

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

EFFECTO DE HERBICIDAS Y SUS MEZCLAS EN EL COMPORTAMIENTO,
CRECIMIENTO Y REPRODUCCIÓN DE *Eisenia foetida*

por

Marcos TORRES MAYOBRE
Sebastián COMAS RUBIO

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.

MONTEVIDEO
URUGUAY
2016

Tesis aprobada por:

Director: -----

Ing. Agr. (Dr. Sc.) Grisel Fernández

Q.F. (Dra.) Verónica Cesio

Ing. Agr. Isabel García

Lic. Ricardo Hladki

Fecha: 27 de diciembre de 2016

Autores: -----

Sebastián Comas

Marcos Torres

AGRADECIMIENTOS

A nuestra tutora Grisel Fernández y nuestros co-tutores Isabel García y Ricardo Hladki, por su apoyo y dedicación constante durante todo el proceso de elaboración de esta tesis.

A Sully Toledo, por la colaboración y disposición en la presentación de la tesis.

A Terra Nova, por brindar los herbicidas utilizados.

A los integrantes del grupo de análisis de cinta, imanes y trazas (GACT) y en especial a la Q. F. Natalie Besil.

A nuestras familias y todos aquellos que hicieron que este trabajo sea posible.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
2.1 IMPACTO DE LOS HERBICIDAS EN EL SUELO.....	2
2.2 IMPACTOS DE MEZCLAS DE HERBICIDAS.....	4
2.3 LA LOMBRIZ COMO BIOINDICADOR DE IMPACTOS EN SUELO.....	5
2.3.1 <u>Fundamentación y ejemplos</u>	5
2.3.2 <u>Metodologías propuestas para los estudios de mortalidad, crecimiento, reproducción y evasión</u>	7
2.4 HERBICIDAS UTILIZADOS, PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS.....	10
2.4.1 <u>Flumioxazin</u>	10
2.4.2 <u>Sulfentrazone</u>	11
2.4.3 <u>Fomesafen</u>	12
2.4.4 <u>Metribuzin</u>	13
2.4.5 <u>Metolaclor</u>	14
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	16
3.1 UBICACIÓN.....	16
3.2 EXPERIMENTO 1.....	16
3.2.1 <u>Tratamientos</u>	16
3.2.2 <u>Metodología de instalación</u>	17
3.2.3 <u>Determinaciones</u>	20
3.3 EXPERIMENTO 2.....	21
3.3.1 <u>Tratamientos</u>	21

3.3.2 <u>Metodología de instalación</u>	22
3.3.3 <u>Determinaciones</u>	22
3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN	22
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	24
4.1 EXPERIMENTO 1.....	24
4.1.1 <u>Efectos en el crecimiento de <i>E. foetida</i></u>	24
4.1.2 <u>Efectos en la reproducción de <i>E. foetida</i></u>	29
4.2 EXPERIMENTO 2	34
5. <u>CONCLUSIONES</u>	37
6. <u>RESUMEN</u>	38
7. <u>SUMMARY</u>	40
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	42
9. <u>ANEXOS</u>	48

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Detalle de los tratamientos ensayados	17
2. Ganancia en peso (g) de las 10 lombrices estimada a los 28 días en los 16 tratamientos ensayados y la correspondiente variación en relación al testigo negativo (T15) en porcentaje	25
3. Tasa de crecimiento relativo (TCR) estimada a los 28 días en los 16 tratamientos ensayados y la correspondiente variación en relación al testigo negativo (T15) en porcentaje	26
4. Valores observados y esperados en mezclas en ganancia de peso calculados según Colby y expresados como reducción en la ganancia de peso(%)	28
5. Número de lombrices estimado a los 56 días en los 16 tratamientos ensayados y la correspondiente variación en relación al testigo negativo (T15) y al tratamiento de flumioxazin a dosis 10 (T6) en porcentaje	30
6. No. de cocones eclosionados, No. de cocones totales, No. de lombrices en relación a los cocones eclosionados y No. de lombrices en relación a los cocones totales estimados a los 56 días en los 16 tratamientos.....	32
7. No. de lombrices en los compartimentos de suelo tratado y suelo sin tratar con su respectivo valor de evasión en cada tratamiento.....	35
 Figura No.	
1. Evasión (%) estimada a las 48 horas en los 6 tratamientos ensayados	34

1. INTRODUCCIÓN

El comienzo del siglo XXI en Uruguay se vio marcado por un gran aumento en el área de siembra de cultivos agrícolas. Este proceso de agriculturización se asoció con un muy importante incremento del uso de herbicidas.

La decisión relativa al uso de herbicidas en agricultura en el mundo, y también en el país, se rige principalmente por la densidad y especie de malezas que se encuentre interfiriendo en el rendimiento de los cultivos y otros aspectos económicos vinculados al tratamiento, dejando por fuera la evaluación de los impactos que se puedan producir en el ambiente, en el corto, mediano y/o largo plazo en la mayoría de los casos.

En los últimos años se han encontrado evidencias que indican que el uso de herbicidas puede estar asociado a impactos en la calidad del suelo y los alimentos. Estos son importantes factores a tener en cuenta para el futuro de la producción agrícola, además de los posibles daños a la salud animal y humana (Zabaloy et al., 2011).

Por lo recientemente expuesto también se constata un importante aumento en el interés en los estudios sobre estos temas. En lo que respecta a estudios relativos a impactos a nivel de la calidad del suelo, numerosos autores (Piola 2011, Palafox et al. 2012) sostienen que algunas especies de lombrices resultan bioindicadores de utilidad cuando se pretende estudiar el efecto en la calidad del suelo. Sin embargo, según Pelosi y Hedde (2014) en su extensa revisión, muestran que el total de artículos publicados, sobre estudios relacionados a efectos de herbicidas que estuvieran permitidos en Europa, sobre reproducción y crecimiento era solo de 8 hasta la fecha de su revisión.

Con la intención de aportar al conocimiento de estos temas, se planteó el siguiente estudio que tuvo por objetivo estudiar el efecto de 5 herbicidas y 4 mezclas sobre biomarcadores asociados al comportamiento de evasión, al crecimiento y a la reproducción en la especie bioindicadora *Eisenia foetida*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPACTOS DE LOS HERBICIDAS

Los herbicidas son sustancias utilizadas para controlar malezas a los efectos de disminuir sus efectos de interferencia en cultivos. Aparecen en la historia como solución a la problemática del control de malezas, donde cantidades relativamente pequeñas de producto son capaces de eliminar las plantas indeseables de forma selectiva (Papa, s.f.).

Se trata de sustancias químicas que en su forma pura tienen muy poca utilidad para los usuarios. Por lo tanto, necesitan ser acondicionadas para ser usadas en la agricultura, es decir, necesitan ser formulados. La formulación es la forma en la cual el plaguicida está disponible para la venta y el uso (Salazar, 2010).

La formulación se hace con la finalidad de mejorar o incrementar las propiedades de un herbicida en cuanto a su aplicación, manejo, efectividad, almacenamiento y seguridad.

Los componentes básicos de una formulación son el ingrediente activo que es parte del producto comercial responsable por la acción y efecto del herbicida; el material transportador, que en el producto comercial es el vehículo, ya sea líquido o sólido en donde se encuentra disuelto o distribuido el ingrediente activo y los aditivos, que son sustancias que aumentan la acción o modifican favorablemente la acción del ingrediente activo como la penetración, la absorción y/o la adherencia en el follaje (Salazar, 2010).

Si bien, como se comentara, la razón del uso de los herbicidas es la de controlar especies vegetales malezas, existe abundante información relatando otros numerosos efectos sobre los organismos no-blancos y el ambiente en general.

A modo de ejemplo, Procopio et al. (2014) evaluando la toxicidad de los herbicidas paraquat, imazapyr, ametryne, glyphosate y oxyfluorfen sobre la bacteria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, encontraron marcadas inhibiciones del crecimiento in vitro de la bacteria. En particular, el herbicida glifosato promovió una reducción drástica de la fijación biológica de nitrógeno in vitro de *H. seropedicae*.

Wilkison y Lucas, citados por Procopio et al. (2004) observaron que la formulación comercial de Paraquat aumentaba su efecto tóxico en hongos, comparado con el ingrediente activo puro.

Viegas et al. (2012) encontraron que la degradación de atrazina por efecto de la bioaumentación de *Pseudomonas*, en suelos contaminados no tenía lugar en presencia de S-metolachlor. Aparentemente este herbicida limitó la mineralización de la atrazina por parte de las *Pseudomonas sp.* (cepa ADP).

También Filimon et al. (2015) evaluando bajo condiciones de laboratorio el efecto de herbicidas sulfonilureas en la actividad de enzimas del suelo y en los principales grupos de microorganismos envueltos en el ciclo del nitrógeno del suelo (bacterias amonificadoras, nitrificantes y desnitrificantes) comprobaron efectos de los herbicidas. La actividad enzimática sufrió una fuerte inhibición en su actividad tras la aplicación de nicosulfuron y tribenuron metil, determinándose fuertes inhibiciones en los valores de actividad de las enzimas ureasa y deshidrogenasa. Por otra parte, los tres tipos de bacterias indicadoras de la actividad enzimática del suelo estudiados mostraron diferentes respuestas a la acción de los herbicidas, dependiendo de la dosis en que fueron aplicados.

Gigliotti y Allevi (2001), estudiando otras dos sulfonilureas, bensulfuron y cinosulfuron, no encontraron efecto en el número de bacterias y nitrificadores, ni en la respiración del suelo, tanto a tasas normales de aplicación a campo como 100 veces su dosis. Sin embargo se observó un descenso en la actividad nitrificadora, limitado por un período de una semana en el caso del cinosulfuron, para ambas concentraciones, mientras que en el bensulfuron ocurre una marcada disminución y pérdida de actividad nitrificadora, solo en el tratamiento de alta concentración, que se ve atenuada con el paso del tiempo.

En estudios similares Procopio et al. (2003) estudiando el herbicida fomesafen, comprobaron reducciones en el crecimiento de *Bradyrhizobium*, de hasta el 48% y, consecuentemente una disminución en la fijación de nitrógeno. La toxicidad de fomesafen fue atribuida a su mecanismo de acción, actuando como inhibidor de la enzima protoporfirinógeno oxidasa (PPO). Sin embargo, según sostienen los autores no se descarta que el efecto en el crecimiento sea producto de la toxicidad de algún ingrediente de la formulación comercial del producto.

En otro estudio en el que también se investigaran los efectos de fomesafen, realizado por Qingming et al. (2014) los resultados fueron variados. En experimentos de laboratorio examinaron los efectos de diferentes concentraciones en la estructura y la actividad de la comunidad microbiana y, encontraron efectos estimulantes en la actividad de la fosfatasa ácida, la

fosfatasa alcalina y la deshidrogenasa, resultando ésta última la más sensible al fomesafen. Por el contrario, la actividad de la ureasa fue significativamente inhibida luego de los tratamientos con fomesafen en los primeros 30 días, aunque retomó los niveles de actividad a partir de ese período.

En este mismo trabajo, a nivel de la estructura de la comunidad microbiana también se encontraron resultados variados. El recuento en placa indicó que el número de bacterias y actinomicetos aumentó en suelos tratados comparado con el control, mientras que el número de hongos decreció significativamente después de 10 días de tratado el suelo.

Daugrois et al. (2004) evaluaron el efecto de tres herbicidas inhibidores de la PPO en diferentes especies de *Pythium*, extraídas de las raíces del cultivo de caña de azúcar, y microorganismos del suelo, encontrando que aplicaciones de azafenidina en hojas y de sulfentrazone y flumioxazin en suelo, provocaron reducciones significativas en el porcentaje de *Pythium arrhenomanes*. Algunos herbicidas aparecen cambiando los perfiles de especies aisladas de raíces infectadas. El porcentaje de aislados de otras especies incrementó hasta un 67% para suelos con aplicación de flumioxazin y 60% con aplicaciones de sulfentrazone y azafenidina. Las otras especies aisladas fueron *Pythium spinosum*, *Pythium graminicola*, *Pythium irregulare* y *Pythium torulosum*.

2.2 IMPACTOS DE MEZCLAS DE HERBICIDAS

En la práctica, los herbicidas se utilizan en mezclas también con otros principios activos y/o acompañados con otras sustancias que están presentes en la formulación. Con las mezclas pueden producirse interacciones de sinergia, aditividad o antagonismo y aunque es frecuente el estudio de la eficiencia agronómica de mezclas se sabe muy poco del resultado de las posibles interacciones en cuanto a su implicancia ambiental (Tornisielo et al., 2013).

