

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

EFFECTO DE SEIS ADYUVANTES EN EL CRECIMIENTO,  
REPRODUCCIÓN Y COMPORTAMIENTO DE *Eisenia fetida*

por

Sofía FERNÁNDEZ MUZIO  
Ignacio GUGGERI SOLARO

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

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2019

Tesis aprobada por:

Director: -----  
Ing. Agr. (PhD.) Grisel Fernández

-----  
Ing. Agr. (MSc.) Isabel García

-----  
Qca. (Dra.) Silvina Niell

Fecha: 19 de julio de 2019

Autores: -----  
Sofía Fernández Muzio

-----  
Ignacio Guggeri Solaro

## AGRADECIMIENTOS

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

A Ricardo Hladki por su colaboración y apoyo en la etapa de experimentación del ensayo.

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

A Terra Nova, por brindar los adyuvantes utilizados.

A nuestras familias y a todos los que colaboraron directa e indirectamente con este informe.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	2
2.1. GENERALIDADES SOBRE EL USO DE PLAGUICIDAS.....	2
2.1.1. <u>Generalidades sobre adyuvantes</u> .....	3
2.2. IMPACTO DE ADYUVANTES.....	4
2.2.1. <u>Efectos directos de adyuvantes en el ecosistema</u> .....	5
2.2.2. <u>Efectos indirectos de los adyuvantes en el ecosistema</u> .....	7
2.3. ECOTOXICOLOGÍA.....	8
2.4. EVALUACIÓN DE LOS IMPACTOS DE LOS AGROQUÍMICOS.....	8
2.4.1. <u>Lombriz de tierra como bioindicador</u> .....	9
2.4.2. <u>Biología y anatomía de la lombriz</u> .....	11
2.5. TIPOS DE EVALUACIONES CON BIOINDICADORES: EXPERIMENTOS DE TOXICIDAD AGUDA Y CRÓNICA.....	14
2.6. EXPERIMENTOS EN CONDICIONES CONTROLADAS.....	15
2.7. ADYUVANTES UTILIZADOS EN EL ENSAYO.....	16
2.7.1. <u>Rizospray extremo</u> .....	19
2.7.2. <u>RizoOil</u> .....	19
2.7.3. <u>Agral 90</u> .....	20
2.7.4. <u>Silwet L*AG</u> .....	21
2.7.5. <u>Dusilan SP</u> .....	21
2.7.6. <u>Potenciador líquido (sulfato de amonio)</u> .....	22
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	23
3.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS.....	23
3.1.1. <u>Ensayo 1</u> .....	23
3.1.1.1. Cálculo de dosis.....	25
3.1.1.2. Suelo artificial.....	25

3.1.1.3. Selección de lombrices y acostumbramiento .....	26
3.1.1.4. Instalación y mantenimiento .....	26
3.1.1.5. Determinaciones .....	29
3.1.1.6. Diseño experimental.....	31
3.1.1.7. Procesamiento estadístico .....	32
3.1.2. <u>Ensayo 2</u> .....	32
3.1.2.1. Metodología de instalación.....	33
3.1.2.2. Determinaciones .....	33
3.1.2.3. Diseño experimental.....	34
3.1.2.4. Procesamiento de datos.....	34
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....	36
4.1. ENSAYO 1 .....	36
4.1.1. <u>Efectos en el crecimiento de <i>E. fetida</i></u> .....	36
4.1.2. <u>Efectos en la reproducción de <i>E. fetida</i></u> .....	38
4.2. ENSAYO 2.....	41
4.2.1. <u>Efectos en el comportamiento de <i>E. fetida</i></u> . .....	41
4.3. CONSIDERACIONES FINALES .....	43
5. <u>CONCLUSIONES</u> .....	44
6. <u>RESUMEN</u> .....	45
7. <u>SUMMARY</u> .....	46
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	47

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Categoría toxicológica de cada adyuvante según la OMS y toxicidad para aves, peces y abejas según el MGAP .....	17
2. Información toxicológica para cada adyuvante, registrada por diferentes métodos, en varios organismos .....	18
3. Descripción de los tratamientos en el ensayo 1 .....	24
4. Ganancia media de peso (g) y tasa de crecimiento relativo, estimadas a los veintiocho días, de las diez lombrices por tratamiento, ordenadas de forma decreciente.....	36
5. Número medio de lombrices hijas al cabo de cincuenta y seis días, por tratamiento, en orden decreciente, exceptuando al tratamiento 2.....	39
6. Medias calculadas de potencial de proliferación por tratamiento, exceptuando al tratamiento 2, en orden decreciente .....	40
Figura No.	
1. Fotografía de una repetición del ensayo 1, con las 10 lombrices posicionadas en la superficie del suelo artificial.....	28
2. Fotografía del ensayo 2 instalado, junto con el ensayo 1, en la cámara de crecimiento.....	29
3. Fotografía del conteo de cocones, una vez tamizado el suelo artificial de cada frasco .....	31
4. Fotografía de una repetición del ensayo 2, con el tabique que se utilizó para dividir el suelo testigo del tratado.....	33
5. Box – plot de la tasa de crecimiento relativo (TCR), estimada a los veintiocho días, de las diez lombrices por tratamiento.....	37
6. Cantidad de lombrices (%) observadas en sustrato tratado y sin tratar, al cabo de 48 horas, por tratamiento .....	42

## 1. INTRODUCCIÓN

El comienzo de la siembra directa en el Uruguay, alrededor de los años 90, estuvo asociado a un incremento del uso de herbicidas como herramienta de control químico de las malezas en los sistemas agrícolas. Estas se tornaron cada vez más difíciles de eliminar, y el mercado comenzó a ofrecer mayor cantidad de productos que facilitarían su control.

De esta forma surgen los adyuvantes, o coadyuvantes, destinados a mejorar la eficacia de los herbicidas. En el país se ha registrado un incremento en el uso de estos productos a medida que crece la producción agrícola. En el 2015 se importaron 779.219 kg de adyuvantes para ser utilizados en la agricultura, lo que implica una exposición frecuente de los agroecosistemas a estos productos.

Si bien son considerados compuestos químicos de baja toxicidad en general, los estudios de sus impactos crónicos en poblaciones de organismos terrestres son escasos. Entre estos últimos la lombriz de tierra *Eisenia fetida* ha sido muy utilizada, por sus múltiples virtudes como especie bioindicadora y por el rol fundamental que cumplen en la formación y estructuración del suelo.

Resulta necesario generar un banco de información acerca de la toxicidad de los diferentes plaguicidas, para minimizar el uso de aquellos que resulten perjudiciales y nutrir modelos de simulación que permitan predecir la toxicidad de potenciales productos que aparezcan en el futuro, en base a características fisicoquímicas similares (Edwards, 1992).

Si bien existen diversos métodos para estimar la toxicidad de los químicos en los seres vivos, el presente estudio se basa en la utilización de bioindicadores, entre ellos se ensayó con la lombriz de tierra (*E. fetida*). Además de ser una especie muy utilizada como bioindicador, resulta de gran importancia testear en ella la toxicidad que tienen los agroquímicos de uso masivo en Uruguay y que son propensos de terminar en los suelos.

Por lo mencionado se plantea la realización de este estudio, que tiene por objetivo evaluar la incidencia de seis adyuvantes agrícolas en la reproducción, crecimiento y comportamiento de *E. fetida*.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. GENERALIDADES SOBRE EL USO DE PLAGUICIDAS

A partir de los 60', con la "Revolución Verde", el uso de plaguicidas en la agricultura se tornó masivo y fundamental para mantener altos volúmenes de producción de alimentos. Estos beneficios de la "era química" trajeron aparejados perjuicios no menores para los ecosistemas debido a la perturbación de las relaciones depredador-presa y a la pérdida de biodiversidad, además de las consecuencias del uso de plaguicidas en la salud humana (Ongley, 1997). La FAO define el término "plaguicida" como todo compuesto químico destinado a eliminar y/o controlar plagas.

Los plaguicidas constituyen el espectro más amplio de productos químicos industriales, identificándose más de trece millones en 1993 y a los que se suman quinientos mil nuevos compuestos por año, según la base de datos de la American Chemical Society (Ongley, 1997).

La peligrosidad de un plaguicida en el suelo está relacionada con su persistencia en el ambiente y su toxicidad; la primera está en función de la capacidad del plaguicida de ser absorbido por el suelo y la solubilidad de la sustancia, mientras que la toxicidad está determinada por la dosis letal media y las posibles patologías y otros efectos en la salud de los organismos expuestos al plaguicida (EPA, 2010). Según Corra (2009) las malas prácticas agrícolas, la falta de capacitación del personal y la escasez de elementos de protección constituyen un agravante en la contaminación del suelo con plaguicidas, estando determinada la variación en la persistencia en el suelo por el número de dosis aplicada, la frecuencia de aplicación y la concentración del plaguicida al momento de aplicarlo.

Surgan et al. (2010) destacan que existe desarrollada una gran variedad de herramientas para analizar las características y amenazas de los pesticidas para el ser humano y el ambiente. Estas herramientas se conocen como "Pesticide Risk Indicators" (PRIs), es decir indicadores de riesgo de pesticidas. Los PRIs son utilizados para evaluar y comparar los riesgos de salud y los riesgos ambientales que tienen los pesticidas, y son utilizados para crear normativas de su uso. Sin embargo, dado que las formulaciones de pesticidas no están compuestas únicamente por el ingrediente activo del pesticida en sí, sino que también hay en ellas una variedad de solventes, surfactantes y otros adyuvantes que tienen como propósito mejorar la estabilidad, efectividad y acción de la formulación, resulta necesario conocer también el impacto en la salud y el ambiente de estos otros compuestos presentes en las formulaciones.



Por ende la adición de adyuvantes debe considerarse en la evaluación de riesgos de los plaguicidas, dado que estos pueden cambiar los efectos esperados de los fitosanitarios aplicados individualmente. Actualmente los efectos de dicha adición no son considerados en la regulación de los productos. Además, es conveniente tener información acerca de la toxicidad de los distintos adyuvantes que permita compararlos y optar por aquel menos perjudicial (De Santo et al., 2018).

### 2.1.1. Generalidades sobre el uso de adyuvantes

En 1987, Foy, citado por Krogh et al. (2003), define los adyuvantes como aquellos ingredientes, en la formulación de un pesticida, que modifican o potencian la acción del principal ingrediente de dicha formulación. Si bien existen adyuvantes incluidos en las formulaciones comerciales de fitosanitarios, también hay otros que se comercializan individualmente y se mezclan con los fitosanitarios en el momento de la aplicación.

Básicamente se añaden adyuvantes a los pesticidas para mejorar la eficacia de estos, ya sea mediante la mejora de la solubilidad, como también de la compatibilidad de los ingredientes activos; además se puede aumentar la absorción, penetración y la traslocación de estos últimos hacia los sitios de acción (Reddy y Singh 1992, Roggenbuck et al. 1993). Por otra parte pueden también ampliar la resistencia a la lluvia así como alterar la selectividad del ingrediente activo. Otros efectos pueden ser modificaciones en las partículas del suelo debido a la adsorción de los adyuvantes; cambios en la lixiviación, movilidad o persistencia de los pesticidas, conjuntamente se pueden generar variaciones en la toxicidad de la mezcla (Krogh et al., 2003).

Debido a la variedad de sus usos, los adyuvantes son los químicos con mayor volumen de producción y comercialización del mundo. Existen diversas formas de clasificarlos según la característica que se considere; una de estas divide a los adyuvantes en solventes, sinérgicos y surfactantes, en función de la clasificación química. Estos últimos y en particular los surfactantes no iónicos son el grupo que contiene la mayor cantidad de formulaciones (Nobels et al., 2011). Otra clasificación diferencia a los adyuvantes según si son de pulverización o de formulación, los primeros son los que se agregan junto con el pesticida al tanque del equipo de aplicación, mientras que los de formulación son aquellos que forman parte de la formulación del pesticida y pueden ser llamados aditivos o inertes (Hochberg 1996, Krogh et al. 2003).

En la agricultura uno de los usos más comunes de los adyuvantes es para potenciar el efecto de los herbicidas postemergentes en las malezas (Ramsey et al., 2006). El efecto puede determinar un aumento de la toxicidad

del herbicida para la maleza, como también para el cultivo (Peterson et al., 2001).

Existe abundante información que evidencia el efecto positivo de los adyuvantes sobre el control de malezas. A continuación se citan algunos ejemplos: para el glifosato a razón de 0,56; 1,12 y 2,24 kg/ha con 0,5% (volumen/volumen) de adyuvante se incrementó el control tanto de malezas gramíneas como de hoja ancha (Young, 1984). También ocurrió esto en *Bracharia plantaginea*, *Cynodon dactylon*, *Sporobolus sp.*, *Mullebergia spp.* y *Cyperus rotundus* cuando se mezclaba una dosis de 0,4 kg/ha de glifosato con Agral plus al 0,25% (Bolaños y Rosas, 1991). Otro ejemplo es el incremento en el control observado con paraquat (dosis de 0,15 kg/ha) mezclado con Agral plus (0,25%) sobre *Bidens odorata* y *Amaranthus hybridus* a los 10-15 días de emergidos (Urzúa y Sánchez, 1991).

Papa (2011) demostró que la adición de los adyuvantes (éster metílico de aceite vegetal, organosilicona heptametilsiloxano, nonilfenol etoxilado, éster poliglicólico de amina grasa y sulfato de amonio) a la mezcla de glifosato más suflufenacil tuvo un efecto favorable en el control de *Conyza bonariensis*, por un incremento en la velocidad de acción y un menor rebrote relativo o el retraso del mismo.

Ensayos realizados por Esqueda - Esquivel (2008) demostraron que la adición del aceite mineral Agratex-he, en dosis de 2 y 2,5 L/100L de agua, a la mezcla de herbicidas ametrina + 2,4 D, incrementó el control de *Leptochloa mucronata* y *Urochloa fasciculata* en más de 10% a los 30 días post-aplicación y más de 15% a los 45 días post-aplicación. Resultados similares se encontraron con la adición de Argidex a 2,5L/100L de agua para la misma mezcla de herbicidas.

## 2.2. IMPACTO DE ADYUVANTES

Si bien en los últimos años se ha indagado sobre los efectos toxicológicos de los adyuvantes, es muy escasa su consideración en la legislación para su uso y en la determinación de los niveles de residuo permitidos. Esto genera una dispersión descontrolada de los adyuvantes en el ambiente (suelo, sedimentos, agua y cadenas tróficas, Nobels et al., 2011).

