

## Bioensayos para la detección de plaguicidas como agentes contaminantes en los componentes del sistema soja: suelo-rastrojo. Un enfoque interdisciplinario

Anglada, M.M.\*; Cerana, J.A.\*; Elizalde, J.H.I.\*; Hernández, J.P.\*; Masin, C.E.\*\*; Rodríguez, A.R.\*\*\*; Lallana, M. del C.\*; Maidana, A.\*; Foti, N.\*; Toledo, C.E.R.\*; Panario, M.\*; Riffel, M.F.\*; Tortul, P.\*; Pezzini, F.\*

AUTORES: \*Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos (3100) Oro Verde, Entre Ríos, Argentina. \*\*Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química – INTEC – (UNL-CONICET), (3000) Santa Fe, Argentina. \*\*\*Facultad de Humanidades y Ciencias. Universidad Nacional del Litoral, (3000) Santa Fe, Argentina

CONTACTO: [manglada@fca.uner.edu.ar](mailto:manglada@fca.uner.edu.ar)

### Resumen

Los plaguicidas utilizados en la agricultura, han favorecido la obtención de mayores rindes y mejorar la calidad de los productos obtenidos. El cultivo de soja bajo el sistema de siembra directa, continúa expandiéndose en la provincia de Entre Ríos y es altamente demandante de la utilización de plaguicidas. El objetivo principal del Proyecto es determinar la presencia de plaguicidas como principales contaminantes en los componentes del sistema soja y evaluar su toxicidad sobre especies no blanco a través de la aplicación de diferentes técnicas de bioensayos.

Para ello se evaluó el manejo de plaguicidas y la presencia de residuos en un sistema de producción de soja, aplicando las prácticas habituales para la zona y se procedió a: 1) caracterizar el suelo del campo experimental; 2) aplicar glifosato y cipermetrina en parcelas de ensayo; 3) realizar muestreos de suelo, de las parcelas del ensayo, para la determinación de residuos de glifosato y cipermetrina por procedimientos analíticos clásicos; 4) la aplicación de bioensayos para la determinación de la concentración efectiva media y detección de residuos (de glifosato y cipermetrina) en rastrajo y suelo; 5) la determinación de fauna edáfica hipogea; 6) estudio de la oligoquetofauna edáfica y bioensayos de toxicidad con *Eisenia fetida*. El abordaje multidisciplinario, permitió el desarrollo y aplicación de métodos que permitieron valorar la presencia de residuos contaminantes y el potencial efecto negativo en el ambiente.

**Palabras clave:** plaguicidas; soja, residuos, toxicidad

## Marco teórico

La intensificación agrícola, las técnicas modernas aplicadas en la producción agropecuaria y el conocimiento de efectos que ponen en peligro la sustentabilidad de los sistemas productivos, significan un nuevo reto al conocimiento científico, debiendo recurrir por el grado de complejidad, a su resolución a través del abordaje interdisciplinario.

El cultivo de la soja ha mostrado un avance muy claro en la agricultura argentina. La superficie cultivada en todo el país creció casi 50% en los últimos 30 años, pasando de ser un cultivo casi inexistente en la década del 70 a ocupar cerca de la mitad del área sembrada. En la Argentina cada año, la soja le gana superficie a la ganadería y al resto de los cultivos extensivos (Souza Casadhino, 2009).

En Entre Ríos la soja bajo el sistema de siembra directa, ocupa cada año mayor superficie, situación que justifica analizar de cerca las particularidades que tiene el cultivo, entre ellos los aspectos del manejo fitosanitario y su posible impacto negativo en el ambiente. Las prácticas más sobresalientes las constituyen el uso del herbicida **glifosato** y la utilización de insecticidas, entre ellos la **cipermetrina**.

Glifosato es el nombre común de la sustancia N-(fosfonometil)-glicina, cuya fórmula molecular es  $C_3H_8NO_5P$ , herbicida de amplio espectro usado en agricultura. En el suelo, el glifosato es fuertemente adsorbido por los minerales de arcillas y materia orgánica, compitiendo con el fósforo por sus sitios de unión. Se considera al glifosato como un herbicida que se adsorbe (une) fuertemente a los suelos, por lo que a pesar de ser muy soluble, tiene poca movilidad (Informe UNL, 2011). El glifosato es considerado como de rápida degradación en suelos y aguas por los microorganismos y con alta capacidad para adsorberse a las partículas de suelo. Sin embargo se detectó una cierta capacidad de desorción en suelos de Entre Ríos y Santa Fe, lo que permitiría (dadas condiciones de precipitaciones abundantes) lixiviar a través del suelo con la consiguiente contaminación de los mismos. (Maitre, et al.2008).

Piccolo et al (1994), estudiaron cuatro tipos de suelos y concluyeron que el herbicida glifosato puede ser muy móvil en el ambiente edáfico; sus resultados indican que de la cantidad aplicada entre el 15 y el 80 % del glifosato aplicado se desorbe rápidamente, puntualizando que en uno de los suelos el 80 % fue desorbido en menos de dos horas. Por lo tanto los últimos estudios realizados en suelos con distintas características edafológicas muestran que el glifosato no es inmóvil ni se degrada tan rápidamente.

Debido a que el glifosato es un herbicida utilizado a gran escala y en grandes cantidades en el mundo, ha estimulado numerosos estudios referentes a su comportamiento y persistencia en los suelos (Forlani *et al.*, 1999; Araujo *et al.*, 2003, tomado de Forero, V 2004). Por derivaciones de la aplicación de glifosato, éste puede enriquecer el suelo a través de varios mecanismos: aplicación sobre malezas emergidas en el barbecho, procedente de las pulverizaciones foliares realizadas sobre el cultivo y/ o de sus metabolitos de degradación, contaminación indirecta por deriva de las pulverizaciones (Ellis y Griffin (2002, citado en Bozzo, 2010), exudación radicular o muerte y descomposición de los residuos de las plantas tratadas Laitinen, *et al.* (2007 citado en Bozzo, 2010).

Rampoldi et al. (2008 citado en Bozzo, 2010) señalan que la siembra directa introduce un componente extra en el análisis de la performance del glifosato que es la presencia de los rastrojos sobre el suelo, donde el glifosato puede permanecer por períodos de tiempo variables.

El glifosato es degradado por microorganismos edáficos dependiendo del tipo de suelo, concentración de nutrientes, pH, temperatura y humedad (Haney *et al.*, 2002; Rodríguez, 2005; Sørensen *et al.*, 2006; Cuervo, 2007; Santos *et al.*, 2009; Keshteli *et al.*, 2011, citado en Martínez-Nieto, 2012). La degradación co-metabólica del glifosato depende de la actividad microbiológica del suelo. Los microorganismos pueden romper los enlaces C-P (carbono-fósforo) dando como producto la sarcosina o el ácido aminometil fosfónico. Posteriormente el AMPA (ácido aminometil fosfónico) puede ser degradado a tasas más lentas que el glifosato. (Informe UNL, 2011)

La utilización de productos químicos constituye una importante fuente de contaminación en zonas de intensa actividad agrícola (Guarrancino *et al.*, 1999, tomado de Forero, 2004). La contaminación, en el suelo o el agua por una sustancia química, ha sido entendida solamente en relación a su concentración, o sea una propiedad intensiva. Este indicador no provee información sobre su difusión en el medio, sus efectos sobre el bioma ni su biodisponibilidad (entendida como una medida del potencial de una sustancia para producir respuestas en los seres vivos, generalmente mediante receptores biológicos), por lo que se consideró importante, predecir las respuestas biológicas que puedan ocurrir por efecto de la contaminación.

Los métodos tradicionales de análisis fisicoquímicos, informan sobre la composición (componentes y sus concentraciones) en una muestra, pero no sobre su biodisponibilidad ni toxicidad. Algunas sustancias pueden resultar nocivas a través de un derivado originado luego de la captación y transformación de un precursor.

Debe tenerse en cuenta que el método fisicoquímico permitiría predecir todas las respuestas biológicas posibles, solo en el caso de conocerse la concentración de cada una de las formas químicas de una sustancia dañina, y además conocer los efectos biológicos de cada una de ellas per se o en combinación (sinergismos, antagonismos, sumas), (Lapoint, T. - Waller, P.; 2000).

Las pruebas analíticas de laboratorio sobre muestras de suelo, pueden pasar por alto importantes daños subletales en los organismos. Estos efectos subletales también son llamados “señales tempranas de advertencia”, que dan información muy importante cuando se trata de determinar el nivel de riesgo biotóxico por una contaminación ambiental (Denneman, A.; van Staelen, N. 1989).

Una gran cantidad de sustancias químicas han sido encontradas en suelos y aguas, pero su actividad biológica generalmente no ha sido probada. Actualmente se acepta que la caracterización y medición fisicoquímica de sustancias reconocidas como tóxicas o sus componentes por separado, no es suficiente para asegurar la ausencia de efectos indeseables, ya que tanto la presencia de estas sustancias como sus posibles transformaciones ambientales, pueden modificar aquellos efectos, de aquí que el uso de bioensayos está siendo considerado cada vez con mayor frecuencia para evaluar la toxicidad global de los contaminantes (Martínez Yepes, P. y Osorio J.; 2002).

No es fácil detectar residuos de sustancias altamente solubles en agua como el glifosato, en laboratorio, porque en las pruebas de laboratorio se trabaja comúnmente con solventes orgánicos. De ahí que sean importantes las pruebas biológicas, los cuales pueden permitir detectar presencia de herbicidas cuando ya no se detecten residuos en laboratorio.

La biodisponibilidad de una sustancia es una medida de su potencial para producir efectos observables sobre los seres vivos. La biodisponibilidad es específica tanto de la sustancia como del organismo receptor sensible a la misma, y se informa como concentración del compuesto químico activo que efectivamente tiene efecto biológico.

En un primer relevamiento realizado sobre las posibilidades de encarar un proyecto de investigación, a través de un planteamiento holístico, se visualizaron campos comunes de actividad donde las condiciones y experiencias previas podrían ser potenciadas avanzando en la integración de objetivos y ampliando sus proyecciones. Esta situación es la que convocó a los grupos de diferentes cátedras de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y al INTEC (Laboratorio de Ecotoxicología. Grupo Medioambiente - UNL) para la realización de una presentación conjunta, enmarcada en el programa UNER orientado a problemas sociales y productivos. (Convenio de Cooperación Técnica entre la UNER y la UNL 000031/2015 (Proyecto: Bioensayos para detección de plaguicidas en).

## **Objetivo general**

Determinar la presencia de glifosato y cipermetrina como principales contaminantes en los componentes del sistema soja y evaluar su toxicidad sobre especies sensibles a través de la aplicación de bioensayos.

Con esa finalidad, se desarrollaron las siguientes actividades: se caracterizó el suelo del lote experimental; se aplicaron tratamientos con glifosato y cipermetrina en un cultivo de soja, durante dos campañas agrícolas consecutivas; se estudió la presencia de residuos (en suelo y rastrojos) del herbicida e insecticida incorporados al ensayo; se estudió la riqueza y diversidad de la fauna edáfica hipógea; se aplicaron bioensayos de elongación radical con plantas indicadoras, para determinar efecto tóxico de los residuos de glifosato y cipermetrina; se estudió la oligoquetofauna presente en el lote experimental, se desarrollaron bioensayos de toxicidad con *Eisenia fetida* y se aplicó el test de huida.

### Metodología utilizada y resultados obtenidos

Las actividades de investigación en campo se realizaron en el período noviembre de 2012 - marzo de 2014, en un lote implantado con soja, en el campo experimental José Ramón Roldán (FCA – UNER), ubicado en Colonia Ensayo, Departamento Diamante provincia de Entre Ríos (S31°51'46-9"; W60° 38' 25.8"). El diseño consistió en bloques al azar con tres repeticiones y 12 parcelas de 10 m x 10 m. Los tratamientos aplicados fueron: glifosato en barbecho; glifosato en barbecho y en postemergencia; glifosato en barbecho, glifosato en postemergencia y cipermetrina; testigo absoluto.

