/tratamiento/bloque). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\*\*) $p < 0,001$ ).

### 4.1.3 Ensayos en el campo

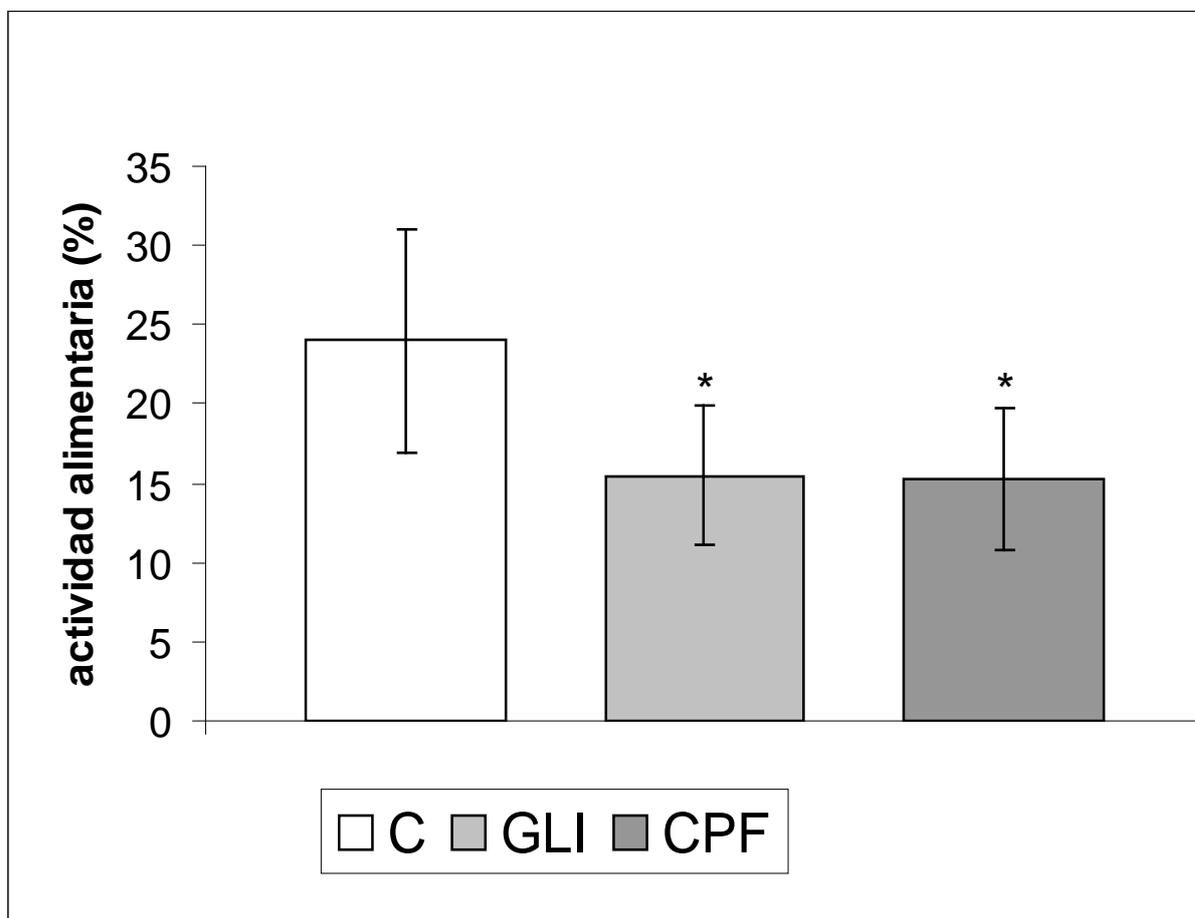
#### 4.1.3.1 Descomposición de materia orgánica: ensayos de lámina cebo

Para su evaluación, se suelen emplear dos técnicas que difieren en la materia orgánica y en el modo de exposición de la misma: la de bolsas con hojarasca y la de láminas-cebo. Esta última fue la empleada en este trabajo de tesis.

Después de 50 días de exposición de las láminas cebo en el campo, el consumo del cebo por parte de la macrofauna del suelo fue bajo, posiblemente debido a la baja densidad de lombrices en los suelos. Sin embargo la actividad alimentaria se vio

## Resultados

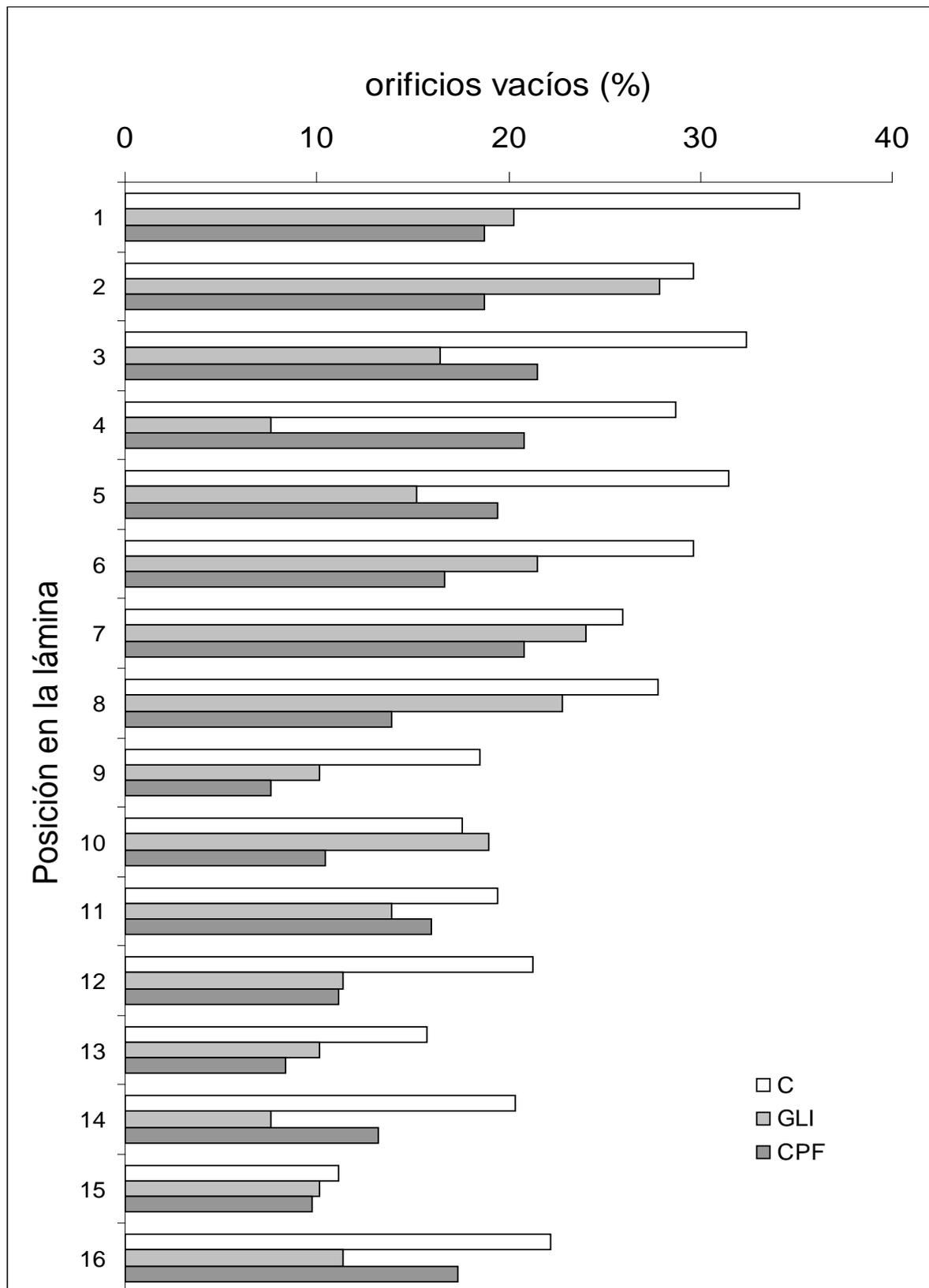
significativamente disminuida ( $p < 0,05$ ) en las parcelas tratadas respecto de los controles (C:  $24,0 \pm 7,0$  %; GLI:  $15,5 \pm 4,4$  %; CPF:  $15,3 \pm 4,4$  %), indicando una alteración por el tratamiento con los formulados empleados (Figura 54).



**Figura 54.** Lámina cebo en campo. Actividad alimentaria (50 días) de macrofauna en controles y suelos tratados con GLI y CPF. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desvío estándar (3 replicados/tratamiento/bloque). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control ( $*p < 0,05$ ).

Al estudiar la distribución de los agujeros perforados (Figura 55) se pudo observar que en general para ambos tratamientos y para los controles la actividad alimentaria disminuyó con la profundidad.

## Resultados



**Figura 55.** Lámina cebo en campo. Distribución vertical de agujeros vacíos en controles y suelos tratados con GLI y CPF (n=144).

### **4.1.3.2 Abundancia relativa y diversidad de lombrices**

La extracción de lombrices se efectuó por el método de la formalina (Edwards 1991). Por las características de los suelos ensayados, con más de 20 años de cultivo, donde los 3 últimos correspondieron a siembra directa, el número de lombrices fue muy bajo en los primeros 14 días de los experimentos y no se pudo evaluar el efecto a campo sobre la abundancia y diversidad de lombrices. No se encontraron lombrices en los muestreos siguientes.

## **4.2 Campaña Colón**

### **4.2.1 Análisis químico de los plaguicidas**

Los suelos tratados con CPF 240 g ia/ha (DB) presentaron una concentración promedio de  $0,05 \pm 0,02$  ppm en muestras de la capa de 0-3 cm y de  $0,02 \pm 0,01$  ppm en las de la capa de 0-10 cm, tomadas 24 horas ( $t_1$ ) después del tratamiento. 14 días después de los tratamientos ( $t_2$ ), las concentraciones de CPF DB fueron de  $0,03 \pm 0,01$  ppm en la capa superior y de  $0,02 \pm 0,01$  ppm en la capa de 0-10 cm. En cuanto al CPF DA los valores detectados para  $t_1$  fueron de  $0,19 \pm 0,02$  ppm en la capa de 0-3 cm y de  $0,10 \pm 0,02$  ppm en la capa de 0-10 cm. En  $t_2$  los valores para la capa superior se mantuvieron, detectando  $0,21 \pm 0,01$  ppm, y se observó una disminución en la capa de 0-10,  $0,03 \pm 0,01$  ppm. No se detectó CPF en las parcelas control. Dado que en  $t_2$  el análisis químico no mostró diferencias significativas en las concentraciones para ambos tratamientos (capa 0-10), los bioensayos a este tiempo se realizaron sólo sobre las muestras correspondientes a la mayor concentración ensayada.

### **4.2.2 Bioensayos en laboratorio**

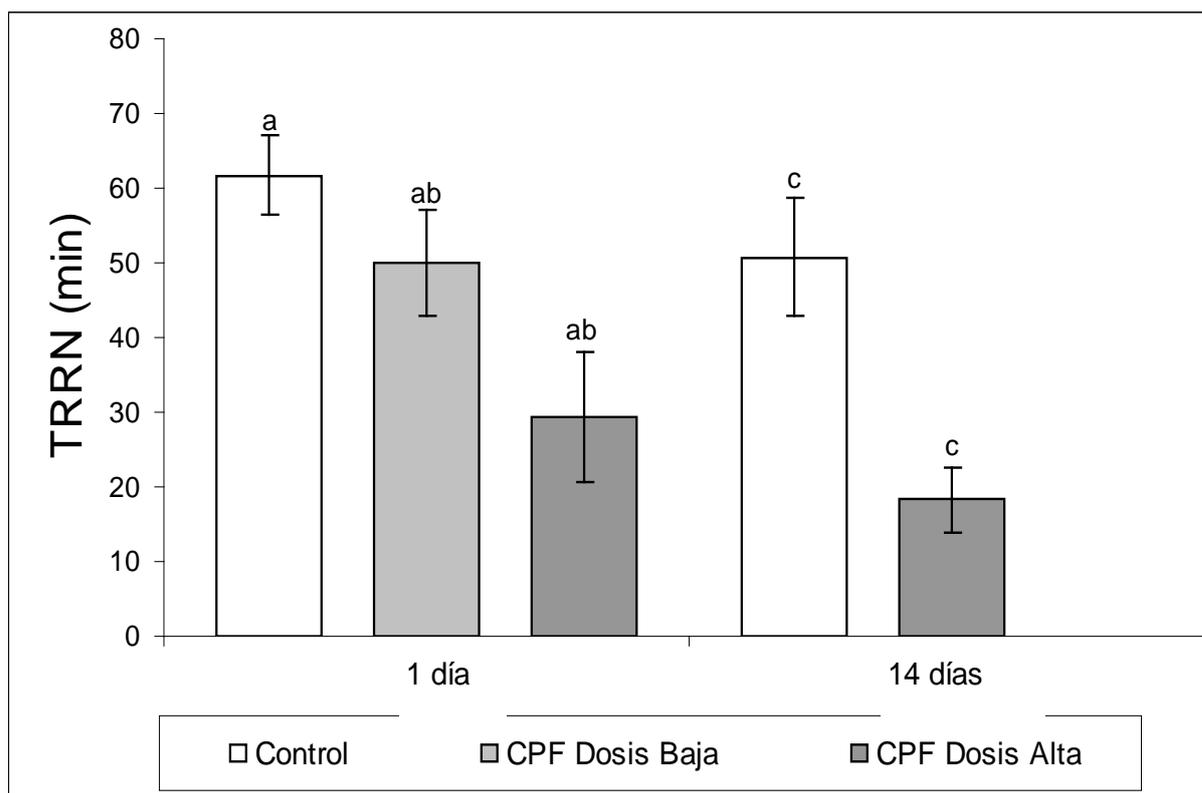
En *Eisenia andrei* expuestas entre 3 días y 8 semanas, dependiendo del punto final elegido, a muestras de suelos controles y tratados (capa 0-10 cm), se efectuaron los bioensayos optimizados previamente.