Los impactos relacionados a su uso pueden dividirse en directos e indirectos. Los efectos directos incluyen aquellos en los que el adyuvante como compuesto químico genera toxicidad a los organismos. Los efectos indirectos involucran generalmente a otras sustancias que son las que producen el efecto tóxico, potenciado por la ayuda del adyuvante.

### 2.2.1. Efectos directos de adyuvantes en el ecosistema

En varios experimentos se ha demostrado el efecto directo de los adyuvantes en diferentes organismos y biomoléculas. Cserhádi (1995) en su revisión sobre la interacción de algunos surfactantes con compuestos bioactivos y sus efectos biológicos, destacó que los surfactantes interactúan con proteínas y fosfolípidos de membrana al modificar su estructura, solubilidad y permeabilidad. Estas interacciones pueden causar efectos beneficiosos o dañinos sobre la actividad de diversas enzimas en sistemas biológicos, ya sea estimulando su actividad o inhibiéndola.

Nobels et al. (2011) utilizaron varios surfactantes y solventes comúnmente aplicados en la agricultura de Bélgica, con el objetivo de generar información acerca de sus impactos toxicológicos y ecotoxicológicos. En el ensayo se medían directamente respuestas toxicológicas específicas a nivel celular como: daño en el ADN, daño a la membrana, estrés oxidativo y lesiones celulares generales, en el organismo blanco *Escherichia coli*, al exponerlo a diferentes concentraciones de cada adyuvante. Los resultados indican que ante la presencia de estos compuestos, la bacteria *E. coli* exhibe problemas en la replicación de su ADN, demostrando una posible toxicidad por parte del adyuvante. Además se sugiere que, frente a los resultados en la expresión y replicación del ADN, los solventes son menos tóxicos que los surfactantes. A su vez, los mismos autores manifiestan que en el ensayo utilizaron 2 organosiliconados que, a pesar de ser surfactantes, mostraron bajos niveles de toxicidad.

En 1984 Yamane et al. realizaron un estudio sobre los efectos inhibitorios de surfactantes y detergentes sintéticos, utilizados en grandes volúmenes en ese entonces en Japón, sobre algas planctónicas de agua dulce. Utilizaron las especies *Selenastrum capricornutum*, *Microcystis aeruginosa*, *Nitzschia fonticola*, y los resultados mostraron que a concentraciones de entre 4 a 8 mg/L de algunos surfactantes, ya se evidenciaban efectos tóxicos sobre *S. capricornutum*, que fue de las tres algas la más sensible.

Kravetz et al., citados por Krogh et al. (2003), estudiando la toxicidad de surfactantes no iónicos sobre la especie crustácea planctónica *Daphnia magna*, concluyeron que cuanto más hidrofóbico el surfactante, mayor era la toxicidad tanto aguda como crónica del mismo sobre esta especie.

De Santo et al. (2018) realizaron ensayos de letalidad y de evasión utilizando el herbicida metsulfurón-metil (nombre comercial: Ally) solo y en mezcla con un aceite adyuvante (nombre comercial: Assist), en las especies *Eisenia andrei* (anélido) y *Folsomia candida* (colémbolo). Los resultados del

ensayo de letalidad mostraron que no hubo muertes en ninguno de los tratamientos de metsulfurón-metil con y sin adyuvante, inclusive cuando se utilizó 10000 veces la dosis recomendada para cultivos de avena. Sin embargo, el herbicida en mezcla con el adyuvante presentó resultados de evasión con la dosis recomendada a campo, para ambos organismos, confirmándose la toxicidad intrínseca del adyuvante, ya que lombrices y colémbolos mostraron evasión frente a Assist aplicado individualmente a razón de 5 mL por cada litro de agua. A partir del trabajo realizado, De Santo et al. (2018) afirman que los resultados obtenidos en ensayos de letalidad en lombrices, utilizados como única referencia para evaluar la contaminación del suelo, pueden subestimar los efectos de los químicos en la fauna de este ecosistema.

Ma et al. (2004), ensayaron los efectos de 14 principios activos de adyuvantes, que son utilizados en muchas formulaciones con pesticidas en China, sobre las especies unicelulares de algas verdes *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorella vulgaris*, en laboratorio bajo condiciones controladas. Los resultados demostraron que 8 de los 14 adyuvantes disminuían el crecimiento de las poblaciones de algas. Por otra parte, la magnitud de la disminución del crecimiento varió entre adyuvantes y entre algas, por lo que no se pudo concluir que una especie de algas fuera más susceptible que la otra o que un adyuvante fuera más tóxico que el resto.

En ensayos de evasión realizados por Marques et al. (2009) con *E. andreei*, se evaluó el efecto del herbicida Mikado y de su ingrediente activo (sulcotriona) en el comportamiento de esta lombriz. El ensayo se realizó en tres tipos de suelos naturales de diferentes características y utilizando diferentes concentraciones del químico en cada caso. Se consideró evasión cuando el 80% de los organismos evitaban la zona contaminada con el químico. Los resultados mostraron evasión por parte de las lombrices al suelo tratado con el formulado Mikado, no siendo así en el suelo tratado con el principio activo sulcotriona. Esto demuestra un efecto directo de los adyuvantes agregados en el formulado comercial con respecto al principio activo del herbicida aplicado individualmente, en el comportamiento de las lombrices.

Beixing et al. (2018) realizaron un estudio sobre la toxicidad de pesticidas y adyuvantes en diferentes organismos. En el mismo señalan que la biodegradación de los etoxilatos de nonilfenol (compuesto surfactante que se encuentra ocupando el 30 % del principio activo del adyuvante de nombre comercial Dusilan SP) es lenta y tiene como uno de sus metabolitos estables al nonilfenol. Esta sustancia produce alteración endócrina que puede inducir la proliferación de células desordenadas, la feminización y problemas en el sistema inmunológico y en el sistema nervioso de organismos expuestos. Los autores comprueban, en este ensayo, que a medida que aumenta el nivel de

óxido de etileno en el nonilfenol etoxilado, disminuye la toxicidad para los organismos *D. magna* y *Brachydanio reiro*.

### 2.2.2. Efectos indirectos de los adyuvantes en el ecosistema

Según Krogh et al. (2003) los adyuvantes generalmente poseen poca toxicidad para los seres vivos, el principal problema está en su capacidad para modificar la movilidad de otros contaminantes en el perfil del suelo.

Marques et al. (2009) ensayaron el efecto del herbicida Viper y su principio activo (penoxsulam) en el comportamiento de *E. andreii*. Los resultados demostraron que ambos químicos generaron comportamiento de evasión en los organismos expuestos, pero en el formulado la evasión se registró a concentraciones menores que en su principio activo. Los autores adjudican el incremento en la toxicidad del formulado en relación al ingrediente activo al agregado de los adyuvantes incluidos en el producto comercial.

Piola et al. (2013) evaluaron la toxicidad, de dos productos a base de glifosato (Roundup FG y Mon 8750), a dosis subletales en la especie *E. andreii*. El formulado Roundup FG mostró lesiones en el ADN y daño lisosomal en tratamientos cuyas concentraciones del formulado eran similares a las utilizadas a campo. En el formulado Mon 8750 también se observaron daños pero en tratamientos donde las concentraciones utilizadas eran elevadas, similares a la DL50. Las diferencias fueron adjudicadas a los “ingredientes inertes” o adyuvantes que llevan las formulaciones; ya sea debido a una toxicidad intrínseca directa de los adyuvantes, o por una mejora en la biodisponibilidad y/o bioacumulación del ingrediente activo. Finalmente los autores resaltan la importancia de realizar evaluaciones ecotoxicológicas, no solo a los ingredientes activos, sino también a los formulados comerciales, que son los que se emplean en las prácticas agrícolas.

Kucharski (2007) realizó un estudio donde se comparaba el residuo de los principios activos del herbicida Betanal Progress AM 180EC, con y sin el agregado de tres adyuvantes, en la raíz de remolacha azucarera y en el suelo. Los tratamientos fueron los siguientes: aplicación del herbicida a dosis recomendada, aplicación del herbicida a dosis reducida, y aplicación del herbicida a dosis reducida en mezcla con adyuvante. Los resultados indicaron que el agregado de adyuvante al herbicida aumentaba la concentración de residuo activo, tanto en la raíz de la planta como en el suelo, pero era mayor el residuo que dejaba el tratamiento de herbicida a dosis recomendada. Por este motivo el agregado de adyuvante generó un menor residuo de químico en el suelo, ya que el control de malezas ejercido por el tratamiento en mezcla fue

tan eficaz como el ejercido por el de la dosis recomendada de herbicida, teniendo este último un nivel de residuo mayor.

Swarcewicz et al., Sumińska et al., citados por Kucharski (2007) también demostraron que la adición de adyuvantes a diferentes tipos de herbicidas enlentecía la degradación del principio activo de estos últimos. Este fenómeno incrementa el tiempo de exposición de organismos no blanco a dicha sustancia, lo que deriva en un aumento de riesgo ecotoxicológico.

En estudios realizados por Beixing et al. (2018), se investigó el efecto de dos surfactantes en mezcla con dos pesticidas en los organismos acuáticos *D. magna* y *B. reiro*. Los surfactantes utilizados fueron los principios activos etoxilatos de nonilfenol y etoxilatos de alcohol, para cada uno de ellos se analizaron diferentes concentraciones de óxido de etileno, y los pesticidas fueron indoxacarb y acetamiprid. Los resultados indicaron que para ambos etoxilatos, en mezcla con los pesticidas o individualmente aplicados, la toxicidad disminuía considerablemente con el aumento del nivel de óxido de etileno, para ambos organismos. Sin embargo el nonilfenol etoxilado mostraba una toxicidad levemente superior al alcohol etoxilado, por lo que los autores sugieren utilizar este último en lugar del primero.

### 2.3. ECOTOXICOLOGÍA

La ecotoxicología como disciplina surge alrededor de los años 60', a causa de la preocupación por los impactos ecológicos de los contaminantes que comenzaban a usarse masivamente (Hernández, 2014). Truhaut (1975) define a esta ciencia como una rama de la toxicología, que estudia los efectos tóxicos de las sustancias en los organismos vivos que constituyen la biosfera. También considera la interacción de las sustancias con el ambiente en donde se hallan los organismos. Por último el autor señala que debido a lo complejo y delicado del tema, los problemas de ecotoxicología deben ser estudiados en un contexto integrado.

### 2.4. EVALUACIÓN DE LOS IMPACTOS DE LOS AGROQUÍMICOS

Para estimar los impactos de los plaguicidas en la biodiversidad ecosistémica, originalmente se estudiaba a las poblaciones y comunidades que la componían. El inconveniente de este método resultó ser la detección tardía de los cambios debidos al efecto del pesticida, cuando el número de individuos de una especie podía verse disminuido significativamente, o haber desaparecido (Piola, 2011).

Surge entonces el estudio de los efectos biológicos de los pesticidas en especies representativas, mediante ensayos de toxicidad en condiciones controladas, para luego ser extrapoladas a campo. Este enfoque determina una noción cuantificable de la cantidad y el efecto que cada agroquímico genera sobre la biota (Piola, 2011).

Debido al rol fundamental que cumplen las lombrices en el aumento de la calidad del suelo, la cual puede verse afectada ante reducciones de poblaciones de las mismas (Edwards y Bohlen, 1992).

#### 2.4.1. Lombriz de tierra como bioindicador

Hawksworth (1992) define los bioindicadores como aquellos organismos que manifiestan síntomas particulares en respuesta a cambios medioambientales, generalmente de manera cuantitativa.

La lombriz de tierra es preferida para esta tarea, ya que es considerada el principal componente del ecosistema suelo y representa un factor de gran importancia para el ambiente.

Las lombrices juegan un rol fundamental en el ecosistema, conformando gran parte de la biomasa animal edáfica (Ríos 2005, Alejo et al. 2012) y participando en la formación del suelo.

Estos anélidos consumen los restos secos orgánicos que se encuentran en la superficie del suelo y al excretarlos aumentan la proporción de materia orgánica en el perfil; a su vez consumen suelo y materia orgánica, de modo que la fragmentan y la mezclan con minerales promoviendo la asociación órgano-mineral; en este proceso se produce una sustancia mucilaginosa que favorece la adhesión de partículas de suelo. Finalmente el resultado de estas actividades de la lombriz es la formación de agregados con la consecuente mejora de las propiedades físicas del suelo. Por otra parte la incorporación de materia orgánica aumenta la capacidad de retención de agua, y la construcción de galerías mejora la infiltración y el drenaje (Edwards y Bohlen 1996, Escudero et al. 2017), además de aumentar el traslado de solutos y de materia orgánica hacia estratos inferiores (Coleman et al. 2004, Piola 2011).

Conjuntamente con lo mencionado, las lombrices de tierra mejoran las propiedades químicas del suelo al intervenir en el ciclado de nutrientes. Mediante la fragmentación y digestión de restos secos se aceleran la descomposición de la materia orgánica y la mineralización del nitrógeno. A su vez aumenta la disponibilidad de estos a través de modificaciones del pH,

producto de sus excretas (Pelosi et al. 2014, Dignac et al. 2017, Escudero et al. 2017).

Otros organismos del suelo se pueden ver beneficiados por modificaciones de la red trófica o facilitación ecológica, de esta forma las lombrices también intervienen en las propiedades biológicas del suelo. En el primer caso se considera un consumo selectivo por parte de la lombriz generando un control sobre algunos patógenos y enfermedades que deprimen la vida de los microorganismos (entre otros). La facilitación ecológica está determinada por el aumento en la fragmentación de residuos y en la formación de agregados, producto de la actividad de la lombriz, que promueven a los microorganismos y a su vez estos promueven el ciclado de nutrientes (Hamilton y Dindal 1989, Escudero et al. 2017).

Desde el punto de vista agronómico, los beneficios que producen las lombrices en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo son de suma importancia para el crecimiento vegetal. Se ha evidenciado un resultado positivo e indirecto sobre la productividad y sanidad de las plantas a nivel mundial en 58 ensayos que concluyeron que las lombrices incrementan el rendimiento y la biomasa aérea de la cobertura vegetal en un 25 y 23% respectivamente. Por otra parte se observó que en suelos pobres las lombrices tienden a contrarrestar las limitantes que estos tienen para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Escudero et al., 2017).

Además de la importancia de las lombrices en el ecosistema suelo, las facilidades de su manipulación, identificación, conteo, etc. para el levantamiento de datos es otro importante factor para su elección como bioindicador (Fründ et al. 2011, Piola 2011).