El suelo del lote en estudio, pertenece a: Orden Molisol – Gran Grupo Argiudol – Subgrupo Argiudol ácuico – Serie Tezanos Pinto (TP) – Fase moderadamente erosionada (INTA- Gob. Entre Ríos 1998).

El paisaje característico es de peniplanicie ondulada con pendientes entre 2 y 4 % y el material original sedimento loess calcáreos, de textura franco arcillo limosa. La permeabilidad es lenta a muy lenta y su limitante principal es la erosión hídrica. El perfil modal presenta una secuencia de horizontes: Ap - B21t - B22t - B31 - B32 - CCa.

Para conocer sus condiciones, en el inicio del ensayo se realizó un muestreo del suelo cuyo material fue analizado en el Laboratorio de Suelos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias – UNER arrojando los siguientes resultados. (Tabla 1)

**TABLA 1.** Análisis de suelo del ensayo

Situación	Bloque	pH <sup>1</sup> 1:2,5	MO <sup>2</sup> %	Cap. Int. <sup>3</sup> Catiónico (CIC)	Fósforo <sup>4</sup> Disponibile (mg/kg)	N de <sup>5</sup> Nitratos (mg/kg)	DAP <sup>6</sup> (Mg/m <sup>3</sup> )	TEXTURA <sup>7</sup>			
								Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Clase Textural
Media Loma Alta	I	6,72	3,33	27,1	11,2	8,9	1,10	12,4	49,9	37,7	Franco arcillo limosa
Media Loma Baja	II	6,69	3,89	22,97	36,8	14,3	1,21	7,9	58,1	34,0	Franco arcillo limosa
Bajo	III	6,72	3,03	22,23	36,5	9	1,00	14,3	50,2	35,5	Franco arcillo limosa

1- pH por el método potenciométrico en relación suelo-agua 1:2,5 p/v (Jackson, 1976). 2- MO por el método de Walkley y Black (Jackson, 1976); 3-Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) Extr. Acetato amonio 1 N (Jackson, 1976); 4- Método Bray Kurtz 1 modificado Norma IRAM-SAGPyA 29570-1; 5- Nitrógeno de Nitratos; 6- Densidad Aparente (DA) por el método del cilindro (Baver et al., 1973); 7- Textura por análisis granulométrico por sedimentación con pipeta de Robinson (Baver et al., 1973).

Los tratamientos aplicados en las parcelas de ensayo, fueron: glifosato en barbecho; glifosato en barbecho y en postemergencia; glifosato en barbecho, en postemergencia y cipermetrina; testigo absoluto. (Tabla 2)

**TABLA 2.** Tratamientos aplicados

Fecha	Principio activo	Producto comercial	Dosis
31/10/2012	Glifosato (sal monoamónica 67,9 % equiv. Ácido)	Roundup ultra max SG 74,7 %	1,5 Kg/ha de p.c.
27/12/2012	Glifosato (sal amónica 67,9 % equiv. Ácido)	Roundup ultra max SG 74,7 %	1,5 g/ha de p.c
28 /02/12	Cipermetrina	LIBREK Red Surcos CE 26.1	100 cc/ha
14/11/2013	Glifosato Sal amónica e.ácido 36 %	Glifotop Zamba SL 42.8 %	4 l/ha de p.c.
06/01/2014	Glifosato Sal amónica 42.8 %;e.ácido 35.6 %	Glifotop Zamba	4 l/ha de p.c.

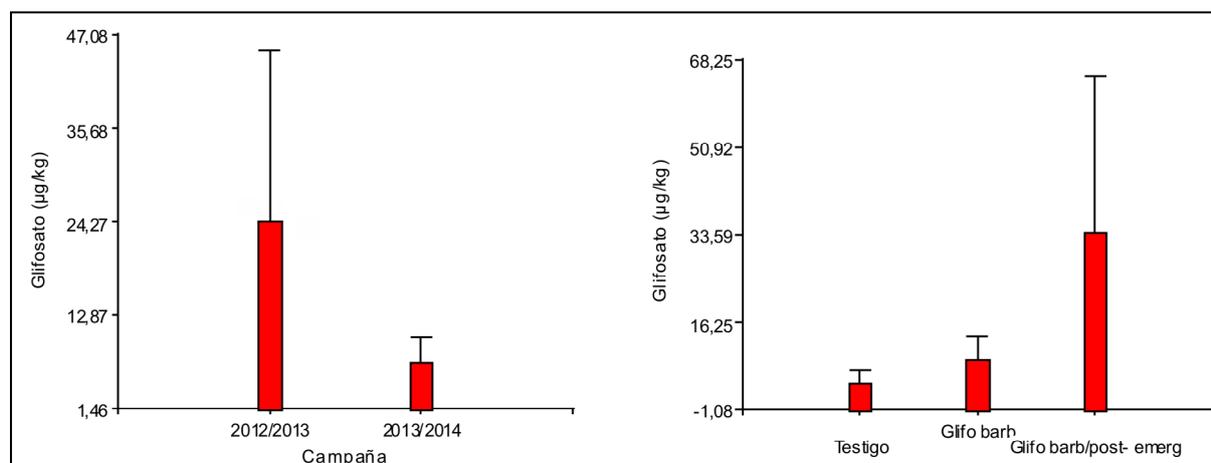
### Residuos de glifosato en el suelo

Se evaluó su concentración a través de determinaciones analíticas realizadas por cromatografía líquida en el Laboratorio de Pesticidas INTA Balcarce. Las dosis de principio activo (glifosato) expresado como equivalente ácido, empleados en los tratamientos, fueron de 1.018 kg/ha<sup>-1</sup> por aplicación para la primera campaña y de 1,424 kg/ha<sup>-1</sup> por aplicación durante el segundo ciclo agrícola.

Las determinaciones de glifosato y AMPA se realizaron a los quince días de la aplicación en la primera campaña agrícola y a los 30 días de la aplicación en la segunda. La determinación de residuos se realizó con un cromatógrafo líquido de ultra performance acoplado a un espectrómetro de masas con fuente de ionización electrospray (UHPLC- MS/MS ESI).

Los residuos de glifosato detectados en el suelo del ensayo, en las campañas agrícolas 2012/13 mostraron un rango de concentraciones que varió de 1,5 µg/kg – 189.72 µg/kg, y en la campaña 2013/2014, las concentraciones registradas variaron entre 1 µg/Kg – 30 µg/Kg, respectivamente.

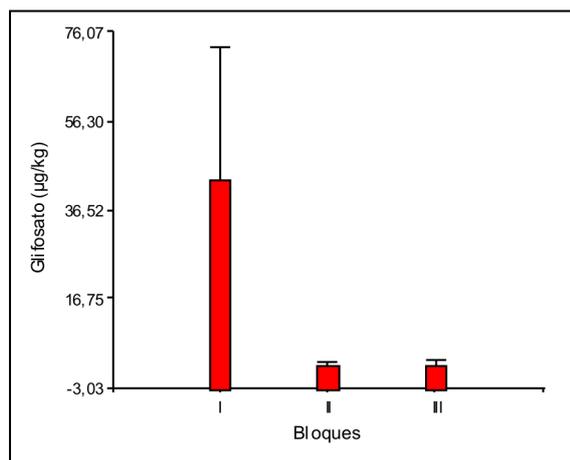
Al comparar los valores promedio de residuos obtenidos en las dos campañas agrícolas, mediante ANOVA (diseño completamente aleatorizado, aplicando software Infostat versión 2015) para las evaluaciones realizadas 15 dda y 30 dda, respectivamente, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ). (Figura 1).



**FIGURA 1.** residuos de glifosato en dos campañas agrícolas **FIGURA 2.** residuos de glifosato en cada tratamiento

Cuando se consideraron los valores promedio de residuos de glifosato hallados en relación con el número de aplicaciones del herbicida (tratamientos) realizadas en cada campaña, las concentraciones se incrementaron, pero no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ). (Figura 2).

Los valores promedios de residuos de glifosato determinados para cada bloque, indican que en el bloque I, o sector más alto, son más elevados respecto a los obtenidos en los dos sectores restantes. A la vez, los valores promedio de residuos obtenidos en los bloques II y III son valores similares y menores a lo determinado en el bloque I. La dispersión de los valores, no permite marcar diferencias estadísticas significativas. (Figura 3).



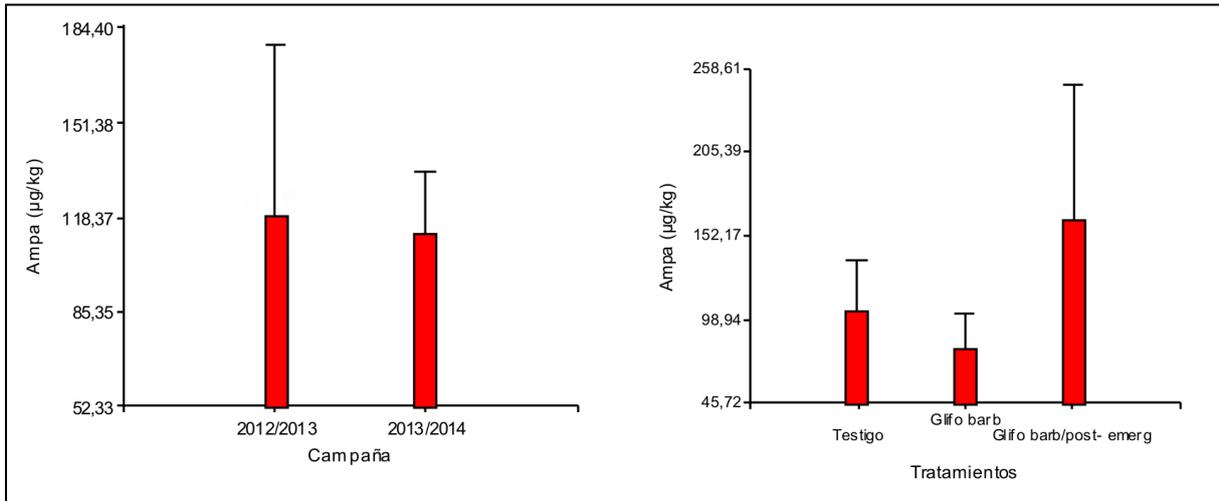
**FIGURA 3.** residuos de glifosato en cada bloque

En caso de alcanzar el suelo, gran parte de este herbicida es adsorbido, mientras que otra parte es degradada principalmente por actividad microbiológica. Por tal motivo, su persistencia en el ambiente edáfico depende de la capacidad degradadora de los microorganismos del suelo (Gómez Ortíz, 2015). Se hallaron residuos de AMPA, en el suelo estudiado aún en los tratamientos (Testigo) en los que no se aplicó el herbicida. Los valores de AMPA alcanzaron niveles superiores al glifosato, en cada valoración realizada y en cada tratamiento, confirmando la actividad microbiana del suelo y la susceptibilidad del herbicida a la degradación.

El AMPA es posiblemente adsorbido más fuertemente a las partículas del suelo que el glifosato y por lo tanto, su degradación es más lenta. Al ser estructuralmente similar al glifosato, se acumula debido a que los organismos responsables no presentan la suficiente variedad de enzimas para dar lugar a la transformación completa, en particular como intermediario en las secuencias metabólicas normales. (Bozzo, A. 2010). A la vez se afirma que el producto es biodegradado con velocidad variable según las condiciones de cada suelo (Monsanto, 2007).