#### **4.2.2.1 Ensayo del TRRN**

Los TRRN de lombrices expuestas durante 7 días a suelos colectados 1 día después de los tratamientos se redujeron significativamente tanto en las lombrices expuestas a CPF DB ( $50,0 \pm 7,1$  minutos,  $p < 0,01$ ) como en las expuestas a CPF DA ( $29,4 \pm 8,8$  minutos,  $p < 0,001$ ), al compararlos con los controles ( $61,7 \pm 5,4$  minutos). Se observó una relación concentración-respuesta significativa ( $r = 0,888$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 56).

La reducción del TRRN también fue significativa para las lombrices expuestas a suelos tratados con CPF DA, colectados 14 días después del tratamiento (TRRN:  $18,3 \pm 4,3$  minutos,  $p < 0,001$ .) Los tiempos para los controles fueron de  $50,8 \pm 8,0$  minutos en este caso (Figura 56).

## Resultados



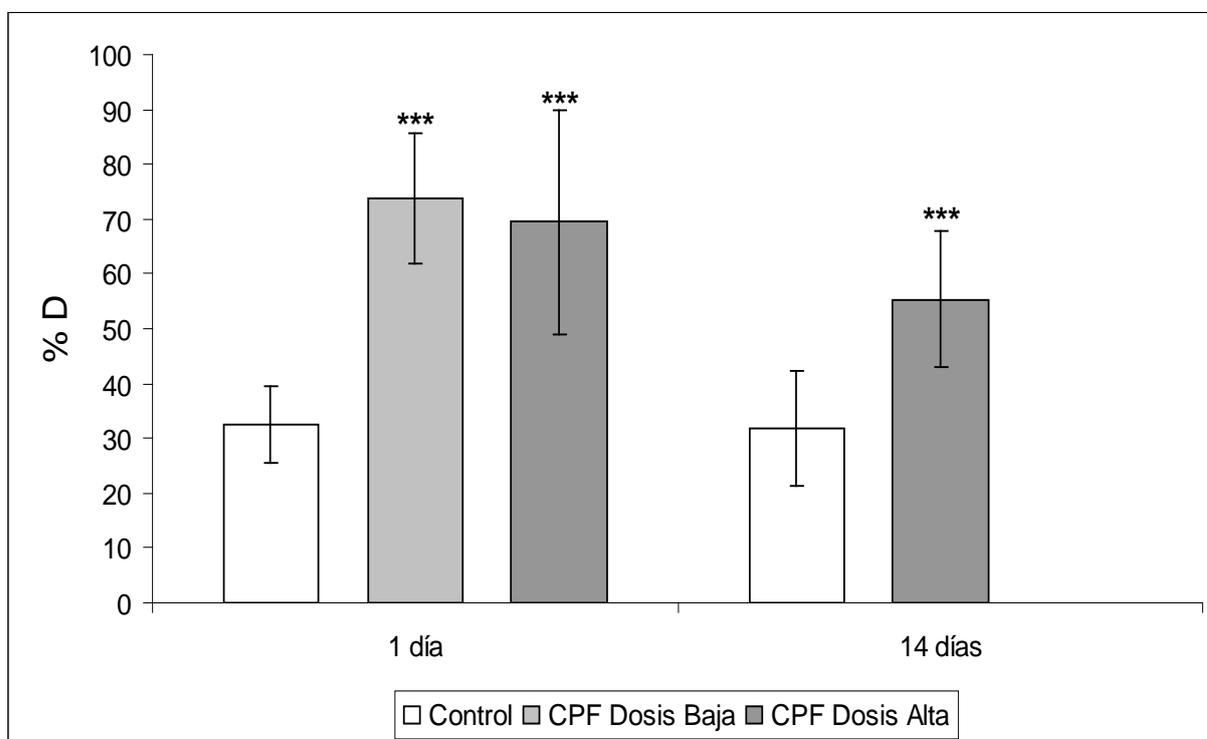
**Figura 56.** TRRN en celomocitos de *Eisenia andrei* expuestas por 7 días a controles y suelos tratados con dos concentraciones de CPF, 1 día y 14 días después de la aplicación. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desvío estándar (3 lombrices/tratamiento/bloque). Mismas letras representan diferencias significativas entre grupos.

### 4.2.2.2 Ensayo Cometa

Se evaluó el porcentaje de daño y el índice de daño en celomocitos de lombrices expuestas a los suelos de campo. Con las lombrices expuestas a suelos colectados en  $t_1$  tratados con CPF DB, se produjo un aumento significativo del % D ( $73,7 \pm 11,9$  %,  $p < 0,001$ ) y del ID ( $228,0 \pm 54,5$ ,  $p < 0,001$ ) respecto de los controles (% D:  $32,4 \pm 7,0$ , ID:  $77,8 \pm 21,5$ ). También se observó un aumento significativo en la migración del ADN en las lombrices expuestas a suelos tratados con CPF DA (% D:  $69,5 \pm 20,5$ ,  $p < 0,001$ , ID:  $213,4 \pm 67,3$ ,  $p < 0,001$ ) (Figuras 57 y 58).

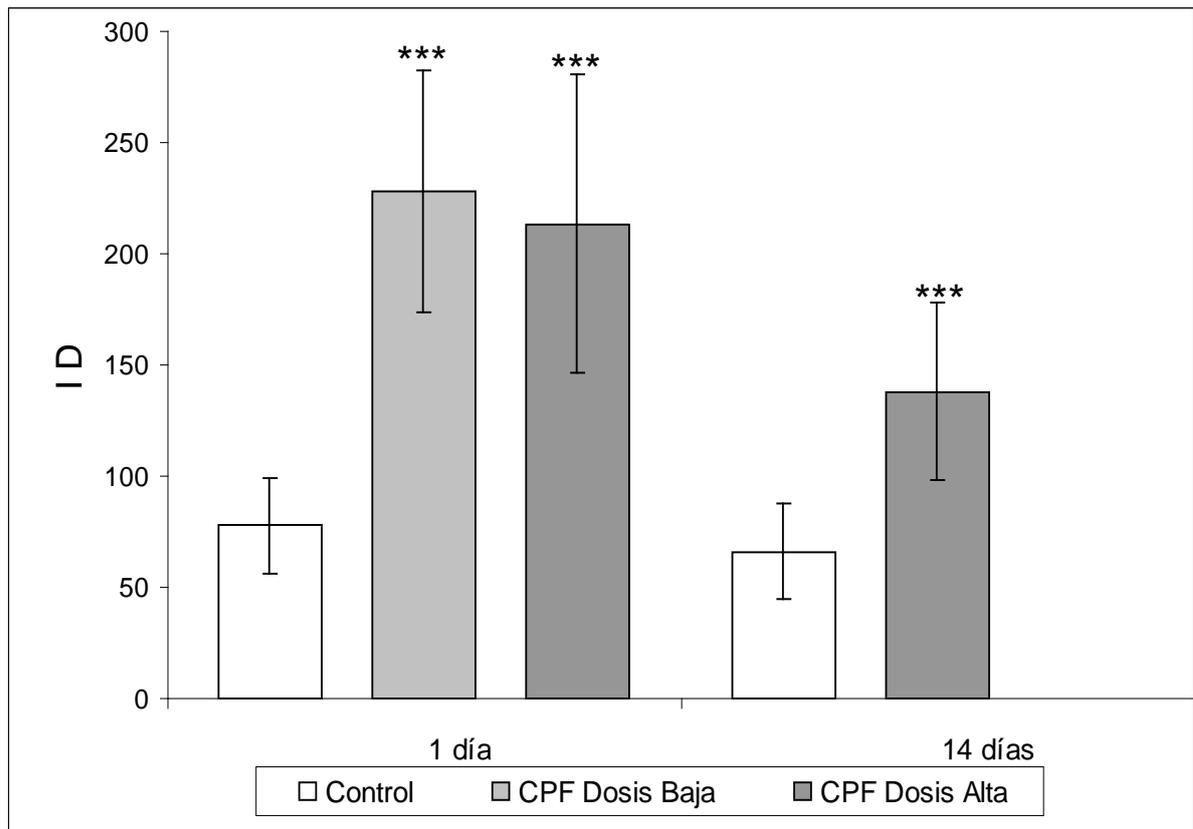
## Resultados

Para los suelos muestreados en  $t_2$ , al igual que en los ensayos de TRRN, se evaluó el cometa sólo para el tratamiento con CPF DA. Si bien los valores de % D y los de ID disminuyeron con respecto a los obtenidos con los suelos de  $t_1$ , las diferencias se mantuvieron respecto de los controles (CPF DA, % D:  $55,3 \pm 12,4$ ,  $p < 0,001$ , ID:  $137,8 \pm 39,9$ ,  $p < 0,001$ ; T, % D  $31,8 \pm 10,4$ , ID:  $66,2 \pm 21,6$ ) (Figuras 57 y 58). La viabilidad de los celomocitos fue superior al 95% en todos los casos.



**Figura 57.** Porcentaje de daño al ADN obtenido mediante el Ensayo Cometa en celomocitos de lombrices *Eisenia andrei* expuestas a suelos tratados con dos concentraciones de CPF. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desvío estándar (3 lombrices/tratamiento/bloque). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

## Resultados

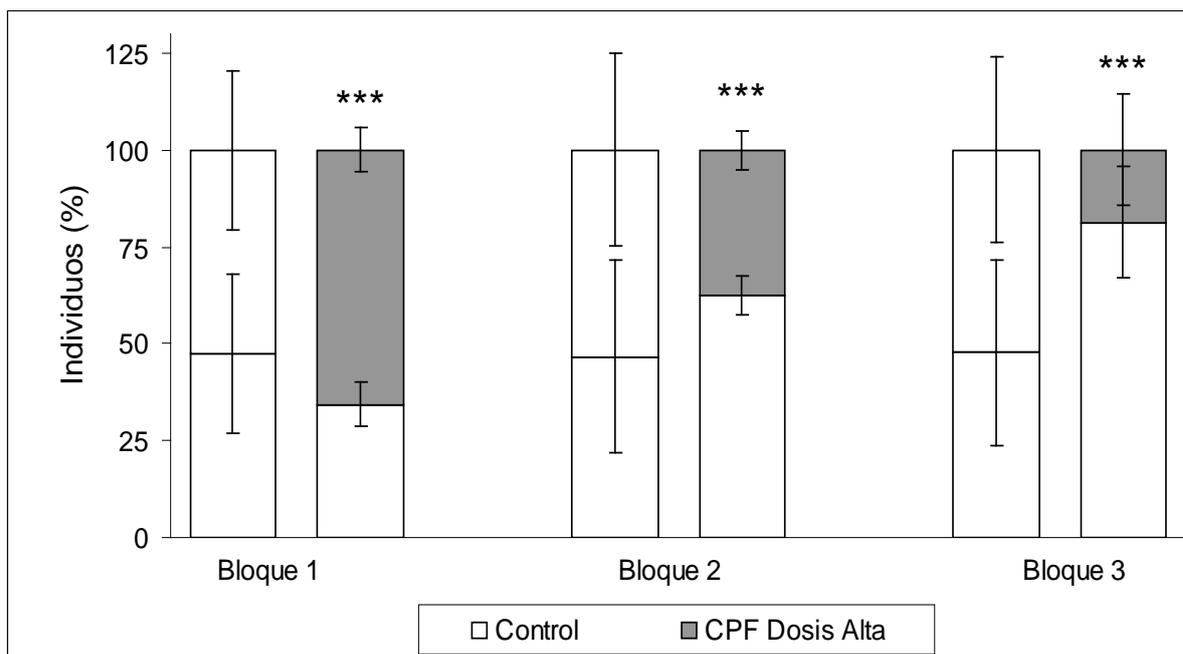


**Figura 58.** Índice de daño al ADN obtenido mediante el ensayo cometa en celomocitos de *Eisenia andrei* expuestas a suelos tratados con dos dosis de CPF. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desvío estándar (3 lombrices/tratamiento/bloque). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

### 4.2.2.3 Ensayos de evasión

En los ensayos donde se colocó suelo control en ambas mitades de los recipientes no se encontraron diferencias significativas en la distribución de las lombrices ( $p > 0,05$ ), indicando una distribución al azar de los individuos en ambas cámaras. Al igual que en Oliveros, las lombrices expuestas a CPF DA, 14 días después de los tratamientos, mostraron un comportamiento controversial, ya que cuando se trabajó con suelos del bloque 1, las lombrices prefirieron el suelo tratado. En cambio, las lombrices tendieron a evitar significativamente ( $p < 0,001$ ) los suelos tratados cuando se usaron muestras de los bloques 2 y 3 (Figura 59).