Las lombrices pueden ser indicadoras de la calidad del suelo mediante su abundancia y riqueza particular; el comportamiento individual en contacto con el sustrato suelo, ya sea por evasión o preferencia al mismo; la acumulación de agroquímicos en su interior; y la aparición de indicadores de estrés (labilidad de la membrana lisosomal y daño genético en células expuestas al contaminante) (Fründ et al. 2011, Piola 2011). A su vez estos anélidos son ampliamente usados como organismos para evaluar la contaminación, y son considerados indicadores sensibles al daño ambiental (Römbke et al. 2006, Xiao et al. 2006), se utilizan para medir el impacto que los agroquímicos realizan en la biota del suelo, dada la susceptibilidad que presentan a la acción de xenobióticos (Fründ et al. 2011, Piola 2011). Estos efectos pueden medirse a nivel de especie, población y comunidad (Edwards y Bohlen 1992, Paoletti 1999).



Las lombrices al vivir en contacto íntimo con el suelo, consumirlo y trasladarlo por su intestino, llegan a un equilibrio con los químicos que hay en este (Edwards, 1973). Esta concentración corporal del químico es un parámetro a considerar al utilizar a las lombrices como indicadores de acumulación, ya que indica el riesgo de envenenamiento secundario para los depredadores que se alimentan de ellas y la potencial bioacumulación del químico en las cadenas tróficas (Edwards y Bohlen, 1992). Otro parámetro es el factor de bioacumulación, calculado como la relación que existe entre la concentración del químico en la lombriz y la concentración del químico en el suelo, esto indica la biodisponibilidad del contaminante en el suelo (Fründ et al., 2011). Los bioacumuladores son aquellos organismos que acumulan sustancias particulares dentro de sus tejidos, cuyas concentraciones se determinan mediante métodos químicos (Hawksworth et al., 2005).

Dentro de los organismos estándar utilizados en ecotoxicología terrestre, las lombrices de las especies *E. fetida* y *E. andreei* se destacan básicamente por la amplia base de datos y registros sobre los efectos que tienen en ellas numerosos compuestos químicos y su buena sensibilidad a estos, además de la facilidad de crianza y mantenimiento bajo condiciones controladas (en laboratorio), en comparación con otras especies de la familia (OECD 1984, 2004, Piola 2011).

Así mismo los efectos que tienen los químicos en el crecimiento de las lombrices varían según la especie. Estas difieren en su tipo de alimentación y en sus patrones de crecimiento (Edwards y Lofty, 1977), por lo que estos efectos serán más notorios en las especies de rápido crecimiento. Tanto la pérdida de peso como el enlentecimiento en el crecimiento en respuesta a los compuestos químicos han sido reportados con más frecuencia en *E. fetida* que es una especie de rápido crecimiento que en *Lumbricus terrestris* o *Aporrectodea caliginosa* que presenta más lento crecimiento (Edwards y Bohlen, 1992).

Por otra parte *E. fetida* presenta una susceptibilidad a los productos químicos similar a la de las lombrices nativas de la región río platense (Piola, 2011) lo que agrega una ventaja para los estudios en esta región.

#### 2.4.2. Biología y anatomía de la lombriz

*E. fetida*, conocida como “lombriz californiana” o “lombriz del compost”, se clasifica taxonómicamente en: phylum *Annelida*, clase *Clitellata*, subclase *Oligochaeta*, orden *Haplotaxida*, superfamilia *Lumbricoidea*, familia *Lumbricidae* (Storer, 1951).

*E. fetida* es originaria de la región Paleártica, si bien no es una especie nativa ni típica en la mayoría de los suelos, presenta una distribución mundial en climas que le resultan favorables. Habita suelos ricos en materia orgánica y forma parte del grupo de lombrices epigéicas (viven en estratos superiores del perfil del suelo); tiene un ciclo de vida corto y una alta tasa de reproducción y prolificidad: nace en cocones (capullos) que eclosionan a las 3-4 semanas y alcanzan la madurez en 7-8 semanas (a temperaturas de 20°C), cada lombriz produce de 2 a 5 cocones por semana, de los cuales nacen 3,3 lombricillas juveniles vivas en promedio por cocón (OECD 1984, Edwards y Bohlen 1996, ISO 2008). La alimentación de esta especie no es una limitante ya que se crían fácilmente en una amplia gama de desechos orgánicos (OECD, 1984).

Comúnmente se clasifica a las lombrices en tres grupos según su morfología, alimentación, microhábitat y comportamiento. Se distinguen las lombrices epigéicas, endogéicas y anécicas. Las primeras pueden ser de color rojo o marrón y se encuentran en los estratos superiores del suelo, ya que se alimentan de la materia orgánica que está en la superficie; las endogéicas presentan colores pálidos, viven a mayor profundidad y cavan túneles horizontales, alimentándose del suelo; las lombrices anécicas, que suelen ser de mayor tamaño y de dos colores (oscuro en el extremo posterior y pálido en el inferior), pasan el día a una mayor profundidad y en la noche suben a la superficie a alimentarse de materia orgánica, que luego trasladan por sus túneles verticales hacia estratos inferiores (Piola, 2011). Existe una gran diversidad y una amplia gama de adaptaciones a condiciones ambientales entre las lombrices (Fragoso et al., 1999).

Las lombrices son organismos invertebrados, de cuerpo blando y forma cilíndrica; el tamaño, peso y color varían según la especie. Para *E. fetida* las dimensiones aproximadas que alcanzan en estado adulto son: 10 a 13 cm de largo, 3 a 5 mm de diámetro y 1 g de peso; el color rojo intenso es característico de esta especie y no solo está determinado por la pigmentación de la piel, si no que está muy influenciado por el contenido de sangre del intestino (Alas y Alvarenga 2002, Piola 2011).

El cuerpo de estos seres vivos está conformando por anillos (metámeros) por lo que se dice que es segmentado. El primer segmento se llama prostomio y contiene a la boca, dando inicio al canal alimenticio que se compone por faringe, esófago, intestino y finaliza en el ano (Alas y Alvarenga, 2002). La respiración es a través de la piel. El sistema nervioso se compone por un cordón nervioso ventral del cual se desprenden nervios laterales, formando una red neuronal local por cada segmento, además cuentan con un sistema nervioso entérico dentro de la pared del intestino. La circulación sanguínea depende principalmente de los movimientos musculares generales, el sistema

circulatorio se compone de un vaso dorsal, que tiene válvulas y actúa como corazón, y 4 vasos laterales longitudinales conectados entre sí por vasos transversales (Piola, 2011).

Las lombrices son hermafroditas, lo que significa que todos los individuos poseen gónadas femeninas y masculinas, sin embargo no son capaces de autofecundarse y requieren intercambiar fluido seminal con otra lombriz. Luego de aparearse, a través del clitelo se forma el cocón; esta estructura es una especie de capullo, formado por células mucosas, en donde se depositan los ovocitos y los espermatozoides (que estaban guardados de forma latente en la espermateca, desde la cópula) completándose la fecundación. Cada cocón contiene de 3 a 20 huevos fecundados y albúmina para alimentarlos durante el desarrollo. Esta etapa tiene una duración de entre 14 y 30 días dependiendo de la temperatura ambiental, una vez nacidas las lombrices juveniles, estas tardan entre 30 y 60 días para completar su madurez sexual y estar aptas para reproducirse (Coleman et al. 2004, Piola 2011). La reproducción está muy influida por la temperatura, siendo mayor a medida que aumenta esta última. Para *E. fetida* se registraron las máximas tasas reproductivas a temperaturas constantes de 25°C. Además se han detectado incrementos en la producción de cocones y en la emergencia cuando los adultos son removidos a sustratos nuevos regularmente. Por otra parte el aumento en la densidad poblacional genera detrimentos en la tasa reproductiva (Alas y Alvarenga, 2002).

La máxima producción de cocones reportada por Cristales (1997) para *E. fetida* fue de 466 cocones provenientes de 10 lombrices adultas, en el tercer mes luego de instalado el ensayo, de estos capullos nacieron 2.150 lombrices y el período de máxima producción de cocones fue de 3 meses. Tripathi y Bhardwaj (2004) reportaron un promedio de 9 cocones por mes, con un período de 4 meses para que los huevos fertilizados dieran lugar a individuos adultos.

Según Cristales, citado por Alas y Alvarenga (2002) a temperaturas bajas (5,6 a 10°C) *E. fetida* presenta tasas de emergencia de 88% y un período de incubación de 86 días, mientras que a 25°C la tasa de emergencia baja a 40% y el período de incubación disminuye a 19 días. Estos efectos son representativos de lo que sucede con la tasa reproductiva en climas templados versus climas tropicales.

En el laboratorio la vida de las lombrices puede extenderse hasta 5 años, no siendo común esta cifra en condiciones de vida a campo. El crecimiento está determinado principalmente por la cantidad y tipo de alimento proporcionado; en ausencia de materia orgánica la pérdida de peso registrada en promedio para 37 días a 25°C fue de 1,3% de peso corporal por día. Bajo

condiciones óptimas de 25°C, la mortalidad estimada para *E. fetida* es de 0 a 1% por semana, pudiendo alcanzar un 70% de mortalidad con temperaturas extremas en condiciones de crianza. Las lombrices tienen la capacidad de regenerar una parte amputada siempre y cuando esta se encuentre en la zona postclitelar (Alas y Alvarenga 2002, Piola 2011).

## 2.5. TIPOS DE EVALUACIONES CON BIOINDICADORES: EXPERIMENTOS DE TOXICIDAD AGUDA Y CRÓNICA

El potencial inherente de una sustancia que causa daño sistémico a un organismo se define como “toxicidad”. Para reconocer y evaluar los efectos de los químicos en los seres vivos se hacen bioensayos, que brindan información de la toxicidad de diferentes compuestos y de la susceptibilidad de cada especie (Gómez, 2014).

Esta toxicidad se clasifica en “aguda” y “crónica”. Como ya se mencionó, *E. fetida* es de los organismos terrestres más utilizados para bioensayos de toxicidad.

Para estudiar la toxicidad aguda se expone a los individuos (de una misma especie) frente a un compuesto, durante un breve período de tiempo y ante una sola exposición. Con este ensayo se puede determinar la mortalidad mediante la dosis letal media (DL<sub>50</sub>), que representa la dosis de una sustancia que mata al 50% de un conjunto de animales en un ensayo; calcular otras dosis que ocasionan la muerte de distintos porcentajes de la población (CL<sub>10</sub>, CL<sub>20</sub>, etc.) o estimarlas a través de una regresión, así como la dosis de pesticida que no causa efecto (Ratte et al., 2003). También se pueden registrar resultados como parálisis o detención del crecimiento en los organismos a determinada dosis del químico.

Contrariamente, la toxicidad crónica implica una exposición al químico por un lapso prolongado mediante la administración repetida o continua del compuesto y, considerando el ciclo de vida de la especie que se utilice, se miden efectos en la reproducción y en el desarrollo de los individuos en cuestión; también se puede obtener información de la teratogenicidad, que es la capacidad de la sustancia para producir malformaciones en la descendencia (Ratte et al. 2003, Gómez 2014).

El test de evasión es un bioensayo de toxicidad aguda. Estos ensayos tienen la ventaja de ser de corta duración y de poco esfuerzo en comparación a los ensayos que evalúan los efectos crónicos en lombrices. Arrojan resultados primarios sobre los efectos de determinados pesticidas en la fauna del suelo, complementando la información que brindan las pruebas de crecimiento y

reproducción (De Santo et al., 2018). Puede calcularse la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ), que representa la concentración de contaminante a la cual el 50% de la población presenta comportamiento de evasión (Alejo et al., 2012).

Edwards y Bohlen (1996) fundamentan que los quimiorreceptores que tienen las lombrices en su piel son de alta sensibilidad, por lo que estas serían capaces de detectar los químicos en el ambiente y retirarse hacia áreas libres de contaminantes. En contraparte hay autores que indican que algunos compuestos químicos pueden no ser detectados por las lombrices, quienes pueden morir en consecuencia (Piola, 2011).

Considerado un test ecológicamente relevante, los ensayos de evasión con lombrices pueden aportar buenos datos sobre la calidad de un suelo, mostrando respuestas sensoriales a la adición de pesticidas al suelo (Marques et al. 2009, Brami et al. 2017). El comportamiento de evasión puede provocar una disminución en las poblaciones generando efectos en el funcionamiento del ecosistema cuando las concentraciones son menores a las que provocan letalidad o problemas reproductivos (Buch et al. 2013, Lowe et al. 2016).

## 2.6. EXPERIMENTOS EN CONDICIONES CONTROLADAS

Lo más usual es que las evaluaciones de impacto, con experimentos estimando la toxicidad aguda o crónica, se realicen bajo condiciones controladas en laboratorio. Mientras que los resultados de las evaluaciones de campo están influenciados por el clima y otros factores no inherentes del suelo, los experimentos de laboratorio tienen la ventaja de ser realizados bajo condiciones ambientales controladas (Fründ et al., 2011). Por otra parte, dadas las características estables de un suelo artificial (posible mayor adsorción de tóxicos en un suelo natural) y el mayor tiempo de contacto de la lombriz con el suelo contaminado en experimentos realizados en laboratorio, existe una tendencia a que la biodisponibilidad del químico sea mayor en ensayos de este tipo que en los realizados a campo, determinando una mayor toxicidad para los organismos en estudio. Además efectos indirectos pueden modificar los resultados en ensayos a campo cuando se realizan diferentes métodos de labranza, fertilizaciones, etc. (Piola, 2011).

La utilización de protocolos y su ejecución en condiciones controladas permiten generar resultados consistentes y reproducibles, ya que logran reducir el error por variabilidad ambiental (Edwards y Bohlen, 1996). Los bioensayos realizados en estas condiciones generan información que permite establecer los límites para el uso de los contaminantes estudiados (Gómez, 2014).

## 2.7. ADYUVANTES UTILIZADOS EN EL ENSAYO

Se pretende estudiar, en los ensayos de crecimiento, reproducción y comportamiento de *E. fetida*, un adyuvante representativo de cada grupo para la agricultura del Uruguay. Además en la selección de los adyuvantes se intenta involucrar a los que presentan el mayor consumo en kg importados por el país.

Entre los adyuvantes importados, el principio activo más utilizado es el aceite de soja (92 % del RizoOil), representando el 48,5 % de un total de 779.218,8 kg de adyuvantes importados en el 2015 (Rabuñade, 2015).

El principio activo que le sigue en volumen de importación es esteres metílicos de ácidos grasos vegetales (70 % del Rizospray extremo), ocupando el 13 % en el total, para el mismo año. Ambos compuestos también encabezan la lista de adyuvantes en lo referente a dólares invertidos (Rabuñade, 2015).