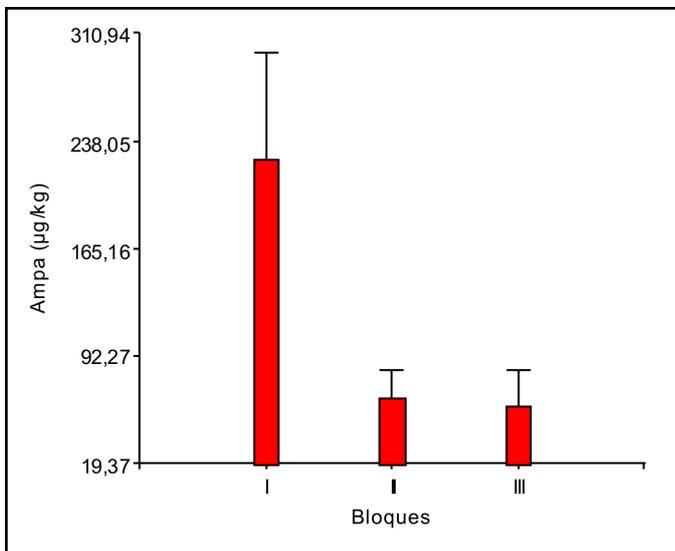
Cuando se efectuó la comparación de los residuos de AMPA hallados en las dos campañas, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ). (Figura 4).

De la comparación efectuada entre los residuos de AMPA y los tratamientos, los valores de residuos hallados se incrementaron con las aplicaciones pero no presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0,5$ ). (Figura 5)



**FIGURA 4.** Residuos de AMPA en dos campañas agrícolas      **FIGURA 5.** Residuos de AMPA en cada tratamiento

Los valores promedio de residuos de AMPA determinados para cada bloque, indican que el bloque I o sector más alto, son más elevados respecto a los obtenidos en los dos sectores restantes. A la vez, los valores promedio de residuos obtenidos en los bloques II y III son valores similares y menores a lo determinado en el bloque I, presentando diferencias estadísticas significativas Duncan ( $p \leq 0,05$ ). (Figura 6).



**FIGURA 6.** Residuos de AMPA en cada bloque

Las concentraciones de glifosato y AMPA fueron superiores en la primera de las repeticiones realizadas (Bloque I). El suelo del ensayo presentó algunas diferencias en cuanto a los contenidos de arcilla, grado de alcalinidad y contenido de Materia Orgánica (M.O.), que si bien no son significativos podrían ayudar a explicar la diferencia en los valores residuales de glifosato hallados y para considerar su destino ambiental habida cuenta que la adsorción y desorción del herbicida depende de las propiedades del suelo, textura, pH y el contenido de materia orgánica, entre otras.

Los registros obtenidos para el AMPA, metabolito primario y predominante, confirman la actividad microbiana del suelo y la degradación del producto.

Los resultados obtenidos en la evaluación de residuos de glifosato a través de las muestras de suelo, presentaron marcada variabilidad en las concentraciones halladas, tanto en muestras obtenidas a los quince días de la aplicación, como en aquellas donde el tiempo transcurrido entre la aplicación y el muestreo, fue de treinta días. Estos resultados indicarían que el producto es biodegradado con velocidad variable según las condiciones de cada suelo (Monsanto, 2007).

La heterogeneidad del terreno y la historia agrícola de la superficie experimental, que incluyó la aplicación

del glifosato más allá del aplicado en la etapa del ensayo, hace que sea difícil obtener una conclusión clara de lo que ocurrió en las diferentes parcelas. La evaluación del comportamiento del glifosato en un suelo, permitió conocer la situación del lote y estimar el posible impacto ambiental del producto independientemente de la posible sinergia del herbicida con otros productos fitosanitarios utilizados en cada campaña.

### **Residuos de cipermetrina en el suelo**

Se evaluaron utilizando cromatografía gaseosa y fueron realizadas en el Laboratorio de Medio ambiente INTEC (CONICET/UNL). Se utilizó la técnica QuEChERS y la identificación y cuantificación se realizó por cromatografía gaseosa, con equipo VARIAN modelo 3400 provisto con columna capilar y detector de captura electrónica. Para el límite de determinación se utilizó un estándar certificado para la calibración del equipo y la mínima cantidad cuantificable es de 46  $\mu$  /kg de alfa - cipermetrina.

El resultado obtenido mostró que en el lote en estudio, no fue detectado el compuesto en las parcelas tratadas con el insecticida, sobre el límite de determinación utilizado (46  $\mu$ g/kg de alfa cipermetrina).

### **Fauna edáfica hipogea**

La fauna del suelo influye en el tipo de humus, en las propiedades físicas y químicas, en la tasa de descomposición de la materia orgánica y en el ciclado de nutrientes (Vedder *et al.*, 1996; Michelena *et al.*, 1998; Kandeler *et al.*, 1999; Momo & Falco, 2003). En el suelo existen diversas comunidades cuya organización se basa en las relaciones funcionales entre los distintos organismos que allí habitan. Así, cada componente biológico juega un rol funcional determinado en su nicho específico y difícilmente puede ser reemplazado por otros presentes en este complejo sistema (Decaens *et al.*, 2006). En particular, la importancia de la mesofauna edáfica en un ecosistema radica en su diversidad estructural y funcional al contribuir, en interacción con la microflora, a la descomposición de la materia orgánica y al ciclo de nutrientes. Sus representantes han mostrado ser, además, indicadores excelentes de la calidad del suelo (Paoletti *et al.*, 1991).

La fauna edáfica requiere condiciones edafoambientales determinadas para cada especie siendo muy sensibles a cambios en el hábitat de cada una; es esa la razón que se comportan como muy buen indicador del funcionamiento del suelo y sus características principales.

El objetivo de este ensayo fue realizar el estudio de la fauna edáfica de un suelo cultivado con soja (*Glicine max*) luego de los tratamientos con Glifosato y con Cipermetrina.

Al diseño general del ensayo (tratamientos con glifosato y cipermetrina), en tres bloques (media loma alta, media loma baja y bajo), se incorporaron los subtratamientos que correspondieron a los muestreos efectuados a las 24 horas, 10 días y 30 días. Se extrajeron 2 muestras simples de suelo sin disturbar de 10cm x 10cm x 20cm de profundidad, tomadas al azar dentro de cada parcela experimental, para cada tratamiento y bloque y en el tiempo de muestreo previsto.

El método utilizado para relevar la mesofauna del suelo fue descrito en primer lugar por Berlese (1905) y luego fue modificado por Tullgren (1918) el cual le agregó el uso de una fuente de luz. El mismo constó de un embudo sobre el cual se colocó un tamiz con un diámetro de malla de 3 mm. Sobre el tamiz se colocó un volumen de 150 cm<sup>3</sup> de suelo, de forma invertida y ligeramente desagregada manualmente y sobre el conjunto se aplicó una fuente de luz durante 10 días.

Posteriormente al muestreo de campo, las muestras fueron llevadas inmediatamente a laboratorio, las cuales fueron acondicionadas y colocadas según indica el método de Berlesse-Tullgren (Tullgren, A. 1918), se colocaron en un sistema armado a tal fin que consistió de un embudo sobre el cual se colocó un tamiz con un diámetro de malla de 10 mm. Sobre el tamiz se colocó un volumen de 150 cm<sup>3</sup> de suelo, de forma invertida y ligeramente desagregada manualmente y sobre el conjunto se aplicó una fuente de luz y calor durante 10 días. Se relevó la cantidad de individuos por metro cuadrado para cada muestra utilizando una lupa óptica binocular de 10x, y luego determinó Riqueza mediante el conteo de los individuos y Diversidad mediante el índice de Diversidad de Shannon (H). (Shannon y Weaver, 1949).

El índice de Shannon se define como:

$$H = -\sum_{i=1}^S \pi_i \ln \pi_i$$

La diversidad máxima (Hmax= lnS) se alcanza cuando todas las especies están igualmente presentes. Un índice de homogeneidad asociado a esta medida de diversidad puede calcularse como el cociente H/Hmax=H/lnS, que será uno si todas las especies que componen la comunidad tienen igual probabilidad (pi = 1/S).

Para el caso del glifosato barbecho 10 días, el muestreo no se pudo realizar debido a que ocurrió una lluvia de 35,8 mm, lo cual dificultó el acceso al ensayo. Y para los muestreos de Glifosato postemergencia a los 10 y 30 días, el muestreo se realizó de acuerdo a lo propuesto, pero no se registró la presencia de edafofauna en ningún caso. Esto puede deberse a las condiciones de alta temperatura ambiente y baja humedad del suelo reinantes al momento del muestreo a campo, condiciones en las que los Artrópodos presentes migraron a mayor profundidad, en búsqueda de zonas de mayor humedad y menor temperatura, por debajo de la profundidad de muestreo, tanto para los tratamientos como para los testigos.

Se presenta una tabla resumen de las condiciones climáticas observadas en la estación meteorológica de la EEA Inta Paraná, distante 10 km del ensayo. (Tabla 3). En los que se observa la temperatura media del día de la aplicación y del muestreo, la precipitación observada en el día y las precipitaciones acumulada, desde el día de la aplicación del tratamiento (día 0) hasta los 30 días luego de la aplicación del tratamiento.

**TABLA 3.** Datos climáticos EEA Inta Paraná. Temperatura Media, Precipitación del día, y Precipitaciones acumuladas. (Campaña 2013/14)

		Temperatura Media (°C)	Precipitaciones (mm)	Precipitaciones Acumuladas (mm)
<b>Gli B (aplicación)</b>	14/11/2013	25,35	0	0
<b>24 horas</b>	15/11/2013	19,3	18,7	18,7
<b>10 días</b>	25/11/2013	20,6	35,8	54,5
<b>30 días</b>	14/12/2013	27,1	0	113,7
<b>Gli Post (aplicación)</b>	06/01/2014	27,5	0	0
<b>24 horas</b>	07/01/2014	29,5	0	0
<b>10 días</b>	16/01/2014	28,4	0	0
<b>30 días</b>	05/02/2014	27,3	0	106,9
<b>CIPER (aplicación)</b>	18/02/2014	24,2	1,2	1,2
<b>24 horas</b>	19/02/2014	23,9	0	1,2
<b>10 días</b>	28/02/2014	21,7	0	22
<b>30 días</b>	20/03/2014	19	0	154

De acuerdo al relevamiento realizado, los grupos Taxonómicos encontrados fueron; Coleópteros, Hemípteros, Himenópteros, Lepidópteros, Ácaros y Miriápodos. La Riqueza varió entre 398 y 4776 individuos por metro cuadrado para el Testigo, entre 199 y 3980 para los tratamientos. El índice de Diversidad de Shannon varió entre 0 y 2,12 para el Testigo, entre 0 y 1,77 para los tratamientos con Glifosato y Cipermetrina. De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 4, no se observan diferencias significativas (LSD Fisher  $p > 0,05$ ) entre los tratamientos con Glifosato en barbecho y postemergencia, Cipermetrina y los testigos, para los valores de Diversidad de Shannon.

**TABLA 4.** Medias para el índice de Diversidad de Shannon de acuerdo a cada tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas (LSD Fisher  $p > 0,05$ ). Glifosato en Barbecho (GB), testigo (T), Glifosato Postemergencia (GP) y Cipermetrina (C).

Tratamiento	DDA	Media
GB	1	1,27 a
GB T	1	1,04 a
GB	30	0,51 a
GB T	30	0,83 a
GP	1	0,67 a
GP T	1	1,04 a
C	1	0,94 a
C T	1	1,17 a
C	10	1,14 a
C T	10	0,95 a
C	30	0,33 a
C T	30	0,98 a

En Tabla 5 se presentan los valores medios de Riqueza para cada tratamiento y testigo. No se observan diferencias significativas entre los tratamientos Glifosato en Barbecho y Glifosato en Postemergencia. Para el caso de los tratamientos con Cipermetrina, se observan diferencias a partir de los 10 días de aplicado. Donde se registra una diferencia entre el tratamiento aplicado (C 10) y el testigo (C T 10), a favor del testigo. Para el caso del tratamiento con Cipermetrina a los 30 días, se observa una disminución en los valores de Riqueza de individuos, aunque se observa una mayor cantidad de individuos en el tratamiento aplicado sobre el testigo.