## Resultados

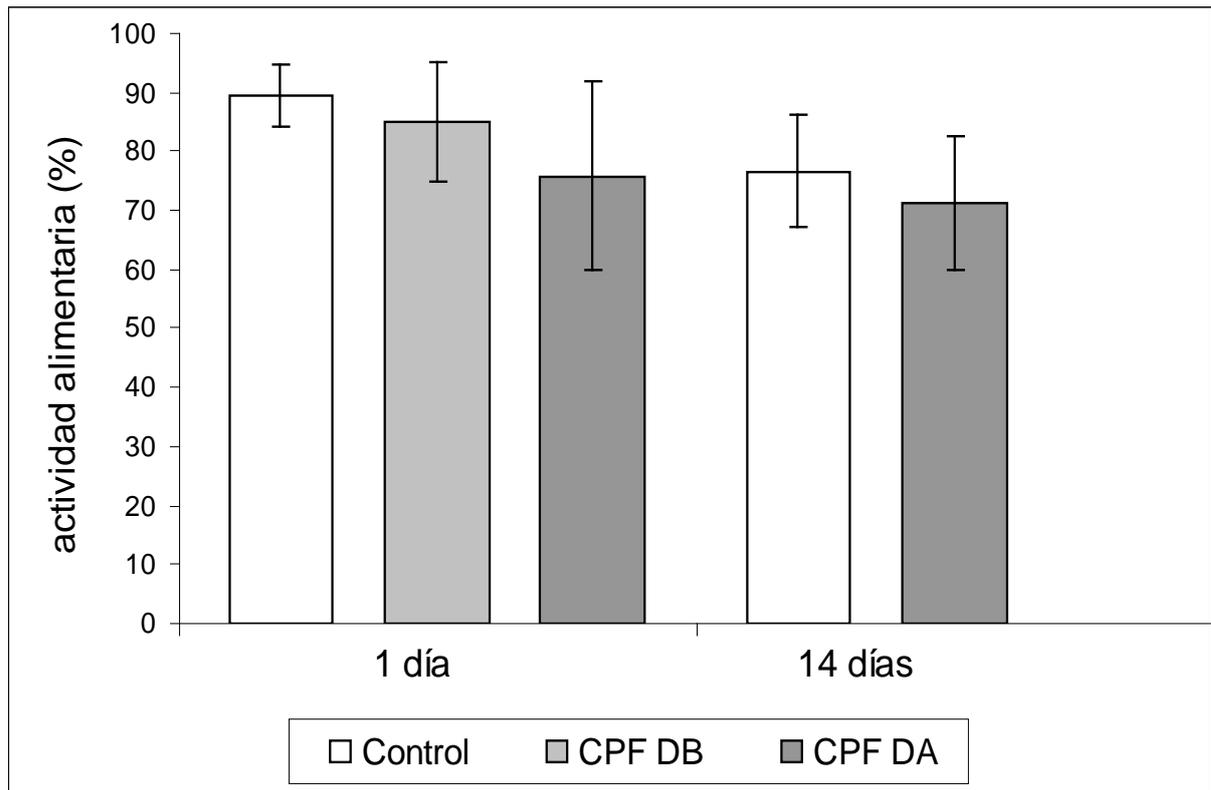


**Figura 59.** Ensayo de evasión. Distribución de *Eisenia andrei* en suelos tratados con la mayor concentración de CPF. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desvío estándar (4 replicas/bloque/ensayo). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\*\*) $p < 0,001$ .

### 4.2.2.4 Ensayo de lámina cebo

Las tasas de consumo, medidas como el porcentaje de agujeros vacíos en las láminas cebo, no mostraron diferencias significativas entre los suelos tratados con CPF colectados 1 día o 14 días después de los tratamientos y los suelos controles. Para  $t_1$ , el consumo promedio en los controles fue de  $89,5 \pm 5,4$  %, mientras que para los suelos tratados con CPF DB y CPF DA fue de  $85,0 \pm 10,1$  % y  $75,8 \pm 8,9$  % respectivamente. Para los suelos recolectados en  $t_2$  el consumo medio en los suelos control fue de  $76,7 \pm 9,4$  % y en los suelos tratados con CPF DA  $71,3 \pm 11,2$  % (Figura 60).

## Resultados



**Figura 60.** Lámina cebo en laboratorio. Actividad alimentaria (3 días) de *Eisenia andrei* en suelos controles y tratados con dos concentraciones de CPF. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (4 replicados/tratamiento/bloque).

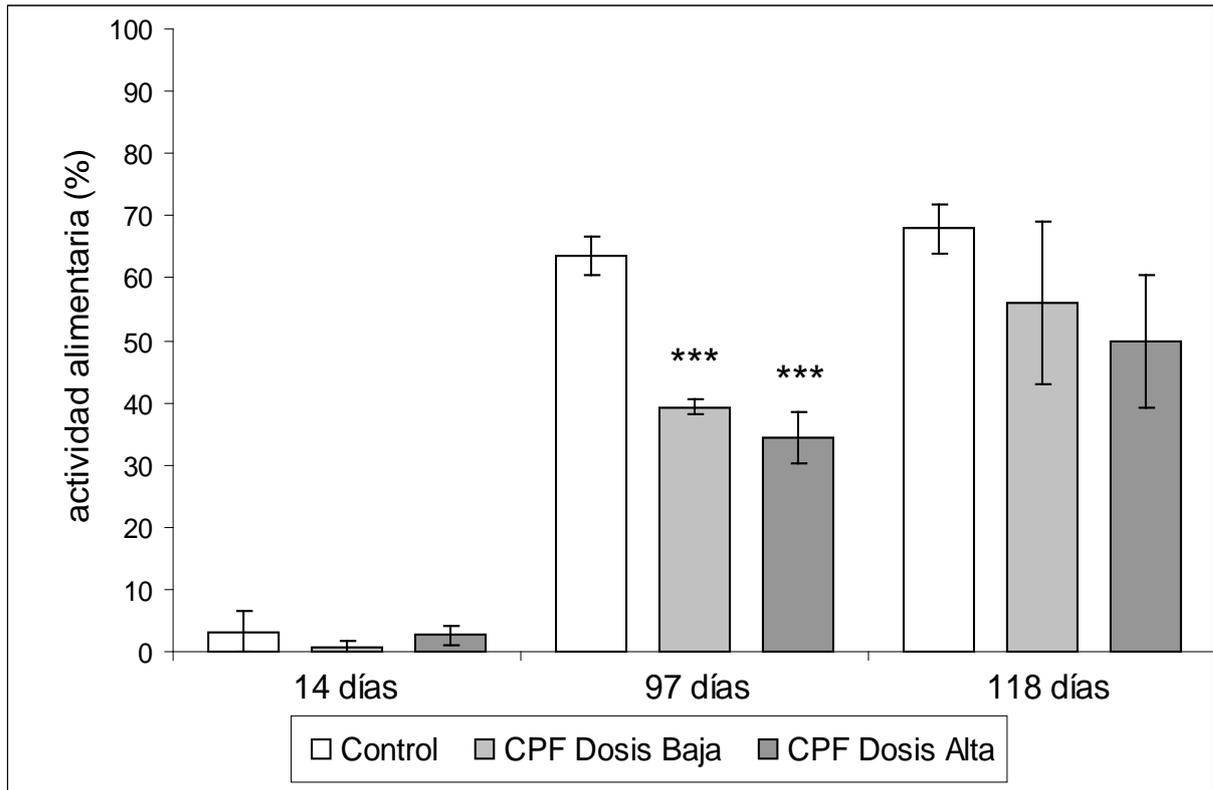
### 4.2.3 Ensayos en el campo

#### 4.2.3.1 Descomposición de materia orgánica: ensayos de lámina cebo

Después de 14 días de exposición de las láminas cebo en el campo, el consumo del cebo por parte de la macrofauna del suelo fue muy bajo, posiblemente debido a la baja densidad de lombrices y al escaso tiempo de exposición de las láminas. No se encontraron diferencias significativas entre el consumo en las parcelas tratadas y controles. En las láminas recolectadas luego de 97 días de exposición, sin embargo, la actividad alimentaria se vio significativamente disminuida en las parcelas tratadas, respecto de los controles ( $p < 0,001$ ) (Control:  $63,5 \pm 3,0$  %; CPF DB:  $39,3 \pm$

## Resultados

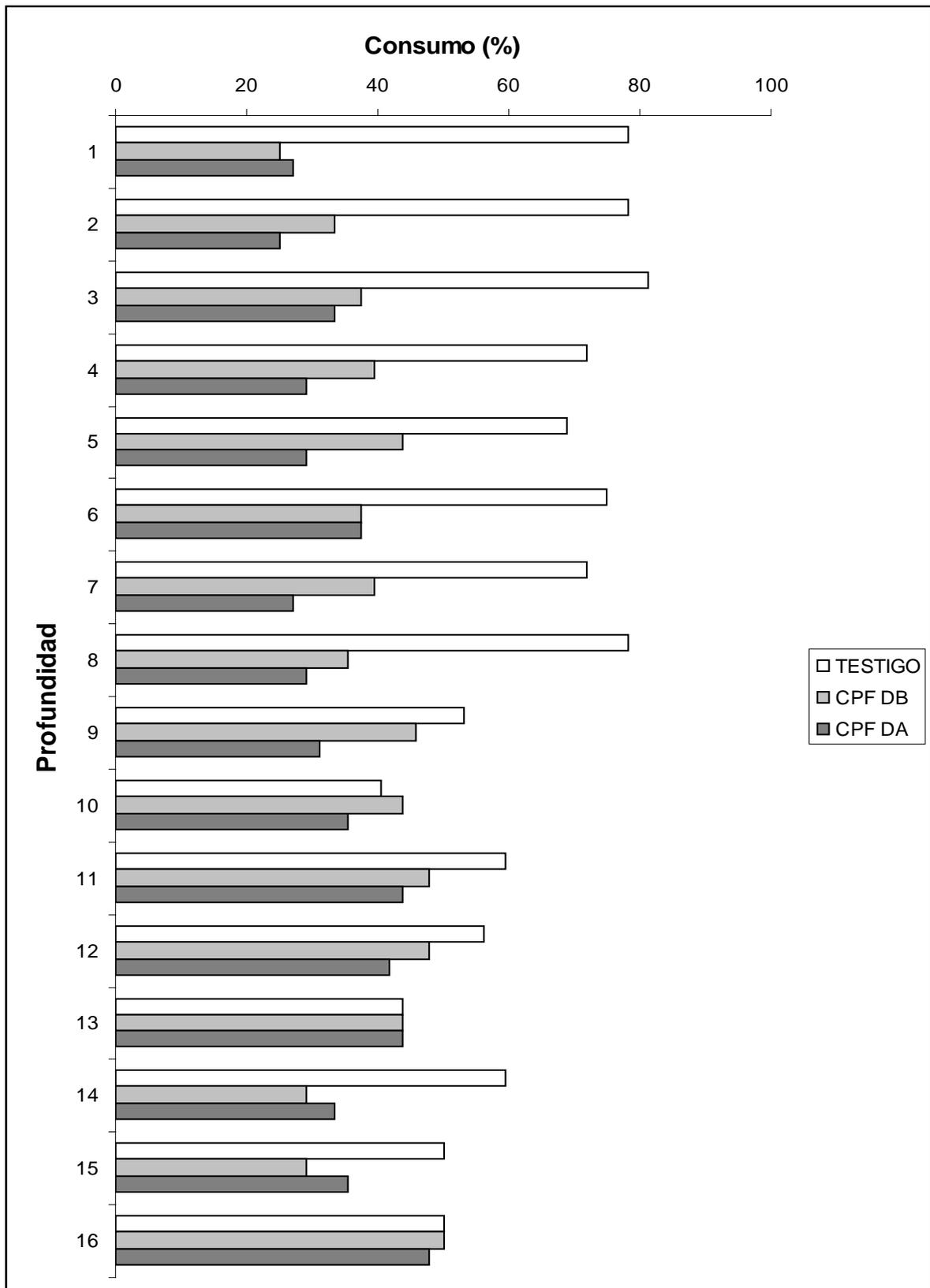
1,2 %; CPF DA:  $34,3 \pm 4,1$  %), sin relación concentración-efecto. En las láminas recolectadas luego de 118 días se registró una leve disminución no significativa, sugiriendo una reversión del efecto adverso de los tratamientos (Control:  $67,0 \pm 3,9$  %; CPF DB:  $56,0 \pm 13,0$  %; CPF DA:  $50,0 \pm 10,6$  %) (Figura 61).



**Figura 61.** Lámina cebo en campo. Actividad alimentaria (14, 97 y 118 días) de la macrofauna en suelos controles y tratados con dos concentraciones de CPF. Los resultados se expresan como media +/- desvío estándar (3 replicados/tratamiento/bloque). Diferencias estadísticamente significativas respecto del control (\*\*\*) $p < 0,001$ .

Al estudiar la distribución de los agujeros vacíos se pudo observar que para el control la actividad alimentaria disminuyó con la profundidad, mientras que para ambos tratamientos de CPF no se observa esa disminución (Figura 62).

## Resultados



**Figura 62.** Lámina cebo en campo. Distribución vertical de agujeros vacíos en controles y suelos tratados con CPF DB y CPF DA (n=48).

### **4.2.3.2 Abundancia relativa y diversidad de lombrices**

La extracción de lombrices se efectuó por el método de la formalina (Edwards 1991). En el lote seleccionado, en un monitoreo previo se pudo detectar presencia de pocas lombrices, identificándose *Octolasion cyaneum* (Lumbricidae) y *Microsclex dubium* (Acanthodrilidae), aunque en las evaluaciones posteriores la densidad poblacional fue muy baja.

# ***Discusión***

La estimación de los efectos de los plaguicidas en agroecosistemas se puede realizar por observaciones de campo y/o mediante ensayos ecotoxicológicos en laboratorio, los cuales permiten establecer una relación causal entre las concentraciones ambientales y los efectos sobre las poblaciones y, eventualmente, extrapolar estos resultados hasta el nivel de comunidad y ecosistema. En este trabajo de tesis, nos propusimos el desarrollo y evaluación de herramientas a distintos niveles de organización biológica, para el estudio de los efectos de distintos plaguicidas de uso extensivo en agroecosistemas de nuestro país, a través de la articulación de bioensayos laboratorio-campo.

A partir de bioensayos de laboratorio, en condiciones controladas, por exposición de las lombrices *Eisenia andrei* a papeles de filtro o suelo artificial, se optimizaron las técnicas para la evaluación de potenciales biomarcadores.

### **1. BIOENSAYOS EN PAPEL**

Los bioensayos usando papeles de filtro impregnados con sustancias potencialmente tóxicas pueden resultar una alternativa rápida, sensible y de bajo costo, para evaluar bajo condiciones controladas efectos tóxicos de contaminantes que aparecen con frecuencia en suelos. Con esta técnica se evalúa toxicidad por contacto.