Con un porcentaje menor en cuanto a kg de activo importados se encuentra el nonil fenol con óxido de etileno (Agral 90), del cual se consumen 4,3 % del total de adyuvantes importados en el 2015. Con cifras similares está el sulfato de amonio, constituyendo el 3,3 % del total de activo (Rabuñade, 2015).

Por último el principio activo del Dusilan SP (nonil fenoxi polioxi etanol + dodecil benceno sulfonato de sodio) es el menos utilizado en el Uruguay de los 6 adyuvantes seleccionados para el ensayo. Su participación en el volumen de importación es de 0,17 % en el 2015 (Rabuñade, 2015).

Estos adyuvantes se agregan al caldo de aplicación, de diferentes herbicidas, fungicidas e insecticidas, para potenciar su acción según el mecanismo de cada uno. A continuación se presenta una breve descripción de la composición, función y parámetros, tanto toxicológicos como ecotoxicológicos (ver cuadros No. 1. y No. 2.), de los adyuvantes seleccionados para este trabajo.

Cuadro No. 1. Categoría toxicológica de cada adyuvante según la OMS y toxicidad para aves, peces y abejas según el MGAP

Nombre comercial	Categoría toxicológica	Toxicidad para aves	Toxicidad para peces	Toxicidad para abejas
Rizospray extremo	IV	Prácticamente no tóxico	Prácticamente no tóxico	Prácticamente no tóxico
Risoil	IV	Prácticamente no tóxico	Prácticamente no tóxico	Prácticamente no tóxico
Agral 90	III	Prácticamente no tóxico	Ligeramente tóxico	Virtualmente no tóxico
Silwet L AG	IV	Prácticamente no tóxico	Moderadamente tóxico	Virtualmente no tóxico
Dusilan SP	III	Prácticamente no tóxico	Prácticamente no tóxico	Virtualmente no tóxico
Potenciador líquido	III	Prácticamente no tóxico	Prácticamente no tóxico	Virtualmente no tóxico

Fuente: adaptado de Syngenta (2006), Calister (2009), Tampa (2016), Rizobacter (2017a, 2017b, 2018).

Cuadro No. 2. Información toxicológica para cada adyuvante, registrada por diferentes métodos, en varios organismos

	Rizospray extremo	RizoOil	Agral 90	Silwet L*AG	Dusilan SP	Potencia-dor Líquido
DL <sub>50</sub> oral rata	>5000 mg/Kg	> 3000 mg/Kg	-	> 2000 mg/Kg	> 5000 mg/Kg	2840 mg/Kg
DL <sub>50</sub> dermal rata	-	-	-		> 4000 mg/Kg	-
DL <sub>50</sub> inhalatoria rata (4 hs)	>2,87 mg/L	> 2,07 mg/L	-	2 mg/L	> 4,07 mg/L	-
DL <sub>50</sub> dermal conejo	>5000 mg/kg	> 4000 mg/Kg	-	> 2000 mg/Kg	> 3000 mg/Kg	-
DL <sub>50</sub> oral aves	>2000 mg/kg	> 2000 mg/Kg	-	-	> 200 mg/Kg	-
DL <sub>50</sub> oral abejas (48 hs)	>100 µg/abeja	100 µ/abeja	-	-	> 200 µg/abeja	-
CL <sub>50</sub> <i>Oncorhynchus mykiss</i> (48 hs)	>100 mg/L	> 100 mg/L	-	-	-	-
ETA-CE <sub>50</sub> <i>D. magna</i> calc. (48 hs)	>100 mg/L	> 100 mg/L	5 - 25 mg/L	-	-	129 mg/L
CL <sub>50</sub> <i>B. rerio</i> (96 hs)	-	-	-	2,75 mg/L	-	420 mg/L
ETA-CE <sub>50</sub> <i>Tetrahymena pyriformis</i> calc. (48 hs)	> 100 mg/L	> 100 mg/L	-	-	-	-

Fuente: adaptado de Syngenta (2006), Calister (2009), Tampa (2016), Rizobacter (2017a, 2017b, 2018).



### 2.7.1. Rizospray extremo

Este adyuvante combina organosilicona y aceite vegetal refinado y modificado, la composición es 70% de ésteres metílicos de aceites vegetales y 30% de organosilicona en forma de trisiloxanos. Se presenta como un concentrado emulsionable. Es un adyuvante producido y comercializado por Rizobacter (Rizobacter, 2017b).

Aporta al caldo de aplicación características antievaporantes, humectantes y favorece la penetración. La acción antievaporante consiste en la protección de las gotas del caldo, desde que salen de las pastillas del pulverizador hasta que llegan al blanco; esto se debe al aceite vegetal. A su vez, la organosilicona le proporciona al caldo un alto poder de mojado y mayor superficie de cobertura. El Rizospray extremo homogeniza el tamaño de las gotas aumentando la superficie de contacto y logrando así una mayor eficiencia de uso del caldo. Otra ventaja que resulta de su aplicación es el aumento de la penetración cuticular: el aceite vegetal disuelve la pared celular y la organosilicona genera una mayor afinidad de las gotas a la cera cuticular (Rizobacter, 2017b).

Se utiliza en dosis de 0,2 L/ha cuando la aplicación total de caldo es menor a 200 L/ha, y si la dosis de caldo a aplicar supera los 200 L/ha la dosis de Rizospray extremo es de 0,1% V/V (Rizobacter, 2017b).

Según la ficha de datos de seguridad del producto de la empresa Rizobacter (2017b) hay algunos componentes del mismo que no son biodegradables, o se degradan con dificultad.

Más datos de ecotoxicidad del producto se presentan a continuación (Rizobacter, 2017b):

- ETA-CE<sub>50</sub> (*Pseudokirchneriella subcapitata*, calc., 48 hs): > 100 mg/L
- ETA-CSEO (*D. rerio*, calc., 48 hs): >1 mg/L
- ETA-CSEO (*D. magna*, calc., 48 hs): > 1 mg/L

### 2.7.2. RizoOil

RizoOil es un aceite vegetal (principio activo: aceite de soja), está compuesto por aceite vegetal en un 92% y polietilenglicol en 8%. Se formula como concentrado emulsionable y es producido y comercializado por Rizobacter (2017a) en Uruguay.

El mecanismo con el que actúa, para promover la acción de los agroquímicos, es la reducción de la tensión superficial del caldo de aplicación, lo que implica una mayor deposición de las gotas producidas durante la aplicación (Rizobacter, 2017a).

Este adyuvante se aplica en dosis de 300 – 500 cm<sup>3</sup> cada 100 litros de agua (Rizobacter, 2017a).

Otros datos de toxicidad aguda del producto son los siguientes (Rizobacter, 2017a):

- ETA-CE<sub>50</sub> (*P. subcapitata*, calc., 48 h): > 100 mg/L
- ETA-CSEO (*D. rerio*, calc., 14 d): > 1 mg/L
- ETA-CSEO (*D. magna*, calc., 14 d): > 1 mg/L

### 2.7.3. Agral 90

El Agral 90 es un adyuvante mojante y dispersante tensoactivo no iónico, el principio activo es concentrado de óxido de etileno nonilfenólico y es formulado como concentrado soluble. Es producido y comercializado por Syngenta Agro S.A. (Syngenta, 2012).

Este adyuvante mejora las propiedades saturadoras de diseminación y penetración de los productos aplicados en las superficies tratadas, aumentando la eficacia y persistencia de los ingredientes activos, incrementando la acción biológica. También se utiliza para el lavado de maquinaria de aplicación (pulverizadoras, etc.). Como contraindicaciones se menciona en la etiqueta del producto que puede inducir fitotoxicidad (Syngenta, 2012).

Se recomienda su utilización en dosis de hasta 0,05% (50 cc por 100 litros de agua) para insecticidas y fungicidas y hasta el 0,3% para herbicidas (300 cc por 100 litros de agua, Syngenta, 2012).

Según la empresa que lo produce, este químico es muy tóxico para organismos acuáticos, pudiendo generar daños a largo plazo en el ecosistema acuático (Syngenta, 2012).

Según la ficha de datos de seguridad (Syngenta, 2006) del producto la toxicidad aguda para la Trucha arco iris es:

- LC<sub>50</sub> Trucha arco iris, 96 hs = 10 - 100 mg/L (OECD 203).

#### 2.7.4. Silwet L\*AG

Silwet L\*AG es un adyuvante organosiliconado humectante adherente no iónico, su principio activo es el heptametiltriloxano modificado (84 % de su peso) y su formulación es como concentrado soluble. Producido y comercializado por Rizobacter (Rizobacter, 2018).

Posee una alta capacidad reductora de la tensión superficial del caldo de aplicación. Homogeniza el tamaño de las gotas, aumenta la adherencia del producto y aumenta la velocidad de penetración de los agroquímicos por la pared celular debido a su afinidad a la cera cuticular. Está especialmente indicado para las aplicaciones con reguladores de crecimiento (Rizobacter, 2018).

Se recomiendan dosis de 25 a 50 mL por cada 100 L de agua para aplicaciones terrestres y 50 a 100 mL por cada 100 L de agua para aplicaciones aéreas.

El producto no es fácilmente degradable y puede ocasionar efectos adversos de largo plazo en el medio ambiente acuático (Rizobacter, 2018).

Para toxicidad aguda la ficha de datos de seguridad (Rizobacter, 2018) presenta además la siguiente información:

- CE<sub>50</sub> (*D. similis*, OECD 202, 48 h): 22,61 mg/L
- CE<sub>50</sub> (algas, OECD 201, 72 h): 5,5 mg/L

#### 2.7.5. Dusilan SP

Este adyuvante es una mezcla de agentes tensoactivos con acción esparcidora y emulsionante. Sus principios activos son nonil fenoxi polioxi etanol (300 g/L) en un 29,4% (tensoactivo no iónico) y dodecil benceno sulfonato de sodio (150 g/L) en un 14,7% (tensoactivo aniónico). Se formula como concentrado soluble (Tampa, 2016).

Su función principal es generar una mayor efectividad y permanencia de los productos fitosanitarios sobre la superficie vegetal. Esto lo logra debido a la acción humectante, que facilita el mojado de las superficies con el producto que se aplique; al poder tensoactivo, que reduce el tamaño de las gotas pulverizadas (se forma una película uniforme que cubre totalmente la superficie a tratar); y a la acción emulsionante, que asegura emulsiones estables y homogéneas (se genera una distribución uniforme del plaguicida). Si bien el Dusilan SP es compatible con todos los productos fitosanitarios, su uso es

especialmente recomendado para los fitosanitarios de penetración (MGAP, 2017).

Se recomiendan aplicaciones terrestres de 50 cc/100 L de agua y en el caso de ser aplicaciones aéreas se recomienda 100-200 cc/ha (MGAP, 2017).

Por otra parte en la ficha de datos de seguridad de la empresa se destacan los siguientes datos ecotoxicológicos (Tampa, 2016):

Ecotoxicidad acuática: tóxico para el medio acuático

- Lebistes (*Poecilia reticulata*)  $CL_{50}$  (agudo, 96 hs) > 52 mg

#### 2.7.6. Potenciador líquido (sulfato de amonio)

El sulfato de amonio  $(NH_4)_2SO_4$  es un adyuvante líquido compuesto por 40,3% de sulfato de amonio (principio activo) y 58,85% de agua, el restante porcentaje corresponde a aditivos de formulación. A su vez el porcentaje en peso de los nutrientes que lo componen es 8,47% de nitrógeno amoniacal y 9,68% de azufre, y su pH es de 3,25 (Calister, 2009).

Este adyuvante se utiliza para acondicionar aguas duras, ya que evita la interacción de los minerales presentes en el agua con el fitosanitario, permitiendo su rápida absorción. Sus propiedades se explican porque el ion  $NH_4^+$  compite con el  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  presentes en las aguas duras, de esta manera la formación de complejos insolubles entre el fitosanitario y estos iones tiene menor incidencia (MGAP, 2017).

Las dosis recomendadas van en función de la dureza del agua, siendo esta menor a 250 ppm de  $CaCO_3$  se debe aplicar 1 L de sulfato de amonio cada 100 L de agua, en caso de ser mayor a 250 ppm de  $CaCO_3$  la dosis de sulfato de amonio debe ser de 1,5 L/100 L de agua. No presenta fitotoxicidad si se utiliza en la dosis recomendada (MGAP, 2017).

En la ficha de seguridad de la empresa que provee el producto se encuentra la siguiente información toxicológica (Calister, 2009):

- $DL_{50}$  intraperitoneal ratón: 610 mg/Kg
- $DL_{50}$  oral ratón: 640 mg/Kg

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios se realizaron en el laboratorio de Malherbología de la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” de la Facultad de Agronomía (UdelaR); ubicado en Paysandú, en la ruta 3 Km 363, de febrero a marzo del año 2017.

Consistió en la conducción de dos ensayos, uno evaluó los efectos de distintos adyuvantes en el crecimiento y reproducción de *E. fetida*, y el otro evaluó el efecto de los mismos adyuvantes en el comportamiento de la lombriz.

Importa aclarar que todos los procedimientos utilizados en estos estudios se realizaron en base a la guía para el testeo de químicos de la OECD (2004). Se modificaron algunos pasos y valores con el fin de generar una mejor adaptación de las metodologías a las condiciones de la experimentación.

Según la OECD (2004) se debe contar con un control negativo (testigo) y otro positivo en cada ensayo; el control negativo debe cumplir con ciertos requisitos para que los resultados finales sean válidos y reproducibles. Estos son, para la prueba de crecimiento y reproducción, que: cada repetición que contiene 10 lombrices debe resultar en un conteo de por lo menos 30 juveniles al final del período de prueba, el coeficiente de variación de la reproducción no puede ser mayor a 30% y la mortalidad de los adultos en los primeros 28 días de instalado el ensayo (prueba de crecimiento) debe ser menor al 10%.

El control positivo que propone la guía 222 de la OECD (2004) es el carbendazim, sin embargo la EC (2004) recomienda al ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) como compuesto tóxico de referencia tanto para la prueba de reproducción como para la de evasión.

#### 3.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS

##### 3.1.1.1. Ensayo 1 (ensayo de reproducción basado en OECD 222)

En el ensayo 1 se evaluaron los efectos de 6 adyuvantes en 2 dosis cada uno, la dosis comercial y 10 veces la misma. Para esto se realizaron 14 tratamientos con 5 repeticiones cada uno como se muestra en el cuadro No. 3.