**TABLA 5.** Riqueza de individuos/m<sup>2</sup> de acuerdo a cada tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas (LSD Fisher  $p > 0,05$ ) Glifosato en Barbecho (GB), testigo (T), Glifosato Postemergencia (GP) y Cipermetrina (C).

Tratamiento	DDA	Media
GB	1	1127,67 a
GB T	1	1061,33 a
GB	30	331,67 a
GB T	30	862,33 a
GP	1	663,33 a
GP T	1	796,00 a
C	1	1127,67 a
C T	1	2918,67 bc
C	10	3383,00 c
C T	10	1658,33 ab
C	30	862,33 a
C T	30	

De acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto a Riqueza y Diversidad de individuos de la mesofauna del suelo, no se observaron diferencias estadísticas significativas, en cuanto a la población de organismos ante la aplicación de Glifosato en barbecho, Glifosato en postemergencia y Cipermetrina, con respecto a los testigos. Se observan en general, valores de índice de Shannon muy bajos con respecto a otros ecosistemas naturales, denotando ambientes que han perdido la diversidad. En cuanto a la riqueza de individuos por metro cuadrado, se observan en general valores similares a los encontrados por Sandler, et al (2010), en poblaciones de artrópodos en suelos Argiudoles típicos de la provincia de Buenos Aires, bajo utilización agrícola.

Estos sistemas se hallan desde hace muchos años, bajo el sistema agrícola de siembra directa, con uso de estos mismos fitosanitarios utilizados en el ensayo, por lo cual podemos inferir que las poblaciones de artrópodos de suelo, se pueden haber adaptado a las condiciones del lugar, debido a que no se obtuvieron diferencias entre el testigo y los tratamientos aplicados.

### Bioensayos de germinación

Los bioensayos de germinación llevados a cabo con especies terrestres sensibles (rúcula, lechuga, rabanito, tomate, arroz, entre otras) resultan muy útiles para ser aplicados en muestras ambientales o en el monitoreo de procesos de destoxificación, saneamiento, control de efluentes o reutilización de biosólidos (Wang, 1991; IDRC/IMTA, 2004), detección de salinidad o presencia de herbicidas en aguas (Iannacone *et al.*, 2000; Foti y Lallana, 2005) y suelo (Forero *et al.*, 2004).

En estos bioensayos el crecimiento de la raíz como punto final de lectura, resulta más sensible a la toxicidad que la germinación de las semillas (Wang, 1991; IDRC/IMTA, 2004). Una variante para evaluar el grado de toxicidad es la Concentración Efectiva 50 (CE50) que representa la concentración requerida de un compuesto tóxico para disminuir el crecimiento (longitud radical) en un 50 % en relación con el testigo (Dutka, 1989).

El objetivo fue detectar el efecto de los residuos de agroquímicos en suelo y rastrojo de un cultivo de soja, mediante bioensayos de elongación de la raíz de especies sensibles, en dos campañas consecutivas.

El trabajo se realizó en las campañas 2012/ y 2013/14. En la primera campaña se sembró soja sobre rastrojo de maíz y en la segunda sobre rastrojo de soja. Las aplicaciones de glifosato se realizaron con equipo pulverizador terrestre y un volumen de 100 L.ha<sup>-1</sup>.

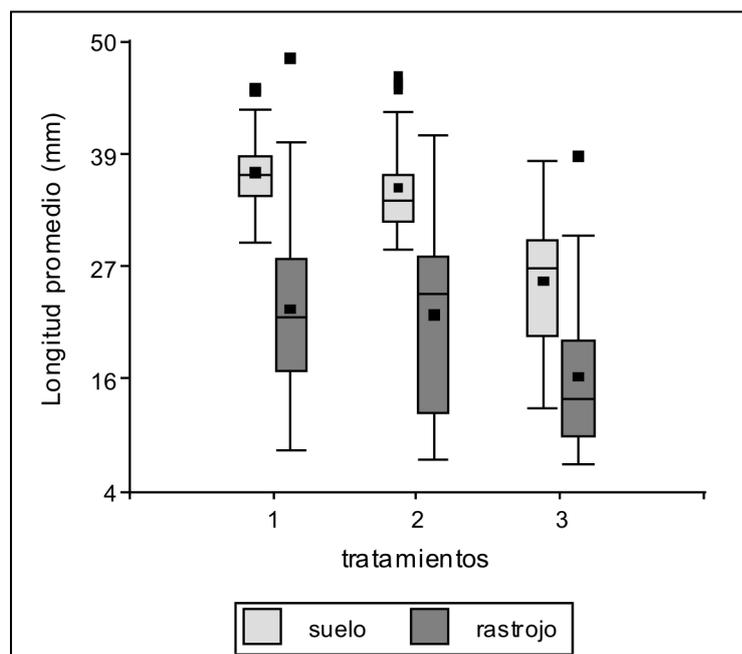
Se aplicó el modelo de análisis de varianza: Parcelas Divididas en el tiempo, con diseño en bloques al azar; siendo los tratamientos la parcela principal y las condiciones suelo y rastrojo la subparcela (Cochran y Cox, 1992; Di Rienzo, *et al.*, 2014). Cada tratamiento consistió en una parcela de 10 x 10 m. Los tratamientos fueron: testigo (T1); glifosato en barbecho (T2); glifosato en barbecho y en postemergencia (T3). En cada bloque se tomaron muestras de suelo, profundidad de 3 cm y de rastrojo sobre una superficie de 0,50 m<sup>2</sup>. Las muestras se colocaron en heladera a 4 °C, hasta el momento de inicio de los ensayos.

Las aplicaciones de glifosato y cipermetrina para cada campaña, se indican en la Tabla 2. Los muestreos tanto de suelo como de rastrojo se iniciaron a 1 día después de cada aplicación (dda), a los 2, 4, 7, 14 y 30 dda, en las parcelas tratadas y en las testigos.

En Laboratorio, los bioensayos se realizaron siguiendo el protocolo para lechuga mantecosa (*Lactuca sativa* L. var. mantecosa) y rúcula (*Eruca sativa* Mill.), adaptado por Lallana *et al.* (2009) y de acuerdo a las normas ISTA (2003) para tomate. Todas las semillas utilizadas tenían un poder germinativo entre 80 y 85 %, razón por la cual se decidió utilizar semillas pre-germinadas en cámara de crecimiento a 23° ±1°C, hasta obtener una radícula no mayor a 1 mm. Se realizaron ensayos preliminares para acotar las concentraciones de glifosato o de cipermetrina según correspondiere a fin de determinar la concentración efectiva 50 (CE 50) para cada producto utilizado; es decir la concentración que reducía al 50 % el crecimiento radical de la lechuga (rúcula y/o tomate), a fin de usarlo como control positivo en los ensayos con suelo y rastrojo.

Los bioensayos para detección de glifosato se hicieron siempre con lechuga mantecosa. En cambio los bioensayos para detección de cipermetrina en la primera campaña se hicieron con rúcula y en la segunda con tomate, dado que en ensayos previos se observó que la lechuga no detectaba la presencia de cipermetrina. Se colocaba en caja de petri, parte de la muestra de suelo o rastrojo (no más de la mitad de la profundidad de la base de la caja) según correspondiere, se humedecía con agua destilada y se sembraban en cada una 20 semillas pregerminadas. Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones. Posteriormente todas las cajas se llevaron a cámara de crecimiento (23 °C ± 1°C y un régimen de 16 h de luz) hasta totalizar 96, 72 y 144 horas para lechuga, rúcula y tomate, respectivamente. Luego se sacaban las plántulas de las cajas y se medía la longitud radical de cada una de las semillas con calibre digital.

Los resultados de los bioensayos considerando las dos campañas de soja y abarcando todas las fechas de muestreo, indicaron interacciones entre la parcela y la subparcela. El modelo de análisis de varianza: Parcelas Divididas en el tiempo aplicado a un nivel de significación p<0,05 mostró que los tratamientos se comportan diferente en condiciones de suelo y rastrojo y la interacción entre los tratamientos y la condición suelo rastrojo resultó estadísticamente significativa (p-valor 0,0324). En todos los tratamientos se registraron menores crecimientos radicales en el rastrojo que en el suelo (Figura 7).



**FIGURA 7.** Longitud radical (mm) de lechuga sobre suelo y rastrojo en ambas campañas de soja, en los tratamientos testigo (1); tratado con una aplicación (2) y tratado con dos aplicaciones (3) de glifosato.

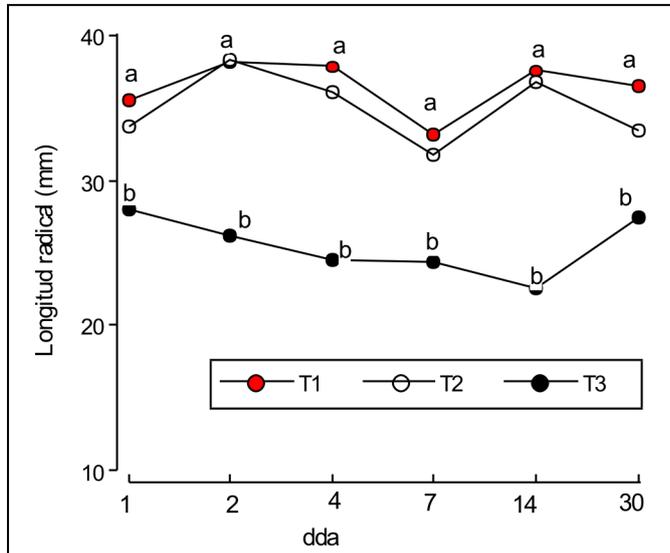
El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las parcelas tratadas con dos aplicaciones de glifosato (T3) respecto al testigo, tanto en suelo como en rastrojo (Tabla 6).

**TABLA 6.** Longitud radical de lechuga (mm), promedio de dos campañas de soja, en suelo (condición 1) y rastrojo (condición 2) en los tratamientos 1 (Testigo), 2 (tratado con una aplicación de glifosato), 3 (tratado con dos aplicaciones de glifosato). *Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).*

Tratamiento	Condición	Medias	D.E	
1	1	35,62	3,94	A
2	1	34,94	9,47	A
3	1	25,55	6,87	B
1	2	24,85	6,89	B
2	2	21,97	4,50	B
3	2	15,63	7,51	C

Las parcelas tratadas con dos aplicaciones de glifosato mostraron una reducción en el crecimiento radical respecto al testigo del 28 % en la condición suelo y del 37 % en rastrojo (Tabla 6). En las dos campañas de soja el efecto de residualidad en el rastrojo del cultivo tratado con dos aplicaciones de glifosato, significó una reducción del crecimiento radical respecto al testigo del de 44 % a los 2 dda y del 49 % a los 4 dda y el efecto también se observó a los 14 dda con 38 % de disminución. Los valores de residualidad registrados se hallaron muy próximos a los límites de toxicidad, hasta los 4 dda. A los 30 dda no se observó efecto residual luego de las 2 aplicaciones de glifosato sobre el rastrojo. En la

condición suelo en ambas campañas de soja el crecimiento radical de las plantas de lechuga luego de la primera aplicación de glifosato (T2) fue similar al testigo (Figura 8). Esta situación estaría indicando un bajo efecto residual en el suelo por una sola aplicación de glifosato en soja.