Roberts y Dorough (1984) clasifican la toxicidad aguda de las sustancias químicas en *Eisenia sp* mediante la técnica del papel impregnado, según sus DL<sub>50</sub>, como:

supertóxicos ( $< 1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), extremadamente tóxicos ( $1\text{--}10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), muy tóxicos ( $10\text{--}100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), moderadamente tóxicos ( $100\text{--}1000 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) o relativamente no tóxicos ( $> 1000 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

### **1.1 Clorpirifos: Comparación entre producto técnico y formulado**

#### **1.1.1 Toxicidad letal**

Muchas evaluaciones de la toxicidad de plaguicidas se llevan a cabo con los ingredientes activos. Sin embargo, a campo son aplicados compuestos formulados, combinación de principios activos y aditivos, algunos de ellos agregados para modificar la absorción o el metabolismo del principio activo. Resulta difícil evaluar específicamente el efecto de estos coadyuvantes debido a que no son dados a conocer, y, por lo tanto, debe recurrirse a la evaluación comparativa de producto formulado y principio activo. Se han realizado pocos estudios para investigar la toxicidad comparativa de productos puros y formulados de uso en suelos agrícolas (Salminen *et al* 1996, Marques *et al* 2009, Pereira *et al* 2009).

Dado que las  $CL_{50}$  obtenidas en este trabajo fueron de  $CL_{50} = 2,20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  y  $2,80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para técnico y formulado, respectivamente, según la clasificación de toxicidad de Roberts y Dorough (1984), ambos productos resultaron extremadamente tóxicos para las lombrices, sin diferencias entre sí en cuanto a toxicidad letal.

### **1.1.2 Biomarcadores celulares/subcelulares**

La evaluación de respuestas en organismos bioindicadores a nivel suborganismo puede ser útil para predecir efectos adversos en organismos y poblaciones del suelo (Scott Fordsmand y Weeks 2000, Maboeta *et al* 2002, Vasseur y Cossu-Leguille 2003, van Gestel y Weeks 2004, Moore *et al* 2006). Entre ellas, la disrupción de los procesos lisosomales y el daño al ADN pueden constituir indicadores relevantes del estado de salud de los organismos vivos.

Los lisosomas son un grupo morfológicamente heterogéneo de organelas subcelulares unidas a membrana, que contienen hidrolasas ácidas, con un rol funcional en la digestión intracelular y reciclado de macromoléculas y como un sistema de defensa inmunológico natural. El compartimiento lisosomal es sensible a diferentes estresores, una de sus características es la fragilidad de la membrana lisosomal. El rojo neutro, un colorante lipofílico, levemente básico, que es tomado y acumulado en lisosomas no dañados, tiende a liberarse hacia el citosol, el que se tiñe con el colorante. La estabilidad de la membrana lisosomal decrece en respuesta al estrés y la permeabilidad de la membrana aumenta. En lombrices de tierra, un mayor nivel de estrés ambiental antropogénico se corresponde con un menor tiempo de retención del rojo neutro (TRRN) en los lisosomas. El mecanismo por el que la estabilidad disminuye no se conoce, pero se cree que puede deberse a reacción directa de las sustancias químicas sobre la membrana lisosomal. El desenlace de las células luego del daño lisosomal es variable; la magnitud de la ruptura y consecuentemente la cantidad de enzimas hidrolíticas liberadas al citosol, pueden inducir daño subletal reparable, apoptosis o necrosis

## Discusión

---

(Bursch *et al* 1999, Hwang *et al* 2004). Según Hwang *et al* (2004), ostras *Crassostrea virginica* recuperaron su salud lisosomal luego de dejarlas depurar en ambiente limpio. La recuperación de la membrana lisosomal puede deberse a: i) recuperación de la función lisosomal en las células dañadas, a medida que decrece la concentración de tóxico; ii) regeneración celular y reemplazo de las células dañadas removidas a medida que mueren.

En nuestros ensayos, el TRRN mostró diferencias muy significativas en los tratamientos con clorpirifos grado técnico y formulado, a todas las concentraciones estudiadas, respecto de los controles. Los resultados expresados en la figura 25 además no mostraron diferencias entre ambos productos, sugiriendo que el efecto sobre la membrana lisosomal podría deberse al principio activo y no a los coadyuvantes utilizados para la formulación comercial del producto.

El Ensayo Cometa es un método rápido y sensible para la detección de daño primario al ADN a nivel de célula individual, por medición de la migración de ADN nuclear inmovilizado (Lee y Steinert 2003). Actualmente se usa ampliamente en investigación biomédica, estudios de biomonitorio humano y ambiental y ensayos de genotoxicidad (Zang *et al* 2000, Reinecke y Reinecke 2004). Este ensayo es capaz de detectar la interacción de xenobióticos con el ADN como consecuencia de la exposición a muestras ambientales complejas (Kosmehl *et al* 2004).

En cuanto al Ensayo Cometa, a diferencia del producto técnico, el formulado no mostró aumento en la migración del ADN, medida como porcentaje e índice de daño (Figuras 26 y 27). Esto podría deberse a que alguno de los componentes de

la formulación esté ocasionando un alto daño celular, que se refleja en cometas sin cabeza y con colas largas y difusas (nubes), que representan potencialmente células apoptóticas o necróticas. Yu *et al* (2008) demostraron efecto apoptótico del clorpirifos en células de retina de ratón. Este tipo de efectos confunde la interpretación de los resultados del ensayo, y por lo tanto, podría haber quedado enmascarado el daño al ADN producido por el CPF.

### **1.2 Glifosato: Comparación entre diferentes formulaciones**

El ensayo de toxicidad aguda en lombrices con el método del papel impregnado se empleó también para comparar la toxicidad de diferentes formulaciones del herbicida glifosato.

#### **1.2.1 Toxicidad letal**

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 12, el formulado A se clasificó como muy tóxico ( $CL_{50}$ : 10-100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), mientras que los formulados B y C resultaron moderadamente tóxicos ( $CL_{50}$ : 100-1000  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Estos resultados sugieren que la mayor toxicidad en el formulado A puede deberse a que los compuestos de la formulación modifican de manera diferente la biodisponibilidad del GLI, o a una toxicidad intrínseca de alguno de los componentes de la formulación.

### **1.2.2 Biomarcadores celulares/subcelulares**

Se compararon las respuestas a la exposición a los formulados A y C, ya que ambos contienen el mismo ingrediente activo.

En lombrices expuestas a concentraciones subletales, los TRRN mostraron una disminución significativa a todas las concentraciones ensayadas para el formulado A (7,5 – 30,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), mientras que para el formulado C recién se observó un descenso significativo a la mayor concentración ensayada (240  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que a esa concentración, cercana a la  $CL_{50}$ , la disminución de peso de las lombrices fue mayor al 30 %, indicando un gran deterioro que podría estar anunciando la posible muerte de las lombrices afectadas (Figuras 29 y 30).

Los parámetros estudiados, TRRN y variación en el peso corporal, indican un estrés tóxico producido por los formulados en estadios previos a la muerte, y pueden ser de utilidad como alertas tempranas de efectos deletéreos de los mismos.

El ensayo Cometa expuso diferencias sólo en las lombrices expuestas al formulado A (Figuras 31, 32, 33 y 34). Los resultados obtenidos indicarían que las diferencias en las respuestas entre los formulados A y C podrían deberse a que algún componente de la formulación, y no el GLI, fuera responsable de los efectos encontrados, resaltando la importancia de la evaluación ecotoxicológica no solo de los principios activos, sino también de las diferentes formulaciones usualmente empleadas a campo.

### **2. BIOENSAYOS EN SUELO ARTIFICIAL**

Los bioensayos por exposición a papeles de filtro sólo dan información sobre toxicidad por contacto. Son útiles como ensayos preliminares reproducibles de toxicidad de sustancias químicas, aunque sus resultados son más difíciles de extrapolar a condiciones ambientales reales. Los bioensayos en suelo artificial, en cambio, pueden constituir una buena aproximación a las condiciones ambientales. Estos ensayos estandarizados tienen la ventaja de compensar la variabilidad entre los diferentes tipos de suelo y son de utilidad para la comparación de toxicidad entre distintos productos. Dado que las lombrices ingieren suelo, con esta técnica se evalúa toxicidad por contacto y por ingestión.

#### **2.1 Evaluación de CL<sub>50</sub>. Clorpirifos – Glifosato**

De acuerdo con la clasificación de toxicidad aguda sugerida para los bioensayos por exposición de lombrices a concentraciones de plaguicidas en suelo artificial (Zhou *et al* 2007): altamente tóxico (CL<sub>50</sub> <1 mg/kg), moderadamente tóxico (1–10 mg/kg), levemente tóxico (10 – 100 mg/kg), prácticamente no tóxico (> 100 mg/kg), nuestros resultados indican baja toxicidad aguda del CPF (CL<sub>50</sub> entre 300 mg/kg- 450 mg/kg), tanto técnico como formulado. Dichos resultados se encuentran en el orden de los obtenidos por otros autores. De Silva *et al* (2009a) determinaron la CL<sub>50</sub> para CPF GT (98%) en SA en lombrices *Eisenia andrei*: 492 mg/kg (456 – 531 mg/kg), en un estudio que duró 28 días. The Pesticide Manual (2000) informa una CL<sub>50</sub> para individuos de *Eisenia fetida* expuestos a CPF en SA de 215 mg/kg. Rodgers (1994) encontró una CL<sub>50</sub> de 210 mg/kg para *Eisenia sp.* expuestas por 14 días a CPF GT en SA. En un trabajo publicado en 2007, Zhou *et*

al informaron una CL<sub>50</sub> más baja: 91,8 mg/kg, luego de 14 días de exposición de *Eisenia andrei* a SA con CPF agregado.

Las diferencias de toxicidad podrían deberse a variaciones en las condiciones de los ensayos o en la composición del suelo artificial empleado, tal como lo ilustran trabajos de la literatura para diversos plaguicidas. Así, Bauer y Römbke (1997) estudiaron la toxicidad del insecticida paratión y de herbicidas amitrol-diurón en lombrices *Eisenia fetida*, *Lumbricus terrestris* y *Aporrectodea longa* y encontraron que la humedad del suelo y la temperatura son dos factores que influyen sobre la toxicidad. Por su parte, Ellis *et al* (2007) estudiaron el efecto de distintos suelos artificiales sobre la toxicidad del fungicida carbendazim en lombrices *Eisenia fetida*. Sus resultados indicaron que la adsorción del fungicida al suelo estaba directamente relacionada con el contenido de materia orgánica y el pH del suelo, pudiendo afectar la biodisponibilidad del plaguicida, y por lo tanto, su toxicidad en lombrices.

La CL<sub>50</sub> de las lombrices *Eisenia andrei* expuestas a los distintos formulados de glifosato en SA resultó ser mayor a los 1000 mg/kg en todos los casos, similar a lo publicado por Correia y Moreira (2010), quienes reportaron la supervivencia de todos los adultos de *E. fetida* expuestos a distintas concentraciones de glifosato GT (98%) (10 – 1000 mg/kg) durante 14 días.

### 2.2 Estudios con Glifosato y Clorpirifos, solos y en combinación

En la práctica agrícola es común aplicar varios plaguicidas sucesivamente, o como mezclas, ya sea para asegurar su eficacia, combatir distintos tipos de plagas y/o disminuir la aparición de fenómenos de tolerancia o resistencia. El glifosato y el clorpirifos suelen ser aplicados en forma sucesiva o como mezcla en cultivo de soja transgénica, por lo tanto ambos plaguicidas pueden coexistir en el ambiente. Se evaluaron los efectos de su acción combinada en lombrices expuestas a SA suplementado con concentraciones subletales de ambos principios activos.

Los resultados obtenidos (Figura 35) mostraron una contribución de ambos plaguicidas en el daño a la membrana lisosomal. Al no contar con glifosato monoamónico técnico, no se pudo evaluar el tipo de interacción entre ambos principios activos.

A diferencia de lo encontrado en el TRRN, el ensayo Cometa no parece estar evidenciando un efecto combinado de los plaguicidas ensayados (Figuras 36 y 37). Si bien se registraron diferencias respecto de los controles, la exposición a la mezcla CPF 200 mg/kg + GLI 300 mg/kg no mostró diferencias con respecto a la exposición de lombrices a CPF 200 mg/kg, ni para el porcentaje de daño ni para el índice de daño.

Estos resultados preliminares subrayan la importancia del uso de potenciales biomarcadores para la evaluación de la toxicidad combinada de plaguicidas de uso conjunto o sucesivo en campo.

### **2.3 Exposición a suelo artificial (PEC): Glifosato-Clorpirifos**

La evaluación del riesgo de plaguicidas debe seguir un enfoque por niveles, empezando con estudios en laboratorio en una especie, bajo condiciones extremas de exposición. Idealmente, la habilidad predictiva de los estudios en laboratorio debe validarse contra datos obtenidos en condiciones más ecológicamente realistas, y proyectarse a mayores niveles de organización biológica. Las concentraciones ambientales previstas (PEC), son de utilidad en los procesos de evaluación de riesgo para identificar posibles efectos de xenobióticos en organismos no blanco. De acuerdo con las pautas fijadas en nuestro trabajo para su cálculo, podríamos considerarla como la mayor concentración esperada en el compartimiento suelo, y es posible que se produzcan efectos similares en condiciones de campo.

Por lo tanto se evaluaron los biomarcadores optimizados, luego de exposición de las lombrices a SA suplementado con formulados de los plaguicidas en concentraciones seleccionadas por cálculo de PEC, para comparar los resultados de estos bioensayos con los obtenidos en experiencias a campo, y estimar su mérito relativo con vistas a su aplicación en la evaluación ecotoxicológica de suelos agrícolas contaminados.