Ke-Bin Li et al. (2008) compararon la degradación de los herbicidas atrazina y bentazone aplicados solos y en mezclas, encontrando que cuando se aplicó en combinación, las tasas de degradación fueron más bajas y la fase estacionaria de los microorganismos incrementó, resultando en una mayor persistencia en el suelo e incrementando el potencial de contaminación del ambiente.

En la misma línea, Tejada (2009) mostró que la mezcla de glifosato y diflufenican reduce la biomasa microbiana del suelo y consecuentemente sus actividades intracelulares (deshidrogenasa) y extracelulares (ureasa, β

glucosidasa, fosfatasa y arilsulfatasa), así como su mayor persistencia en el suelo cuando es aplicado en mezclas comparado con la acción de los herbicidas aplicados individualmente.

La adición de glifosato al fluometuron, incrementó la mineralización de carbono e incrementó la tasa de degradación relativa comparado con el fluometuron aplicado solo. Sin embargo, mayor cantidad de fluometuron permaneció en el medio y menos cantidad de biomasa fúngica (de *Rhizoctonia solani*) fue producida cuando el glifosato fue incluido en el tratamiento (Lancaster et al., 2008).

La aplicación de atrazina mas glifosato estimuló la actividad microbiana de mayor forma a la que la hizo atrazina en su aplicación simple. La mayor mineralización del carbono fue durante los primeros 7 días después de la aplicación, mientras que la mayor mineralización del nitrógeno fue en el período de 14 a 28 días post aplicación. La curva de degradación de atrazina mostró un comportamiento similar y en algunas concentraciones incluso mayor cuando se aplicó en mezcla comparado a cuando se aplicó solo (Haney, 2002).

2.3 LA LOMBRIZ COMO BIOINDICADOR DE IMPACTOS EN SUELO

2.3.1 Fundamentación y ejemplos

Eisenia foetida, es un invertebrado utilizado comúnmente en evaluaciones de ecotoxicología de sustancias y suelos, y su utilización para ensayos es recomendada por la Organización para la Cooperación y el desarrollo Económicos (OECD, por su sigla en inglés) y la Organización Internacional de Normalización (ISO) (ISO 1993, OECD 2004) y es ampliamente utilizada por diversos factores.

Uno es la simplicidad pues, como sostiene Paoletti (1999) la taxonomía de las lombrices es razonablemente sencilla incluso para no expertos. A veces la simple evaluación del número o biomasa puede ser una medida suficientemente útil, ya que presenta alta tasa de reproducción y es sensible.

Por otra parte y muy importante, la lombriz de tierra es el organismo más abundante en biomasa de los organismos terrestres, y juega un rol irremplazable en mantener las funciones ecológicas del suelo. Es por esta razón que las lombrices han sido recomendadas como un indicador biológico importante para evaluar los riesgos ecológicos de las sustancias tóxicas en el ambiente terrestre (Rombke et al., citados por Xu et al., 2010).

Las lombrices juegan un rol importante en la estructura del suelo e incrementando su contenido de nutrientes. Su uso como bioindicador es oportuno por el hecho de que ingieren grandes cantidades de residuos acelerando el proceso de descomposición y generando una capa superficial rica (Yasmin, 2010). Además se ha demostrado que la piel de la lombriz es una fuente de recepción de contaminantes, por lo que su uso en investigación como bioindicadores puede ser de gran ayuda.

Los pesticidas pueden mostrar una toxicidad directa en las lombrices, y producir efectos latentes en su crecimiento y fertilidad. Adicionalmente, lombrices contaminadas pueden representar una forma de contaminación de un alto número de componentes de la cadena alimenticia, gaviotas y otros pájaros (Paoletti, 1999).

Pelosi y Hedde (2014) en una extensa revisión encontraron que solo había ocho trabajos que estudiaran efectos de herbicidas en la reproducción de lombrices, la mayoría de ellos centrados en los resultados producidos por el herbicida glifosato. En estos trabajos los resultados con las dosis recomendadas de uso a campo muestran importante variabilidad general.

Xu et al. (2010) en un experimento comparando metolaclor y su isómero S-metolaclor, mostraron que la tasa de crecimiento de las lombrices en suelos tratados fue más baja que la del control, con resultados significativos para metolaclor y muy significativos para S-metolaclor.

Piola et al. (2013) estudiaron el efecto de dos formulados distintos del herbicida glifosato en lombrices de tierra *Eisenia andrei* y encontraron que se produjo una reducción de peso en concentraciones subletales del herbicida, dependiente de la dosis. Encontraron también que el herbicida con mayor contenido porcentual de equivalente ácido fue el menos tóxico, atribuyendo dicho efecto a las sustancias "inertes" que componen la formulación del herbicida.

Contrariamente a los trabajos mencionados, Farenhorst et al. (2003) en un estudio donde evalúan los residuos de cultivos de soja y maíz y distintas concentraciones de atrazina y metolaclor, sobre el peso de lombrices de la especie *Lombricus terrestris*, a los 21 y 46 días, demuestran que las lombrices no fueron afectadas adversamente por las aplicaciones, a menos que las mismas excedan por seis veces la máxima tasa de aplicación recomendada, siendo más influyente el tipo de residuo de cultivo presente que la dosis de aplicación de los herbicidas mencionados.

Viswanathan (1997) estudió en tres generaciones el efecto del herbicida terbutilazina en la reproducción de *Eisenia andrei* y encontró que el herbicida promovió a partir de la F1, el crecimiento y producción de cocones, atribuyendo las posibles causas a un efecto de estímulo del metabolismo o una selección de fenotipos resistentes a través de los cocones que eclosionaron de la generación anterior.

Alves et al. (2012) en un estudio donde evaluaron reproducción y evasión de lombrices utilizando tres insecticidas (imidacloprid, fipronil y thiametoxam) y dos tratamientos con fungicidas (captan y carboxin + thiram), obtuvieron resultados que mostraron reducción en la reproducción en todos los tratamientos y evasión en la mayoría, menos en el insecticida fipronil, tratamiento para el cual las lombrices mostraron preferencia.

2.3.2 Metodologías propuestas para los estudios de mortalidad, crecimiento, reproducción y evasión

Variados son los métodos que se han desarrollado para medir la ecotoxicidad de sustancias que puedan implicar un impacto sobre la salud y el ambiente.

La prueba de mortalidad es un ensayo que se utiliza para evaluar la toxicidad de pesticidas. Es una prueba aguda que estima la mortalidad a través de la concentración letal media (CL_{50}), la cual representa la concentración del pesticida en el suelo problema que ocasiona la muerte (daño máximo) en el 50 % de las lombrices que han sido expuestas (Palafox et al., 2012). A través de dicha prueba, también se puede establecer las concentraciones a las cuales no hay efecto agudo (NOEC), estimando a través de una regresión los porcentajes esperados de muerte según la concentración (DL_{10} , DL_{20} , DL_x) según se cause una "x" mortalidad en las lombrices.

La mortalidad es un indicador utilizado, pero sin embargo la sobrevivencia es un parámetro menos sensible desde un punto de vista ecotoxicológico, ya que es un test agudo y no ofrece datos sobre los riesgos para lombrices en la mayoría de los casos.

De las distintas evaluaciones propuestas a nivel del crecimiento y reproducción de lombrices para la evaluación de impactos, se han llevado a cabo las siguientes.

La prueba de crecimiento se realiza como primera parte de la prueba de reproducción, especificada en el siguiente párrafo. Luego de 28 días de exposición a los pesticidas, las lombrices son removidas del suelo, contadas y

pesadas luego de haber pasado tres horas sobre papel de filtro húmedo para descargar su contenido intestinal. De esta prueba se pueden calcular las ganancias de peso y las tasas de crecimiento específico y relativo. Cualquier individuo que no sea encontrado en esta etapa, se anota como muerto, ya que se asume que se descompuso durante el período de ensayo.

La prueba de reproducción evalúa el efecto subletal que ejerce la exposición a un suelo contaminado sobre la formación de cápsulas y el número de descendientes de las lombrices (Kapanen e Itavara, citados por Palafox et al., 2012).

Según la OECD (2004) la validación del ensayo es posible si el control negativo tiene las siguientes características:

- Cada repetición, que contiene 10 adultos, debe producir por lo menos 30 juveniles al final del ensayo.

- El coeficiente de variación de reproducción debe ser como máximo 30 %.

- La mortalidad de los adultos en las primeras cuatro semanas debe ser menor al 10 %.

En este método no se tiene en cuenta la degradación de las sustancias durante el período de evaluación, por lo que no se puede asumir que la concentración inicial se mantenga para todos los casos.

Es necesario tener un tratamiento control positivo para estos ensayos, para asegurar que las condiciones de laboratorio son adecuadas y verificar la respuesta de los organismos de prueba.

De acuerdo con la guía OECD (2004) se utiliza carbendazim como compuesto tóxico de referencia para esta prueba; sin embargo la guía EC (2004) recomienda el ácido bórico (H_3BO_3) si se van a realizar la prueba de evasión y reproducción, ya que funciona como compuesto tóxico de referencia para ambas pruebas (Palafox et al., 2012).

Se prepara una solución stock de ácido bórico y se procede a adicionarla al suelo, considerando una aplicación de 2000 mg/kg de suelo. Para preparar la solución se utilizaron 5 g de ácido bórico en la cantidad de agua requerida para llegar al 60 % de la capacidad de campo en las para las 5 repeticiones

$H_3BO_3 = (2 \text{ g } H_3BO_3 / 1000 \text{ g suelo seco}) \times 500 \text{ g suelo a utilizar}$

$H_3BO_3 = 1 \text{ g por repetición, } 5 \text{ g tuvo la solución stock, en } 550 \text{ ml de agua para los } 5 \text{ repeticiones.}$

La prueba de evasión es una prueba aguda, que se puede aplicar como una alternativa a la prueba de mortalidad.

Se basa en la observación de efectos subletales caracterizados por el comportamiento de evasión de las lombrices para la cual se mide el número de lombrices que se desplazan desde el suelo contaminado y que, por lo tanto, evaden la exposición. Dicho comportamiento se calcula a través de la concentración efectiva media (CE_{50}), que indica la concentración a la que el comportamiento de evasión es el 50 % de los organismos expuestos, comparado con el control. Esta prueba se usa para evaluar si el hábitat tiene riesgos ecológicos, a través de las lombrices (Feisthauer, Hund et al., citados por Palafox et al., 2012).

Es una prueba corta, de 48 horas, la cual complementa los ensayos de reproducción, y es una herramienta que ayuda a la articulación entre los trabajos de laboratorio y a los trabajos a campo (Piola, 2011).

Edwards y Bohlen (1996) argumentan que las lombrices poseen muchos quimiorreceptores en su pared corporal, especialmente en los segmentos anteriores del cuerpo, que muestran una alta sensibilidad a los químicos en su ambiente. Razón por la cual se infiere que podrían evadir el mismo, generando cambios en la cantidad de lombrices en un ambiente dado.

Sin embargo, García et al., citados por Piola (2011) 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.

Según Alves et al. (2012) para garantizar la distribución homogénea de las lombrices en el test de evasión y que no se encuentre influenciada por aspectos ambientales u otro factor, un tratamiento de doble control se lleva a cabo a través de la disposición de un contenedor con suelo sin tratar en ambos lados, con cinco repeticiones. La distribución esperada de las lombrices es de 40 a 60 % en cada uno.

2.4 HERBICIDAS UTILIZADOS, PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS

Se presenta a continuación un resumen de las principales características de los herbicidas ensayados en el presente estudio con especial énfasis en sus características de toxicología y ecotoxicología.

2.4.1 Flumioxazin

Flumioxazin es clasificado como un herbicida selectivo de pre-siembra, que puede ser aplicado en pre-emergencia y post-emergencia temprana de las malezas con acción de contacto. Es utilizado para combatir malezas como *Amaranthus quitensis*, *Bidens pilosa*, *Conyza bonariensis*, *Digitaria sanguinalis* entre otras (SATA, 2016)

El flumioxazin es un herbicida que pertenece al grupo de los inhibidores de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO). Es dependiente de la luz (LDPH) que actúa bloqueando la biosíntesis de clorofila, resultando en una acumulación endógena de porfirinas fototóxicas.

Este tipo de herbicidas son conocidos por tener un modo de acción fototóxico en plantas y posiblemente en peces. Los ensayos de toxicidad estándar no incluyen luz con la misma longitud de onda o intensidad que la luz natural del sol, por lo que los LDPH podrían ser más tóxicos cuando son expuestos a la luz natural del sol, como en las condiciones a campo (EPA, 2001).

Según estudios de toxicidad aguda, el herbicida es clasificado en la categoría de toxicidad III.