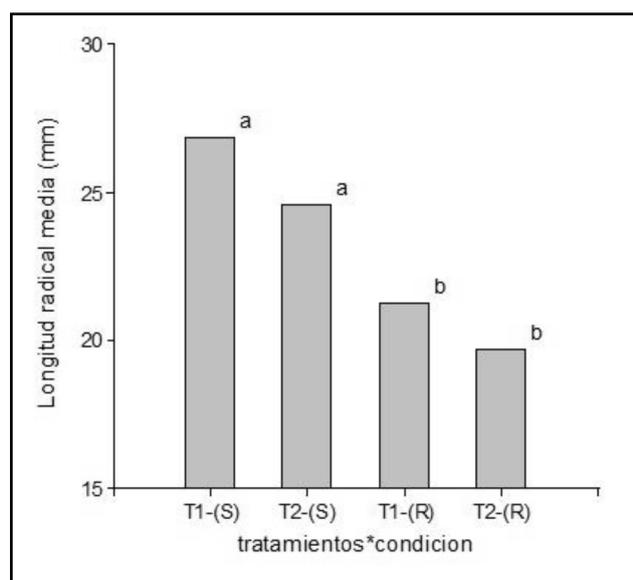
**FIGURA 8.** Crecimiento radical de lechuga sobre suelo en las dos campañas de soja, según los días transcurridos desde la aplicación del glifosato. T1 (Testigo), T2 (una aplicación de glifosato), T3 (dos aplicaciones de glifosato). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

La situación cambió con dos aplicaciones de glifosato (T3). La trayectoria de esta línea se separa del testigo en todas las fechas de muestreo. La mayor reducción del crecimiento radical se observó a los 14 dda donde el tratado experimentó una reducción del 39,8 % respecto al testigo.

De acuerdo a los resultados obtenidos tanto en el suelo como en el rastreo, el efecto de toxicidad se observó hasta los 14 dda y a los 30 dda, no fue evidente. Si bien los síntomas de toxicidad desaparecieron en los bioensayos, pueden quedar igualmente residuos del herbicida en uno y otro componente del sistema.

### Bioensayos en suelo y rastreo con cipermetrina

Los bioensayos con rúcula (campaña de soja (2012-2013) mostraron un menor crecimiento radical en el rastreo que en suelo. El análisis en forma separada de ambas condiciones suelo y rastreo, mostró que en el suelo tratado con cipermetrina, el crecimiento radical de rúcula (T2) fue menor que en el testigo (T1). Sin embargo no hubo efecto de residualidad ya que la reducción en el crecimiento radical fue de 8,4 % en T2, sin diferencias significativas entre las parcelas tratadas y testigo. Situación similar se observó en el rastreo, sin diferencias estadísticamente significativas entre rastreo testigo y rastreo tratado donde la reducción en el crecimiento radical fue de 7,5 % (Figura 9). La aplicación de cipermetrina sobre el cultivo de soja en la campaña 2012/2013, no manifestó toxicidad en suelo ni en los rastreos.



**FIGURA 9.** Crecimiento radical de rúcula sobre suelo testigo T1(S) y tratado T2 (S) y sobre rastrojo testigo T1 (R) y tratado T2 (R). Campaña de soja 2012/2013.

### Bioensayo con tomate

En la campaña 2013/2014 en el suelo no se observó diferencia entre parcelas tratadas y testigo (Tabla 7)

**TABLA 7.** Longitud radical media (mm) de plántulas de tomate en la condición suelo (1) y rastrojo (2) en los tratamientos testigo (1) y tratado con cipermetrina (2).

Tratamientos	Condición	Medias	D.E.	
2	1	46,48	9,55	a
1	1	43,36	8,85	a
1	2	40,23	13,80	a
2	2	34,21	10,29	b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

En rastrojo, si bien se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las parcelas tratadas y las parcelas testigo, la reducción en el crecimiento radical fue de un 15 %, marcando con ello leves efectos fitotóxicos.

### Estudio de la oligoquetofauna en Campo y en Laboratorio

Las lombrices de tierra (Annelida: Lumbricina) forman parte de la macrofauna del suelo y son las principales representantes del gremio funcional "ingenieros del ecosistema" (Lavelle, 1997; Jiménez *et al.*, 2001a) y por su alta sensibilidad a los cambios en el entorno edáfico son eficaces indicadores del grado de perturbación del ambiente suelo (Edwards & Bohlen, 1996; Domínguez *et al.*, 2009). A través de sus actividades de excavación y mezcla de los sustratos orgánico y mineral, las lombrices producen estructuras físicas que facilitan la disponibilidad y acceso de los recursos para otros organismos; regulan la

actividad microbiana, intervienen en la degradación de la materia orgánica, aportan al suelo sus excrementos y exudados que repercuten en la estructura y fertilidad del suelo (Lavelle *et al.*, 1994; Kladvik, 2001; Bedano *et al.*, 2004; Coleman *et al.*, 2004) sumado a su alta sensibilidad para responder a los cambios en el entorno edáfico.

Los objetivos planteados fueron: a) determinar la oligoquetofauna presente en un suelo con uso agrícola bajo el sistema soja: rastrojo-suelo; b) estudiar la toxicidad de residuos de plaguicidas en suelo y rastrojos de soja en lombrices de tierra.

### Densidad y riqueza de la oligoquetofauna

Para determinar la densidad y riqueza de la oligoquetofauna se realizaron muestreos en otoño y primavera de 2013 en las zonas Alta, Media y Baja según la pendiente. Los tratamientos de aplicación fueron: Glifosato/barbecho (**G/B**); Glifosato/barbecho, Glifosato/postemergencia (**G/B, G/P**); Glifosato/barbecho, Glifosato/postemergencia-Cipermetrina (**G/B, G/P-C**) en las tres zonas. Se extrajeron al azar bloques de 30x30x30 cm, según el método estándar TSBF (Andersen & Ingram, 1993). Cada bloque se revisó manualmente para la extracción de lombrices adultas, juveniles y ootecas. En el laboratorio de Ecotoxicología del Grupo Medio Ambiente (INTEC-UNL-CONICET) de Santa Fe se realizó la diagnosis siguiendo las claves taxonómicas de Righi (1979) y Mischis (1991). Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y test pos hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ), del programa estadístico SPSS 17. El muestreo se repitió en otoño de 2014 al finalizar los tratamientos de aplicación de plaguicidas con el fin de contrastar estos resultados con los datos obtenidos en 2013.

En el otoño-primavera de 2013, la abundancia fue mayor ( $p < 0,01$ ) en otoño que en primavera, registrándose 306 y 15 individuos, respectivamente y también varió respecto a la pendiente del lugar ( $p < 0,01$ ), en particular en la estación primavera donde la zona Baja mostró el mayor número de individuos, 14 lombrices.

El número de individuos juveniles y adultos en otoño fue de 290 y 16 respectivamente. En tanto que en primavera se cuantificaron sólo 15 juveniles, de tamaño pequeño y varios de ellos en estado de aquiescencia. La aquiescencia está relacionada a factores ambientales de estrés tales como compactación y contenido de humedad del suelo (Edwards & Bohlen, 1996; Jiménez *et al.*, 2001b; Jiménez *et al.*, 2001c; Domínguez *et al.*, 2009). Las especies halladas en ambos muestreos estacionales fueron *Microscolex dubius* y *Aporrectodea rosea*, pertenecientes a las familias Acanthodrilidae y Lumbricidae respectivamente. *M. dubius* registró para otoño 278 juveniles y 16 adultos, y en primavera 6 juveniles; mientras que para *A. rosea* se hallaron en otoño y primavera 12 y 9 juveniles respectivamente. Cuendet (1984) y Momo *et al.* (1993) relacionan la presencia de ejemplares del género *Aporrectodea* con ambientes perturbados por actividad agropecuaria, y a *M. dubius* con suelos ricos y poco perturbados. Asimismo Burela & Cazzaniga (2001) postulan que *A. rosea* y *M. dubius* muestran un nicho ecológico más amplio, adaptándose a condiciones adversas tales como estrés hídrico o baja estabilidad estructural, en tanto que Momo *et al.* (2003) las caracteriza como especies de transición.

En el otoño de 2014, el número de oligoquetos mostró un valor cercano al registrado en otoño 2013, obteniéndose un total de 317 individuos, no hallándose diferencias ( $p = 0,221$ ) entre las zonas Alta, Media y Baja. La abundancia en relación a los tratamientos varió significativamente ( $p = 0,039$ ), destacándose G/b con el mayor valor, 151. Según Mele & Carter (1999), Clemente *et al.* (2003) y Domínguez *et al.* (2009) la siembra directa sobre el sistema suelo, integrando el efecto de la misma tanto en lo que respecta a propiedades fisicoquímicas como a la aplicación de agrotóxicos pueden afectar significativamente las poblaciones de lumbrícidos. La dinámica poblacional también mostró variaciones en los tratamientos, primando el número de juveniles. En G/b y G/b-G/p-C el recuento no varió significativamente ( $p = 0,03$ ) 145 y 87 respectivamente, pero sí en G/b-G/p con un total de 64. Respecto al número de adultos fue parejo (6, 7 y 8 en G/b, G/b-G/p y G/b-G/p-C respectivamente). La riqueza de especies en otoño

2014 fue de 2, *A. rosea* y *M. dubius*, con los muestreos 2013. *A. rosea* presentó una abundancia de 213 individuos y *M. dubius* 104. A diferencia de lo hallado en otoño 2013, en el muestreo de 2014 *M. dubius* (especie epigea-endogea), disminuyó su abundancia registrando 91 juveniles y 13 adultos, mientras que *A. rosea* (especie endogea), incrementó el registro de juveniles respecto a adultos, 205 y 8 respectivamente. Según Fragoso *et al.* (1997) y Brown *et al.* (2004), la predominancia de especies endogeas es interesante por el rol que juegan en los procesos edáficos al ingerir grandes cantidades de partículas orgánicas y minerales, formar luego bioagregados, construir extensas galerías a través de los horizontes del suelo y establecer relaciones mutualistas con la microflora del suelo en sus intestinos acelerando las tasas de mineralización y la disponibilidad de agua y nutrientes.

### **Bioensayo de toxicidad con *Eisenia fetida***

Las lombrices de tierra son organismos muy sensibles ante la exposición o perturbación del medio edáfico y por su amplia capacidad de respuesta son consideradas eficaces bioindicadores, actuando como organismos blanco de la contaminación antropogénica del ambiente suelo.

De acuerdo al cronograma de aplicación de los plaguicidas, el bioensayo constó de 4 tratamientos a saber: Testigo Absoluto (TA); G/B; G/B-G/P; G/B-G/P-G/C y 3 réplicas de acuerdo a la topografía (zona Alta, Media y Baja). El sustrato estuvo compuesto por suelo-rastrajo del sitio en estudio y organismos adultos de *E. fetida* que provinieron del cultivo propio del bioterio del Grupo Medio Ambiente. Esta especie está estandarizada debido a su amplia distribución mundial, fácil manejo, cultivo y mantenimiento en laboratorio (OECD 1999). Al momento de la aplicación de Glifosato/Barbecho, en el predio experimental se colocaron *in situ* 3 cajones de 50x30x25cm conteniendo suelo-rastrajo del sitio y asegurando que reciban el mismo asperjado que el lote, más un cajón conteniendo suelo del sitio de referencia o testigo absoluto (TA) que no recibió asperjado del plaguicida. Inmediatamente los 4 cajones fueron llevados a laboratorio y en cada uno se colocó 30 lombrices adultas siendo mantenidos en condiciones de temperatura y humedad requeridas por la especie (OECD, 1999). Semanalmente se alimentó con estiércol de vaca seco y finamente molido. Dos días antes de la aplicación de los tratamientos subsiguientes G/B, G/P y G/B, G/P, G-C, se revisó cada cajón para registrar la biomasa en peso vivo y el número de ootecas y juveniles. El bioensayo finalizó al momento de la cosecha en el predio de estudio. Los datos obtenidos se analizaron mediante ANOVA ( $p \leq 0,05$ ).