#### **2.3.1 Biomarcadores celulares/subcelulares**

Nuestros resultados muestran que los ensayos de TRRN y Cometa fueron sensibles a la exposición a CPF en suelo artificial, aún a las bajas concentraciones

equivalentes a campo (Figura 38). Las respuestas fueron similares a las obtenidas en los bioensayos con concentraciones subletales, pero más altas que las PEC en SA y por exposición a papeles impregnados con CPF.

TRRN y Cometa no respondieron a la exposición a GLI en suelo artificial, a las bajas concentraciones equivalentes a campo ensayadas (Figuras 39 y 40).

### ***2.3.2 Estudios de actividad biológica y comportamiento***

Para determinar el impacto de los contaminantes sobre poblaciones expuestas a campo, es importante vincular las respuestas a nivel suborganismo con efectos a mayores niveles de organización biológica, empleando parámetros ecológicamente relevantes.

Según Bone y Moore (2008), el comportamiento se refiere a reacciones de un organismo observables o medibles (movimientos, alteraciones fisiológicas) como respuesta a un estímulo originado por el medio ambiente. Por su parte Baatrup (2009) indicó que el comportamiento es regulado por diversos sistemas, incluyendo el sistema sensorial (quimiorreceptores), sistema nervioso (producción de neurotransmisores como la acetilcolina), sistema endocrino y actividades metabólicas y oxidativas (consumo de oxígeno, lípidos). Pequeños disturbios en alguno de estos sistemas pueden traducirse en severas aberraciones comportamentales que pueden poner en riesgo la supervivencia de los individuos. Debido a la gran variabilidad que pueden presentar los datos, estos ensayos son frecuentemente criticados (Zala y Penn, 2004). Sin embargo, para evaluar

toxicidad de suelos, los estudios de comportamiento en lombrices podrían constituir un punto final sensible y relevante, más económico y fácil de ejecutar que estudios por métodos químicos (Hund-Rinke y Wiechering 2001, Lukkari y Haimi, 2005).

### **2.3.2.1 Reproducción**

Los contaminantes pueden reducir el suceso reproductivo o la supervivencia de la descendencia de lombrices. Los efectos sobre la reproducción pueden interpretarse de dos maneras: como un efecto directo debido a interacción con mecanismos clave en la reproducción, o como un efecto indirecto, vía asimilación de nutrientes y mantenimiento del balance energético (Booth y O' Halloran 2001). La tasa y la viabilidad de cocones parecen ser dos marcadores muy sensibles a la exposición a plaguicidas (Yasmin y D'Souza, 2010).

En nuestro trabajo, la exposición a CPF en concentraciones equivalentes a campo no mostró alteraciones significativas en los parámetros de reproducción evaluados. Sin embargo, los resultados obtenidos por exposición a 10 PEC indicarían un efecto incipiente en la reproducción. La producción total de cocones, la cantidad de cocones eclosionados y el número de juveniles mostraron una disminución con respecto a los controles y al tratamiento a PEC, sin embargo ésta no resultó significativa. Esta tendencia se vería apoyada por el menor aumento de peso ( $p < 0,01$ ) que se observa en el tratamiento con CPF 10 PEC respecto de los controles, luego de 28 días de exposición (Tabla 13).

Jager *et al* (2007) sugirieron efectos deletéreos del CPF en la reproducción de la colémbola *Folsomia candida*, mientras que Zhou *et al* (2007) y De Silva y van Gestel (2009b) informaron efectos del CPF GT (3 – 900 mg/kg) sobre la producción y viabilidad de cocones y juveniles de *Eisenia andrei* en SA. En ensayos de laboratorio, Booth y O' Halloran (2001) encontraron una disminución significativa en la producción y viabilidad de cocones, y crecimiento de juveniles en lombrices *Aporrectodea caliginosa*, expuestas a suelos suplementados con CPF, a concentraciones ligeramente mayores (28 mg/kg).

Con GLI, el ensayo de reproducción en SA utilizando concentraciones PEC mostró resultados interesantes en cuanto al suceso reproductivo. A GLI 10 PEC (26 mg/kg), se observó una disminución en la viabilidad de los cocones, así como en el número de juveniles. Estos parámetros están relacionados entre sí, indicando un impacto adverso en la eficiencia reproductiva de las lombrices expuestas a 10 PEC. Yasmin y D'Souza (2007) evaluaron el efecto de GLI (41%) sobre la reproducción de *Eisenia fetida*, en concentraciones de 2 y 8 mg/kg. Si bien encontraron una disminución en la biomasa de las lombrices luego de 28 días de exposición, no encontraron disminución en el número de juveniles.

### **2.3.2.2 Evasión**

Los bioensayos estandarizados de toxicidad en lombrices reflejan efectos directos, mientras que las pruebas de comportamiento se focalizan en efectos indirectos. El comportamiento de evasión podría ser de gran importancia para las distintas poblaciones y contribuir a su exposición y supervivencia en condiciones de campo

(Lukkari y Haimi, 2005). Los ensayos de evasión o repelencia reflejan esa propiedad, siendo una técnica rápida, útil como ensayo preliminar antes de emprender los de reproducción que son más largos y trabajosos (Hund-Rinke *et al* 2005, Loureiro *et al* 2005) Sin embargo, García *et al* (2004) sugieren que algunas sustancias químicas pueden no ser detectadas por las lombrices de suelo, y en ocasiones pueden morir en el suelo a testear sin escapar.

Los resultados observados al evaluar la evasión de *Eisenia andrei* en suelos con CPF PEC y 10 PEC mostraron una tendencia a evitar el SA tratado, significativa a 10 PEC (Figura 41). Existen pocos estudios con CPF en lombrices (Hodge *et al* 2000, Zhou *et al* 2007, De Silva y van Gestel 2009b). Hodge *et al* (2000) no observaron respuesta de evasión en *Aporrectodea caliginosa* frente a los organofosforados diazinon y clorpirifos. De Silva y van Gestel (2009b) informaron evasión de clorpirifos a concentraciones mayores a 30 mg/kg para *Eisenia andrei*.

En cuanto a los ensayos con GLI, las lombrices no mostraron un comportamiento de evasión por exposición a SA tratado con GLI PEC; sin embargo este comportamiento si pudo observarse con GLI 10 PEC (26 mg/kg). Al respecto, Iwai *et al* (2008) informaron evasión de lombrices *Pheretima posthuma* expuestas a SA con GLI agregado (10-1000 mg/kg).

Si los efectos detectados para GLI en reproducción y evasión en SA se reprodujeran en campo, pueden redundar en una disminución de la densidad poblacional de lombrices, con la consecuente pérdida de sus funciones benéficas para el suelo.

### 2.3.2.3 Descomposición de materia orgánica - Lámina cebo

La descomposición de la materia orgánica es uno de los procesos más integradores en el ecosistema suelo. Los plaguicidas que afectan esta función pueden influenciar adversamente el ciclado de nutrientes y la fertilidad del suelo (Forster *et al* 2004). Progresivamente han ido surgiendo diversos métodos para su estudio, pero debido a la complejidad de los suelos, aun no existe un método de ensayo internacionalmente aceptado y estandarizado para evaluar las modificaciones que pueden producir los plaguicidas en dicha actividad. Entre ellos, una de las técnicas más prometedoras es la de las láminas cebo, que estudia la actividad alimentaria directamente en el campo o a nivel de laboratorio (Von Törne 1990, Helling *et al* 1998, Knacker *et al* 2003). Pocos estudios aplican el ensayo de lámina cebo en laboratorio (Helling *et al* 1998, van Gestel *et al* 2001). En los ensayos con SA, los resultados son indicativos de la actividad alimentaria de las lombrices incorporadas en el recipiente; a campo, el ensayo es un indicador de la actividad del conjunto de la fauna del suelo.

Con SA PEC, el consumo de sustrato en las lámina cebo ocurre rápidamente, con alrededor de un 40 % de consumo en 3 días. Nuestros resultados no mostraron efecto en la actividad alimentaria en las lombrices expuestas a CPF y GLI en concentraciones equivalentes a campo. Van Gestel *et al* (2001) informaron que en SA control, lombrices *Eisenia fetida* tuvieron una actividad alimentaria del 50% en 4,5 días, siendo esta tasa de consumo del orden de la encontrada en este trabajo.

### **3. ESTUDIOS CAMPO- LABORATORIO**

La agricultura moderna utiliza plaguicidas para el control de competidores que comprometen el desarrollo de los productos agrícolas; éstos pueden impactar también en organismos no blanco. El suelo es una matriz compleja y dinámica cuyos componentes pueden modular el efecto de los plaguicidas, modificando su biodisponibilidad, la cual está asociada a las propiedades físico-químicas del compuesto, las características del suelo, y la ruta de ingreso en los organismos expuestos. Los plaguicidas son captados por las lombrices por ingestión de suelo contaminado o por contacto dérmico con los compuestos en solución, que se absorben en función de su coeficiente de partición lípido/agua (Lanno *et al* 2004). En este sentido, la concentración en el agua de poro de los suelos es un factor relevante en la toxicidad. Por lo tanto, resulta fundamental la realización de estudios ecotoxicológicos en condiciones locales (Yu *et al* 2006, Filser *et al* 2008). En nuestro país, hay pocos estudios de evaluación de los efectos de los agroquímicos en los organismos y en la función hábitat del suelo.

Como parte de este trabajo de tesis, se realizaron ensayos integrados laboratorio-campo en suelos agrícolas cultivados con soja o trigo en siembra directa, rociados con los plaguicidas seleccionados, en condiciones controladas, según las prácticas corrientes en la región pampeana en nuestro país.

### 3.1 Campaña Oliveros

#### 3.1.1 *Bioensayos en laboratorio*

##### 3.1.1.1 *Ensayo del TRRN y Ensayo Cometa*

El ensayo de TRRN fue sensible a la formulación de CPF, aún a las bajas concentraciones aplicadas y encontradas en campo. Más aún, cuando las lombrices fueron expuestas a los suelos tratados con CPF muestreados 10 días después, el TRRN disminuyó significativamente, a pesar de que no se detectó CPF en el suelo, resultando más sensible que los ensayos de reproducción y evasión. La exposición a muestras de suelos de campo con CPF durante 28 días también arrojó diferencias muy significativas de los TRRN de las células de las lombrices expuestas frente a las de los controles (Figura 49). Los controles a 28 días registraron TRRN menores que los de células de lombrices expuestas 7 días. Este resultado podría reflejar el estrés generado por una exposición más prolongada en el tiempo.

Cuando las lombrices fueron expuestas a los suelos tratados con GLI recolectados 24 horas después de la aplicación de los plaguicidas, el TRRN resultó significativamente menor. Sin embargo, estos resultados no se repitieron con las lombrices expuestas a los suelos recolectados 10 días después de la aplicación (Figura 48). Esto estaría relacionado con la baja persistencia o la eventual adsorción del GLI en el suelo del campo. Las diferencias significativas respecto de los controles encontradas para las lombrices expuestas a esos mismos suelos por 28 días, podrían deberse a que un mayor tiempo de contacto permite que las

lombrices absorban mayor cantidad de tóxico, alcanzando un valor umbral a partir del cual se observa efecto.

Este ensayo ha sido empleado en lombrices tanto para compuestos orgánicos como inorgánicos (Maboeta *et al* 2002, Xiao *et al* 2006, Maboeta *et al* 2003, Hankard *et al* 2004, Svendsen *et al* 2004, Gastaldi *et al* 2007, Maleri *et al* 2008). Booth *et al* (2005) exponiendo lombrices de la especie *Aporrectodea caliginosa* a hidrocarburos de petróleo, informaron a TRRN como un biomarcador más sensible que la producción de cocones y maduración de juveniles. Con lombrices de esa misma especie expuestas a suelos contaminados con CPF, otros autores concluyeron que TRRN fue un biomarcador sensible para este plaguicida a una concentración de campo de 4 mg/kg (Reinecke y Reinecke 2004). Booth *et al* (2001) informaron que el TRRN es sensible a plaguicidas OP aún a las bajas concentraciones encontradas en el campo, como para ser utilizado como biomarcador de contaminación ambiental por organofosforados.

Algunos autores encontraron una relación entre el TRRN y puntos finales de significancia ecológica como crecimiento y reproducción (Scott-Fordsmand *et al* 1998, Reinecke y Reinecke 1999, Reinecke *et al* 2002, Maboeta *et al* 2004).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el Ensayo Cometa fue sensible a la exposición a suelos tratados con CPF, colectados un día después del tratamiento. El índice de daño obtenido fue muy alto (260,9 sobre un máximo de 300) y el porcentaje de daño estuvo entre el 90 y 100 % de las células estudiadas (Figuras 50 y 51). Como este daño puede tener severas consecuencias en las poblaciones,

puede considerarse de utilidad para la evaluación de la salud del suelo. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que este daño es factible de ser reparado, constituyendo un marcador de exposición más que de efecto. Leucocitos de ratas albinas expuestas a CPF *in vivo* mostraron daño al ADN, aunque parece haber una recuperación con el tiempo (Rahman *et al* 2002). Se encuentran pocos estudios en ambientes terrestres (Xiao *et al* 2006, Martin *et al* 2005).

Al igual que en los bioensayos SA PEC, no se observaron efectos sobre el ADN en las lombrices expuestas a suelos de Oliveros tratados con GLI.

### **3.1.1.2 Ensayo de reproducción**

En los ensayos de reproducción por exposición de las lombrices a muestras de suelo de campo, se observó un efecto significativo del GLI sobre la eclosión de cocones, proceso durante el cual los juveniles son liberados de sus cubiertas protectoras. Aunque los procesos fisiológicos entre organismos acuáticos y terrestres difieren, Marc *et al* (2005) informaron una interferencia del GLI con la expresión de la enzima responsable de la eclosión en *Sphaerechinus granularis*. Santos *et al* (2010) encontraron un descenso en la producción de juveniles y en la supervivencia de adultos en *Folsomia candida* expuestas a concentraciones de GLI a partir de 0,5 mg/kg. El CPF en cambio, no mostró cambios significativos en la reproducción de las lombrices expuestas, repitiendo la respuesta observada en SA PEC. Sin embargo, los valores para el número de cocones y la eclosionabilidad se encuentran entre aquellos obtenidos para los controles y para

los suelos tratados con GLI. La baja concentración en el campo puede haber sido una de las causas de la falta de efectos significativos del CPF.