Cuadro No. 3. Descripción de los tratamientos en el ensayo 1

Tratamiento	Dosis/repetición (400 g de suelo)	Dosis comercial	Adyuvante (nombre comercial)	Principio activo
1	-	-	Control negativo (testigo)	-
2	0,8 g	-	Control positivo	Ácido bórico $H_3BO_3$
3	0,0333 $\mu L$	50 cc/L de $H_2O$	Dusilan SP	Nonil fenoxi polioxi etanol
4	0,3 $\mu L$	50 cc/L de $H_2O$	Dusilan SP	Nonil fenoxi polioxi etanol
5	0,133 $\mu L$	200 mL/ha	Agral 90	Concentrado de óxido de etileno nonilfenólico
6	1,33 $\mu L$	200 mL/ha	Agral 90	Concentrado de óxido de etileno nonilfenólico
7	0,0333 $\mu L$	50 mL/100 L de caldo	Silwet L*AG	Heptametiltriloxano modificado
8	0,3 $\mu L$	50 mL/100 L de caldo	Silwet L*AG	Heptametiltriloxano modificado
9	0,133 $\mu L$	200 mL/ha	Rizospray extremo	70% ésteres metílicos de aceites vegetales 30% trisiloxanos
10	1,33 $\mu L$	200 mL/ha	Rizospray extremo	70% ésteres metílicos de aceites vegetales 30% trisiloxanos
11	0,33 $\mu L$	500 $cm^3$ /L de $H_2O$	RizoOil	Aceite de soja
12	3,3 $\mu L$	500 $cm^3$ /L de $H_2O$	RizoOil	Aceite de soja
13	0,66 $\mu L$	1 L/ha	Potenciador líquido	Sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$
14	6,6 $\mu L$	1 L/ha	Potenciador líquido	Sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$

### 3.1.1.2. Cálculo de dosis

El cálculo de la cantidad de adyuvante a aplicar por repetición se hizo en base a la concentración ambiental prevista (PEC). Este considera que el adyuvante penetra en los primeros 5 cm del suelo (sin intercepción por el cultivo) con una densidad del suelo de 1200 Kg/m<sup>3</sup> (promediado de suelos agrícolas del Uruguay) y tomando en cuenta la dosis a aplicar por hectárea (recomendada por el laboratorio que fabrica cada adyuvante).

$$PEC5 = F \times D / \Delta z / \delta$$

Donde: PEC5 es la concentración esperada de adyuvante en los 5cm superiores de suelo (mg/Kg); F es el factor de conversión de Kg/ha a mg/m<sup>2</sup> (100 mg/m<sup>2</sup>/Kg x ha); D es la concentración de plaguicida rociada a campo (Kg/ha) presentada como “dosis comercial” en el cuadro No. 3.;  $\Delta z$  es el espesor de la capa de suelo (0,05 m);  $\delta$  es la densidad del suelo (Kg/m<sup>3</sup>). Para obtener las dosis elevadas se multiplicó este valor por 10 para cada producto.

### 3.1.1.3. Suelo artificial

El suelo artificial que se utilizó en los ensayos se preparó adaptando las normas de la OECD (2004) con los siguientes materiales y proporciones:

- 70% arena de cuarzo tamizada (1 mm)
- 10% turba seca tamizada
- 20% caolín

Se determinó el porcentaje de materia seca de la turba pesando tres muestras antes y después de secarlas en una estufa a 105°C por 24 horas. La misma presentó 50% de humedad por lo que se adicionó a la mezcla de suelo el doble de turba en peso.

Una vez obtenido el suelo artificial se procedió a medir su humedad y su capacidad de campo. Para la medición de la humedad se llevaron tres muestras de suelo a la estufa (105°C por 24 horas), pesándose antes y después del secado. La humedad promedio de las tres muestras fue de 9,9 %. Este dato permitió corregir el peso del suelo artificial a colocar en cada unidad experimental, siendo 400 g de sustrato seco para el primer experimento y 800 g en cada recipiente del segundo experimento.

La capacidad de campo de un suelo (CC) es la cantidad de agua que permanece en este luego de que el agua gravitacional escurre, horas después de haber sido saturado. Para su determinación se realizó un procedimiento que

consistió en colocar una muestra de 10 g suelo seco en un embudo, cuyo extremo inferior se tapó con lana de vidrio (para evitar que el material del suelo percolara pero permita el pasaje del agua), sujetado sobre una probeta milimetrada. Se agregó a la muestra 10 mL de agua destilada y se registró cuanta de esa agua pasaba a la probeta. Después de cada registro se vació la probeta. Al primer agregado el suelo retuvo casi toda el agua, a medida que se repitió el procedimiento la acumulación de agua en la probeta fue mayor, hasta que cayeron en ella los 10 mL que se le aplicaron a la muestra; lo que indicó que el suelo no fue capaz de retener más agua porque alcanzó su capacidad de campo. El valor se calculó restándole a los 10 mL, que se aplicaron cada vez, el valor que se registró en la probeta y sumando todas esas retenciones. Se realizó el procedimiento para tres muestras, la CC promedio fue 6,6 mL para 10 g de suelo.

#### 3.1.1.4. Selección de lombrices y acostumbramiento

Para el ensayo se utilizaron lombrices de la especie *E. fetida*, de nombre común “lombriz californiana”. Los individuos con los que se trabajó pertenecían a una misma población, de forma de reducir la variación experimental producto de diferencias en su sensibilidad. Se seleccionó, de la población lombrices adultas (de más de tres meses de edad), con un peso de entre 0,250 - 0,600 g y clitelo visible (estructura reproductiva cuya presencia asegura que la lombriz está apta para esta función).

Una semana antes de la instalación del ensayo se inició una etapa de “acostumbramiento” de las lombrices a la dieta a utilizar durante el experimento, la cual fue pellets de alfalfa humedecidos con el doble de agua que su peso seco. 24 – 72 horas previas a la instalación del experimento se colocó a las lombrices en suelo artificial, con esta misma alimentación.

#### 3.1.1.5. Instalación y mantenimiento

Los recipientes utilizados en el ensayo fueron frascos de vidrio con capacidad de 1 L. Se utilizaron recipientes e instrumentos de vidrio, de lo contrario el agroquímico aplicado en cada caso puede permanecer en las paredes de los recipientes con los que toma contacto, por lo que se evita el uso de recipientes plásticos. El lavado posterior al uso debe asegurar la eliminación de los restos de contaminante; para ello se realizó el triple lavado con detergente, acetona y agua destilada.

Al inicio del experimento se registró el peso inicial de las lombrices, una vez evacuado el contenido gastrointestinal, con el fin de pesar su masa corporal real. Este proceso consistió en colocarlas sobre papel filtro húmedo durante 6



horas. Para los tratamientos 1, 2, 3, y 4 se realizó el destare por 6 horas, se notó un debilitamiento de las lombrices por lo que se redujo a 3 horas el tiempo para los siguientes tratamientos.

Por último se limpió con agua destilada y se secó a las lombrices para ser pesadas individualmente con un requisito de 0,250 a 0,600 g/lombriz. Se formaron grupos al azar de 10 lombrices y se registró su peso, cada grupo se correspondió con una unidad experimental. La OECD (2004) recomienda entre 50 - 60 g de suelo por lombriz. Sin embargo en este experimento se utilizaron 40 g/lombriz para asegurar un correcto conteo de juveniles. Colocar más sustrato en los frascos impediría que la altura mínima de agua en el baño maría alcance la altura del sustrato dentro del frasco, lo que resulta imprescindible para permitir una adecuada salida de las lombricillas a la superficie por calor y su posterior contabilización.

El adyuvante se adicionó (según la dosis de cada caso) al volumen de agua necesario para alcanzar el 60% de la CC, valor sugerido en el protocolo, suficiente para no condicionar el desarrollo de las lombrices. Para mezclarlo homogéneamente con el suelo se utilizó el método de cuarteo. Este consiste en dividir el suelo en tres porciones iguales y el agua en dos, a la primera porción de suelo se le agrega la primera mitad de agua y se mezcla hasta homogeneizar, luego se agrega otro tercio de suelo y se homogeniza, se repite el proceso hasta tener el total mezclado.

Finalmente se depositó en cada frasco la cantidad correspondiente de la mezcla, inmediatamente previo a la colocación de las lombrices en este. De esta manera se aseguró una concentración inicial conocida de adyuvante, ya que a partir de su contacto con el sustrato comienzan procesos de degradación y adsorción del primero.

Las lombrices ya pesadas se depositaron en la superficie del sustrato de cada frasco (ver figura No. 1) y se esperó a que ingresan al sustrato por su cuenta, como forma de verificar la buena salud de las mismas. Se registró el peso total de cada repetición para el mantenimiento de la humedad durante todo el ensayo, por diferencia de peso. Luego se taparon los frascos con papel film agujereado para permitir el intercambio gaseoso y tela sujetos con una gomita para evitar que las lombrices escaparan del recipiente.



Figura No. 1. Fotografía de una repetición del ensayo 1, con las 10 lombrices posicionadas en la superficie del suelo artificial

Las unidades experimentales se mantuvieron en la cámara de crecimiento a 21°C y 16 horas de luz/8 de oscuridad, con una iluminación de 400 - 800 lux (OECD, 2004, ver figura No. 2).



Figura No. 2. Fotografía del ensayo 2 instalado, junto con el ensayo 1, en la cámara de crecimiento

Completadas las 24 horas de instalado cada tratamiento se suministró 4 g de alfalfa molida previamente hidratada con el doble de agua, lo que resultó en 12 g totales por repetición. Esta cantidad fue modificada posteriormente considerando que fuera suficiente alimento, pero evitando los excesos, ya que en estos proliferan hongos.

Este procedimiento de alimentación y revisión de las condiciones de cada frasco se realizó semanalmente hasta completar los 28 días de experimentación. Se aseguró un 60% de CC en cada frasco durante la totalidad del experimento, hidratando los tratamientos de acuerdo a la variación de su peso producto del agua evaporada semanalmente.

#### 3.1.1.6. Determinaciones

La prueba de crecimiento consiste en evaluar los cambios de peso en las lombrices, que fueron expuestas al químico durante 28 días. Se mide el peso de las 10 lombrices, que se colocarán en cada repetición, al inicio y al final de este período y luego se descartan. Posteriormente se utilizan las mismas repeticiones para realizar la prueba de reproducción. En este caso se mide la progenie, que dejaron estas 10 lombrices ya descartadas, al cabo de 28 días. Se espera encontrar lombrices hijas juveniles de diferentes tamaños y cocones.

Para determinar el crecimiento de las lombrices adultas, estas se retiraron de cada frasco a los 28 días de iniciado el experimento, se limpiaron con agua destilada para quitar restos de suelo y se dejaron en un papel de filtro con humedad durante 3 horas para que eliminaran el contenido gastrointestinal. Durante estos procedimientos se observó el comportamiento de las lombrices y se registró cualquier anomalía, en caso de que faltara alguna se consideró muerta asumiendo que se descompuso previo al conteo. Posteriormente se registró el peso de las lombrices.

Las mediciones fueron:

- Peso inicial (g) de 10 lombrices.
- Peso final (g) de las lombrices, a los 28 días de instalado el ensayo.

Con estos datos se calcularon los siguientes parámetros:

- Crecimiento (g) = Peso final <sub>28d</sub> (g) – Peso inicial (g).
- Crecimiento relativo (g) = Crecimiento (g) / Peso inicial (g).

Luego de extraer las lombrices se volvió a poner el suelo en los frascos, y estos en la cámara, para continuar con la prueba de reproducción.

A los 56 días se contabilizaron las lombrices juveniles y los cocones eclosionados y sin eclosionar que había en cada repetición. Para ello se colocaron los frascos en un baño maría a temperatura controlada. La temperatura comenzó a 40°C, se elevó a 50°C y finalizó en 60°C, permaneciendo 10 minutos en cada uno de los niveles. De esta forma las lombricillas subieron hacia la superficie y se aglomeraron buscando menores temperaturas, lo que facilitó su colecta. Posteriormente se vació cada frasco en un tamiz de 2 mm, y con el lavado del sustrato se retuvieron los cocones en el tamiz, como se aprecia en la figura No. 3. Se contabilizaron diferenciando los eclosionados de los no eclosionados.



Figura No. 3. Fotografía del conteo de cocones, una vez tamizado el suelo artificial de cada frasco

Mediciones:

- Conteo de lombrices juveniles (hijas).
- Conteo de cocones eclosionados.
- Conteo de cocones sin eclosionar.

Con la información obtenida se calcularon los parámetros:

- Tasa de eclosión =  $\text{Cocones eclosionados} / \text{Cocones totales}$ .
- Potencial de proliferación =  $\text{Juveniles} + \text{Cocones sin eclosionar} \times (\text{Juveniles} / \text{Cocones eclosionados})$ .

#### 3.1.1.7. Diseño experimental

El ensayo 1 consistió en 14 tratamientos con 5 repeticiones cada uno, organizados en un diseño de bloques completos al azar (DBCA). Los bloques correspondieron a diferente ubicación dentro de la cámara, que pudieran traducirse en diferencias en las condiciones de luz y/o temperatura.

La unidad experimental es el frasco de vidrio, con capacidad de 1 L, en donde se depositan 10 lombrices adultas en el suelo artificial tratado.

El modelo estadístico utilizado para DBCA es:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \rho_j + \varepsilon_{ij}$$

$$i = 1, 2, \dots, t$$

$$j = 1, 2, \dots, r$$

Donde:  $y_{ij}$  es el valor observado para  $i$  tratamiento y  $j$  bloque (repetición),  $\mu$  es la media del experimento,  $\tau_i$  es el valor del efecto del tratamiento  $i$ ,  $\rho_j$  es el valor del efecto del bloque  $j$  y  $\varepsilon_{ij}$  es el valor del efecto del error experimental.

Se consideran los siguientes supuestos: los efectos de los tratamientos y los efectos de los bloques son aditivos;  $\varepsilon_{ij}$  iid,  $N(0, \sigma^2)$ .

Las hipótesis estadísticas establecidas fueron:

Ho: no hay efecto de adyuvantes en el crecimiento y reproducción de *E. fetida*.

Ha: al menos uno de los adyuvantes tuvo efecto sobre el crecimiento o la reproducción de *E. fetida*.

#### 3.1.1.8. Procesamiento estadístico

Para el procesamiento estadístico de las variables estimadas se procesaron análisis de varianza, y siempre que se detectó efecto significativo de tratamientos se realizó el test de Tukey con probabilidad de cometer error de tipo 1 de 0,05. Mediante el test de Tukey se probó si las diferencias estimadas entre tratamientos eran significativas o si se debían a error experimental. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software InfoStat en su versión estudiantil.