La variación en el peso de las lombrices fue mínima para los tratamientos G/B; G/P y G/B-G/P-G-C siendo de 4,5% y 5,6% respectivamente. Por el contrario al momento de la cosecha la mayor diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) acusó un descenso de 25,9% respecto al TA. Respecto a la abundancia de adultos, el número de individuos varió pero sólo fue significativo ( $p \leq 0,05$ ) en la tercera aplicación presentando el mayor valor (107 individuos) el TA respecto del tratamiento G/B-G/P-G/C (74 individuos). La cuantificación de ootecas en la última aplicación y cosecha mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) siendo 25 y 59,5% menor en ambos tratamientos respecto al TA. En tanto que el número de crías registradas también varió con los tratamientos de manera significativa respecto al TA; en la primera aplicación es donde se cuantificó el mayor número (26 individuos en G/B-G/P) de los organismos expuestos. La biomasa de los individuos inmaduros solo difirió significativamente en la segunda aplicación (G/B-G/P) y en la cosecha. Se destaca que en todos los tratamientos fue notoria la disminución de la movilidad de las lombrices, hecho atribuible a la neurotoxicidad de los piretroides en general (de Sousa & de Andréa, 2011), y que se manifestó en la menor cantidad de galerías excavadas y una mayor compactación del sustrato. Verrel & Van Buskirk (2004) informan de resultados semejantes cuando exponen a *E. fetida* a concentraciones de aplicación recomendadas para un formulado a base de glifosato conteniendo 5% del principio activo (como sal de isopropilamina). Estos autores registraron mínima mortalidad (1,42% y 3,57% a 24 y 48 horas de exposición respectivamente) y actividad motriz seriamente afectada. La disminución de la movilidad afectaría la capacidad de bioturbación (mezclado)

de la matriz edáfica, función primaria de las lombrices que cumplen excavando túneles y galerías junto a la ingesta de distintas proporciones de materia orgánica e inorgánica (Meysman *et al.*, 2006). Con respecto a la baja tasa de eclosión de los capullos registrada en el bioensayo, Casabé *et al.* (2007), no obtuvieron diferencias en la producción de ootecas, pero sí en la viabilidad de las mismas. En consecuencia el número de ootecas eclosionadas estuvo significativamente reducida (~40%) en los tratamientos expuestos al glifosato a dosis recomendadas de aplicación y 28 días de exposición. En el trabajo realizado, se suma también el retardo en el crecimiento y maduración de los juveniles eclosionados que puede deberse también tanto a las prácticas agrícolas como a la utilización de agrotóxicos (Domínguez *et al.*, 2009; Muthukaruppan *et al.*, 2005; Cox, 2004), entre ellos el glifosato ampliamente utilizado en los sitios estudiados.

Respecto a los atributos biológicos de la oligoquetofauna se concluye que:

- La comunidad de lombrices de tierra presentó una riqueza baja predominando los ejemplares juveniles respecto a adultos.
- La dinámica poblacional de los organismos resulta de la interacción entre los factores ambientales (precipitaciones, temperaturas), las características edáficas, las prácticas de manejo y la disponibilidad del recurso alimenticio.
- La utilización de los suelos con fines agrícolas, y de forma intensiva, conlleva necesariamente la modificación de sus aspectos físicos, químicos y biológicos. Dicha modificación genera cambios en el ambiente edáfico que lo vuelven menos favorable para el desarrollo de las lombrices de tierra, cuya abundancia, actividad, y madurez se ven seriamente disminuidas.
- Se destaca la necesidad de avanzar en el conocimiento del impacto producido por los sistemas agrícolas implementados en la actualidad sobre la calidad, química y biología de los suelos.

### **Test de Huída. Bioensayo con *Eisenia fetida* (lombriz californiana)**

Las lombrices de suelo, colaboran en el mantenimiento de la estructura y fertilidad del suelo debido a que ingieren materia orgánica que se mezcla con enzimas digestivas generando estructuras muy importantes en la agregación y nutrición del suelo. El glifosato es uno de los herbicidas más utilizados en agricultura en nuestro país. Es una sustancia de baja persistencia y limitada potencialidad de bioacumulación y toxicidad sobre organismos no blanco. No obstante su uso masivo y extendido ha sido motivo de estudio sobre los efectos que puede provocar en la salud humana y el ambiente.

El objetivo del bioensayo fue evaluar el efecto del herbicida Glifosato a dosis crecientes, en *Eisenia fetida* (lombriz californiana).

Se desarrollo el Test de Huida (Ricardo, T. 2010) para determinar la preferencia o rechazo de *Eisenia fetida* (lombriz californiana) a la aplicación del glifosato en el suelo. Se utilizaron ejemplares adultos clitelados de *Eisenia fétida* pertenecientes al lombricario instalado en el laboratorio de suelos de la FCA UNER. Las mismas se expusieron a una serie de 3 concentraciones, las cuales fueron establecidas de acuerdo a las dosis medias propuestas por la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) (2007) "Guía de Productos Fitosanitarios". La aspersion de glifosato C.S. 42,8% y 35,6% de equivalente ácido (1,25 lts de p.c. /100 lts de agua; 2,5 lts p.c./100 lts de agua; 5 lts p.c./100 lts de agua). Teniendo en cuenta el valor promedio de tres bloques de acuerdo a la posición topográfica en la que se extrajo la muestra de suelo (media loma alta, media loma baja y bajo), correspondientes al sitio experimental donde se ubicaron los bloques para los ensayos a campo. Las cajas se dividieron en dos compartimentos por un separador removible, marcando exteriormente la posición donde se realizó el tratamiento. (Loureiro *et al.*, 2005). Luego el separador fue removido y se colocaron diez ejemplares clitelados en la línea de división entre tratamiento y control. Los recipientes se mantuvieron en ambiente estable durante 48 horas. Luego de este tiempo se determinó la preferencia o rechazo, mediante el conteo de individuos de uno u otro lugar. (García, 2004; Loureiro *et al.*, 2005; García *et al.*, 2008).

Cuando se encuentra una distribución del 50% de los ejemplares en el suelo tratado, se considera que no existe preferencia por determinado suelo. Cuando el porcentaje hallado en el suelo tratado es del 20% o menos, se considera que el tratamiento tiene un efecto sobre el comportamiento de los individuos.

La proporción de individuos que responden (huyen) se calcula según la ecuación:

$$A = \frac{N - 2 * T}{N}$$

Donde *N* es el número de individuos por réplica; *T* es el número de individuos en el suelo tratado; *A* es la respuesta neta (valores de *A* negativos indican que hay huida).

De acuerdo a la Tabla 8 no se observó respuesta a la huida ante la aplicación de Glifosato aún en altas concentraciones del herbicida (LSD Fisher  $p > 0,05$ ). Además no se observaron diferencias significativas en ambos compartimentos de acuerdo a la situación topográfica analizada ante la aplicación de diferentes dosis de glifosato (LSD Fisher  $p > 0,05$ ).

**TABLA 8.** Valores de A (promedio) letras diferentes demuestran diferencias significativas (LSD Fisher  $p > 0,05$ )

Bloque	Glifosato 1,25lt*ha <sup>-1</sup>	Glifosato 2,5 lt*ha <sup>-1</sup>	Glifosato 5 lt*ha <sup>-1</sup>
I	0,06 a	0,06 a	0,06 a
II	0,06 a	0 a	-0,06 a
III	0 a	0 a	0,4 a

Luego del ensayo se observó que en ningún caso de mortalidad ni de morbilidad de los individuos fue afectada. No se observó respuesta a la huida ante la aplicación de Glifosato aún en altas concentraciones del herbicida (LSD Fisher  $p > 0,05$ ). Además no se observó diferencias significativas en ambos compartimentos de acuerdo a la situación topográfica analizada (bloque) ante la aplicación de diferentes dosis de glifosato (LSD Fisher  $p > 0,05$ ). Por lo cual se observa que no existe rechazo de *Eisenia fetida* ante la aplicación de Glifosato en suelo.

## Conclusiones

- El glifosato y su principal metabolito AMPA fueron detectados en el suelo del ensayo, en las evaluaciones realizadas en las campañas agrícolas 2012/13 y 2013/14, en un rango de concentraciones que varió de 1 µg/Kg – 189.72 µg/Kg y 18.19 µg/Kg – 572.17 µg/Kg, respectivamente.
- Los resultados obtenidos en la evaluación de residuos de glifosato, presentaron marcada variabilidad en las concentraciones halladas, tanto en las muestras obtenidas a los quince días de la aplicación, como en aquellas donde el tiempo transcurrido entre la aplicación y el muestreo, fue de treinta días.
- La riqueza de individuos por metro cuadrado y la diversidad de las especies integrantes de la mesofauna del suelo, no fueron particularmente afectadas por las aplicaciones de glifosato.
- En la riqueza de individuos por metro cuadrado, se observaron en general valores similares a los encontrados por Sandler, et al (2010), en poblaciones de artrópodos en suelos Argiúdoles típicos de la provincia de Buenos Aires, bajo utilización agrícola.

- Se obtuvieron valores de índice de Shannon muy bajos con respecto a otros ecosistemas naturales, denotando que el trabajo se realizó en un ambiente que ha perdido la diversidad.
- Los estudios con oligoquetos (riqueza y densidad) en el lote experimental a través de muestreos estacionales, determinó que antes de la aplicación de los tratamientos la densidad resultó mayor en otoño respecto del muestreo efectuado en la primavera.
- Luego de la aplicación de los tratamientos, la densidad de oligoquetos terrestres no mostró diferencias significativas entre otoño 2013 y 2014 y las especies halladas fueron las mismas que se determinaron en las zonas sin tratamiento. Se registraron 306 individuos antes del inicio de los tratamientos y 317 después de los mismos.
- El número de oligoquetos hallados fue mayor (139 ind/m<sup>2</sup>, cuando el tratamiento aplicado fue glifosato sólo en el barbecho.
- La dinámica poblacional también mostró variaciones entre los tratamientos, primando los organismos en estadio juvenil.
- Se hallaron dos especies presentes. *Microscolex dubius* y *Aporrectodea rosea*, pertenecientes a las familias Acanthodrilidae y Lumbricidae, respectivamente.
- A diferencia de lo registrado en otoño 2013, en el muestreo de 2014, *M. dubius* disminuyó su abundancia registrando 104 organismos, mientras que *A. rosea* incrementó marcadamente el registro, 213 individuos.
- En los bioensayos de germinación con especies sensibles, todos los tratamientos registraron menores crecimientos radicales en el rastrojo que en el suelo.
- Las parcelas tratadas con dos aplicaciones de glifosato mostraron una reducción en el crecimiento radical respecto al testigo del 28 % en la condición suelo y del 37 % en rastrojo.
- En las dos campañas de soja el efecto fitotóxico por la residualidad en el rastrojo del cultivo tratado con dos aplicaciones de glifosato, significó una reducción del crecimiento radical respecto al testigo del 44 % a los 2 dda, del 49 % a los 4 dda y de 38% a los 14 dda.
- A los 30 dda, no se observó efecto fitotóxico por residualidad del glifosato, en el rastrojo, cuando se evaluó la realización de dos aplicaciones.
- En los ensayos de toxicidad con *Eisenia fetida*, la cuantificación de ootecas en la última aplicación y cosecha fue menor en los tratamientos con respecto al testigo absoluto.
- El número de crías registradas también varió con los tratamientos de manera significativa respecto al testigo.
- Fue notoria la disminución de la movilidad de las lombrices, en todos los tratamientos, manifestándose en la menor cantidad de galerías excavadas y mayor compactación del sustrato.
- Cuando se aplicó el test de huida, no se observó respuesta a la huida ante la aplicación de Glifosato aún en altas concentraciones del herbicida y no se observaron diferencias significativas en ambos compartimentos de acuerdo a la situación topográfica analizada ante la aplicación de diferentes dosis de glifosato.
- En las parcelas tratadas con cipermetrina, no fue detectado el insecticida, sobre el límite de determinación utilizado (46 µg/kg de alfa cipermetrina).
- La riqueza de individuos por metro cuadrado y la diversidad de las especies integrantes de la mesofauna del suelo, no fueron particularmente afectadas por las aplicaciones de cipermetrina.
- La aplicación de cipermetrina sobre el cultivo de soja en la campaña 2012/2013, no manifestó presencia de toxicidad en suelo ni en los rastrojos, en los bioensayos realizados con rúcula y tomate.
- Los residuos cuantificados de glifosato, denotan la presencia del herbicida y de su metabolito en el suelo, como consecuencia de las aplicaciones realizadas y también de la historia agrícola continua, del lote en estudio.