### **3.1.1.3 Ensayo de evasión**

El ensayo de evasión de lombrices es considerado como una herramienta útil para la evaluación de sitios potencialmente contaminados (Natal da Luz *et al* 2004; Sousa *et al* 2008). Las lombrices pueden detectar un amplio rango de contaminantes, incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales pesados, explosivos y plaguicidas. Sin embargo hay también ejemplos en los cuales las lombrices muestran una preferencia por los suelos tratados con plaguicidas (Reinecke *et al* 2002, García 2004, Fuchs *et al* 2007). La exposición a plaguicidas puede inducir un comportamiento de evasión, el cual puede llevar a modificaciones en la abundancia y en la diversidad de especies de lombrices y contribuir significativamente a su exposición y posibilidades de supervivencia en condiciones de campo. Se encuentran pocos trabajos que evalúen el efecto de plaguicidas en el comportamiento de evasión en lombrices con suelos de campo (Hodge *et al* 2000, Zhou *et al* 2007).

Nuestros resultados muestran un claro rechazo de las lombrices a los suelos tratados con GLI en los tres bloques. (Figura 52). Santos *et al* (2010) encontraron un claro comportamiento de evasión en colémbolas de la especie *Folsomia candida* expuestas a glifosato, al insecticida dimetoato y al fungicida espiroclorfen aplicados de manera independiente, además del efecto en la reproducción.

Al estudiar el efecto del CPF sobre el comportamiento de evasión de las lombrices, los resultados no fueron claros, ya que en dos de los bloques estudiados las lombrices prefirieron los suelos tratados frente a los suelos control y en el bloque restante, la tendencia fue la contraria.

Aunque la densidad y diversidad de poblaciones de lombrices en campo puede verse afectada por múltiples factores, las respuestas adversas para el GLI en la reproducción y evasión de lombrices resultan cruciales y pueden contribuir significativamente a su disminución.

### **3.1.1.4 Descomposición de materia orgánica - Lámina cebo**

Como hemos mencionado, la descomposición de la materia orgánica es una de las funciones ecológicas más importantes en el ecosistema suelo, que integra diversos factores físicos, químicos, climáticos y biológicos (Römbke *et al* 2003). Si la materia orgánica no es procesada y mineralizada, las plantas no pueden obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento, y finalmente se compromete la fertilidad del suelo. Por lo tanto es de extrema importancia evaluar el efecto de las actividades antropogénicas en este proceso. Empleando el método de lámina cebo, que evalúa actividad alimentaria de la macrofauna, nuestros resultados en los ensayos en laboratorio mostraron un patrón similar de respuesta con GLI y CPF, con una disminución muy significativa en el consumo de cebo por las lombrices *Eisenia andrei*.

### **3.1.2 Bioensayos a campo**

Para validar el uso de biomarcadores, es importante relacionar los resultados de laboratorio con puntos finales ecológicos, como densidad y diversidad de lombrices, o funcionales, como descomposición de la materia orgánica.

#### **3.1.2.1 Descomposición de materia orgánica**

Para su evaluación a campo, se emplean dos técnicas que difieren en la materia orgánica y en el modo de exposición de la misma: la de bolsas con hojarasca y la de láminas-cebo. La primera provee una medida de la contribución de un amplio rango de organismos del suelo a la DMO. El método de lámina-cebo integra la actividad alimentaria de invertebrados (principalmente lombrices) y microorganismos del suelo, aunque estos últimos contribuyen en muy pequeña proporción.

Los ensayos de lámina cebo en Oliveros mostraron un descenso significativo en la actividad alimentaria en las parcelas tratadas respecto de las controles a los 50 días de exposición (Figura 54).

Förster *et al* (2004) estableció una correlación directa entre la actividad alimentaria registrada por lámina cebo y la densidad de lombrices del suelo. El bajo consumo de cebo registrado en nuestros ensayos a campo concuerdan con la baja densidad de lombrices revelada por exámenes ocasionales a lo largo del monitoreo. Esa baja densidad puede deberse a diversos factores, incluyendo condiciones climáticas y características del suelo. En particular, estos suelos

poseen una larga historia de disturbio debido a prácticas agrícolas (Ferraras *et al* 2007).

Cuando evaluamos el perfil de consumo, la actividad biológica decreció con la profundidad de las capas de suelo (Figura 55). La compactación del suelo puede haber tenido influencia en la estratificación de la respuesta (Taboada *et al* 1998, Förster *et al* 2004).

Los patrones de efectos de los tratamientos con GLI y CPF en la actividad alimentaria fueron similares en laboratorio y campo. Por lo tanto, la evaluación de actividad alimentaria en condiciones de laboratorio puede resultar un ensayo simple y rápido, útil como método de pre evaluación de toxicidad.

Durante los ensayos a campo, la Ing. Agrónoma Rosana Giménez, integrante del grupo de trabajo, evaluó la descomposición de materia orgánica después de 10, 50 y 90 días de exposición de bolsas de hojarasca (Casabé *et al* 2007). La pérdida de masa no mostró diferencias significativas entre tratamientos y controles a ninguno de los tiempos ensayados.

Ambos puntos finales funcionales están muy relacionados con la humedad del suelo y la densidad de lombrices. El ensayo de bolsas de hojarasca no mostró influencia de los tratamientos, sugiriendo una escasa contribución de la macrofauna del suelo. El ensayo de lámina cebo, que provee un sustrato artificial, a pesar del bajo consumo de cebo, fue útil para detectar los efectos de GLI y CPF en la actividad alimentaria de la fauna del suelo.

### **3.2 Campaña Colón**

En una segunda experiencia, se seleccionó el sitio de estudio en una región del sudoeste de la provincia de Santa Fe, en un terreno cercano a la localidad de Colón, de diferentes características físico-químicas, para evaluar la influencia de las características de los suelos en los biomarcadores ensayados

#### **3.2.1 Bioensayos en laboratorio**

##### **3.2.1.1 Ensayo del TRRN y Ensayo Cometa**

El ensayo del TRRN mostró una reducción significativa, concentración-dependiente, en las lombrices expuestas a las distintas concentraciones de CPF, resultando sensible a las bajas concentraciones presentes en el suelo (Figura 56). Este resultado es similar a los encontrados por Booth y O' Halloran (2001) y Reinecke y Reinecke (2007a) que observaron un claro efecto concentración – respuesta para lombrices expuestas a suelos con organofosforados en laboratorio y microcosmos.

El Ensayo Cometa mostró un alto nivel de daño al ADN en las lombrices expuestas a los suelos tratados con CPF, a ambos tiempos de muestreo (Figuras 57 y 58).

Estos resultados presentan un patrón de respuesta similar con los obtenidos en el ensayo de campo anterior, para ambos biomarcadores.

### **3.2.1.2 Ensayo de evasión**

El ensayo de evasión luego de la exposición a los suelos muestreados a 14 días después de la aplicación del plaguicida, muestran para el CPF el mismo comportamiento ambiguo que se observó con los suelos de Oliveros (Figura 59). El comportamiento de evasión está directamente asociado con la carga de energía de las lombrices, e, indirectamente con la estructura del suelo. Tanto en Oliveros como en Colón, los análisis físico-químicos no mostraron diferencias entre bloques, en ninguno de los dos sitios muestreados. Estos resultados muestran que el comportamiento de evasión no es un buen indicador la evaluación de los efectos del CPF en lombrices, a concentraciones tan bajas como las encontradas a campo.

### **3.2.1.3 Ensayo de lámina cebo**

Contrariamente a lo obtenido en los suelos de Oliveros, los ensayos de lámina cebo en laboratorio no mostraron diferencias en el consumo de cebo entre lombrices expuestas a suelo control y a suelo tratado con CPF (Figura 60). La distinta textura y composición físico-química de los suelos pueden ser responsables de las diferencias observadas, ya que tienen gran influencia en este punto final funcional. Al respecto, el suelo de Oliveros (arcillo limoso) tiene menor contenido en materia orgánica y en arcilla que el de Colón (franco arcilloso). Estos dos componentes están muy relacionados con la adsorción de compuestos orgánicos y justifican que el CPF esté más biodisponible para las lombrices en los suelos de Oliveros.

### **3.2.2 Bioensayos a campo**

En la figura 61 se muestran los resultados obtenidos por exposición de las láminas a campo en Colón. La actividad alimentaria de la macrofauna del suelo aumentó con el tiempo de exposición. Con respecto al efecto del CPF, con suelos del primer monitoreo no hubo diferencias significativas entre controles y tratados, aunque en general el consumo de cebo fue muy bajo (menor al 5%), posiblemente debido a la baja densidad de lombrices y al escaso tiempo de exposición de las láminas. A lo largo del tiempo se observó variabilidad en los resultados, con diferencias en el consumo de cebo entre controles y tratados a los 97 días, y reversión del efecto adverso después de 118 días. Esta reducción del efecto podría deberse a una disminución en la exposición a los compuestos. La diferencia en la respuesta con el tiempo puede deberse a que la actividad alimentaria está muy relacionada con el contenido de humedad y la densidad de lombrices del suelo.

A diferencia de lo observado en Oliveros, los ensayos de lámina cebo en laboratorio y en campo no resultaron buenos indicadores de los efectos del tratamiento con CPF en los suelos de Colón, remarcando la importancia de realizar estudios comparativos laboratorio-campo para la selección de los biomarcadores apropiados. El análisis de la variación en el consumo de cebo no mostró disminución del consumo con la profundidad (Figura 62).

## Discusión

---

Al igual que en Oliveros, el ensayo de bolsas de hojarasca no mostró diferencias significativas entre tratamientos y controles. La velocidad de descomposición resultó muy lenta a lo largo de todo el tiempo de exposición (datos no mostrados) (Piola *et al* 2009).

# ***Conclusiones***

## Conclusiones

---

- Los bioensayos de contacto usando papeles de filtro impregnados con sustancias potencialmente tóxicas resultaron una alternativa rápida y sencilla para optimizar las técnicas para la evaluación de posibles biomarcadores.
- Los bioensayos en suelo artificial presentan la ventaja de compensar la variabilidad en la respuesta entre diferentes tipos de suelos y constituyeron una alternativa más representativa de las condiciones ambientales.
- Los bioensayos en laboratorio por exposición de las lombrices a papel de filtro o suelo artificial en condiciones controladas, permitieron evaluar las diferencias en los efectos tóxicos entre producto técnico y formulado de clorpirifos y entre diferentes formulados de glifosato.
- Los ensayos de TRRN y Cometa revelaron alteraciones a nivel subcelular, antes de que el daño sea visible a mayores niveles de organización, pudiendo considerarse complementarios de los bioensayos de actividad biológica. El TRRN fue más sensible a la exposición a clorpirifos que los ensayos de reproducción y evasión. El Ensayo Cometa respondió sólo a la exposición a clorpirifos.
- Los bioensayos de reproducción y evasión fueron buenos indicadores de la exposición a glifosato, aunque el primero es más laborioso. Para clorpirifos, los ensayos de evasión no reflejaron un patrón homogéneo de respuesta entre los distintos bloques, indicando que el comportamiento de evasión no es un buen marcador para evaluar los efectos de este plaguicida en lombrices, a concentraciones tan bajas como las encontradas a campo.

## Conclusiones

---

- El bioensayo de lámina cebo en campo fue sensible a los plaguicidas ensayados, aunque su respuesta resultó muy dependiente del tipo de suelo y del tiempo de exposición.
- Los patrones de efectos de los tratamientos con glifosato y clorpirifos en la actividad alimentaria fueron similares en los ensayos de lámina cebo de laboratorio y campo. Por lo tanto, la evaluación de actividad alimentaria en condiciones de laboratorio, un ensayo simple y rápido, puede resultar útil como método de pre-screening.
- En general, los parámetros evaluados con los suelos de campo de ambas campañas presentaron un patrón similar de respuesta a los obtenidos con suelo artificial suplementado con clorpirifos y glifosato a concentraciones ambientales previstas (PEC). Por lo tanto, los bioensayos por exposición de lombrices a PEC pueden resultar de utilidad en los procesos de evaluación de riesgo para identificar posibles efectos de plaguicidas en estos organismos no blanco.
- Los biomarcadores estudiados reflejaron un estrés tóxico producido por los plaguicidas a concentraciones en las que no se observó mortalidad, indicando su utilidad para la detección temprana de efectos adversos de los agroquímicos sobre las poblaciones de lombrices.

Nuestros resultados mostraron que estudios complementarios laboratorio-campo facilitan la selección de una batería de biomarcadores apropiados para la evaluación ecotoxicológica del riesgo asociado al uso extensivo de plaguicidas. El

## Conclusiones

---

suelo es un ecosistema complejo, cuyos componentes modulan la biodisponibilidad, y, por ende, los efectos de los plaguicidas, que se ven también influenciados por las condiciones ambientales. Por lo tanto, enfatizamos la necesidad de realizar los ensayos ecotoxicológicos en condiciones locales.

Este trabajo de tesis documenta la modificación de una batería de biomarcadores cuidadosamente seleccionados, en presencia del insecticida organofosforado clorpirifos y del herbicida glifosato, dos plaguicidas ampliamente utilizados en suelos agrícolas de nuestro país e incluye datos de laboratorio y de campo-laboratorio. Constituye un esfuerzo para enriquecer la base de datos ecotoxicológicos del ecosistema suelo, de la cual se observa una enorme falta de información.