Su vida media en un suelo que presente metabolismo aeróbico es de 15,7 días en promedio (EPA, 2001).

El flumioxazin es relativamente inestable y su potencial para filtrar hacia aguas subterráneas es bajo. Sin embargo el potencial de los productos de su degradación (APF Y THPA) para filtrar hacia agua subterránea es alto. La movilidad del 482-HA, (mayor producto de su degradación) y otros productos no identificados, presentes en la fotólisis acuosa y en el metabolismo acuático anaerobio no son conocidas. Flumioxazin puede potencialmente alcanzar cursos de agua a través de las aplicaciones o por deriva bajo ciertas condiciones ambientales (EPA, 2001).

Flumioxazin es prácticamente no tóxico para la codorniz en base aguda ($LD_{50} > 2250$ mg/kg) y prácticamente no tóxica para el pato de superficie

(mallard duck) y la codorniz en una base sub-aguda (5 días $LC_{50} > 5620$ ppm). Es prácticamente no tóxico para pequeños mamíferos ($LD_{50} > 5000$ mg/kg).

Es levemente tóxico y moderadamente tóxico para algunas especies de peces y altamente tóxico para el camarón (96-horas $LC_{50}/EC_{50} = 0.23$ ppm) (EPA, 2001).

2.4.2 Sulfentrazone

Según SATA (2016) el sulfentrazone es clasificado como un herbicida selectivo como pre-emergente del cultivo y las malezas. Utilizado para el control de *Amaranthus quitensis*, *Conyza bonariensis*, *Bowlesia incana*, *Sida rhombifolia* entre otras.

El sulfentrazone es un herbicida que controla malezas a través del proceso de inhibición de la enzima protoporfirinógeno oxidasa, perteneciendo al grupo comúnmente llamado inhibidores de la PPO.

Suficiente información fue colectada para confirmar que el sulfentrazone filtra sustancialmente hacia agua subterránea en suelos arenosos (EPA, 1997).

Basado en una serie de estudios, se clasificó como tóxico categoría III, no cancerígeno. Sin embargo, bajo las condiciones de los estudios revisados, sulfentrazone tuvo efectos tóxicos en el desarrollo y reproducción. Efectos significativos fueron encontrados en la segunda generación de animales en estudios de reproducción (EPA, 1997).

Según EPA (1997) sulfentrazone es prácticamente no tóxico para pájaros en base aguda oral con un DL_{50} mayor a 2250 mg/Kg. Es prácticamente no tóxico para pájaros en una dieta con DL_{50} mayor a 5620 ppm. Resultados en mamíferos indican que sulfentrazone es ligeramente tóxico para pequeños mamíferos en base aguda oral.

En organismos acuáticos, es prácticamente no tóxico para la trucha ($LC_{50} > 120$ ppm) y ligeramente tóxico para bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*), (93.8 ppm). Los resultados indican que sulfentrazone es ligeramente tóxico para peces en base aguda. Los resultados crónicos indican que sulfentrazone afecta la sobrevivencia de alevines a concentraciones acuáticas tan bajas como 5.93 ppm. sulfentrazone es levemente tóxico para invertebrados acuáticos en base aguda. Los resultados provenientes de estudios agudos para animales marinos y de estuarios son incompletos, pero indican que sulfentrazone es altamente tóxico para dichos organismos (EPA, 1997).

2.4.3 Fomesafen

Fomesafen es clasificado como un herbicida selectivo de pos-emergencia con acción de contacto. Es utilizado para controlar malezas como *Amaranthus quitensis*, *Bidens pilosa*, *Raphanus raphanistrum* entre otras (SATA, 2016).

Según SATA (2016) el fomesafen actúa inhibiendo la enzima PPO oxidasa.

Clasificado en el grupo oncogénico G, el fomesafen aparece como posiblemente cancerígeno para los humanos y en la categoría toxicológica III (EPA, 1987).

Efectos orales agudos en ratas, se observan a concentraciones de 1.25-2.00 mg/Kg, situándolo en la categoría toxicológica III (EPA, 1987).

Toxicidad dérmica aguda a concentraciones mayores de 780 mg/kg, categoría toxicológica II, con irritación de ojos y conjuntivitis en conejo, con remisión antes de un día (EPA, 1987).

Efectos sub-crónicos orales en ratas y perros muestran que el hígado es el primer órgano afectado por la toxicidad del producto. El nivel de concentración más baja a la cual se observó efectos tóxicos fue de 100 ppm (5 mg/kg/día) en ratas (EPA, 1987).

Fomesafen es relativamente estable a la hidrólisis, su vida media fue estimada en tres años a 25 °C, y no aparece como pH dependiente. Estudios de laboratorio indican una rápida degradación del compuesto original bajo condiciones aeróbicas. Los residuos del fomesafen, lo muestran como moderadamente móviles en suelos franco arcillosos y muy móviles en suelos arenosos (EPA, 1987).

Fomesafen posiblemente contamine las aguas subterráneas, aunque se precisaría de mas información para evaluar el potencial de su contaminación (EPA, 1987).

Toxicidad aguda oral en el pato (mallard duck) > 5000 mg/Kg, para la trucha y bluegill sunfish 6030 ppm (EPA, 1987).

Fomesafen es esencialmente no tóxico para aves, peces de agua dulce, invertebrados y abejas. Es ligeramente tóxico para invertebrados acuáticos. Según estudios de toxicidad aguda y crónica, no se esperan efectos

significativos para organismos no blanco en el uso de fomesafen en cultivos de soja (EPA, 1987).

Según Xiaohu et al. (2014) la degradación del fomesafen fue fuertemente dependiente de la tasa de aplicación con valores de vida media de 84,9, 156,3 y 1452,7 días para aplicaciones de 3,75, 37,5 y 375 mg fomesafen /kg suelo.

2.4.4 Metribuzin

El metribuzin se encuentra clasificado como un herbicida de pre y post-emergencia y con acción sistémica y de contacto. Es utilizado para combatir malezas como *Amaranthus quitensis*, *Anthemis cotula*, *Digitaria sanguinalis*, *Poa annua* entre otras (SATA, 2016).

El metribuzin actúa inhibiendo el proceso fotosintético, interfiriendo en el transporte de electrones en el fotosistema I o II (SATA, 2016).

En estudios que utilizan animales de laboratorio, metribuzin generalmente ha mostrado una baja toxicidad aguda. Es levemente tóxico a través de la inhalación o por vía oral y fue colocado en la categoría de toxicidad III. Es prácticamente no tóxico a través de la vía dermal, y fue colocado como categoría IV por este motivo (EPA, 1998).

La toxicidad del metribuzin en organismos no blanco es extrapolado desde estudios en laboratorio de unas pocas especies.

Los compuestos provenientes de su degradación primaria son capaces de filtrar hacia el agua subterránea en condiciones normales, ya que no son volátiles. Una vez en agua subterránea, se espera persistencia, debido a su estabilidad a la hidrólisis y la ausencia de luz. Contrariamente es probable que sus residuos no persistan en aguas superficiales, con una buena penetración de luz que lo degrade rápidamente a través de fotólisis acuática (EPA, 1998).

Existe un riesgo potencial de toxicidad aguda y crónica para especies de aves, incluso especies en peligro de extinción, para tasas de aplicación de metribuzin de 4,45 kg de ingrediente activo por hectárea o más altas. También riesgos crónicos y agudos son probables para especies de mamíferos, incluso en peligro de extinción, para tasas de 1,125 kg/ha o mayores. Adicionalmente, es posible que especies de plantas terrestres y acuáticas no blanco, corran riesgo en tasas iguales o mayores a 0,55 kg de ingrediente activo por hectárea (EPA, 1998).

Información actualmente disponible por EPA (1998) indica que metribuzin y sus residuos son muy móviles, muy persistentes y tienen el potencial de contaminar aguas subterráneas y superficiales.

2.4.5 Metolaclor

El metolaclor es clasificado como un herbicida selectivo de pre-siembra y pre-emergencia con acción sistémica y de contacto, preventivo. Utilizado para el control de malezas como *Amaranthus quitensis*, *Digitaria sanguinalis*, *Echinochloa colona*, entre otras (SATA, 2016).

El metolaclor interfiere la absorción y el transporte de metabolitos, así como la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y de otras moléculas relacionadas con el metabolismo de las giberelinas. Inhibe la mitosis y en consecuencia, la división celular (SATA, 2016).

Metolaclor ha presentado un bajo nivel de toxicidad en pruebas agudas. Es levemente tóxico por las vías oral, dermal e inhalación, siendo colocado en la categoría de toxicidad III por dichos efectos. Es no irritante para los ojos y la piel (categoría toxicológica IV) pero si es positivo para la sensibilización de los conejillos de indias (EPA, 1995).

En estudios utilizando ratas, metolaclor dió incrementos significativos de nódulos en hígado y carcinomas en ratas hembras a dosis altas (EPA, 1995).

Es clasificado como grupo C "posiblemente cancerígeno" (EPA, 1995).

Parece ser de altamente móvil a móvil, dependiendo el tipo de suelo, y además fue detectado en aguas subterráneas. Es estable a la hidrólisis bajo condiciones ambientales normales. Su degradación es dependiente de microorganismos y procesos abióticos (EPA, 1995).

El nivel de preocupación (LOC por su sigla en inglés) para especies de pájaros en peligro de extinción es de 6,73 Kg de ingrediente activo por hectárea. Adicionalmente las especies en peligro de extinción y pequeños mamíferos que comen pasto corto son excedidos por el uso restringido LOC hasta una tasa de aplicación de 4,48 Kg i.a./ha (EPA, 1995).

Aunque no se esperan efectos agudos para organismo acuáticos por la exposición al metolaclor en aguas profundas, los peces de agua dulce desencadenan la LOC de especies en peligro de extinción en profundidades menores a 1 pie. También se espera riesgo para plantas no objetivo (EPA, 1995).

Wu et al. (2011) en un trabajo donde evalúan el efecto de la adsorción en la degradación y biodisponibilidad de metolaclor, encontraron que la adsorción sigue una isoterma de Freundlich y fue positivamente correlacionada con el contenido de materia orgánica del suelo ($p < 0,01$). La degradación del metolaclor arrojó una variación en la vida media de 37,9 a 49,5 días, que fue significativamente influenciado por el contenido de materia orgánica del suelo ($p < 0,01$).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

La etapa experimental de los estudios conducidos, se desarrolló en el laboratorio de Malherbología de la Estación Experimental "Dr. Mario A. Cassinoni" perteneciente a la Facultad de Agronomía, la cual está ubicada en el departamento de Paysandú, ruta 3 km 363 en el periodo de agosto a noviembre de 2016.

El estudio planteado en la presente tesis combinó la realización de 2 experimentos. Un primer experimento, Experimento 1 que tuvo por objetivo determinar los efectos de los herbicidas en estudio sobre el crecimiento y la reproducción de *Eisenia foetida* y tuvo una duración de 56 días. El segundo, Experimento 2, tuvo una duración de 48 horas, conocido como experimento de evasión y tuvo por objetivo la evaluación de efectos sub-letales, caracterizados por el comportamiento de evasión de las lombrices.

3.2 EXPERIMENTO 1

3.2.1 Tratamientos

El Experimento 1 constó de 16 tratamientos, resultado de la evaluación de 5 herbicidas simples a dos dosis, la dosis comercial recomendada y diez veces esta dosis, 4 mezclas herbicidas en la dosis mayor y 2 testigos tal como se detalla en el Cuadro No. 1.

Cuadro No. 1. Detalle de los tratamientos ensayados

Trat.	Principio activo	Herbicida comercial	Dosis	Dosis comercial kg ó l/ha	Dosis en 500 g de suelo
1	Flumioxazin	Flumyzin 500	1	0,15 kg	0,125 mg
2	Sulfentrazone	Boral 500 SC	1	0,5 l	0,42 µl
3	Metribuzin	Sencor	1	1,1 l	0,92 µl
4	Fomesafen	Fomax	1	1,0 l	0,83 µl
5	Metolaclor	Dual Gold 460	1	1,4 l	1,17 µl
6	Flumioxazin	Flumyzin 500	10	0,15 kg	1,25 mg
7	Sulfentrazone	Boral 500 SC	10	0,5 l	4,17 µl
8	Metribuzin	Sencor	10	1,1 l	9,16 µl
9	Fomesafen	Fomax	10	1,0 l	8,34 µl
10	Metolaclor	Dual Gold 460	10	1,4 l	11,67 µl
11	Flum.+ meto.	Flumyzin 500 + Dual Gold 460	10	0,15 kg + 1,4 l	1,25 mg + 11.67 µl
12	Sulf. + meto.	Boral 500 SC + Dual Gold 460	10	0,5 l + 1,4 l	4,17 µl + 11.67 µl
13	Metri + meto.	Sencor + Dual Gold 460	10	1,1 l + 1,4 l	9,16 µl + 11.67 µl
14	Fome + meto	Fomax + Dual Gold 460	10	1,0 l + 1,4 l	8,34 µl + 11.67 µl
15	Control – (*)	Sin tratar	-	-	-
16	Control + (**)	Ac. bórico	-	-	1 g

(*) Control -: tratamiento al cual no se le aplicó ningún herbicida, también llamado tratamiento de validación.