- Con los estudios realizados, se cumplieron los primeros pasos de un abordaje interdisciplinar de relacionados con la capacidad potencial de contaminación de los sistemas agrícolas, por el uso de productos fitosanitarios.
- El estudio realizado brinda una valiosa información en cuanto a las aplicaciones de glifosato en el cultivo de soja realizado en suelos de altos contenidos de arcilla utilizados en agricultura continua. Los valores detectados de Glifosato y AMPA, indican la presencia del herbicida y de su metabolito en todas las parcelas aun en las testigos. Esto indica que los ensayos con Glifosato y los sistemas de aplicación deberían ajustarse a las condiciones del ensayo, aumentando las borduras, la superficie de parcelas y el número de repeticiones. Este último punto, es tan esencial como crítico, por el costo que el procesamiento de cada muestra implica.
- Resulta muy importante la información relevada sobre las diferentes vías de captación y evolución del glifosato en el cultivo de soja glifosato resistente, sobre todo en la detección de efectos en rastros, que pudieron haber incorporado y conservado el glifosato aplicado.
- Los resultados obtenidos, referidos a la presencia de residuos de glifosato y cipermetrina en un suelo agrícola de Entre Ríos y los efectos de su biodisponibilidad en especies vegetales sensibles y en oligoquetos, impactan en el campo de la producción agrícola y posibilitan dar continuidad a través de nuevas líneas de investigación en el tema cuyos resultados posibiliten establecer pautas básicas para el manejo y aplicación de plaguicidas en los sistemas agrícolas actuales. A la vez, aportan información sobre metodologías que pueden ser empleadas para el seguimiento de prácticas agropecuarias orientadas a la sostenibilidad y bajo impacto ambiental.

## Referencias bibliográficas

### Marco teórico y residuos de glifosato en suelo

- ARAUJO, A.; R. MONTEIRO y R. ABARKELI, 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere* 52, 799-804.
- BOZZO, A. 2010. Persistencia del glifosato y efecto de sucesivas aplicaciones en el cultivo de soja en agricultura continúa en siembra directa sobre parámetros biológicos del suelo. Tesis para obtener el grado de Magister en Ciencias Ambientales. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 135 p.
- CÁMARA DE SANIDAD AGROPECUARIA Y FERTILIZANTES. 2007. "Guía de Productos Fitosanitarios". Buenos Aires, Argentina. 13° Edición
- DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ, L., TABLADA M, ROBLEDO C.W. Infostat versión 2015. Grupo Infostat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com>
- FORERO, C.V; RODRÍGUEZ, P.E. E. y CILIA L. Fuentes. 2004. Detección de residuos biodisponibles de glifosato en aguas y suelos: Optimización de una técnica de bioensayo con plantas indicadoras. *Agronomía Colombiana*, 2004. 22 (1): 63-73.
- FORLANI, G.; A. MANGIACALLI; E. NELSEN y C. SUARDI. 1999. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. En: FORERO, C.V. 2004, Detección de residuos biodisponibles de glifosato en aguas y suelos: Optimización de una técnica de bioensayo con plantas indicadoras. *Agronomía Colombiana*, 22 (1): 63-73.
- GÓMEZ ORTIZ, A.M.; BEDMAR, F.; COSTA, J.L. 2015. Persistencia de glifosato en suelos molisoles y ultisoles de Argentina. XXII Congreso de la ALAM – I Congreso de la ASACIM. [www.asacim.com.ar](http://www.asacim.com.ar)
- GUARRANCINO, L.; L. CANDELA y E. SANTOS. 1999. Simulación numérica del transporte del herbicida glifosato en la zona no saturada del suelo. En: FORERO, C.V; Rodríguez, P.E.E. y Cilia L. Fuent-

- es.2004. Detección de residuos biodisponibles de glifosato en aguas y suelos: Optimización de una técnica de bioensayo con plantas indicadoras. *Agronomía Colombiana*, 2004. 22 (1): 63-73.
- INFORME UNL, 2011. UNL – Vinculación. Informe acerca del grado de toxicidad del glifosato. En [http://www.unl.edu.ar/articles/view/informe\\_sobre\\_la\\_toxicidad\\_del\\_glifosato](http://www.unl.edu.ar/articles/view/informe_sobre_la_toxicidad_del_glifosato) revisado 3/10/2015
- MAITRE M.I; LORENZATTI, E; LENARDÓN, A; ENRIQUE, S. 2008. Adsorción-desorción de glifosato en dos suelos argentinos. *Natura neotropicalis* 39 | 1 y 2 | 2008 ISSN 0329-2177
- MARTÍNEZ NIETO, P; BERNAL- CASTILLO, J; AGUDELO-FONSECA, E; y SANDRA BENIER –LÓPEZ 2012. Tolerancia y degradación del glifosato por bacterias aisladas de suelos con aplicaciones frecuentes de roundup sl®. *Revista Pilquen • Sección Agronomía • Año XIV • N° 12*,
- MARTÍNEZ YEPES, P.L; OSORIO, J. 2002. Análisis del procedimiento para la determinación de la DL50 (dosis letal media). *Revista de investigaciones de la Universidad del Quindío Vol 4, N° 12, Septiembre 2002. ISSN 0121-795*.
- MONSANTO 2007. Seguridad del herbicida ROUNDUP READY®, y de su empleo sobre variedades modificadas genéticamente para tolerancia a glifosato. Cuaderno Técnico N° 6. [www.monsanto.es](http://www.monsanto.es)
- PICCOLO, A; CELANO, G.; ARIENZO, M.; MIRABELLA, A. 1994. Adsorption and desorption of glyphosate in some European soils. Tomado de Bozzo de Brum M.A., 2010. Persistencia del glifosato y efecto de sucesivas aplicaciones en el cultivo de soja en agricultura continua en siembra directa sobre parámetros biológicos del suelo. Tesis Magister en Ciencias Ambientales. Montevideo Uruguay.
- RAMPOLDI, A.; HANG, S.; BARRIUSO, E. 2008. Glyphosate mineralization: Effect of temperature and soybean and corn crop residues. *Chilean journal of agricultural research* 68 (1): 13-20. En: BOZZO, A. 2010. Persistencia del glifosato y efecto de sucesivas aplicaciones en el cultivo de soja en agricultura continua en siembra directa sobre parámetros biológicos del suelo. Tesis para obtener el grado de Magister en Ciencias Ambientales. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 135 p
- SOUZA CASADHINO, J. 2009. Acerca modelo agropecuario y la utilización de glifosato. *Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina RAP-AL*. 8p.

### **Caracterización del suelo experimental y fauna Edáfica**

- BAVER, L.D., GARDNER, W.H., GARDNER, W.R. 1973. "Física de Suelos". Ed. Hispanoamericana.
- BERLESE, A. (1905). *Apparecchio per raccogliere presto ed in gran numero piccoli Artropodi*. *Redia*, Vol. 2, pp. 85-90.
- BRAY, R. H. y KURTZ, L. T. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Science*. 59:39-45.
- DECAËNS, T., JIMÉNEZ, J.J., GIOIA, C., MEASEY, G.J. & LAVELLE, P. (2006) The values of soil animals for conservation biology. *European Journal of Soil Biology* 42, S23–S38
- GARCÍA, M. 2004. Effects of pesticides on soil fauna: Development of ecotoxicological test methods for tropical regions. *Ecology and Development Series N° 19*, Zentrum für Entwicklungs-forschung, Universität Bonn: 281 pp.
- GARCIA, M; J RÖMBKE; M TORRES DE BRITO & A SCHEFFCZYK. 2008. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. *Environ. Pollut.* 153(2): 450-456.
- JACKSON, M. L. (1976). Determinación de los cationes metálicos canjeables de los suelos. p. 123-189. En: *Análisis químico de suelos*. Ediciones Omega S. A., Barcelona, España. 662 pp.
- KANDELER E., TSCHERKO D., SPIEGEL H. (1999): Long-term monitoring of microbial biomass, N mineralisation and enzyme activities of a Chernozem under different tillage management. *Biol. Fertil. Soils*, 28: 343–351

- LOUREIRO, S; AMV SOARES & AJA NOGUEIRA. 2005. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environmental Pollution* 138: 121-131.
- MICHELENA, R; IRURTIA, C; VAVRUSKA, F; MON, R.; PITTALUGA, A. 1989. Degradación de suelos del Norte de la Región Pampeana. Publicación Técnica 6. INTA. Centros Regionales de Buenos Aires Norte, Córdoba, Entre Ríos y Santa Fé. Proyecto de Agricultura Conservacionista.
- MOMO, F. R. & L. B. FALCO. 2003. Meso fauna del suelo. Biología y ecología. Pp.: 51-58. In: A. Albanesi, A. Anriquez, S. Luna, C. Kunst and R. Ledesma (Eds.). *Microbiología agrícola. Un aporte de la investigación argentina*. Editorial de la Universidad Nacional de Santiago del Estero, Santiago del Estero.
- PAGE, A. L., R. H. MILLER and D. R. KEENEY (Ed., 1982): *Methods of soil analysis*; 2. Chemical and microbiological properties, 2. Aufl. 1184 S., American Soc. of Agronomy (Publ.), Madison, Wisconsin, USA, gebunden 36 Dollar.
- PAOLETTI, M.G., M.R. FAVRETTO, B.R. STINNER, EE PURRING TON & J.E. BATER. 1991. Invertebrates as bioindicators of soil use. p. 341 -362 In D.A. Crossley Jr., et al. (eds.). *Modern techniques in soil ecology*. Elsevier, Nueva York, p
- PLA, L. 2006. «Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza». *Interciencia* 31 (8). ISSN 0378-1844. Consultado el 27 de febrero de 2014.
- PLAN MAPA DE SUELOS 1998. Carta de Suelos de la República Argentina. Departamento Paraná, Provincia de Entre Ríos. Acuerdo complementario del Convenio INTA- Gob. de ER. INTA EEA Paraná. Serie Relevamiento Recursos Naturales N° 17. 114 p.
- RICARDO, T; MAITRE, M; RODRIGUEZ, A. (2010) Efectos subletales de la lambda-cialotrina sobre Eisenia fetida (Annelida, Oligochaeta, Lumbricidae). *Cienc. Suelo*. vol.28, n.1. ISSN 1850-2067.
- SANDLER, ROSANA V; LILIANA B. FALCO; CESAR DI CIOCCO; ROMINA DE LUCA & CARLOS E. COVIELLA. (2010) Eficiencia del embudo Berlese-Tullgren para extracción de artrópodos edáficos en suelos argiudoles típicos de la provincia de Buenos Aires. *Cienc. suelo* vol.28 no.1 Ciudad Autónoma de Buenos Aires ene./jul. 2010 ISSN 1850-2067
- TULLGREN, A. (1918). Ein sehr einfacher Ausleseapparat für terricole Tierfaunen. *Zeitschrift für angewandte Entomologie* Vol. 4, pp.149-150
- VEDDER B; KAMPICHLER C; BACHMANN G; BRUCHNER A; KANDELER E. 1996. Impact of faunal complexity on microbial biomass and N turnover in field mesocosms from a spruce forest soil. *Biol Fertil Soils* 22:22-30.