# ***Bibliografía***

## Bibliografía

---

- AMRHEIN N, SCHAB, J, STEINRUCKEN HC (1980): The mode of action of the herbicide glyphosate. *Naturwissenschaften*, 60: 356-357.
- ARNAUD C, SAINT DENIS M, NARBONNE JF, RIBERA D (2000): Influences of different standardised test methods on biochemical responses in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Soil Biology & Biochemistry*, 32: 67–73.
- ARREGUI MC, LENARDÓN A, SÁNCHEZ D, MAITRE MI, SCOTTA R, ENRIQUE S. (2004): Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean. *Pest Management Science*, 60: 163-166.
- BAATRUP, E (2009): Measuring complex behavior patterns in fish-effects of endocrine disruptors on the guppy reproductive behavior. *Human and Ecological Risk Assessment*, 15: 53-62.
- BASKARAN S, KOOKANA RS, NAIDU R (1999): Degradation of bifenthrin, chlorpyrifos and imidacloprid in soil and bedding materials at termiticidal application rates. *Pesticide Science*, 55:1222-1228.
- BAUER C, RÖMBKE J (1997): Factors Influencing the Toxicity of two Pesticides on three *Lumbricid* species in Laboratory Tests. *Soil Biology & Biochemistry*, 29: 705-708.
- BIERKENS J, KLEIN G, CORBISIER P, VAN DEN HEUVEL R, VERSCHAEVE L, WELTENS R, SCHOETERS G (1998): Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere*, 37: 2935-2947.
- BONE Q, MOORE R (2008): *Biology of fishes*. 3ª Edición. Taylor and Francis Group, New York, 478 pp.
- BOOTH L, O'HALLORAN K (2001): A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 2494-2502.

## Bibliografía

---

- BOOTH L, HEPPELTHWAITE V, O'HALLORAN K (2005): Effects-based assays in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. Their utilization for evaluation of contaminated sites before and after remediation. *Journal of and Soils Sediments*, 5: 87–94.
- BURCH S, FITZPATRICK L, GOVEN A, VENABLES B, GIGGLEMAN M (1999): In vitro earthworm *Lumbricus terrestris* coelomocyte assay for use in terrestrial toxicity identification evaluation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 547-554.
- BURLINSON B, TICE RR, SPEIT G, AGURELL E, BRENDLER-SCHWAAB SY, COLLINS AR (2007): Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation Research*, 627: 31–35.
- CASABÉ N, PIOLA L, FUCHS J, ONETO ML, PAMPARATO L, BASACK S, GIMÉNEZ R, MASSARO R, PAPA J, KESTEN E (2007): Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. *Journal of Soils and Sediments*, 7: 232-239.
- CASAFE (2003): Guía de Productos Fitosanitarios, 338-348, 897-906.
- CASARETT LJ, AMDUR MO, KLASSEN CD, DOULL J (2008): Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 7<sup>ma</sup> Edición. Klaassen CD (Ed), Mc Graw Hill 1309 pp.
- COLEMAN DC, CROSSLEY JR DA, HENDRIX PF (2004): Fundamentals of Soil Ecology, 2<sup>a</sup> Edición, Elsevier Academic Press, 386 pp.
- COLGAN A, HANKARD PK, SPURGEON DJ, SVENDSEN C, WADSWORTH RA, WEEKS JM (2003): Closing the loop: a spatial analysis to link observed environmental damage to predicted heavy metal emissions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22: 970–976.

## Bibliografía

---

- COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN SOBRE AGROQUÍMICOS, CONSEJO CIENTÍFICO INTERDISCIPLINARIO (2009): Evaluación de la Información Científica Vinculada al Glifosato en su Incidencia sobre la Salud Humana y el Ambiente, CONICET.
- CORREIA FV, MOREIRA JC (2010): Effects of glyphosate and 2,4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 85: 264–268.
- COSTA LG (2008): Toxic effects of pesticides. Capítulo 22 en CASARETT AND DOULL'S TOXICOLOGY. THE BASIC SCIENCE OF POISONS. 7<sup>ma</sup> Edición. Klaassen CD (Ed), Mc Graw Hill, 1309 pp.
- DE SILVA PMCS, PATHIRATNE A, VAN GESTEL CAM (2009a): Influence of temperature and soil type on the toxicity of three pesticides to *Eisenia andrei*. Chemosphere, 76: 1410-1415.
- DE SILVA PMCS, VAN GESTEL CAM (2009b): Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. Chemosphere, 77: 1609-1613.
- EDWARDS CA (1991): Methods for assessing populations of soil-inhabiting invertebrates, Agriculture, Ecosystems & Environment, 34: 145-176.
- EDWARDS CA, BOHLEN PJ (1992): Effects of toxic chemicals on earthworm. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 125: 23-99.
- EDWARDS CA, LOFTY JR (1977): Biology of Earthworms. 2<sup>a</sup> Edición Chapman & Hall, London, UK, 333 pp.

## Bibliografía

---

- ELLIS SR, HODSON ME, WEGE P (2007): The influence of different artificial soil types on the acute toxicity of carbendazim to the earthworm *Eisenia fetida* in laboratory toxicity tests. *European Journal of Soil Biology*, 43: S239-S245.
- ENVIRONMENT CANADA (1999): Guidance document on application and interpretation of single-species test in environmental toxicology. Minister of Public Works and Government Services, Ottawa.
- ENVIRONMENT CANADA (2004): Biological Test Method: tests for toxicity of contaminated soil to earthworms (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*). Minister of Public Works and Government Services, Ottawa.
- FERRERAS L, MAGRA G, BESSON P, KOVALEVSKI P, GARCÍA F (2007): Indicadores de calidad física en suelos de la región pampeana norte de Argentina bajo siembra directa. *Ciencia del Suelo*, 25: 159-172.
- FILSER J, KOEHLER H, RUF A, RÖMBKE J, PRINZING A, SCHAEFER M (2008): Ecological theory meets soil ecotoxicology: challenge and chance. *Basic Applied Ecology*, 9: 346-355.
- FORSTER B, VAN GESTEL CAM, KOOLHAAS JE, NENTWIG G, RODRIGUES JML, SOUSA JP, JONES SE, KNACKER T (2004): Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME) – An instrument for testing potentially harmful substances: effects of carbendazim on organic matter breakdown and soil fauna feeding activity. *Ecotoxicology*, 13: 129-141.
- FRAGOSO C, KANYONYO J, MORENO AG, SENAPATI BK, BLANCHART E, RODRÍGUEZ C (1999): A survey of tropical earthworms: Taxonomy, biogeography and environmental plasticity. En: Lavelle P, Brussaard L y Hendrix P (Eds) *Earthworm Management in Tropical Agroecosystems*. CAB International Publishing, Wallingford, U.K, 1-26.

## Bibliografía

---

- FUCHS J, PIOLA L, BASACK S, GIMÉNEZ R, MASSARO R, PAPA JC, KESTEN E, CASABÉ N, ONETO ML (2007): Efectos de fenitrotión y esfenvalerato solos o en combinación en suelos agrícolas. VIII Congreso SETAC “Ecotoxicología y Desarrollo Sustentable”, SETAC LA, Montevideo, Uruguay, 8 - 11 de Octubre.
- FUKUTO R (1990): Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87: 245-254.
- GARCÍA M (2004): Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. *Ecology and Development Series No. 19*.
- GARCÍA M, FORSTER B, RÖMBKE J, WELP G, MARTIUS C (2004): Effects of pesticides on soil fauna. Development of ecotoxicological test methods for the tropics. *ZEF news* 15: 4–5.
- GASTALDI L, RANZATO E, CAPRÌ F, HANKARD P, PÉRÈS G, CANESI L, VIARENGO A, PONS G (2007): Application of a biomarker battery for the evaluation of the sublethal effects of pollutants in the earthworm *Eisenia andrei*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146: 398-405.
- GIESY JP, DOBSON S, SOLOMON KR (2000): Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup ® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167: 35-120.
- HANKARD PK, SVENDSEN C, WRIGHT J, WIENBERG C, FISHWICK SK AND SPURGEON DJ (2004): Biological assessment of contaminated land using earthworm biomarkers in support of chemical analysis. *Science of the Total Environment*, 330, 9–20.
- HELLING B, PFEIFF G, LARINK O (1998): A comparison of feeding activity of collembolan and enchytraeid in laboratory studies using the bait lamina test. *Applied Soil Ecology*, 7: 207–212.

## Bibliografía

---

- HENDAWI M, SAUVÉ S, ASHOUR M, BROUSSEAU P, FOURNIER M (2004): A new ultrasound protocol for extrusion of coelomocyte cells from the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59: 17-22.
- HENDRIX PF, CALLAHAM Jr MA, DRAKE JM, HUANG CY, JAMES SW, SNYDER BA, ZHANG W (2008): Pandora's box contained bait: the global problem of introduced earthworms. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 39: 593–613.
- HODGE S, WEBSTER KM, BOOTH L, HEPPLETHWAITE V, O'HALLORAN K (2000): Non-avoidance of organophosphate insecticides by the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (*Lumbricidae*). *Soil Biology & Biochemistry*, 3: 425-428.
- HUND-RINKE K, WIECHERING H (2001): Earthworm avoidance test for soil assessment. *Journal of Soils and Sediments*, 1, 15–20.
- HUND-RINKE K, ACHAZI RK, RÖMBKE J, WARNECKE D (2003): Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicator for the habitat function of soils: results of a laboratory comparison test. *Journal of Soils and Sediments*, 3: 7-12.
- HUND-RINKE K, LINDEMANN M, SIMON M (2005): Experiences with novel approaches in earthworm testing alternatives. *Journal of Soils and Sediments*, 5: 233–239.
- HWANG HM, WADE TL, SERICANO JL (2004): Destabilized lysosomes and elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1991–1995.
- INTA (1985): Carta de suelos de la República Argentina. Hoja 3360-8-3, 66–68, INTA, Argentina.
- ISO (International Organization for Standardization) 11268-1 (1993): Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate.
- ISO (International Organization for Standardization) 11268-2.2 (1996): Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*)- Determination of effects on reproduction.

## Bibliografía

---

- ISO (International Organization for Standardization) 11268-3 (1999): Soil quality - Effects of pollutants on earthworms - Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations.
- ISO/DIS 17512-1 (2005): Soil quality - Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour - Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*)
- IWAI CB, PRATAD Y, SEREEPONG S, NOLLER B (2008): Earthworm: potential bioindicator for monitoring diffuse pollution by agrochemical residues in Thailand. *KKU Research Journal*, 13 (9): 1081-1088.
- JAGER T, CROMMENTUIJN T, VAN GESTEL CAM, KOOIJMAN S (2007): Chronic exposure to chlorpyrifos reveals two modes of action in the springtail *Folsomia candida*. *Environmental Pollution*, 145: 452–458.
- JÄNSCH S, FRAMPTON G, RÖMBKE J, VAN DEN BRINK P, SCOTT-FORDSMAND J (2006): Effects of pesticides on soil invertebrates in model ecosystem and field studies: A review and comparison with laboratory toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 2490–2501.
- JETT DA, LEIN PJ (2005): Noncholinesterase mechanisms of central and peripheral neurotoxicity: muscarinic receptors and other targets, En: *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*, capítulo 17. Gupta R (Ed), Academic Press. 768 pp.
- JERGENTZ S, MUGNI H, BONETTO C, SCHULZ R (2005): Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61: 817–826.
- JOHNSON ML (1942): The respiratory function of the haemoglobin of the earthworm. *Journal of Experimental Biology*, 18: 266-277.

## Bibliografía

---

- KLAUDE M, ERIKSSON S, NYGREN J, AHNSTRIJM G (1996): The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*, 363: 89-96.
- KNACKER T, FÖRSTER B, RÖMBKE J, FRAMPTON G (2003): Assessing the effects of plant protection products on organic matter breakdown in arable fields - Litter decomposition test systems. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 1269–1287.
- KOBAYASHI H, OHTOMI M, SEKIZAWA Y, OHTA N (2001): Toxicity of coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* to vertebrates but not invertebrates: Probable role of sphingomyelin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 128: 401–411
- KÖRDEL W, RÖMBKE J (2001): Requirements on physical, chemical and biological testing methods for estimating the quality of soils and soil substrates. Extended summary of the GDCh monograph. *Journal of Soils and Sediments*, 20: 98-104.
- KOSMEHL T, KREBS F, MANZ W, ERDINGER L, BRAUNBECK T, HOLLERT H (2004): Comparative genotoxicity testing of Rhine river sediment extracts using the permanent cell lines RTG-2 and RTW-W1 in the comet assay and Ames assay. *Journal of Soils and Sediments*, 4: 84–94.
- KRÜGER (1952): Über die Beziehung des Sauerstoffverbauche zum Gewicht bei *Eisenia foetida* (Sav), Annelides oligochaeta. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, 34: 1–5.
- LAJMANOVICH R C, SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ J C, STRINGHINI G, PELTZER P (2004): Levels of serum cholinesterase activity in the rococo toad (*Bufo paracnemis*) in agrosystems of Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72: 586-591.
- LANNO R, WELLS J, CONDER J, BRADHAM K, BASTA N (2004): The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 39-47.

## Bibliografía

---

- LEE RF, STEINERT S (2003): Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544: 43-64.
- LOUREIRO S, SOARES AMVM, NOGUEIRA AJA (2005): Terrestrial avoidance behavior tests as screening tool to assess soil contamination. *Environmental Pollution*, 138: 121–131.
- LUKKARI T, HAIMI J (2005): Avoidance of Cu- and Zn-contaminated soil by three ecologically different earthworm species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62: 35–41.
- MABOETA MS, REINECKE SA, REINECKE AJ (2002): The relation between lysosomal biomarker and population responses in a field population of *Microchaetus sp.* (*Oligochaeta*) exposed to the fungicide copper oxychloride. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52: 280–287.
- MABOETA MS, REINECKE SA, REINECKE AJ (2003): Linking lysosomal biomarker and population responses in a field population of *Aporrectodea caliginosa* (*Oligochaeta*) exposed to the fungicide copper oxychloride. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 411-418.
- MABOETA MS, REINECKE SA, REINECKE AJ (2004): The relationship between lysosomal biomarker and organismal responses in an acute toxicity test with *Eisenia Fetida* (*Oligochaeta*) exposed to the fungicide copper oxychloride. *Environmental Research*, 96: 95-101.
- MALERI RA, REINECKE AJ, REINECKE SA (2008): Metal uptake of two ecophysiologicaly different earthworms (*Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*) exposed to ultramafic soils. *Applied Soil Ecology*, 38: 42-50.
- MARC J, LE BRETON M, CORMIER P, MORALES J, BELLÉ R, MULNER-LORILLON O (2005): A glyphosate-based pesticide impinges on transcription. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203: 1-8.