(**)Control +: tratamiento al cual se le aplicó una solución de ácido bórico según recomienda la guía EC (2004).

3.2.2 Metodología de instalación

Se utilizaron recipientes con tapa, con capacidad para sustrato de 500 g de suelo. La tapa fue de papel film con agujeros y recubierto con tela para permitir intercambio gaseoso e impedir que las lombrices escapen.

El sustrato donde fueron colocadas las lombrices fue un suelo artificial generado por adaptación de las normas de la OECD (2004), presentando 70 % de arena industrial de cuarzo, previamente tamizada en una zaranda de 1 mm, 10 % de turba sin restos de plantas visibles, también tamizada para evitar

pequeñas aglomeraciones y 20 % de caolín. Estos componentes fueron mezclados con una mezcladora eléctrica.

Una vez homogéneo el sustrato, se procedió a medir la humedad y el pH, obteniendo de las 3 mediciones realizadas, un valor promedio de pH de 6,9.

Para medir la humedad del sustrato utilizado, se dispusieron tres muestras del sustrato previamente pesadas a la estufa, por 24 horas a 105 °C y luego pesadas nuevamente. Los resultados obtenidos mostraron que el contenido de humedad del suelo fue de 4,78 %, dato que fue tenido en cuenta al momento de suministrar el agua para establecer un 60 % de la capacidad de campo.

Luego se procedió a la determinación de la capacidad de campo utilizando 4 réplicas de 10 gramos de suelo, donde se dispuso el sustrato en embudos de vidrio, acondicionados previamente con una pequeña cantidad de lana de vidrio para retener el suelo. Cada embudo fue colocado sobre una probeta de 10 ml de capacidad, donde se adicionaron 10 ml de agua mojando toda la superficie, hasta que escurrió totalmente y se registró el valor del volumen de agua obtenido, para luego desecharlo. Se repitió el procedimiento hasta el momento en que se recupera el mismo valor del agua vertida sobre el suelo (10 ml), sumando los valores de agua retenida (10 ml - agua en la probeta). El valor promedio de las 4 determinaciones de capacidad de campo fue de 4,5 ml en 10 gramos de suelo.

Fueron utilizadas en todos los ensayos, lombrices adultas, de más de 0,25 gramos y con clitelo visible. El clitelo es un área glandular donde se ubican los órganos reproductores que abarca un número determinado de segmentos contiguos (de dos a varias decenas). Esta área glandular no es visible toda la vida, ya que se desarrolla cuando la lombriz alcanza la madurez sexual o en los períodos reproductivos (Piola, 2011).

Una vez seleccionada la población, se procedió a la aclimatación en el mismo sustrato y el mismo alimento utilizado en los ensayos por un período de 24 a 72 horas.

Previo a ser colocadas en los ensayos, siguiendo el criterio de Piola (2011) las lombrices se dejaron estar por un mínimo de tres horas sobre papel de filtro húmedo, para permitirles evacuar su contenido intestinal y luego estimar su masa.

Las lombrices fueron expuestas a diferentes concentraciones de herbicidas simples y en mezclas en suelo, aplicando dos concentraciones que

podieran permitir la observación de efectos letales y sub-letales de los pesticidas evaluados (D1 y D10).

Para calcular las dosis a utilizar en el ensayo, se tomó como referencia la propuesta de Piola (2011), donde calcula la concentración ambiental prevista (PEC), considerando 5 cm de suelo, sin intercepción por el cultivo, y una densidad de suelo de 1200 kg/m^3 , tomada del promedio de densidad de suelos agrícolas del Uruguay.

$$\text{PEC5} = F \times D / \Delta z / \delta$$

Donde:

PEC5 es la concentración esperada de plaguicida en los 5cm superiores de suelo (mg/kg)

F es el factor de conversión de kg/ha a mg/m^2 ($100 \text{ mg/m}^2/\text{kg} \times \text{ha}$);
 D es la concentración de plaguicida rociada a campo (kg/ha);
 Δz es el espesor de la capa de suelo (0,05 m);
 δ es la densidad del suelo (kg/m^3),

Por lo que a los efectos del presente trabajo sería:

$$\text{PEC} = \text{DOSIS CAMPO RECOMENDADA} \times 1,667$$

La forma de extraer cantidades tan pequeñas de herbicida fue utilizando una solución madre, la cual contuvo en 1 litro de agua desionizada, 1 ml del herbicida correspondiente al tratamiento y a partir de esa concentración se dosificó.

Para cada herbicida que se presenta en estado líquido (todos menos flumioxazin) se calculó la densidad utilizando un matraz aforado y una balanza, y con la densidad del herbicida se procedió a pesar el valor de 1 ml de forma más precisa que con una probeta, debido a la viscosidad de los formulados utilizados.

En el caso de flumioxazin (que presenta un formulado sólido) se procedió a pesar directamente la dosis a utilizar, para luego formar la solución a aplicar.

Luego se procedió al agregado de agua faltante para llegar a la cantidad de agua requerida, 60 % de la capacidad de campo según OECD (2004).

La mezcla de la sustancia con el suelo se realizó en un recipiente de vidrio de capacidad suficiente para que entre el suelo de las 5 repeticiones, y luego ser depositado en los bollones correspondientes.

Cuando los tratamientos estuvieron listos, se procedió a pesarlos para tener una referencia de la pérdida de humedad en las semanas siguientes, ya que la misma no debe variar más de un 10 % para un correcto desarrollo de las lombrices.

El ensayo se llevó a cabo en condiciones controladas en una cámara, manteniendo una temperatura de 20 ± 2 °C y condiciones cíclicas, de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, según indica la OECD (2004).

Al día siguiente de instalado, cada tratamiento fue adicionado con alfalfa hidratada (5 g de alfalfa en 10 ml de agua por repetición) siendo revisados semanalmente. Al visualizarse sistemáticamente la presencia de hongos, se procedió a quitarle las sobras en la superficie y adicionar una menor cantidad de alimento, pasando a suministrar 2 g de alfalfa por contenedor.

Cuando pasaron los primeros 28 días de tratamiento, los adultos fueron removidos, observando en esta etapa los efectos de mortalidad y crecimiento.

Luego y por una sola vez en los siguientes 28 días, se adicionan 2 g de alfalfa en cada bollón, aunque se continuó con el suministro semanal de agua que permitió el mantenimiento de la humedad con una variación menor al 10 %.

3.2.3 Determinaciones

De crecimiento: a los 28 días post-instalación del experimento se retiraron de los bollones las lombrices adultas procediéndose al conteo y pesaje. Luego se lavaron y los excesos de agua fueron removidos con papel de filtro. Ante la falta de alguna lombriz se registró como muerta, ya que se asume que se descompuso antes de la evaluación.

A partir de los datos recabados en esta etapa fueron estimados los siguientes biomarcadores:

1. Ganancia de peso (GP): estimado como la diferencia entre el peso final, determinado a los 28 días y el peso inicial. En ambos casos la medición fue realizada sin contenido intestinal.

$$GP = P_f - P_i$$

2. Tasa de Crecimiento Relativo (TCR): calculada como el porcentaje del peso ganado en relación al peso inicial.

$$TCR = (GP/Pi) * 100$$

3. Tasa de Crecimiento Específica (TCE): calculada como el porcentaje de peso ganado en relación al tiempo, utilizando la siguiente fórmula:

$$TCE = ((\ln Pf - \ln Pi) / t) * 100$$

Donde:

LnPf y LnPi son el logaritmo del peso final e inicial respectivamente;
t es el período experimental en días.

De reproducción, luego de un segundo período de 28 días de tratamiento, se determinaron:

1. Número de lombrices en estado juvenil,
2. Número de cocones eclosionados y
3. Número de cocones no eclosionados, para la determinación de los efectos sobre la reproducción.

Cualquier signo de daño fue también registrado.

El proceso consistió en colocar los bollones en un baño maría desde 40 °C hasta llegar a 60 °C, pasando por 50 °C, en un período de 10 minutos por etapa, y en el cual los juveniles subieron a la superficie donde pudieron ser fácilmente removidos y contados. Luego se dispone el suelo en un tamiz de 2 mm, para poder retener a los cocones eclosionados y sin eclosionar.

3.3 EXPERIMENTO 2

3.3.1 Tratamientos

El Experimento 2, llamado de evasión constó de 6 tratamientos, 4 de los mismos fueron seleccionados según resultados obtenidos, 2 representativos de los “mejores” que fueron ensayos en los cuales no hubieron efectos negativos, y 2 representativos de los “peores” tratamientos, más un control negativo y uno positivo.

Como tratamientos representativos de los “peores” resultados fueron elegidos el metribuzin en su dosis simple, por presentar el nivel más bajo de respuesta tanto en crecimiento como en reproducción y el fomesafen, también en su dosis simple por presentar bajos niveles en reproducción.

Como "mejores" fueron elegidos el metolaclor en su dosis 10 y el tratamiento de flumioxazin + metolaclor, que si bien no tuvo buena respuesta en las dos etapas, si la tuvo en la etapa de reproducción.

La dosificación fue realizada de la misma manera que se describió en el Experimento 1.

3.3.2 Metodología de instalación

Para la instalación del ensayo de evasión se siguió la metodología propuesta por Piola (2011) donde se utilizó el mismo sustrato que el utilizado en el Experimento 1, depositado esta vez en recipientes rectangulares de plástico con medidas apropiadas para contener el suelo. Los mismos fueron divididos en dos secciones iguales, utilizando un tabique del mismo material. Se colocaron 500 g de suelo en cada sección, conteniendo una el suelo tratado y la otra un suelo control. También se incluyó un tratamiento con el mismo suelo control en ambas secciones y uno con un tratamiento de probado efecto evasivo con ácido bórico para validar el ensayo.

El tabique fue posteriormente removido y se colocaron 10 lombrices adultas en la línea central de la superficie de los suelos, dejando que lo penetren. Los contenedores fueron cubiertos de papel film con pequeños agujeros para permitir la aireación. Al cabo de 48 horas los tabiques fueron reinsertados en el suelo y se contó la cantidad de lombrices en cada compartimento, según indica Piola (2011).

3.3.3 Determinaciones

En el experimento de evasión la determinación realizada fue el número de lombrices en cada lado del recipiente, a los efectos de registrar el comportamiento de evasión o escape desde el suelo tratado.

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Tanto en el Experimento 1, como en el Experimento 2, el diseño experimental utilizado fue de bloques completos aleatorizados (DBCA) con 5

repeticiones. Los bollones recipientes descritos anteriormente constituyeron las unidades experimentales en los Experimento 1 y 2 respectivamente.

El análisis estadístico fue básicamente ANAVA y separación de medias para un diseño de bloques completos aleatorizados con cinco repeticiones. El mismo fue realizado con el Programa INFOSTAT. Cuando existieron diferencias significativas las medias se separaron utilizando una diferencia mínima significativa (DMS) de Tukey, con un intervalo de confianza del 95 %.

Para el análisis de los potenciales efectos de aditividad, sinergismo y/o antagonismo de las mezclas estudiadas se utilizó la fórmula propuesta por Colby (1967).

$$E = X + (Y (100 - X))/100$$

Donde:

X= Porcentaje de inhibición de G.P. metolaclor

Y= Porcentaje de inhibición del herbicida ensayado

Para el análisis del test de evasión se aplicaron dos procedimientos. En primer lugar se utilizó el criterio descrito en la guía ISO (2008) en donde se establece que un suelo es considerado tóxico siempre y cuando más del 80 % de las lombrices migren al suelo control.

Complementariamente se realizó un ANAVA a los efectos de estudiar el efecto de los distintos tratamientos ensayados en el comportamiento de las lombrices utilizando la ecuación propuesta por Loureiro et al. (2005) para la transformación de los datos.

$$E = ((N-2)*T)/N$$

Donde:

E= Proporción de lombrices que evaden el tratamiento

N= Total de lombrices en cada repetición

T= No. de lombrices observadas en los tratamientos con herbicidas

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan y discuten los resultados de los Experimentos 1 y 2 en forma separada.