#### 3.1.2. Ensayo 2 (test de evasión)

En este ensayo se evaluó el comportamiento de las lombrices al ser expuestas a los mismos 6 adyuvantes estudiados en el ensayo 1, aunque en este caso solo se evaluó 10 veces la dosis a campo (cuadro No. 3). En total se instalaron 8 tratamientos con 5 repeticiones cada uno.



### 3.1.2.1. Metodología de instalación

Los procedimientos para preparar el suelo artificial, los caldos y la selección de lombrices se realizaron en las mismas condiciones descritas para el ensayo 1.

En este caso se utilizaron recipientes con capacidad de 1,5 L de plástico, forrado con nylon para no contaminar los mismos, en donde se colocaron 400 g de suelo sin tratar en una mitad y 400 g de suelo tratado con adyuvante homogéneamente mezclado según el procedimiento de cuarteo en la otra mitad, como se muestra en la figura No. 4. Inicialmente se colocó un tabique para separar ambos sustratos, que previo a depositar las 10 lombrices adultas en la superficie, se retiró. Se ubicaron exactamente en la mitad del recipiente, y se esperó a que se sumergieran correctamente. Por último se colocó una tapa de papel film agujereado y se depositaron los tratamientos en la cámara durante 48 horas (ver figura No. 2).



Figura No. 4. Fotografía de una repetición del ensayo 2, con el tabique que se utilizó para dividir el suelo testigo del tratado

### 3.1.2.2. Determinaciones

Al cabo de 48 horas se retiraron los tratamientos de la cámara, con la ayuda de un tabique se dividió el suelo en dos mitades, y se contabilizaron las lombrices presentes a cada lado. En caso de haber dividido a un individuo con

el tabique, se consideró su ubicación en la porción de suelo que contenía el clitelo.

Mediciones:

- Conteo de lombrices adultas (No.), a las 48 horas de instalado el ensayo, en cada lado del recipiente.

### 3.1.2.3. Diseño experimental

En el ensayo 2 se instalaron 8 tratamientos con 5 repeticiones cada uno. Al igual que en el ensayo 1 los tratamientos se dispusieron en un diseño de bloques completos al azar.

La unidad experimental es el recipiente, en el que se depositan 10 lombrices, y que contiene la mitad de suelo tratado y la mitad de suelo sin tratar con adyuvante.

Modelo estadístico:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \rho_j + \varepsilon_{ij}$$

$$i = 1, 2, \dots, t$$

$$j = 1, 2, \dots, r$$

Supuestos: los efectos de los tratamientos y los efectos de los bloques son aditivos;  $\varepsilon_{ij}$  iid,  $N(0, \sigma^2)$ .

Hipótesis estadísticas:

Ho: no hay efecto de adyuvantes en el comportamiento de *E. fetida*.

Ha: existe efecto de al menos un adyuvante sobre el comportamiento de *E. fetida*.

### 3.1.2.4. Procesamiento de datos

Los resultados del ensayo de evasión se analizaron siguiendo tres criterios diferentes, a partir de la propuesta de distintos autores.

Tomando el criterio definido por Edwards y Bohlen (1996) se considera que existe evasión, en la unidad experimental, cuando el 80% del total de las lombrices se encuentra en la mitad de suelo sin tratar. Este comportamiento evasivo indica adversidad o toxicidad del sustrato tratado con adyuvante.



Por otro lado Natal da Luz et al. (2004) plantean que los resultados obtenidos en el ensayo deben ser procesados con análisis de varianza y las diferencias estudiadas con el test de Fisher ( $\alpha=0,05$ ). Comparando así la distribución de individuos obtenida en los tratamientos con agregado de adyuvante con el testigo el cual tiene una distribución de individuos de no evasión.

Loureiro et al. (2005) proponen realizar un análisis de varianza para la proporción de individuos que evaden por tratamiento. Para este análisis los datos se procesan mediante la siguiente ecuación:

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

Donde: E representa la proporción de individuos que evaden, N el total de individuos por repetición y T el número de individuos observados en el suelo tratado. Valores negativos de E representan comportamiento no evasivo.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos en los ensayos 1 y 2, de forma separada.

##### 4.1. ENSAYO 1

##### 4.1.1. Efectos en el crecimiento de *E. fetida*

En el ensayo 1 el ANAVA para la variable ganancia de peso (g) detectó efecto significativo de tratamiento ( $p < 0,0001$ ). Al procesar el test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) se comprobó que el único tratamiento que se diferencia de los restantes fue el tratamiento 2, el cual corresponde al control positivo (cuadro No. 4).

Cuadro No. 4. Ganancia media de peso (g) y tasa de crecimiento relativo, estimadas a los veintiocho días, de las diez lombrices por tratamiento, ordenadas de forma decreciente

TRATAMIENTO	GANANCIA MEDIA DE PESO (gramos)	TASA DE CRECIMIENTO RELATIVO
10	1,60 A	0,44 A
9	1,55 A	0,43 A
13	1,52 A	0,43 A
11	1,46 A	0,40 A
12	1,35 A	0,38 A
1	1,21 A	0,31 A
4	1,16 A	0,30 A
3	1,14 A	0,31 A
14	1,02 A	0,28 A
7	1,00 A	0,27 A
5	0,94 A	0,23 A
8	0,93 A	0,24 A
6	0,93 A	0,24 A
2	-1,32 B	-0,36 B

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

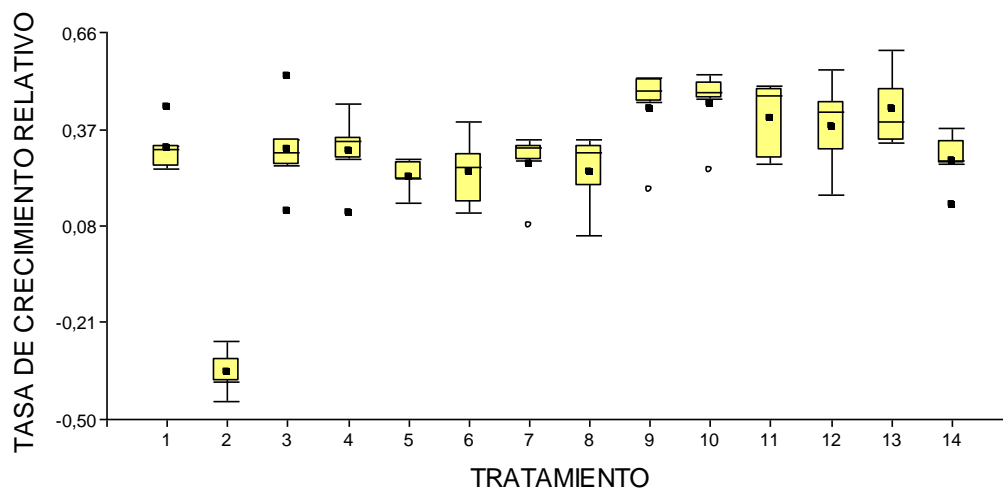
T1: Control negativo, T2= Control positivo, T3= Dusilán D1, T4= Dusilán D2, T5= Agral D1, T6= Agral D2, T7= Silwet D1, T8= Silwet D2, T9= Rizospray extremo D1, T10= Rizospray extremo D2, T11= Rizoil D1, T12= Rizoil D2, T13= Sulfato de amonio D1, T14= Sulfato de amonio D2.

Este resultado es el esperado ya que es dable encontrar que este tratamiento difiera en su crecimiento respecto al testigo, demostrando así la sensibilidad conocida, de la población de las lombrices.

Por otra parte, para los tratamientos en los que se aplicó algún adyuvante, tanto para los que se aplicó la dosis comercial como para los que tuvieron aplicaciones diez veces superiores a esta, no difirieron en su crecimiento respecto al testigo.

Como puede observarse en el cuadro No. 4 también se procesó análisis de varianza para la variable tasa de crecimiento relativo. Los resultados fueron similares a los obtenidos en la ganancia de peso, detectándose efecto de tratamiento solo atribuible a la disminución constatada en el caso del tratamiento 2.

La coincidencia de los resultados entre la tasa de crecimiento relativo y la ganancia de peso, tiene relación con que las lombrices utilizadas en los tratamientos cumplen determinadas características de peso y desarrollo, como se detalló en el capítulo de materiales y métodos. Por ende, los pesos iniciales de las lombrices de cada tratamiento son lo suficientemente homogéneos, justificando la concordancia en el estudio del crecimiento relativo de estos organismos.



T1= Control negativo, T2= Control positivo, T3= Dusilán D1, T4= Dusilán D2, T5= Agral D1, T6= Agral D2, T7= Silwet D1, T8= Silwet D2, T9= Rizospray extremo D1, T10= Rizospray extremo D2, T11= Rizoil D1, T12= Rizoil D2, T13= Sulfato de amonio D1, T14= Sulfato de amonio D2.

Figura No. 5. Box – plot de la tasa de crecimiento relativo (TCR), estimada a los veintiocho días, de las diez lombrices por tratamiento

Se volvió a correr un análisis de varianza para las mismas variables, sin el tratamiento 2, para disminuir el efecto de este tratamiento suponiendo que pudiera estar enmascarando diferencias en los restantes tratamientos. No se detectó efecto tratamiento en la variable ganancia de peso, pero si en la variable tasa de crecimiento relativo ( $p=0,0156$ ). Sin embargo, el test de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) no encontró diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, para esta última variable.

También se corrió un ANAVA para la variable tasa de crecimiento relativo transformada, utilizando la transformación  $\ln+1$ , pero tampoco en este caso fue posible detectar diferencias entre tratamientos, pese a que como puede observarse en el cuadro No. 4 el valor del tratamiento 10 es casi el doble que el del tratamiento 6.

Los análisis realizados permiten concluir que los adyuvantes tal como fueron ensayados no afectaron el crecimiento de las lombrices.

Cabe resaltar que para todos los estudios mencionados en la revisión, referidos al efecto de adyuvantes en el crecimiento, este tuvo lugar únicamente con dosis elevadas. No se encontraron citas de ensayos que probaran dosis similares a las que se utilizaron en el presente estudio.

Asimismo se destaca que tampoco se encontraron trabajos que estudiaran el potencial efecto tóxico de adyuvantes en lombrices.

#### 4.1.2. Efectos en la reproducción de *E. fetida*

Como era esperable no se registraron lombrices juveniles ni cocones en el tratamiento 2, esto permite afirmar que la reproducción se vio totalmente inhibida en el mismo. Por ende, no se tuvo en cuenta este tratamiento en ninguno de los análisis estadísticos presentados a continuación.

Considerando los restantes tratamientos, para la variable número de lombrices hijas se corrió un análisis de varianza que detectó efecto tratamiento ( $p=0,0197$ ). Se destaca como única diferencia estadísticamente significativa en el test de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), a la obtenida entre los tratamientos 5 y 10. Donde el tratamiento 5 registró el máximo número medio de lombrices hijas y el tratamiento 10 el mínimo (cuadro No. 5). Sin embargo ningún tratamiento se diferenció del testigo, cuyo comportamiento en la variable analizada fue intermedio.

Cuadro No. 5. Número medio de lombrices hijas al cabo de cincuenta y seis días, por tratamiento, en orden decreciente, exceptuando al tratamiento 2

TRATAMIENTO	NÚMERO DE LOMBRICES HIJAS
5	165,80 A
4	147,00 A B
6	138,40 A B
8	133,40 A B
12	130,40 A B
3	129,80 A B
7	128,60 A B
1	125,40 A B
14	114,20 A B
13	112,20 A B
11	111,60 A B
9	107,40 A B
10	97,20 B

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

T1: Control negativo, T3= Dusilán D1, T4= Dusilán D2, T5= Agral D1, T6= Agral D2, T7= Silwet D1, T8= Silwet D2, T9= Rizospray extremo D1, T10= Rizospray extremo D2, T11= Rizoil D1, T12= Rizoil D2, T13= Sulfato de amonio D1, T14= Sulfato de amonio D2.

Posteriormente también se analizaron estadísticamente las variables cocones totales, cocones sin eclosionar y cocones eclosionados. Para ninguna de estas tres variables se detectó efecto de tratamiento ( $p=0,2378$ ;  $p=0,7308$ ;  $p=0,1337$  respectivamente).

Para la variable tasa de eclosión tampoco fue posible detectar efectos, sin embargo la variable potencial de proliferación si mostró efecto de tratamiento ( $p=0,0399$ , cuadro No. 6).

Cuadro No. 6. Medias calculadas de potencial de proliferación por tratamiento, exceptuando al tratamiento 2, en orden decreciente

TRATAMIENTO	POTENCIAL DE PROLIFERACIÓN
5	175,24 A
4	160,56 A B
8	150,05 A B
6	149,93 A B
7	146,38 A B
3	143,89 A B
12	142,60 A B
1	137,35 A B
14	127,28 A B
13	126,70 A B
11	125,69 A B
9	118,02 A B
10	109,86 B

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

T1: Control negativo, T3= Dusilán D1, T4= Dusilán D2, T5= Agral D1, T6= Agral D2, T7= Silwet D1, T8= Silwet D2, T9= Rizospray extremo D1, T10= Rizospray extremo D2, T11= Rizoil D1, T12= Rizoil D2, T13= Sulfato de amonio D1, T14= Sulfato de amonio D2.

Como se observa, se detectó diferencia entre el tratamiento 5 y el 10. No obstante, ningún tratamiento se diferencia significativamente del tratamiento 1, correspondiente al testigo.

Puesto que la mayoría de las variables reproductivas analizadas en este ensayo no presentaron efecto tratamiento en sus análisis de varianzas, y que aquellas variables en las que sí se detectó efecto en el ANAVA no tuvieron diferencias significativas respecto al testigo en el test de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), se podría afirmar que la reproducción de las lombrices no se vio afectada por el agregado de los adyuvantes utilizados, a las dosis aplicadas y en el período de tiempo ensayado.

Si bien no se encontraron antecedentes de estudios que evaluaran la reproducción de lombrices frente a adyuvantes, Ma et al. (2004) determinaron en sus ensayos que existe una interferencia por parte de estos sobre la reproducción de bacterias y organismos unicelulares; siendo algunos de los adyuvantes ensayados similares a los usados en el presente estudio. Sin embargo, la interferencia se registra a concentraciones muy superiores a las utilizadas en el presente ensayo

Considerando conjuntamente los resultados a nivel de crecimiento y reproducción puede afirmarse que existe coincidencia con lo sostenido por Krogh et al. (2003), quienes alegan que los adyuvantes poseen escasa toxicidad en los organismos.