## Bibliografía

---

- MARQUES C, PEREIRA R, GONCALVES F (2009): Using earthworm avoidance behaviour to assess the toxicity of formulated herbicides and their active ingredients on natural soils. *Journal of Soils and Sediments*, 9: 137–147.
- MARTIN FL, PEARCE TG, HEWER A, PHILLIPS DH, SEMPLE KT (2005): A biomarker model of sublethal genotoxicity (DNA single-strand breaks and adducts) using the sentinel organism *Aporrectodea longa* in spiked soil. *Environmental Pollution*, 138: 307–315.
- MICUCCI F, TABOADA M (2006): Soil physical properties and soybean (*Glycine max*, Merrill) root abundance in conventionally- and zero-tilled soils in the humid Pampas of Argentina. *Soil Tillage Research*, 86: 152–162.
- MILLER A, GERVAIS JA, LUUKINEN B, BUHL K, STONE D (2010): Glyphosate Technical Fact Sheet. National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services.
- MOORE MT, BENNETT ER, COOPER CM, SMITH S, FARRIS JL, DROUILLARD KG, SCHULZ R (2006): Influence of vegetation in mitigation of methyl parathion runoff. *Environmental Pollution* 142: 288-294.
- MOSCATELLI G, PAZOS MS (2000): Soils of Argentina: Nature and Use. En: Proceedings of International Symposium on Soil Science: Accomplishments and changing paradigm towards the 21st century. I. Kheoruenromne and S. Theerawong (Eds.), 81-92.
- MUTHUKARUPPAN G, JANARDHANAN S, VIJAYALAKSHMI G (2004): Sublethal toxicity of the herbicide butachlor on the earthworm *Perionyx sansibaricus* and its histological changes. *Journal of Soils and Sediments*, 5: 82–86
- NATAL DA LUZ T, RIBEIRO R, SOUSA J (2004): Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23: 2188–2193.

## Bibliografía

---

- NPIC (National Pesticide Information Center) State University of Oregon <http://npic.orst.edu/factsheets/glyphotech.pdf> (acceso octubre 2010), actualizado 2010.
- OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT) (1984): OECD Guideline for testing of chemicals No 207. Earthworm, acute toxicity tests, OECD, Paris, France.
- OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT) (2004): Guideline for the testing of chemicals 222. Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*), OECD, Paris, France.
- PAOLETTI MG (1999): The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74: 137-155.
- PÉREZ-LOSADA M, EIROAB J, MATOB S, DOMÍNGUEZ J (2005): Phylogenetic species delimitation of the earthworms *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouche', 1972 (*Oligochaeta, Lumbricidae*) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Pedobiologia*, 49: 317-324.
- PEREIRA JL, ANTUNES SC, CASTRO BB, MARQUES CR, GONCALVES AMM, GONCALVES F, PEREIRA R (2009): Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology*, 18: 455–463.
- PFINGSTEN O (2003): Dr. Gerhard Schrader, Wendeburger Heimatkunde Heft 24, Verlag Uwe Krebs, Wendeburg.
- PIOLA L, FUCHS J, ONETO ML, BASACK S, GIMÉNEZ R, MASSARO R, PAPA JC, KESTEN E, CASABÉ N (2009): Biomarkers for the assessment of chlorpyrifos effects on earthworms and on soil functional parameters *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44: 874-880.
- PRINSLOO MW, REINECKE SA, PRZYBYLOWICZ WJ, MESJASZ-PRZYBYLOWICZ J, REINECKE AJ (1999): Micro-PIXE studies of Cd distribution in the nephridia of the

## Bibliografía

---

- earthworm *Eisenia fetida* (*Oligochaeta*). Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B, 158: 317– 322.
- RADIX P, LEÓNARD M, PAPANTONIOU C, ROMAN G, SAOUTER E, GALLOTTI-SCHMITT S, THIÉBAUD H, VASSEUR P (2000): Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47: 186-194.
- RAHMAN M, MAHBOOB M, DANADEVI K, SALEHA BANU B, GROVER P (2002): Assessment of genotoxic effects of chloropyrifos and acephate by the Comet assay in mice leucocytes. *Mutation Research*, 516: 139–147.
- REINECKE S, REINECKE A (1999): Lysosomal response of earthworm coelomocytes induced by longterm experimental exposure to heavy metals. *Pedobiologia*, 43: 585–593.
- REINECKE AJ, MABOETA MS, VERMEULEN LA, REINECKE SA (2002): Assessment of lead nitrate and mancozeb toxicity in earthworms using the avoidance response. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 68: 779–786.
- REINECKE S, REINECKE A (2004): The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46: 208–215.
- REINECKE S, REINECKE A (2007a): Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66: 92-101.
- REINECKE S, REINECKE A (2007b): The impact of organophosphate pesticides on earthworms in orchards in the Western Cape, South Africa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, 244-251.
- ROBERTS BL & DOROUGH HW (1984): Relative toxicities of chemicals to the earthworm *Eisenia foetida*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3:67-68.

## Bibliografía

---

- RODGERS MH (1994) Chlorpyrifos (Dursban FE) Acute Toxicity (LC<sub>50</sub>) to the earthworm (*Eisenia foetida*). Huntingdon Research Centre. Dow Chemical Company Report No DWC 711/942865.
- RÖMBKE J, HEIMBACH F, HOY S, KULA C, SCOTT-FORDSMAND J, SOUSA P, STEPHENSON G, WEEKS J (2003): Effects of plant protection products on functional endpoints in soil (EPFES), 24-26 April 2002. SETAC, Lisbon, 92 pp.
- RÖMBKE J, BREURE AM, MULDER C, RUTGERS M (2005a): Legislation and ecological quality assessment of soil: implementation of ecological indication systems in Europe. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62: 201-210.
- RÖMBKE J, FÖRSTER B, JÄNSCH S, SCHEFFCZYK A, GARCÍA M (2005b): Terrestrische ökotoxikologische Testmethoden für die Tropen - Teil 2: Halbfreiland- und Freilandtests sowie Risikobeurteilung. *UWSF*, 17: 85-93.
- RÖMBKE J, JÄNSCH S, DIDDEN W (2005c): The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62: 249–265.
- SALMINEN J, ERIKSSON I, HAIMI J (1996): Effects of terbuthylazine on soil fauna and decomposition processes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 34: 184-189.
- SANDAHL J, BALDWIN D, JENKINS J, SCHOLZ N (2005): Comparative thresholds for acetylcholinesterase inhibition and behavioral impairment in coho salmon exposed to chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24: 136–145.
- SANTOS MJG, SOARES AMVM, LOUREIRO S (2010): Joint effects of three plant protection products to the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus* and the collembolan *Folsomia candida*. *Chemosphere*, 80: 1021-1030.
- SASAL C, ANDRIULO AE, WILSON MG, PORTELA SI (2010): Pérdidas de Glifosato por Drenaje y Escurrimiento y Riesgo de Contaminación de Aguas. Taller de Aspectos Ambientales del Uso de Glifosato, Ediciones INTA, 103-114.

## Bibliografía

---

- SCHAEFER M (2003): Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology: Evaluation of different test systems in soil toxicity assessment. *Journal of Soils and Sediments*, 3: 79-84.
- SCHUH RA, LEIN PJ, BECKLES RA, JETT DA (2002) : Noncholinesterase mechanisms of chlorpyrifos neurotoxicity: Altered phosphorylation of  $Ca_2^+$ /cAMP response element binding protein in cultured neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 182: 176-185.
- SCOTT-FORSDSMAN JJ, WEEKS JM, HOPKIN SP (1998): Toxicity of nickel to the earthworm and the applicability of the neutral red retention assay. *Ecotoxicology* 7:291-295.
- SCOTT-FORDSMAN JJ & WEEKS JM (2000): Biomarkers in earthworms. *Review of Environmental Toxicology*, 165: 117-159.
- SINGH N, MCCOY M, TICE R, SCHNEIDER E (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 123–130.
- SOLOMON KR, ANADÓN A, CARRASQUILLA G, CERDEIRA AL, MARSHALL J, SANIN LH (2007): Coca and poppy eradication in Colombia: Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 190: 43-125.
- SOUSA A, PEREIRA R, ANTUNES SC, CACHADA A, PEREIRA E, DUARTE AC, GONÇALVES F (2008): Validation of avoidance assays for the screening assessment of soils under different anthropogenic disturbances. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 661-670.
- STADLER T (1998): Bioindicadores de la contaminación de suelos: efectos secundarios de insecticidas sobre la fauna edáfica. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia e Instituto Nacional de Investigaciones en Ciencias Naturales*, volumen de Ecotoxicología, 153:1-10.

## Bibliografía

---

- STORER T (1951): General Zoology. 2ª Edición, EJ Boell (Ed) Mc Graw-Hill Book Company, Inc. 832 pp.
- SUTHAR S (2009): Earthworm communities a bioindicator of arable land management practices: a case study in semiarid region of India. *Ecological Indicators*, 9: 588-594.
- SVENDSEN C, SPURGEON DJ, HANKARD PK, WEEKS JM (2004): A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 20–29.
- TABOADA M, MICUCCI F, COSENTINO D, LAVADO R (1998): Comparison of compaction induced by conventional and zero tillage in two soils of the Rolling Pampa of Argentina. *Soil Till Research*, 49: 57–63.
- TARRADELLAS J, BITTON G, ROSSEL D (1997): *Soil Ecotoxicology*, CRC Lewis Publishers.
- THE PESTICIDE MANUAL. (2000). 5ª Edición Martin H, Worthing CR, (Eds). The British Crop Protection Council, UK.
- TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, BURLINSON B, HARTMANN A, KOBAYASHI H, MIYAMAE Y, ROJAS E, RYU JC, SASAKI YF (2000): Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206 – 221.
- TRIPATHI G, BHARDWAJ P (2004): Comparative studies on biomass production, life cycles and composting efficiency of *Eisenia fetida* (Savigny) and *Lampito mauritii* (Kinberg). *Bioresource Technology*, 92: 275-283.
- UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL (2010): Informe Acerca del Grado de Toxicidad del Glifosato.  
<http://www.unl.edu.ar/noticias/media/docs/Informe%20Glifosato%20UNL.pdf>

## Bibliografía

---

- US EPA United States Environmental Protection Agency (1992): EPA probit analysis program, version 1.5. Ecological Monitoring Research Division. Environmental Monitoring Systems Laboratory. Cincinnati, OH.
- US EPA United States Environmental Protection Agency (2006): Office of prevention, pesticides and toxic substances.  
[http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/REDs/chlorpyrifos\\_red.pdf](http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/REDs/chlorpyrifos_red.pdf) el 12.12.2010
- VAN DER OOST R, BEYER J, VERMEULEN NPE (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57- 149.
- VAN GESTEL CAM, VAN DER WAARDE J, DERSKEN J (2001): The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil polluted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 1438–1449.
- VAN GESTEL CAM AND WEEKS JM (2004): Recommendations of the 3rd International Workshop on Earthworm Ecotoxicology, Aarhus, Denmark, agosto de 2001. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 100-105.
- VASSEUR P, COSSU-LEGUILLE C (2003): Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International*, 28: 711-717.
- VON TÖRNE E (1990): Assessing feeding activities of soil-living animals: Bait-lamina tests. *Pedobiologia*, 34: 89–101.
- WEEKS J, SVENDSEN C (1996): Neutral red retention by lysosomes from earthworm (*Lumbricus rubellus*) coelomocytes: A simple biomarker of exposure to soil copper. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15: 1801–1805.
- WHO (1975): Data Sheets on Pesticides No. 18, Chlorpyrifos. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

## Bibliografía

---

- WHO (1986): Environmental Health Criteria 63: Organophosphorus Insecticides: A General Introduction. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO (1994): Environmental Health Criteria 159: Glyphosate. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WILLIAMS GM, KROES R, MUNRO IC (2000): Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31: 117-165.
- XIAO N, SONG Y, GE F, LIU X, OU-YANG Z (2006): Biomarker responses of the earthworm *Eisenia fetida* to acetochlor exposure in OECD soil. *Chemosphere*, 65: 907–912.
- YASMIN SH, D' SOUZA D (2007): Effect of Pesticides on the Reproductive Output of *Eisenia fetida*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79:529–532.
- YASMIN SH, D' SOUZA D (2010): Effects of Pesticides on the Growth and Reproduction of Earthworm: A Review. *Applied and Environmental Soil Science* doi:10.1155/2010/678360.
- YU F, WANG Z, JU B, WANG Y, WANG J, BAI D (2008): Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59: 415-423.
- YU RM, WONG MM, KONG RY, WU RS, CHENG SH (2006): Induction of hepatic choriogenin mRNA expression in male marine medaka: A highly sensitive biomarker for environmental estrogens. *Aquatic Toxicology*, 77: 348-358.
- ZALA SM, PENN DJ (2004): Abnormal Behaviours Induced by Chemical Pollution: A Review of the Evidence and New Challenges. *Animal Behaviour*, 68: 649-664.
- ZANG Y, ZHONG Y, LUO Y, KONG Z (2000): Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 108: 271–278.

## Bibliografía

---

ZHOU S, DUAN C, FU H, CHEN Y, WANG X, YU Z (2007): Toxicity assessment for chlorpyrifos-contaminated soil with three different earthworm test methods. *Journal of Environmental Sciences*, 19: 854-858.