4.1 EXPERIMENTO 1

4.1.1 Efectos en el crecimiento de *E. foetida*

El ANAVA detectó efectos muy significativos ($p < 0.01$) tanto en la ganancia de peso como en la tasa de crecimiento relativa señalando que los tratamientos herbicidas estudiados afectaron diferencialmente el crecimiento de las lombrices en los primeros 28 días.

Tal como puede observarse en el Cuadro No. 2 a continuación, se registraron tanto ganancias como pérdidas de peso. La ganancia máxima de 0,88 g fue estimada en el testigo negativo (T15) y la máxima pérdida, de -2,67 g, en el tratamiento control positivo (T16), tal como era esperable.

Si bien el testigo negativo fue el que presentó la máxima ganancia, varios otros tratamientos presentaron ganancias similares, sin mostrar diferencias estadísticas en el test de medias. Entre estos, el tratamiento T10, metolaclor a dosis alta, resultó prácticamente igual al testigo negativo. Los restantes tratamientos mostraron un comportamiento intermedio y sin diferenciarse del testigo negativo tampoco se diferenciaron de los tratamientos T8, T3, T6 y T11 que si resultaron distintos al T15.

El control positivo se distinguió claramente del grupo. La variación en peso en relación al testigo negativo alcanzado en este tratamiento (403 %) es más del doble de la variación que se estimara entre el testigo negativo y el tratamiento herbicida en el que se estimara el mayor impacto (T11).

Así, considerando estrictamente el resultado de la separación de medias se podrían distinguir tres grupos: el del control positivo con la máxima pérdida de peso, el correspondiente al control negativo y todos los tratamientos que no se diferenciaron del mismo (T10, T5, T13, T9, T14, T2, T4, T12, T7, Y T1) y un grupo de tratamientos con comportamiento intermedio el T8, T3, T6 y T11 sin ganancias de peso sólo con pérdidas de menor magnitud de las estimadas en el testigo positivo del que difieren.

Cuadro No. 2. Ganancia en peso (g) de las 10 lombrices estimada a los 28 días en los 16 tratamientos ensayados y la correspondiente variación en relación al testigo negativo (T15) en porcentaje

TRATAMIENTO	GANANCIA DE PESO	VARIACIÓN EN RELACIÓN AL TESTIGO NEGATIVO
16	-2,67 A	403
11	-0,58 B	166
6	-0,30 B C	134
3	-0,19 B C	122
8	-0,19 B C	122
1	0,10 B C D	89
7	0,21 B C D	76
12	0,28 B C D	68
4	0,36 C D	59
2	0,36 C D	59
14	0,40 C D	55
9	0,42 C D	52
13	0,48 C D	45
5	0,49 C D	44
10	0,87 D	1
15	0,88 D	0

Medias con igual letra no difieren estadísticamente ($\alpha=0,05$).

T1: flumioxazin D1, T2: sulfentrazone D1, T3: metribuzin D1, T4: fomesafen D1, T5: metolaclor D1, T6: flumioxzin D2, T7: sulfentrazone D2, T8: metribuzin D2, T9: fomesafen D2, T10: metolaclor D2, T11: flumuioxazin + metolaclor D2, T12: sulfentrazone + metolaclor D2, T13: metribuzin + metolaclor D2, T14: fomesafen + metolaclor D2, T15: control negativo, T16: control positivo.

Las tasas de crecimiento relativo (TCR) mostraron tendencias muy similares a las encontradas con las ganancias de peso (Cuadro No. 3).

Cuadro No. 3. Tasa de crecimiento relativo (TCR) estimada a los 28 días en los 16 tratamientos ensayados y la correspondiente variación en relación al testigo negativo (T15) en porcentaje

TRATAMIENTO	TASA DE CRECIMIENTO RELATIVA	VARIACIÓN EN RELACIÓN AL TESTIGO NEGATIVO
16	-62,28 A	416
11	-9,93 B	150
6	-5,09 B C	126
3	-3,57 B C	118
8	-3,57 B C	118
1	2,40 B C D	88
7	5,65 B C D	71
12	6,73 B C D	66
2	7,31 B C D	63
4	8,88 B C D	55
14	10,04 C D	49
9	10,43 C D	47
5	10,67 C D	46
13	11,48 C D	42
10	18,75 D	5
15	19,72 D	0

Medias con igual letra no difieren estadísticamente ($\alpha=0,05$).

T1: flumioxazin D1, T2: sulfentrazone D1, T3: metribuzin D1, T4: fomesafen D1, T5: metolaclor D1, T6: flumioxzin D2, T7: sulfentrazone D2, T8: metribuzin D2, T9: fomesafen D2, T10: metolaclor D2, T11: flumuioxazin + metolaclor D2, T12: sulfentrazone + metolaclor D2, T13: metribuzin + metolaclor D2, T14: fomesafen + metolaclor D2, T15: control negativo, T16: control positivo.

La estrecha similitud entre las estimaciones de la ganancia de peso y la tasa de crecimiento relativo es lo esperable. Tal como se detallara en materiales y métodos las lombrices incluidas en todos los tratamientos pasaron por un criterio de selección de peso, razón por la que el peso inicial no constituyó una variación de importancia.

Nuevamente podría dividirse en tres grupos, el primero compuesto únicamente por el control positivo con una tasa de crecimiento relativa negativa y diferente al resto de los tratamientos. Un segundo grupo donde la tasa de crecimiento relativa continúa siendo negativa pero en un orden menor y

diferente al grupo 1, compuesto por los T11, T6, T3 y T8. El tercer grupo se compone de los restantes tratamientos todos sin diferenciación del testigo negativo (T15) con tasas de crecimiento positivas.

Xiao et al. (2006) estudiando el efecto del herbicida acetoclor a la dosis de campo recomendada, encontraron reducciones significativas en relación al testigo sin herbicida, del orden de 65 % en la tasa de crecimiento relativa estimada a los 30 días. Sólo con dosis 10 veces mayores encontraron tasa negativa.

Coincidentemente en el presente estudio, dentro del grupo con tasas negativas figura una mezcla de dos herbicidas a dosis alta (T11= metolaclor + flumioxazin), dos herbicidas a dosis altas (T6= flumioxazin y T8= metribuzin) aunque también metribuzin a la dosis recomendada para uso en producción (T3) lo que podría estar sugiriendo un mayor impacto relativo en el caso de este herbicida.

Los resultados obtenidos tanto para ganancia de peso como para las tasas de crecimiento relativo están corroborando, tal como lo sostuvieron Xiao et al. (2006) que las estimaciones de crecimiento pueden constituir un parámetro con sensibilidad para la evaluación de toxicidad de herbicidas.

Al igual que encontraran estos autores y también Yasmin y Souza (2007) en su trabajo, podría interpretarse a partir de los resultados obtenidos que existieron efectos dosis dependiente al menos en el caso de flumioxazin. La ganancia de peso así como la tasa de crecimiento relativo en este herbicida no se vieron afectadas a las dosis comerciales y mostraron reducciones significativas cuando se utilizó 10 veces esta dosis. Sin embargo, a diferencia de flumioxazin, metribuzin como se comentara, mostró iguales efectos en las 2 dosis.

Respecto al resultado obtenido con las dosis, también el comportamiento de metolaclor resultó destacable. En este herbicida parece insinuarse una tendencia contraria. Si bien la dosis 1 y la dosis 10 en este herbicida no se diferenciaron estadísticamente parece interesante resaltar que la mayor dosis resultó idéntica al testigo negativo, sin aplicación, mientras que la dosis menor que es la dosis normal recomendada fue similar a esta pero también similar a los tratamientos con pérdidas de peso y tasa de crecimiento negativa.

No se encontró como explicar esta tendencia a la diferencia entre las dosis de metolaclor. Sí se encontraron varios trabajos, como el de Farenhorst et al. (2003) en los que no se observó ningún efecto en el crecimiento de

lombrices con dosis mayores a las recomendadas al igual que en presente estudio con las dosis 10 en los casos de sulfentrazone (T7), fomesafen (T9) y metolachlor (T10).

Como se comentara en el ítem de materiales y métodos para el análisis de los posibles efectos de aditividad, sinergismo o antagonismo de las mezclas ensayadas se utilizó la fórmula propuesta por Colby (1967) a partir de la cual, una vez procesado el análisis estadístico se obtuvieron los resultados que se muestran en el Cuadro No. 4.

Cuadro No. 4. Valores observados y esperados en mezclas en ganancia de peso calculado según Colby, expresado como reducción en la ganancia de peso (%)

TRAT.	REDUCCIÓN GP observada	REDUCCIÓN GP esperada	χ^2 (Valor p)	TIPO INTERACCIÓN
Metolaclor + flumioxazin	39,34	38,09	0,39443	Aditividad
Metolaclor + sulfentrazone	20,30	27,54	1,00735E-06	Antagonismo
Metolaclor + metribuzin	15,77	30,68	2,66897E-24	Antagonismo
Metolaclor + fomesafen	17,53	23,12	0,000273	Antagonismo

Fuente: adaptado de Colby (1967).

Como puede verse, con la prueba Chi cuadrado se encontró independencia entre los valores de ganancia de peso observada y esperado en todos los casos excepto para cuando flumioxazin se mezcló con metolaclor.

En función de estos resultados puede interpretarse que sólo en esta última mezcla no se presenta ninguna interacción y los efectos son sólo de tipo aditivo. En las restantes mezclas se demuestra una interacción significativa y resultaron todas con efecto antagónico. El efecto antagónico redundaría en menores impactos, en concreto se esperarían menores impactos para sulfentrazone, metribuzin y fomesafen cuando son utilizados en mezcla con metolaclor.

Los resultados muestran la utilidad de la utilización de la fórmula de Colby para el análisis de los efectos de las mezclas tal como se enfatiza en la bibliografía (Ferri et al., 2005). Si se observan los resultados del ANAVA para ganancia de peso puede verse que no se hubiera logrado esta información. Las cuatro mezclas estudiadas resultan similares a los respectivos herbicidas simples en combinación con metolachlor según el test de Tukey. El análisis estadístico de la fórmula de Colby muestra que sólo en una mezcla (T11) no existe interacción mientras que el resto dan resultados con diferentes impactos.

4.1.2 Efectos en la reproducción de *E. foetida*

Los resultados obtenidos en las variables reproductivas estimadas permiten la validación del ensayo en consideración de las normas establecidas por la OECD (2004). En todas las repeticiones de los tratamientos se obtuvieron más de 30 lombrices juveniles al final del ensayo, el coeficiente de variación resultó menor a 30 % en todos los tratamientos y la mortalidad de los adultos fue menor al 10 % (Anexo No. 1).

En el testigo positivo como esperable, no se registraron cocones ni lombrices juveniles por lo que se puede afirmar que la reproducción se vio totalmente impedida por este tratamiento.

En cuanto a los tratamientos con herbicidas, se comprobaron efectos diferenciales a nivel del total de lombrices juveniles ($P < 0.001$) (Cuadro No. 5).

Como puede observarse este parámetro parece presentar una mayor capacidad discriminatoria que las variables de crecimiento permitiendo mayor diferenciación entre tratamientos y distinguir 4 grupos de tratamientos: el testigo positivo (T16) con cero lombrices, el T4 distinto del T16 y también del T6, tratamiento con el mayor número de lombrices juveniles y los restantes tratamientos, incluido el testigo negativo, con desempeño intermedio.

Sin embargo, desde la óptica de evaluación de impactos este test presenta menor aporte discriminatorio, en la medida en que ninguno de los tratamientos herbicidas estudiados se diferenció del testigo sin tratar.

La variación entre el tratamiento con mayor (T4) y menor impacto (T6) en esta variable reproductiva, de 59 %, presenta una menor amplitud que la constatada en la ganancia de peso y menor aún en el caso de compararse con el testigo negativo (33 %) del que no se diferencia.

Cuadro No. 5. Número de lombrices estimado a los 56 días en los 16 tratamientos ensayados y la correspondiente variación en relación al testigo negativo (T15) y al tratamiento de flumioxazin a dosis 10 (T6) en porcentaje

TRAT.	NÚMERO DE LOMBRICES	VARIACIÓN EN RELACIÓN AL TESTIGO NEGATIVO	VARIACIÓN EN RELACIÓN AL TRATAMIENTO 6
16	0 A	100	100
4	85 B	39	59
14	123 B C	12	42
3	127 B C	9	39
9	128 B C	9	39
12	138 B C	2	34
15	140 B C D	0	33
8	141 B C D	-0,4	33
13	144 B C D	-3	32
10	144 B C D	-3	31
5	147 B C D	-5	30
7	165 C D	-18	22
2	167 C D	-19	20
1	174 C D	-24	17
11	190 C D	-36	10
6	210 D	-50	0

Medias con igual letra no difieren estadísticamente ($\alpha=0,05$).