### Bioensayos de germinación

- COCHRAN, W.; COX, G. (1992). *Experimental Designs*. Second Edition, John Wiley & Sons Inc. 640 p.
- DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M, ROBLEDO C.W. Infostat versión 2014. Grupo Infostat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- DOUBLET, J.; BARRIUSO, E. (2009). Delayed degradation in soil of foliar herbicides glyphosate and sulcotrione previously absorbed by plants: Consequences on herbicide fate and risk assessment. *Chemosphere* 77(4):582-589.
- DUTKA, B.J. (1989). In: *Methods for microbiological and toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments*. Burlington: Canada, National Water Research Institute (NWRI).
- FORERO, C.V.; RODRÍGUEZ, E.E.P.; FUENTES C.L. (2004). Detección de residuos biodisponibles de glifosato en aguas y suelos: Optimización de una técnica de bioensayo con plantas indicadoras. *Agronomía Colombiana*, 22 (1): 63-73.
- FOTI, M.N.; LALLANA, V.H. (2005). Bioensayo de germinación con semillas de *Eruca sativa* Mill. para la detección de salinidad y presencia de herbicida en agua. *Revista FABICIB* (9): 9-16.

- IANNACONE, J.; ALVARINO, L.; CABALLERO, C.; SÁNCHEZ, J. (2000). Cuatro ensayos ecotoxicológicos para evaluar lindano y clorpirifos. *Gayana (Concepc.)* [online], vol.64 (2):139-146. Consulta: 30-08-2011. doi: 10.4067/S0717-6538200000200003.
- IDRC/IMTA (Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Canadá). (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de agua. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Gabriela Castillo, 202 p.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). (2003). International Rules for Seed Testing. Rules 2003. Zurich Switzerland. 364 p.
- LALLANA, V.H.; ELIZALDE, J.H.; BILLARD, C.; LALLANA, M. DEL C.; MUZZACHIODI, N.; CARÑEL, G.; BOSCHETTI, N.G.; RIVAROLA, S.; SABATTINI, R.A.; MEUCCI, G.; GONZÁLEZ, R.; FERREIRA, T.; SERRANO, P. (2009). Caracterización ecológico-ambiental de represas para riego en Entre Ríos. Coordinador: V.H. Lallana. Ed. *EDUNER*, Concepción del Uruguay, Argentina. 304 p. ISBN 978-950-698-191-4.
- MARTIN, M.L. (2011). Impacto del uso de plaguicidas asociados al cultivo de soja transgénica sobre especies no blanco de la flora riparia y acuática. Informe SEDICI. Tesis doctoral. 194 p.
- WAUCHOPE, R.D.; BUTTLER, T.M.; HORNSBY, A.G. AUGUSTIJN BECKERS, P.W.M.; BURT, J.P. (1992). Pesticide properties database for environmental decision making. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 123:1-157.
- WANG, W. (1991). Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water, Air and Soil Pollution* 59: 381-400.

### **Estudio de Oligoquetofauna y toxicidad con *Eisenia fetida***

- ANDERSON J. M. & INGRAM J. S. I. 1993. Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods, 2<sup>nd</sup> Ed. CAB International. Wallingford, UK.
- BEDANO J. C.; CANTÚ M. & DOUCET M. 2004. La influencia de distintos sistemas productivos en la densidad de ácaros edáficos en agroecosistemas de Córdoba, Argentina. *Ciencia del Suelo* 22 (2): 119-106.
- BROWN G. G.; MORENO A. G.; BAROIS I.; FRAGOSO C.; ROJAS P.; HERNÁNDEZ B. & PATRÓN J. C. 2004. Soil macrofauna in SE Mexican pastures and the effect of conversión from native to introduced pastures. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 103: 313-327.
- BURELA S. & CAZZANIGA N. J. 2001. Earthworms from suthern Buenos Aires province, Argentina. *Megadrilogica*, Vol. 8 N° 9, 49-52.
- CASABÉ N.; PIOLA L.; FUCHS J.; ONETO M. L.; PAMPARATO L.; BASACK S.; GIMÉNEZ R.; MASSARO R.; PAPA J. C. & KESTEN E. 2007. Ecotoxicological Assessment of the Effects of Glyphosate and Chlorpyrifos in an Argentine Soya Field. *Journal of Soils and Sediments* 7(4):232-239.
- CLEMENTE N. L.; LÓPEZ A. N.; VINCINI A. M.; CASTILLO H. A.; CARMONA D. M.; MANETTI P. L. & SAN MARTINO S. 2003. Abundancia de megadrilos (Annelida: Oligochaeta) en diferentes sistemas de producción. *Ciencia del Suelo* 21 (2): 35-43.
- COLEMAN D. C.; CROSSLEY D. A. & HENDRIX P. F. 2004. Fundamentals of Soil Ecology. 2<sup>nd</sup> Elsevier Academic Press. USA
- COX C. 2004. Herbicide Factsheet: Glyphosate. *Journal of Pesticide Reform* 24(4):10-15. Disponible en <http://www.pesticide.org/get-the-facts/pesticide-factsheets/factsheets/glyphosate>
- CUENDET G. 1984. A comparative study of the earthworm population of four different woodland types in Wytham Woods, Oxford. *Pedobiologia* 26: 421-439
- DE SOUSA P. A. & DE ANDRÉA M. M. 2011. Earthworm (*Eisenia andreii*) Avoidance of Soils Treated with Cypermethrin. *Sensors* 11:11056-11063 DOI:10.3390/s111211056
- DOMINGUEZ A.; BEDANO J. C. & BECKER A. R. 2009. Cambios en la comunidad de lombrices de tierra (Annelida: Lumbricina) como consecuencia del uso de la técnica de siembra directa en el centro-sur de Córdoba, Argentina. *Ci. Suelo (Argentina)* 27 (1): 11-19

- EDWARDS C. A. & BOHLEN P. J. 1996. *Biology and Ecology of Earthworms*. 3<sup>rd</sup>. Chapman & Hall. London UK
- FRAGOSO C.; BROWN G. G.; PATRÓN J. C.; BLANCHART E.; LAVELLE P.; PASHANASI B.; SENAPATI B. & KUMAR T. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of earthworms. *Applied Soil Ecology* 6: 17-35
- KLADIVKO E. J. 2001. Tillage systems and soil ecology *Soil and Tillage Research* 61: 61-76
- JIMÉNEZ J. J.; DECAENS T.; THOMAS R. J. & LAVELLE P. 2001a. CHAPTER 1: Soil Macrofauna: An available but Little-known natural resource. *In: Jiménez, J. J. & Thomas, R. J. (eds.). Nature's plow: soil macroinvertebrate communities in the neotropical savannas of Colombia. Ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia*
- JIMÉNEZ J. J.; MORENO A. G.; LAVELLE P. & DECAENS T. 2001b. Chapter 5: Population dynamics and adaptive strategies of *Martiodrilus carimaguensis* (Oligochaeta: Glossoscolecidae), a native species from the well-drained savannas of Colombia. *In: Jiménez J. J. & Thomas, R. J. (eds.). Nature's plow: soil macroinvertebrate communities in the neotropical savannas of Colombia. Ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia*
- JIMÉNEZ J. J.; BROWN G. G.; DECAENS T.; FEIJOO A. & LAVELLE P. 2001c. Chapter 9: Differences in the timing of diapause and patterns of aestivation in tropical earthworms. *In: Jiménez J. J. & Thomas R. J. (eds.). Nature's plow: soil macroinvertebrate communities in the neotropical savannas of Colombia. Ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia*
- LAVELLE P.; DANGERFIELD C.; FRAGOSO C.; ESCHENBRENNER V.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ D.; PASHANASI B. & BRUSSAARD L. 1994. Chapter 6: The relationship between soil macrofauna and tropical fertility. *In: The Biological management of tropical Soil Fertility. Wooster P. L. & Swift M. J. eds. TSBF. A Wiley-Sayce Publication.*
- LAVELLE P. 1997. Faunal activities and soil processes: adaptive strategies that determine ecosystem function. *Advances in Ecological Research* 27: 93-102
- MELE P. M. & CARTER M. R. 1999. Impact of crop management factors in conservation tillage farming on earthworm density, age structure and species abundance in south-eastern Australia. *Soil and Tillage Research* 50: 1-10
- MEYSMAN F. J. R.; MIDDELBURG J. J.; HEIP C. H. R. 2006. Bioturbation: a fresh look at Darwin's last idea. *Trends in Ecology and Evolution* 21 (12):688-695. doi:10.1016/j.tree.2006.08.002
- MISCHIS C. C. 1991. Las lombrices de tierra (Annelida, Oligochaeta) de la Provincia de Córdoba, Argentina. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias Córdoba* 59 (3 y 4): 187-237
- MOMO F. R.; GIOVANETTI C. M. & MALACALZA L. 1993. Relación entre la abundancia de distintas especies de lombrices de tierra (Annelida, Oligochaeta) y algunos parámetros fisicoquímicos en un suelo típico de la estepa pampeana. *Ecología Austral* 3: 7-14
- MOMO F. R.; FALCO L. B. & CRAIG E. B. 2003. Las lombrices de tierra como indicadores del deterioro del suelo. *Revista de Ciencia y Tecnología* 8: 55-63
- MUTHUKARUPPAN G.; JANARDHANAN S. & VIJAYALAKSHMI G. S. 2005. Sublethal Toxicity of the Herbicide Butachlor on the Earthworm *Perionyx sansibaricus* and its Histological Changes. *Journal of Soils and Sediments* 5(2):82-86
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). 1999. Guideline 207 (4) "Earthworm, Acute Toxicity Tests". ECT Oekotoxicologie GmbH.p 50. Hochheim/Main, Germany
- RIGHI G. 1979. Introducción al estudio de las lombrices del suelo (Oligoquetos Megadrilos) de la provincia de Santa Fe (Argentina). *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral* N° 10: 89-155
- SHANNON CE, WEAVER W. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press. Urbana, IL, EEUU.144 pp.
- VERREL P. & VAN BUSKIRK E. 2004. As the worm turns: *Eisenia fetida* avoids soil contaminated by a glyphosate-based herbicide. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72, 219-224.

**PID 2147 Denominación del Proyecto**

Bioensayos para la detección de plaguicidas como agentes contaminantes en los componentes del sistema soja: suelo-rastrojo. Un enfoque interdisciplinario

**Director del proyecto**

ANGLADA, Marta Mónica

**Co-Director/es**

CERANA, Jorge Alberto

**Unidad Ejecutora**

Universidad Nacional de Entre Ríos

**Dependencia**

Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNER)

**Instituciones intervinientes públicas o privadas**

Convenio de colaboración técnica entre la UNER y la UNL

**Contacto**

[manglada@fca.uner.edu.ar](mailto:manglada@fca.uner.edu.ar)

**Integrantes del Proyecto**

ELIZALDE, José Hernán; FAVANT, José Luis; FOTI, María Natalia; HERNANDEZ, Juan Pablo; LALLANA, María del Carmen; MAIDANA, Alberto; HERNANDEZ, Juan Pablo; MAIER, Walter Adrian; RIVAROLA, Silvia Evangelina; RONCAGLIA, Juan Manuel; SATTLER, Aníbal Javier; TOLEDO, Carlos Enrique Roque

**Integrantes externas**

RODRÍGUEZ, Alba Rut (FHUC - Universidad Nacional del Litoral, 3000 Santa Fe).  
MASIN, Carolina –INTEC (UNL - CONICET), 3000 Santa Fe, Argentina–

**Fechas de iniciación y finalización efectivas**

11/07/2012 y 11/07/2015

Aprobación del Informe Final por Resolución CS N°327/16 (8-11-2016)

«« VOLVER AL INICIO