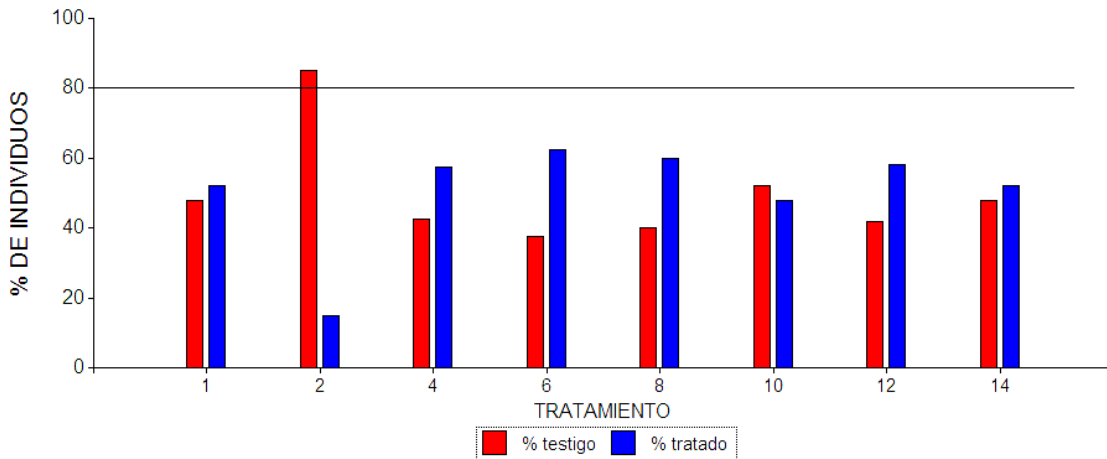
Por otra parte, resulta destacable el comportamiento del tratamiento 10, que resulta con la mayor ganancia de crecimiento pero la menor tasa reproductiva, señalando respuestas de sentido inverso. Al respecto nos interesa mencionar que esta tendencia ya fue observada en un estudio similar, en el que se ensayaron los efectos de herbicidas en la reproducción y crecimiento de *E. fetida* (Fernández y García, 2019).

Por último, es importante mencionar que no fue posible detectar diferencias entre dosis, resultando los efectos de todos los adyuvantes similares a la dosis 1 y a la dosis 10.

## 4.2. ENSAYO 2

### 4.2.1. Efectos en el comportamiento de *E. fetida*

Considerando el criterio sugerido por Edwards y Bohlen (1996), el tratamiento 2 es el único que presenta comportamiento de evasión dada su distribución promedio de lombrices superior al 80% hacia la mitad de sustrato sin tratar. Este resultado era esperable dado el conocido efecto adverso del ácido bórico hacia las lombrices. Adicionalmente, ninguno de los tratamientos con agregado de adyuvante evidencia comportamiento de evasión por parte de *E. fetida* (figura No. 6).



T1: Control negativo, T2= Control positivo, T4= Dusilán D2, T6= Agral D2, T8= Silwet D2, T10= Rizospray extremo D2, T12= Rizoil D2, T14= Sulfato de amonio D2.

Figura No. 6. Cantidad de lombrices (%) observadas en sustrato tratado y sin tratar, al cabo de 48 horas, por tratamiento

En los restantes tratamientos del ensayo hubo una distribución en torno al 50% de organismos a cada lado de la unidad experimental. En los tratamientos 4, 6, 8 y 12 hubo incluso un mayor número medio de lombrices en el sustrato tratado con adyuvante. Por ende se puede constatar que no hubo evasión de *E. fetida* en respuesta a los adyuvantes aplicados en sus respectivas dosis.

Siguiendo la línea de análisis propuesta por Natal da Luz et al. (2004) se realizó un ANAVA para la variable porcentaje de lombrices en suelo tratado, para los 6 tratamientos con agregado de adyuvante y el tratamiento 1. No se detectó efecto de tratamiento ( $p=0,8596$ ), tampoco con este análisis logró detectarse efecto de los adyuvantes en el comportamiento de *E. fetida*.

Igual ocurrió cuando se analizó la proporción de individuos utilizando la metodología propuesta por Loureiro et al. (2005,  $p=0,8596$ ).

Los resultados difieren con los obtenidos por De Santo et al. (2018), quienes constataron comportamiento de evasión en un estudio realizado con lombrices, utilizando un adyuvante a dosis similares a las aplicadas en el presente ensayo. No obstante, el adyuvante que estos autores utilizan es aceite mineral, el cual no es ensayado en este caso.



Por otra parte, también Marques et al. (2009) lograron constatar efecto de adyuvantes en el comportamiento de *E. andreii*, aunque con dosis más elevadas a las utilizadas en el presente estudio. En dosis comparables no se observó evasión.

#### 4.3. CONSIDERACIONES FINALES

Considerando las discrepancias entre estos resultados y algunos que figuran en la revisión bibliográfica, las que parecen tener su mayor explicación en las dosis ensayadas, podría resultar de interés el estudio de la dosis a partir de la cual los adyuvantes no presentan efecto tóxico para *E. fetida*.

Además en consideración de los presentes resultados y de la revisión, debería continuarse con estudios que contemplaran los efectos de la mezcla de herbicidas con adyuvantes. Así como se conoce que algunos adyuvantes modifican la acción herbicida del formulado, debería conocerse cuales y en que magnitud también modifican la efectos tóxicos.

## 5. CONCLUSIONES

La consideración conjunta de todos los parámetros analizados permite concluir que los adyuvantes utilizados, a las dosis utilizadas y por el período de tiempo ensayado, no interfieren o modifican el crecimiento, la reproducción y el comportamiento de *E. fetida*.

## 6. RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Malherbología de la Estación Experimental "Mario A. Cassinoni" de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay. Ubicado en el departamento de Paysandú, ruta 3 km 363, durante el período de febrero a marzo de 2017. El objetivo fue estudiar el efecto de 6 adyuvantes de uso agrícola en el crecimiento, reproducción y comportamiento de la lombriz de tierra *Eisenia fetida*. Los adyuvantes utilizados fueron Dusilan SP, Agral 90, Silwet L\*AG, Rizospray extremo, Rizo Oil y sulfato de amonio, cada uno evaluado en su dosis recomendada comercialmente y diez veces esta dosis. A tales efectos fueron instalados dos ensayos. En el ensayo 1 se estudió el crecimiento y la reproducción de las lombrices durante 4 semanas. Para esto se instalaron doce tratamientos, con cinco repeticiones cada uno, agregando los adyuvantes en las dosis estipuladas, un tratamiento control negativo y un tratamiento control positivo en el que se utilizó ácido bórico. Los indicadores fueron ganancia de peso (g), tasa de crecimiento relativo, número de lombrices hijas, número de cocones, número de cocones eclosionados, número de cocones sin eclosionar, potencial de proliferación y tasa de eclosión. En el ensayo 2 se midió el comportamiento evasivo de la lombriz hacia los adyuvantes, durante un período de 48 horas. Se realizaron seis tratamientos, con cinco repeticiones cada uno, aplicando adyuvante a diez veces la dosis comercial, un tratamiento control negativo y un tratamiento control positivo donde también se utilizó ácido bórico. Los indicadores de este ensayo fueron porcentaje de lombrices en sustrato testigo y un indicador de evasión. La consideración conjunta de todos los biomarcadores analizados permite concluir que los adyuvantes utilizados, a las dosis utilizadas y por el período de tiempo ensayado, no interfieren o modifican el crecimiento, la reproducción y el comportamiento de *E. fetida*.

Palabras clave: Lombriz; *Eisenia fetida*; Ecotoxicidad; Adyuvantes.

## 7. SUMMARY

The present study was carried out in the Laboratory of Malherbology of the Experimental Station "Mario A. Cassinoni" of the Faculty of Agronomy, Republic University, Uruguay. Located in the department of Paysandú, highway 3 km 363, from February to March 2017. The objective was to study the effect of 6 adjuvants for agricultural use on the growth, reproduction and behavior of the earthworm *Eisenia fetida*. The adjuvants used were Dusilan SP, Agral 90, Silwet L \* AG, Extreme Rizospray, Rizo Oil and ammonium sulfate, each evaluated in its commercially recommended dose and ten times this dose. For this purpose, two tests were installed. In trial 1 the growth and reproduction of earthworms was studied for 4 weeks. For this, twelve treatments were installed, with five repetitions each, adding the adjuvants in the stipulated doses, a negative control treatment and a positive control treatment in which boric acid was used. The indicators were weight gain (g), relative growth rate, number of earthworm daughters, number of cocoons, number of cocoons hatched, number of non-hatching cocoons, proliferation potential and hatching rate. In trial 2 the evasive behavior of the earthworm towards the adjuvants was measured during a period of 48 hours. Six treatments were performed, with five repetitions each, applying adjuvant to ten times the commercial dose, a control treatment and a "positive control" treatment where boric acid was also used. The indicators of this test were the percentage of earthworms in the control substrate and an evasion indicator. The joint consideration of all the biomarkers analyzed allows us to conclude that the adjuvants used, at the doses used and for the period of time tested, do not interfere or modify the growth, reproduction and behavior of *E. fetida*.

Key words: Earthworm; *Eisenia fetida*; Ecotoxicity; Adjuvants.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alas, R. C.; Alvarenga, A. M. R. 2002. Evaluación de sustratos de origen animal y vegetal en la producción de humus y carne de lombriz (*Eisenia foetida*). Tesis Ing. Arg. San Salvador, El Salvador. Universidad de El Salvador. Facultad de Ciencias Agronómicas. 82 p.
2. Alejo, A. P.; Romero, Á. H. H.; Luna, J. L.; Díaz, M. D. C. C. 2012. Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con lombrices. In: Cuevas, M. del C.; Espinosa, G.; Ilizaliturri, C. A.; Mendoza, A. eds. Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos. México, INE. pp. 47-86.
3. Baillie, A. J.; Al-Assadi, H.; Florence, A. T. 1989. Influence of non-ionic surfactant structure on motility inhibition of *Tetrahymena ellioti*: a model for surfactant-membrane interactions. International Journal of Pharmaceutics. 53(3): 241-248.
4. Beixing, L.; Jin, L.; Xiuyu, P.; Hua, L.; Xiuhuan, L.; Feng, L.; Wei, M. 2018. Binary mixtures of alcohol ethoxylates, nonylphenol ethoxylates and pesticides exhibit comparative bioactivity against three pests and toxicological risks to aquatic organisms. (en línea). Chemosphere. 204: 44-50. Consultado 13 oct. 2018. Disponible en [doi:10.1016/j.chemosphere.2018.04.034](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.034)
5. Bolaños Espinoza, A.; Rosas Meza, A. 1991. Efecto de cinco surfactantes en la actividad herbicida del glifosato. In: Congreso Nacional de la Ciencia de la Maleza (12º., 1991, Acapulco, Guerrero, México). Memorias. Acapulco, Somecima. p. 54.
6. Brami, C.; Glover, A. R.; Butt, K. R.; Lowe, C. N. 2017. Effects of silver nanoparticles on survival, biomass change and avoidance behaviour of the endogeic earthworm *Allolobophora chlorotica*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 141: 64-69.
7. Buch, A. C.; Brown, G. G.; Niva, C. C.; Sautter, K. D.; Sousa, J. P. 2013. Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972). Applied Soil Ecology. 69: 32-38.
8. Calister, UY. 2009. Ficha de datos de seguridad (FDS), potenciador líquido. (en línea). Canelones, Uruguay. 7 p. Consultado 10 oct.

2018. Disponible en <http://www.calister.com.uy/wp-content/uploads/2017/10/FDS-POTENCIADOR-L%C3%8DQUIDO.pdf>

9. Coleman, D. C.; Crossley, D. A.; Hendrix, P. F. 2004. Fundamentals of soil ecology. San Diego, Elsevier. 386 p.
10. Corra, L. 2009. Herramientas de capacitación para el manejo responsable de plaguicidas y sus envases: efectos sobre la salud y prevención de la exposición. Buenos Aires, OPS (Organización Panamericana de la Salud). s.p.
11. Cristales, O. 1997. Sistema de crianza de lombriz de tierra. Alternativas de su uso, para el manejo de los desechos sólidos. Fundación para el fomento de empresas para la recolección y tratamiento ambiental de los desechos sólidos. San Salvador, El Salvador, ABA. s.p.
12. Cserhádi, T. 1995. Alkyl ethoxylated and alkylphenol ethoxylated nonionic surfactants: interaction with bioactive compounds and biological effects. *Environmental Health Perspectives*. 103(4): 358-364.
13. De Santo, F. B.; Ramos, G. A.; Ricardo, A. M.; Marchioro, C. A.; Niemeyer, J. C. 2018. Screening effects of metsulfuron-methyl to collembolans and earthworms: the role of adjuvant addition on ecotoxicity. (en línea). *Environmental Science and Pollution Research*. 25: 24143-24149. Consultado 24 ago. 2018. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2481-5>
14. Dignac, M. F.; Derrien, D.; Barré, P.; Barot, S.; Cécillon, L.; Chenu, C.; Chevallier, T.; Freschet, G. T.; Garnier, P.; Guenet, B.; Hedde, M.; Klumpp, K.; Lashermes, G.; Maron, P.; Naoise Nunan, N.; Roumet, C.; Basile-Doelsch, I. 2017. Increasing soil carbon storage: mechanisms, effects of agricultural practices and proxies. A review. (en línea). *Agronomy for Sustainable Development*. 37(2): p. irr. Consultado 13 oct. 2018. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0421-2>
15. 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. Environmental Technology Center. s.p.