T1: flumioxazin D1, T2: sulfentrazone D1, T3: metribuzin D1, T4: fomesafen D1, T5: metolaclor D1, T6: flumioxzin D2, T7: sulfentrazone D2, T8: metribuzin D2, T9: fomesafen D2, T10: metolaclor D2, T11: flumuioxazin + metolaclor D2, T12: sulfentrazone + metolaclor D2, T13: metribuzin + metolaclor D2, T14: fomesafen + metolaclor D2, T15: control negativo, T16: control positivo.

El comportamiento del testigo negativo en esta determinación resulta destacable. Mientras que en el caso de la ganancia de peso la mayor ganancia de peso se estimó en el testigo negativo, sin herbicida, que presentó diferencias con el crecimiento estimado en los tratamientos con peor comportamiento, en este caso, el testigo no se diferenció del tratamiento con el peor comportamiento (T4) ni con el que presentara el mayor valor (T6).

De esta forma, las tendencias observadas para los tratamientos en las variables de crecimiento no parecen coincidir completamente con lo estimado en el caso del total de juveniles. Por el contrario los tratamientos con menores ganancias de peso (T6 y T11) son los que presentaron los más altos números de juveniles.

Revisando la bibliografía no fue posible encontrar explicaciones a esta respuesta. Sólo en un trabajo, el de Viswanathan (1997) se reporta algo similar, mayores tasas reproductivas en el tratamiento con el herbicida ensayado en comparación con el testigo, aunque el efecto fue igual tanto para crecimiento como para reproducción. Cabe destacar que son muy pero muy pocos los trabajos en el tema. Tal como se comentara en la revisión, Pelosi y Hedde (2014) en su exhaustiva revisión del tema sólo encontraron 8 publicaciones sobre trabajos estudiando efectos de herbicidas en variables reproductivas, y los mismos varían en la especie de lombriz ensayada, el medio artificial o natural utilizado y el/los herbicidas estudiados.

Considerando aspectos generales de la bioecología de especies no sería extraño que existiera una respuesta inmediata de mayores tasas reproductivas en los tratamientos sometidos a mayor estrés. El resultado a mediano y más largo plazo considerando los efectos sobre otras variables poblacionales dependería en este caso de estudios de mayor duración considerando inclusive la frecuencia de exposición al factor de estrés.

Por otra parte en relación a la magnitud de los efectos estimados, en los 2 trabajos encontrados en la bibliografía en los que se estudió efecto de herbicidas en *E. foetida*, los herbicidas estudiados tuvieron efectos drásticos en la reproducción cuando se ensayó glifosato y 2,4D amina no encontrándose producción de cocones ni juveniles. En el otro, en el que se estudió el efecto del herbicida acetochlor, el número de juveniles se redujo aproximadamente a la mitad con 4 veces la dosis recomendada.

Los presentes resultados muestran alguna similitud con este último trabajo, la reducción del total de juveniles es de aproximadamente un 60 % en el tratamiento con menor número comparado al con mayor número de juveniles y de casi un 40 % en relación al testigo aunque la variación no resultó significativa en el análisis estadístico.

También parece interesante destacar el comportamiento del herbicida fomesafen siendo que todos los tratamientos ensayados conteniendo este herbicida (T4, T9, T14) se agrupan entre los con más baja cantidad de lombrices juveniles.

Igualmente podría comentarse el caso del metribuzin en dosis simple (T3), tratamiento que también forma parte del grupo con menor número de lombrices juveniles y que también fuera destacado en las estimaciones de crecimiento como entre los de menor crecimiento, con pérdida de peso y tasas de crecimiento relativo negativas.

Los resultados para los otros parámetros reproductivos estimados y calculados figuran en el Cuadro No. 6 a continuación.

Cuadro No. 6. No. de cocones eclosionados, No. de cocones totales, No. de lombrices en relación a los cocones eclosionados y No. de lombrices en relación a los cocones totales estimados a los 56 días en los 16 tratamientos

T	No. CE		T	No. CT		T	No. L/CE		T	No. L/CT	
16	0	A	16	0	A	15	2,05	A	4	1,76	A
4	43,2	B	4	49,2	B	4	2,06	A	15	2,00	A B
14	46,4	B C	14	49,4	B	10	2,09	A	10	2,01	A B
9	56,4	B C D	9	60,8	B C	3	2,23	A B	3	2,05	A B
3	57,6	B C D	13	62,0	B C	12	2,26	A B	12	2,07	A B
13	58,2	B C D	8	62,0	B C	9	2,28	A B	9	2,12	A B
8	58,8	B C D	3	63,0	B C	5	2,42	A B	13	2,31	A B
12	61,2	B C D	5	63,2	B C	7	2,46	A B	5	2,33	A B
5	61,2	B C D	12	66,0	B C	8	2,46	A B	7	2,33	A B
2	64,0	B C D	2	68,8	B C	13	2,46	A B	8	2,35	A B
1	65,2	B C D	15	69,8	B C	11	2,50	A B	11	2,41	A B
7	67,2	B C D	1	70,0	B C	2	2,60	A B	2	2,42	A B
15	68,4	C D	7	70,6	B C	1	2,66	A B	1	2,47	A B
10	68,4	C D	10	71,2	B C	14	2,66	A B	14	2,49	A B
6	71,4	C D	6	75,2	C	6	2,88	B	6	2,73	B
11	77,6	D	11	80,2	C	16	-		16	-	

Medias con igual letra no difieren estadísticamente ($\alpha=0,05$).

T1: flumioxazin D1, T2: sulfentrazone D1, T3: metribuzin D1, T4: fomesafen D1, T5: metolaclor D1, T6: flumioxzin D2, T7: sulfentrazone D2, T8: metribuzin D2, T9: fomesafen D2, T10: metolaclor D2, T11: flumuioxazin + metolaclor D2, T12: sulfentrazone + metolaclor D2, T13: metribuzin + metolaclor D2, T14: fomesafen + metolaclor D2, T15: control negativo, T16: control positivo.

Los resultados del total de cocones eclosionados parecen estar indicando información adicional. Los valores para este parámetro tanto en el testigo, supuestamente sin efectos y también en el tratamiento T10 que

resultara prácticamente idéntico en las estimaciones de crecimiento, muestran un comportamiento con mayor concordancia con las respuestas en el crecimiento y se ubican entre los mayores valores estimados.

Por otra parte y aún más importante, en el caso de este bioindicador si se encuentran diferencias entre tratamientos y el testigo sin tratar. El T4 presenta una disminución en el número de cocones eclosionados en relación al testigo sin tratar, la cual resulta significativa estadísticamente.

Siendo que el número de lombrices juveniles es el producto del total de cocones eclosionados y el número de lombrices/cocón también es posible profundizar en algunas nuevas consideraciones.

Así el bajo número de juveniles en tratamientos como el T4, también comparativamente el T14 serían el resultado de su también baja producción de cocones. El más alto valor del tratamiento T11 y similarmente el T6, por su vez, habiendo mantenido la producción de cocones considerando su similitud con el testigo, tendría relación con un efecto de aparente estímulo en el número de lombrices juveniles/cocón.

Analizando conjuntamente los resultados de crecimiento y reproducción cabe resaltar algunos aspectos de interés. En primer lugar, quedan interrogantes en relación a inconsistencias entre los resultados de ambos biomarcadores. En los tratamientos asociados al Fomesafen, fundamentalmente T4 pero similarmente T14 e inclusive podría considerar el T9 se encontraron los mayores efectos en el número de cocones redundando en menores poblaciones de lombrices juveniles aún cuando no afectaron prácticamente el crecimiento.

A modo de comentario, el T3, con valores también bajos de cocones eclosionados muy cercanos al tratamiento, sí podría considerarse un tratamiento con algo de efectos tanto en el crecimiento como en la reproducción de *E. foetida*.

Por otra parte, los tratamientos que más afectaron el crecimiento como T11 y T6 no afectaron el número de cocones ni el número de juveniles, resultando ambos parámetros estadísticamente similares al tratamiento sin tratar. Por el contrario, claramente en el caso del T6 se aumentó el número de lombrices juveniles/cocón. Con las estimaciones previstas y realizadas en el presente estudio no es posible valorar el impacto final de este aumento, es decir si efectivamente resulta en incrementos poblacionales o si tiene algún costo a nivel de la sobrevivencia de las lombricillas que termine teniendo un efecto negativo a nivel de la población.

Lo que sí parece claro es la importancia de sumar la estimación del mayor número posible de biomarcadores a los efectos de mejorar la evaluación de impactos a nivel del suelo. Si bien es claro, tal como se sugiere en la bibliografía, la importancia de agregar estimaciones de la reproducción, a la luz de los presentes resultados parecería como que, para algunos herbicidas, sería necesario analizar combinadamente varios parámetros asociados a la dinámica poblacional, incluyendo por ejemplo el potencial de sobrevivencia de los individuos juveniles.

4.2 EXPERIMENTO 2

Como se comentara en el ítem de materiales y métodos sólo fueron ensayados 4 tratamientos seleccionados como representativos de los de mejor y peor comportamiento en el Experimento 1, más los dos testigos.

En consideración del umbral sugerido por la guía ISO (2008) sólo los tratamientos T16 y T10 debieran catalogarse como con problemas de toxicidad o determinantes de menor calidad de suelo tal como proponen Hund-Rinken et al. (2003) como se puede apreciar en la Figura No.1.

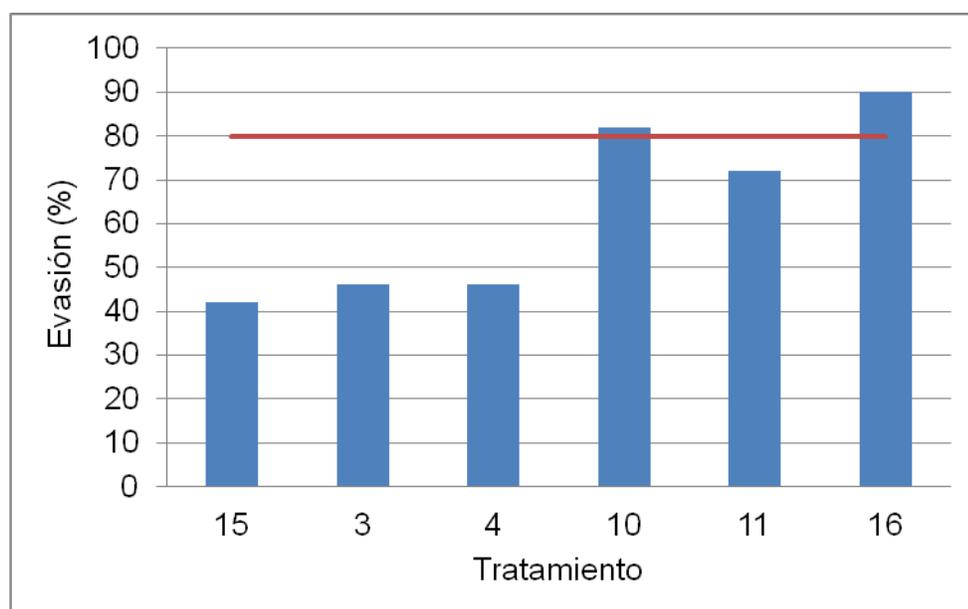


Figura No. 1. Evasión (%) estimada a las 48 horas en los 6 tratamientos ensayados

Sin embargo cuando se estudió el valor de evasión (E) el análisis estadístico señaló al tratamiento T11 como similar a los tratamientos T16 y T10 indicando que también este tratamiento tendría impactos a nivel del suelo afectando su calidad.

Cuadro No. 7. Promedio del No. de lombrices en los compartimentos de suelo tratado y suelo sin tratar con su respectivo valor de evasión en cada tratamiento

T	PROMEDIO DEL No. DE LOMBRICES (suelo s/tratar)	No. DE LOMBRICES (suelo tratado)	VALOR EVASIÓN (formula)	
16	9,0	1,0	0,80	A
10	8,6	1,4	0,64	A
11	7,2	2,8	0,44	A
3	4,6	5,4	-0,08	B
4	4,6	5,4	-0,08	B
15	4,2	5,8	-0,16	B

Medias con igual letra no difieren estadísticamente ($\alpha=0,05$).

T3: metribuzin D1, T4: fomesafen D1, T10: metolaclor D2, T11: flumioxazin + metolaclor D2, T15: control negativo, T16: control positivo.

En este mismo análisis los tratamientos T3, T4 y T15 resultan similares y diferentes tanto a T16 como T10 y T11 y se interpreta como con menor potencial toxicológico.

Comparando estos resultados con los obtenidos en el Experimento 1 es posible realizar varias consideraciones de interés.

En primer lugar, resulta llamativo el comportamiento de evasión del T10. Este tratamiento no mostró diferencias con el testigo positivo en los 2 análisis realizados pudiendo catalogarse como con problemas de toxicidad mientras que en el Experimento 1, por el contrario, llegó a ser prácticamente idéntico al tratamiento sin tratar (T15), tanto en los biomarcadores de crecimiento como en el total de cocones eclosionados.

Esta discrepancia podría tener su explicación en el hecho que el herbicida podría haber causado irritación determinando el comportamiento evasivo, aún si intoxicar la lombriz, tal como lo proponen Alves et al. (2012). Estos autores encontraron, ensayando el insecticida thiametoxam, efectos de evasión a concentraciones 100 veces más baja que la concentración más baja

a la que se observan efectos (LOEC) en el test de reproducción sugiriendo que este pesticida es probablemente más irritante que tóxico para la especie *Eisenia andrei*. Inclusive, los mismos autores observaron discrepancias en el sentido inverso. En el caso del insecticida fipronil, observaron reducción en la reproducción y luego atracción en el test de evasión.

Similarmente, también Capowiez y Berard (2006) no encontraron efecto de evasión en suelos tratados con el insecticida imidacloprid a concentraciones de 1 mg/kg de suelo pero si observaron reducción en el peso y en la capacidad de penetrar el suelo atribuyendo esto al hecho de que el insecticida es tóxico pero no irritante para las especies *Aporrectodea nocturna* y *Allolobophora icterica*.

En el presente algo similar ocurre con los tratamientos T3 y T4, los que aún mostrando resultados asociables a toxicidad en el Experimento 1, se muestran sin potenciales efectos en este estudio de evasión.

Lo cierto es que, en la bibliografía, son numerosas las inconsistencias entre este test y los de crecimiento y reproducción. Inclusive Torkhani et al. (2011) comprobaron preferencia por el suelo tratado con ivermectina en lombrices de la especie *E. foetida* aunque no encontraron explicación para esta preferencia.

Pelosi y Hedde (2014) en su revisión sostienen que pese a que el test de evasión es el más utilizado dentro de los propuestos para estudios de efectos de pesticidas en el comportamiento de lombrices, es también el más controversial y el que muestra menor relación con las funciones del suelo.

5. CONCLUSIONES

Los tratamientos de herbicidas ensayados afectaron significativamente el crecimiento de *E. foetida*, resultando 4 de ellos, la mezcla de metolaclor + flumioxazin (T11), el tratamiento de flumioxazin en dosis 10 (T6) y el de metribuzin a ambas dosis (T3 y T8) distintos del testigo sin tratamiento herbicida y presentando pérdidas de peso y tasas de crecimiento relativas negativas.

A nivel de reproducción los tratamientos mostraron efectos diferenciales sobre el total de lombrices juveniles y el número de cocones eclosionados. Ninguno de los tratamientos ensayados se diferenció del testigo sin tratar cuando el biomarcador utilizado fue el número de lombrices juveniles, mientras que para el total de cocones eclosionados el tratamiento de fomesafen a dosis recomendada (T4) se diferenció del testigo sin tratar.

En el test de evasión el tratamiento con fomesafen resultó similar al testigo sin tratar, al igual que metribuzin a dosis recomendada (T3), en los cuales no se observó comportamiento de evasión. El tratamiento de metolaclor + flumioxazin (T11) y el tratamiento de metolaclor a dosis 10 (T10) se diferenciaron significativamente al igual que el control positivo mostrando evasión.

La consideración conjunta de la totalidad de biomarcadores estimados reveló varias inconsistencias haciendo difícil la extracción de conclusiones combinando los estudios de crecimiento, reproducción y comportamiento de evasión. Por el contrario la conclusión sería la importancia de estudiar el mayor número de biomarcadores posibles a los efectos de mejorar el conocimiento de los potenciales efectos de herbicidas en la lombriz y sus funciones.

Por último, la aplicación de la fórmula de Colby (1967) y su correspondiente análisis estadístico permitió comprobar efectos de interacción entre las mezclas. De las cuatro ensayadas sólo una no mostró interacción resultando las restantes tres con efectos del tipo antagónico.

6. RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo en Laboratorio de Malherbología de la Estación Experimental "Mario A. Cassinoni" de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República, Uruguay, Paysandú ruta 3 km 363, en el período de agosto a diciembre 2016. El objetivo fue estudiar el efecto de 5 tratamientos herbicidas en dosis recomendada comercialmente y diez veces esta dosis: flumioxazin, sulfentrazone, metribuzin, fomesafen y metolaclor y cuatro mezclas: metolaclor + flumioxazin, metolaclor + sulfentrazone, metolaclor + metribuzin y metolaclor + fomesafen. a tales efectos fueron instalados dos experimentos. El Experimento 1, incluyendo todos los tratamientos en el que se estudió el efecto sobre bioindicadores de crecimiento y reproducción de *E. foetida*. Un segundo experimento en el que se evaluó el comportamiento de evasión en la bioindicadora y que constó de 6 tratamientos, un testigo positivo, un testigo negativo sin tratar y 4 tratamientos seleccionados en el Experimento 1 (metribuzin y fomesafen dosis recomendada, metribuzin dosis 10 y la mezcla de metolaclor y flumioxazin dosis 10). Las determinaciones consistieron en la estimación de la ganancia de peso, la tasa de crecimiento relativa a los 28 días y bioindicadores de reproducción (No. de lombrices juveniles, total de cocones y cocones eclosionados) en el Experimento 1. En este experimento se realizó además un estudio particularizado de los potenciales efectos de interacción de los tratamientos mezcla de herbicidas, utilizando la metodología propuesta por Colby. En el Experimento 2 se estimó el comportamiento evasivo de las lombrices a partir de dos indicadores propuestos por la ISO y Loureiro. Los tratamientos de herbicidas ensayados afectaron significativamente el crecimiento de *E. foetida*, resultando 4 de ellos, la mezcla de metolaclor + flumioxazin (t11), el tratamiento de flumioxazin en dosis x 10 (t6) y el de metribuzin a ambas dosis (t3 y t8) distintos del testigo sin tratamiento herbicida y presentando pérdidas de peso y tasas de crecimiento relativas negativas. A nivel de reproducción los tratamientos mostraron efectos diferenciales sobre el total de lombrices juveniles y el número de cocones eclosionados. Ninguno de los tratamientos ensayados se diferenció del testigo sin tratar cuando el biomarcador utilizado fue el número de lombrices juveniles, mientras que para el total de cocones eclosionados el tratamiento T4 se diferenció del testigo sin tratar. En el test de evasión el tratamiento T4 resultó similar al testigo sin tratar, al igual que T3, en los cuales no se observó comportamiento de evasión. El T11 y el T10 se diferenciaron significativamente al igual que el control positivo mostrando evasión. La consideración conjunta de la totalidad de biomarcadores estimados reveló varias inconsistencias haciendo difícil la extracción de conclusiones combinando los estudios de crecimiento, reproducción y comportamiento de evasión. Por el contrario la conclusión sería la importancia de estudiar el mayor número de bioindicadores posibles a los efectos de mejorar el conocimiento de los potenciales efectos de herbicidas en la lombriz y

sus funciones. Por último, la aplicación de la fórmula de Colby y su correspondiente análisis estadístico permitió comprobar efectos de interacción entre las mezclas. De las cuatro ensayadas sólo una no mostró interacción resultando las restantes tres con efectos del tipo antagónico.

Palabras clave: Lombriz; *Eisenia foetida*; Ecotoxicidad; Herbicidas.

7. SUMMARY

The present study took place in the Experimental Station "Mario A. Cassinoni" in the College of Agriculture of the University of the Republic, Uruguay, Paysandú, Route 3 Km 363, in the period that went from August to December 2016. The main purpose was to study the effects of 5 different herbicides treatments in the dosis commercially suggested and ten times this dosis: flumioxazin, sulfentrazone, metribuzin, fomesafen y metolachlor, and four mixes: metolachlor + flumioxazin, metolachlor + sulfentrazone, metolachlor + fomesafen. To such effects there were installed two different experiments: Experiment 1, include all the treatments in which the study of the effect of the bioindicators over the growment and reproduction of the *E. foetida* took place. A second experiment, that evaluated the behaviour of evation in the bioindicator which consisted of 6 different treatments, a positive check, a negative check without any treatment and 4 treatments selected in the Experiment 1, (metribuzin and fomesafen, suggested dosis, metribuzin dosis 10 and a mixture of metolachlor and flumioxazin dosis 10). the determinations consisted of the estimates of profits of weight, the growth rate related to the 28 days and bioindicators of reproduction (number of young earthworms, total of cocoon and eclosed cocoons) in Experiment 1. It also took place in this experiment a particular study about the potential effects of interaction of the treatments mixture of herbicides, using the methodology suggested by Colby. In Experiment 2 it was estimated the evasive behaviour of the earthworms starting from two indicators suggested by the ISO and Loureiro. The treatments of herbicides rehearsed affected in a significant manner the growth of *E. foetida*, resulting 4 of them, the mixture of metolachlor + flumioxazin (t11), the treatment of flumioxazin in dosis x 10 (t6) and the metribuzin in both dosis (t3 and t8) different from the check without herbicide treatment and showing the lost of weight and rates of growth relative negative. In terms of reproduction the treatments show different effects over the total of the young earthworms and the number of eclosed cocoons. None of the rehearsed treatments were any different to the check without treatment when the biomarker used was the number of youth earthworms, whilst for the total of hatched cocoons the treatment T4 had a different impact of the check whithout treatment, in the same manner as the T3, in which no evation behaviour was observed. The T11 and the T10 had significant differences in a similar manner as the positive control showing evation. The conjunct consideration of the total of biomarkers estimate revealed several inconsistencies making it though to extract conclusions combining the studies made in growth, reproduction and evation behaviour. By contrast, the conclusion would be the importance of studying the largest number of bioindicators possible in order to increase the knowledge of the potential effects of the herbicide in earthworms and it functions. Finally, the application of the formula of Colby and its according statistic analysis, allowed to prove the effects of the interaction between the

mixtures. Of the four rehearsed only one did not show interaction, resulting in the other three showing effects of the antagonistic type.

Key words: Earthworm; *Eisenia foetida*; Ecotoxicity; Herbicides.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alves, P. R.; Cardoso, E. J. B. N.; Martines, A. M.; Sousa, J. P.; Pasini, A. 2012. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seed under tropical conditions. *Chemosphere* 90: 2674-2682.
2. Amorim, M. J. B.; Römbke, J.; Soares, A. M. V. M. 2005. Avoidance behavior of *Enchytraeus albidus*: effects of benomyl, carbendazim, phenmedipham and different soil types. *Chemosphere*. 59: 501-510.
3. Arencibia Arrebola, D. F.; Fernández, R.; Curveco Sánchez, L. A.; Dayisell L. 2003. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. (en línea). *Retel*. 40:52. Consultado nov. 2016. Disponible en http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19003.pdf
4. Capowiez, Y.; Bérard, A. 2006. Assessment of the effects of imidacloprid on the behavior of two earthworm species (*Aporrectodea nocturna* and *Allolobophora icterica*) using 2D terraria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 64: 198-206.
5. Colby, S. R. 1967. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. *Weeds*. 15 (1): 20-22.
6. Daugrois, J. H.; Hoy, J. W.; Griffin, J. L. 2005. Protoporphyrinogen oxidase inhibitor herbicide effects on Pythium root rot of sugarcane, Pythium species, and the soil microbial community. *Phytopathology*. 95: 220-226.
7. EC (Environment Canada, CA). 2004. Biological test method; tests for toxicity of contaminated soil to earthworms (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*). Ottawa, Canada. s.p. (Environmental protection series).
8. Edwards, C. A.; Bohlen, P. J. 1996. Biology and ecology of earthworms. (en línea). 3rd. ed. London, Springer. v.3, 426 p. Consultado oct. 2016. Disponible en [https://books.google.com.uy/books?hl=es&lr=&id=ad4rDwD_GhsC&oi=nd&pg=PR9&dq=Edwards,+C.+A.%3B+Bohlen,+P.+J+\(1996\).+Biology+and+ecology+of+earthworms+\(Vol.+3\).+\(En+l%C3%ADnea\).+Springer+Science+%26+Busines+Media.+consultado+oct.+2016.+Disponible+en+&ots=3ah3rLRuv1&sig=ZXGo11Y2l40Yh4h0sMWIVdt8LJA#v=onepag&q&f=false](https://books.google.com.uy/books?hl=es&lr=&id=ad4rDwD_GhsC&oi=nd&pg=PR9&dq=Edwards,+C.+A.%3B+Bohlen,+P.+J+(1996).+Biology+and+ecology+of+earthworms+(Vol.+3).+(En+l%C3%ADnea).+Springer+Science+%26+Busines+Media.+consultado+oct.+2016.+Disponible+en+&ots=3ah3rLRuv1&sig=ZXGo11Y2l40Yh4h0sMWIVdt8LJA#v=onepag&q&f=false)

9. EPA (Environmental Protection Agency, US). 1987. Pesticide Fact Sheet; fomesafen. (en línea). Washington, D. C. 9 p. Consultado oct. 2016. Disponible en <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/91024T7W.txt?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1986%20Thru%201990&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&UseQField=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5CZYFILES%5CINDEX%20DATA%5C86THRU90%5CTXT%5C00000034%5C91024T7W.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=9&ZyEntry=1>
10. _____. 1995. Pesticide Fact Sheet; metolachlor. (en línea). Washington, D. C. 14 p. Consultado oct. 2016. Disponible en <https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/0001fact.pdf>
11. _____. 1997. Pesticide Fact Sheet; sulfentrazone. (en línea). Washington, D. C. 9 p. Consultado oct. 2016. Disponible en https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-129081_27-Feb-97.pdf
12. _____. 1998. Pesticide Fact Sheet; metribuzin. (en línea). Washington, D. C. 7 p. Consultado oct. 2016. Disponible en https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-101101_1-Feb-98.pdf
13. _____. 2001. Pesticide Fact Sheet; flumioxazin. (en línea). Washington, D. C. 14 p. Consultado oct. 2016. Disponible en https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-129034_12-Apr-01.pdf
14. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 1996. Herbicidas; manejo de malezas para países en desarrollo. (en línea). Roma. cap. 10, s.p. (Estudio FAO Producción y Protección Vegetal no. 120). Consultado oct. 2016. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/t1147s/t1147s0e.htm>

15. Farenhorst, A.; Tomlin A. D.; Bowman, B. T. 2003. Impact of herbicide application rates and crop residue type on earthworm weights. 2003 Bulletin Environmental Contamination and Toxicology. 70: 477–484.
16. Filimon, M. N.; Vlad, D. C.; Verdes, D.; Popescu, R. 2015. Enzymatic and biological assessment of sulfonylurea herbicide impact on soil bacterial communities. (en línea). African Journal of Agricultural Research. 10(14): 1702-1708. Consultado nov. 2016. Disponible en <http://www.academicjournals.org/journal/AJAR/article-full-text/613AADA52297>
17. Gigliotti, C.; Allien, L. 2001. Differential effects of the herbicides bensulfuron and cinosulfuron on soil microorganisms. Journal of Environmental Science and Health. 36: 775-782.
18. Haney, R. L.; Senseman, S. A.; Krutz, L. J.; Hons, F. M. 2002. Soil carbon and nitrogen mineralization as affected by atrazine and glyphosate. Biology and Fertility of Soils. 35: 35-40.
19. ISO (International Organization for Standardization, CH). 1993. Soil quality - effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1. Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. Geneva. s.p.
20. _____. 2008. Soil quality-avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour. Part 1. Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). Geneva. 25 p.
21. Ke-Bin L.; Jing-Tao C.; Xiao-Fang W.; Ying Z.; Wei-Ping L. 2008. Degradation of herbicides atrazine and bentazone applied alone and in combination in soils. (en línea). Pedosphere. 18(2): 265-272. Consultado oct. 2016. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1002016008600168>
22. Lancaster, S. H.; Haney, R. L.; Senseman, S. A.; Kenerley, C. M.; Hons, F. M. 2008. Microbial degradation of fluometuron is influenced by Roundup Weather MAX. (en línea). Journal of Agriculture and Food Chemistry. 56(18): 8588-8593. Consultado oct. 2016. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1002016008600168>
23. Loureiro, S.; Soares, A. M. V. M.; Nogueira, A. J. A. 2005. Terrestrial avoidance behavior test as screening tool to assess soil contamination. Environmental Pollution. 138: 121-131.

24. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development, FR). 2004. Guideline for the testing of chemicals 222, earthworm reproduction test (*Eisena fetida/Eisenia andrei*). Paris. 18 p.
25. Palafox Alejo, A.; Hernández Romero, Á. H.; López Luna, J.; Cuevas Díaz, Ma. del C. 2012. Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con lombrices. In: Cuevas Díaz, Ma. del C.; Espinosa Reyes, G.; Ilizaliturri Hernández, C. A.; Mendoza Cantú, A. eds. Ciudad de México, INECC. pp. 47-79. Consultado oct. 2016. Disponible en <https://books.google.com.uy/books?hl=es&lr=&id=oSXfdFI9zr4C&oi=fnd&pg=PA47&ots=j4eNjJBA30&sig=yMa5z7xaFVv9FV4Lh5tTzkMT7H8#v=onepage&q&f=false>
26. Paoletti, M. G. 1999. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. Agriculture, Ecosystems and Environment. 74: 137-155.
27. Papa, J. C. s.f. Interacciones planta-herbicida. (en línea). Santa Fe, INTA. Oliveros. 24 p. Consultado nov. 2016. Disponible en http://www.agroconsultasonline.com.ar//documento.html?op=v&documento_id=663
28. Pelosi, C.; Hedde, M. 2014. Pesticides and earthworms; a review. Agronomy for Sustainable Development. 34: 199-228.
29. Piola, L. 2011. Ensayos ecotoxicológicos para la evaluación del impacto de plaguicidas en suelos agrícolas de Argentina. Tesis doctoral. Buenos Aires, Argentina. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 179 p.
30. _____.; Fuchs, J.; Oneto, L.; Basack, S.; Kesten, E.; Casabé, N. 2013. Comparative toxicity of two glyphosate-based formulations to *Eisenia andrei* under laboratory conditions. (en línea). Chemosphere. 91: 545–551. Consultado dic. 2016. Disponible en <http://www.sciencedirect.com.proxy.timbo.org.uy:443/science/article/pii/S0045653512015378?>
31. Procópio, S.; Dos Santos, J.; Jaques, R.; Megumi Kasuya, M. C.; Da Silva, A. A.; Câmara Werlang, R. 2004. Crescimento de estirpes de bradyrhizobium sob influência dos herbicidas glyphosate potássico, fomesafen, imazetaphyr e carfentrazone-ethyl. Revista Ceres. 51 (294): 179-188.

32. _____.; Ferreira Fernandes, M.; Araújo Teles, D.; Guedes Sena Filho, J.; Cargnelutti Filho, A.; Araújo Resende, M.; Vargas, L. 2013. Toxicidade de herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*. *Planta Daninha*. 29: 1079-1089.
33. Qingming, Z.; Lusheng, Z.; Jun W.; Hui, X.; Jinhua, W.; Fenghua, W.; Fengxia, S. 2014. Effects of fomesafen on soil enzyme activity, microbial population, and bacterial community composition. *Environmental Monitoring Assessment*. 186: 2801-2812.
34. Salazar Pinilla, L. C. 2010. Formulaciones de herbicidas. (en línea). s. l., Universidad de Panamá. Consultado nov. 2016. Disponible en https://issuu.com/veroivo/docs/formulaciones_de_herbicidas_libro_impression
35. SATA. 2016. Guía para la protección y nutrición vegetal. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado oct. 2016. Disponible en <http://www.laquiasata.com/principio-activo/fitosanitarios/1/page/1>
36. Tejada, M. 2009. Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides. *Chemosphere*. 76: 365–373.
37. Torkhani, A. L.; Kolar, L. 2011. Does ivermectin attract earthworms? *Journal of Soils and Sediments*. 11: 124-128.
38. Tornisielo, V.; Grossi Botelho, R.; De Toledo Alves, P. A.; Bonfleur, E. J.; Monteiro, S. H. 2013. Pesticide tank mixes: an environmental point of view. (en línea). In: Andrew, J.; Kelton, P.; Kelton, J. A. eds. *Herbicides; current research and case studies in use*. s.l., Intech. pp 473-487. Consultado oct. 2016. Disponible en <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/44957.pdf>
39. Viegas, C.; Costa, C.; Andre, S; Viana,P.; Ribeiro, R.; Moreira-Santos, M. 2012. Does S-Metolachlor affect the performance of pseudomonas sp. strain ADP as bioaugmentation bacterium for atrazine-contaminated soils? *PloS one*. 7(5): e37140.
40. Viswanathan, R. 1997. Physiological basis in the assessment of ecotoxicity of pesticides to soil organisms. *Chemosphere*. 35: 323-334.

41. Wu, X. M.; Li, M.; Long, Y. H.; Liu, R. X.; Yu, Y. L.; Fang, H.; Li, S. N. 2011. Effects of adsorption on degradation and bioavailability of metolachlor in soil. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 11(3): 83-97.
42. Xiao, N.; Jing, B.; Ge, F.; Liu, X. 2006. The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Esenia foetida* under laboratory conditions. *Chemosphere*. 62: 1366-1373.
43. Xiaohu, W.; Jun, X.; Fengshou, D.; Xingang, L.; Yongquan, Z. 2014. Responses of soil microbial community to different concentration of fomesafen. *Journal of Hazardous Materials*. 273: 155-164.
44. Xu, D.; Yuezhong, W.; Kaixiong, W. 2010. Effect of chiral differences of metolachlor and its(S)-isomer on their toxicity to earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* no. 73: 1925–1931.
45. Yasmin, S.; D'Souza, D. 2010. Effects of pesticides on the growth and reproduction of earthworm; a review. *Applied and Environmental Soil Science*. 2010: 1-9.
46. Zabaloy, M. C.; Zanini, G. P.; Garland, J. L.; Gomez, M. A.; Bianchinotti, V. 2011. Herbicides in the soil environment: linkage between bioavailability and microbial ecology. (en línea) In: Soloneski, S.; Larramendy, M. eds. *Herbicides, Theory and Applications*. s.l., Intech. pp 161-192. Consultado dic. 2016. Disponible en <http://www.intechopen.com/books/herbicides-theory-and-applications/herbicides-in-the-soil-environment-linkage-between-bioavailability-and-microbial-ecology>

9. ANEXOS

No.1. Número de lombrices y número de cocones eclosionados con sus respectivas medias y coeficiente de variación (%) para los 16 tratamientos

TRAT.	VARIABLE	MEDIA	CV.
T1	No. LOMBRIZ	173,60	15,85
T1	No. COCONES E	65,20	13,30
T10	No. LOMBRIZ	144,20	28,94
T10	No. COCONES E	68,40	10,37
T11	No. LOMBRIZ	190,00	12,70
T11	No. COCONES E	77,60	12,48
T12	No. LOMBRIZ	137,80	20,34
T12	No. COCONES E	61,20	17,99
T13	No. LOMBRIZ	143,80	18,11
T13	No. COCONES E	58,20	10,19
T14	No. LOMBRIZ	122,60	18,39
T14	No. COCONES E	46,40	21,15
T15	No. LOMBRIZ	140,00	9,96
T15	No. COCONES E	68,40	17,86
T16	No. LOMBRIZ	0,00	sd
T16	No. COCONES E	0,00	sd
T2	No. LOMBRIZ	167,00	25,00
T2	No. COCONES E	64,00	19,80
T3	No. LOMBRIZ	127,40	13,44
T3	No. COCONES E	57,60	14,24
T4	No. LOMBRIZ	85,40	19,23
T4	No. COCONES E	43,20	28,81
T5	No. LOMBRIZ	147,00	19,26
T5	No. COCONES E	61,20	20,06
T6	No. LOMBRIZ	210,20	29,75
T6	No. COCONES E	71,40	22,90
T7	No. LOMBRIZ	164,60	15,01
T7	No. COCONES E	67,20	14,05
T8	No. LOMBRIZ	140,60	21,91
T8	No. COCONES E	58,80	27,12
T9	No. LOMBRIZ	127,60	18,10
T9	No. COCONES E	56,40	17,62

T1: flumioxazin D1, T2: sulfentrazone D1, T3: metribuzin D1, T4: fomesafen D1, T5: metolaclo D1, T6: flumioxzin D2, T7: sulfentrazone D2, T8: metribuzin D2, T9: fomesafen D2, T10: metolaclo D2, T11: flumuioxazin + metolaclo D2, T12: sulfentrazone + metolaclo D2, T13: metribuzin + metolaclo D2, T14: fomesafen + metolaclo D2, T15: control negativo, T16: control positivo.