16. Edwards, C. A. 1973. Persistent pesticides in the environment. 2<sup>nd</sup>. ed. Cleveland, Ohio, CRC. 170 p.
17. \_\_\_\_\_; Lofty, J. R. 1977. Biology of earthworms. 2<sup>nd</sup>. ed. New York, Wiley. s.p.
18. \_\_\_\_\_; Bohlen, P. J. 1992. The effects of toxic chemicals on earthworms. In: Ware, G. W. ed. Reviews of environmental contamination and toxicology. New York, Springer. v. 125, pp. 23-99.
19. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 1996. Biology and ecology of earthworms. 3<sup>rd</sup>. ed. London, UK, Chapman and Hall. 119 p.
20. EPA (Environmental Protection Agency, US). 2010. Overview of Risk Assessment in the Pesticide Program. (en línea). Washington, D. C. s.p. Consultado 23 set. 2018. Disponible en <http://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/overview-risk-assessment-pesticide-program>
21. Escudero, J. G.; Lagerlöf, J. E.; Martínez Debat, C.; Míguez, D.; Pérez, C. A. 2017. Las lombrices como potencial controlador biológico de *Fusarium graminearum* en sistemas agrícolas. In: Simposio Nacional de Agricultura (5°. , 2017, Montevideo, Uruguay). Al futuro, no alcanza con llegar. Montevideo, Hemisferio Sur. pp. 171-186.
22. Esqueda - Esquivel, V. A. 2008. Efecto del aceite mineral Agratex-HE en el control de malezas en caña de azúcar. *Agronomía Mesoamericana*. 19(1): 93-98.
23. Fernández, G.; García, I. 2019. Impact of diclosulam, paraquat, glyphosate, metsulfuron and its mixtures on growth and reproduction of *Eisenia fetida*. In: SETAC European Annual Meeting (29<sup>th</sup>. , 2019, Helsinki, Finlandia). Short Abstracts. Helsinki, SETAC. p.388.
24. Fragoso, C.; Kanyonyo, J.; Moreno, A.; Senapati, B. K.; Blanchart, E.; Rodriguez, C. 1999. A survey of tropical earthworms: taxonomy, biogeography and environmental plasticity. In: Lavelle, P.; Brussaard, L.; Hendrix, P. eds. Earthworm Management in Tropical Agroecosystems. Wallingford, CABI. pp. 1-26.

25. Frihauf, J. C.; Stahlman, P. W.; Geier, P. W. 2010. Winter wheat and weed response to postemergence saflufenacil alone and in mixtures. (en línea). *Weed Technology*. 24(3): 262-268. Consultado 14 nov. 2018. Disponible en [https://www.jstor.org/stable/40801434?seq=1&cid=pdf-reference#references\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/40801434?seq=1&cid=pdf-reference#references_tab_contents)
26. Fründ, H. C.; Graefe, U.; Tischer, S. 2011. Earthworms as bioindicators of soil quality. *In*: Karaca, A. ed. *Biology of earthworms*. Hamburg, Springer. pp. 261-278.
27. Goats, G. C.; Edwards, C. A. 1988. Prediction of field toxicity of chemicals to earthworms by laboratory methods. *In*: Edwards, C. A.; Neuhauser, E. F. eds. *Earthworms in waste and environmental management*. The Hague, SPB. cap. 8, pp. 283-294.
28. Gómez, A. P. 2014. Evaluación de la Toxicidad de suelos mediante un bio-ensayo con la lombriz de tierra *Eisenia fetida*. Tesis Magíster en Ingeniería Ambiental. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. 102 p.
29. Hawksworth, D. L.; Colwell, R. R. 1992. Microbial diversity 21: biodiversity amongst microorganisms and its relevance. (en línea). *Biodiversity & Conservation*. 1(4): 221-226. Consultado 19 oct. 2018. Disponible en <https://doi.org/10.1007/BF00693760>
30. \_\_\_\_\_; Iturriaga, T.; Crespo, A. 2005. Líquenes como bioindicadores inmediatos de contaminación y cambios medio-ambientales en los trópicos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 22(2): 71-82.
31. Hamilton, W. E.; Dindal, D. L. 1989. Influence of earthworms and leaf litter on edaphic variables in sewage-sludge-treated soil microcosms. *Biology and Fertility of Soils*. 7(2): 129-133.
32. Hernández, L. 2014. Estudios ecotoxicológicos en diferentes bioindicadores ambientales del bioplaguicida Tricosave-34. Tesis Ing. Agr. Santa Clara, Cuba. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 76 p.
33. Hochberg, E. G. 1996. The Market for Agricultural Pesticide. *In*: Foy, C. L.; Pritchard D. W. eds. *Pesticide formulation and adjuvant technology*. New York, CRC. v. 15, pp. 203-208.



34. ISO (International Standard Organization, CH). 2008. Soil quality-avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior - Part 1: test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia Andrei*). Geneva, Switzerland. 25 p.
35. Krogh, K. A.; Halling-Sørensen, B.; Mogensen, B. B.; Vejrup, K. V. 2003. Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere*. 50(7): 871-901.
36. Kucharski, M. 2007. Impact of adjuvants on: phenmedipham, desmedipham and ethofumesate residues in soil and plant. *Pestycydy*. 3(4): 53-59.
37. Kutt, E. C.; Martin, D. F. 1974. Effect of selected surfactants on the growth characteristics of *Gymnodinium breve*. *Marine Biology*. 28(4): 253-259.
38. 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.
39. Lowe, C. N.; Butt, K. R.; Cheynier, K. Y. M. 2016. Assessment of avoidance behaviour by earthworms (*Lumbricus rubellus* and *Octolasion cyaneum*) in linear pollution gradients. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 124: 324-328.
40. Ma, J.; Lin, F.; Zhang, R.; Yu, W.; Lu, N. 2004. Differential sensitivity of two green algae, *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris*, to 14 pesticide adjuvants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 58(1): 61-67.
41. Marques, C.; Pereira, R.; Gonçalves, F. 2009. Using earthworm avoidance behaviour to assess the toxicity of formulated herbicides and their active ingredients on natural soils. *Journal of Soils and Sediments*. 9(2): 137-147.
42. MGAP. DGSSAA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Servicios Agrícolas, UY). 2012. Fóm. 235: etiqueta aprobada de producto fitosanitario, Agral 90. (en línea). Montevideo, Uruguay. 5 p. Consultado 11 oct. 2018. Disponible en <https://www.mgap.gub.uy/profit/viewproductos.aspx?EWX944YlcB7ByyJkJ80log==>

43. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2015. Fórm. 235: etiqueta aprobada de producto fitosanitario, RizoOil. (en línea). Montevideo, Uruguay. 5 p. Consultado 11 oct. 2018. Disponible en <https://www.mgap.gub.uy/profit/viewproductos.aspx?GQVD6y6VCvb7xf2SGEi3rw==>
44. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2017a. Fórm. 235: etiqueta aprobada de producto fitosanitario, Dusilan SP. (en línea). Montevideo, Uruguay. 5 p. Consultado 10 oct. 2018. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/profit/viewproductos.aspx?nMp2c6d3i01PfBTESXEBLQ==>
45. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2017b. Fórm 235: etiqueta aprobada de producto fitosanitario, Silwet L AG. (en línea). Montevideo, Uruguay. 6 p. Consultado 11 oct 2018. Disponible en <https://www.mgap.gub.uy/profit/viewproductos.aspx?v2J5eMfutb2BvMhyucOWfQ==#General>
46. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2017c. Fórm. 235: etiqueta aprobada de producto fitosanitario, Sulfato de amonio. (en línea). Montevideo, Uruguay. 5 p. Consultado 10 oct. 2018. Disponible en <https://www.mgap.gub.uy/profit/viewproductos.aspx?9emiNtTfWVoFSeBcThPNfg==>
47. Natal da Luz, T.; Ribeiro, R.; Sousa, J. P. 2004. Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23(9): 2188-2193.
48. Neuhauser, E. F.; Malecki, M. R.; Loehr, R. C. 1984. Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* after exposure to sublethal concentrations of metals. *Pedobiologia*. 27(2): 89-97.
49. Nobels, I.; Spanoghe, P.; Haesaert, G.; Robbens, J.; Blust, R. 2011. Toxicity ranking and toxic mode of action evaluation of commonly used agricultural adjuvants on the basis of bacterial gene expression profiles. (en línea). *PLoS One*. 6(11): e24139. Consultado 12 set. 2018. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024139>
50. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development, FR). 1984. Test no. 207: earthworm, Acute Toxicity Tests, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. (en línea).

Paris. 9 p. Consultado 8 oct. 2018. Disponible en <https://doi.org/10.1787/9789264070042-en>.

51. \_\_\_\_\_. 2004. Guideline for the testing of chemicals 222, Earthworm Reproduction test (*Eisena fetida/Eisenia andrei*). Paris. 18 p.
52. Ongley, E. D. 1997. Control of water pollution from agriculture. Burlington, CA, Water Collaborating Centre. 107 p.
53. Paoletti, M. G. 1999. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. Agriculture, Ecosystems and Environment. 74 (1-3): 137-155.
54. Papa, J. C. 2011. Efecto de distintos coadyuvantes sobre la eficacia de la mezcla glifosato más saflufenacil para el control de rama negra (*Conyza bonariensis*) en barbecho químico. INTA. Cultivos Estivales. 46: 119-124.
55. Pelosi, C.; Barot, S.; Capowiez, Y.; Hedde, M.; Vandenbulcke, F. 2014. Pesticides and earthworms: a review. (en línea). Agronomy for Sustainable Development. 34(1): 199-228. Consultado 28 set. 2018. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0151-z>
56. Peterson, D. E.; Thomson, C. R.; Regehr, D. L.; Al-Khatib, K. 2001. Herbicide mode of action. Kansas State University. Extension Publication. C-715. 24 p.
57. Piola, L. 2011. Ensayos ecotoxicológicos para la evaluación del impacto de plaguicidas en suelos agrícolas de Argentina. Tesis Dr. en Química Biológica. Buenos Aires, Argentina. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 202 p.
58. \_\_\_\_\_.; Fuchs, J.; Oneto, M. L.; Basack, S.; Kesten, E.; Casabé, N. 2013. Comparative toxicity of two glyphosate-based formulations to *Eisenia andrei* under laboratory conditions. Chemosphere. 91(4): 545-551.
59. Rabuñade, M. L. 2015. Fitosanitarios, importaciones 2015. (en línea). Montevideo, MGAP. DGSSAA. 7 p. Consultado 4 feb. 2019. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/direccion-general-de-servicios-agricolas/tramites-y-servicios/servicios/datos>

60. Ramsey, R. J. L.; Stephenson, G. R.; Hall, J. C. 2006. Effect of humectants on the uptake and efficacy of glufosinate in wild oat (*Avena fatua*) plants and isolated cuticles under dry conditions. *Weed Science*. 54(2): 205-211.
61. Ratte, H. T.; Hammers-Wirtz, M.; Cleuvers, M. 2003. Ecotoxicity testing. In: Markert, B. A.; Breure, A. M.; Zechmeister H. G. eds. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment: Bioindicators & Biomonitoring: Principles, Concepts and Applications*. Oxford, UK, Elsevier. cap. 6, pp. 221-256.
62. Reddy, K. N.; Singh, M. 1992. Organosilicone adjuvant effects on glyphosate efficacy and rainfastness. *Weed Technology*. 6(2): 36-65.
63. Ríos, Y. 2005. Importancia de las lombrices en la agricultura. In: Ríos, Y. ed. *Sistemas integrados de producción con no rumiantes*. Barquisimeto, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Decanato de Agronomía. Cátedra de Zoología Agrícola. pp. 47-52.
64. Rizobacter, AR. 2017a. Ficha de datos de seguridad, Rizoil. (en línea). Buenos Aires, Argentina. 9 p. Consultado 10 oct. 2018. Disponible en <https://www.rizobacter.com/sites/default/files/2018-09/FDS%20-%20RIZO%20OIL.pdf>
65. \_\_\_\_\_. 2017b. Ficha de datos de seguridad, Rizospray extremo. (en línea). Buenos Aires, Argentina. 9 p. Consultado 10 oct. 2018. Disponible en <https://www.rizobacter.com.ar/sites/default/files/2018-12/RIZOSPRAY%20EXTREMO.pdf>
66. \_\_\_\_\_. 2018. Ficha de datos de seguridad, Silwet L AG. (en línea). Buenos Aires, Argentina. 10 p. Consultado 10 oct. 2018. Disponible en <https://rizobacter.com.ar/sites/default/files/2018-12/SILWET%20L%20AG.pdf>
67. Roggenbuck, F. C.; Penner, D.; Burow, R. F.; Thomas, B. 1993. Study of the enhancement of herbicide activity and rainfastness by an organosilicone adjuvant utilizing radiolabelled herbicide and adjuvant. *Pesticide Science*. 37(2):121-125.

68. Römbke, J.; Sousa, J. P.; Schouten, T.; Riepert, F. 2006. Monitoring of soil organisms: a set of standardized field methods proposed by ISO. *European Journal of Soil Biology*. 42: 61-64.
69. Storer, T. 1951. *General Zoology*. 2<sup>nd</sup>. ed. New York, McGraw-Hill. 832 p.
70. Surgan, M.; Condon, M.; Cox, C. 2010. Pesticide risk indicators: unidentified inert ingredients compromise their integrity and utility. *Environmental Management*. 45(4): 834-841.
71. Syngenta, ES. 2012. Ficha técnica Agral. (en línea). Madrid, España. 4 p. Consultado 11 oct. 2018. Disponible en <http://agroquimicoscarlosarmas.com/productos/8-agral.pdf>
72. \_\_\_\_\_. 2018. Ficha de datos de seguridad, Agral. (en línea). Madrid, España. 13 p. Consultado 11 oct. 2018. Disponible en <https://www.syngenta.es/sites/g/files/zhg516/f/ficha-seguridad-agral.pdf?token=1517325256>
73. Tampa, UY. 2016. Ficha de datos de seguridad, Dusilan SP. (en línea). Montevideo, Uruguay. 8 p. Consultado 10 oct. 2018. Disponible en <http://www.agrotampa.com/pdfs/DUSILANSP.pdf>
74. Tripathi, G.; Bhardwaj, P. 2004. Comparative studies on biomass production, life cycles and composting efficiency of *Eisenia fetida* (Savigny) and *Lampito mauritii* (Kinberg). *Bioresource Technology*. 92(3): 275-283.
75. Truhaut, R. 1975. Ecotoxicology, a New Branch of Toxicology: a General Survey of its Aims Methods, and Prospects. (en línea). In: McIntyre, A. D.; Mills C. F. eds. *Ecological Toxicology Research*. Boston, Springer. pp. 3-23. Consultado 5 feb. 2019. Disponible en [https://doi-org.proxy.timbo.org.uy:88/10.1007/978-1-4615-8945-7\\_1](https://doi-org.proxy.timbo.org.uy:88/10.1007/978-1-4615-8945-7_1)
76. Urzúa Soria, F.; Sánchez Barriga, A. 1991. Surfactantes en la porción biológica de herbicidas postemergentes en invernadero y campo. In: Congreso Nacional de la Ciencia de la Maleza (12<sup>o</sup>., 1991, Acapulco, Guerrero, México). Memorias. Acapulco, Somecima. p. 58.
77. Van Gestel, C. A. M.; Van Dis, W. A.; Van Breemen, E. M.; Sparenburg, P. M. 1989. Development of a standardized reproduction toxicity

test with the earthworm species *Eisenia fetida andrei* using copper, pentachlorophenol, and 2, 4-dichloroaniline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 18(3): 305-312.

78. Van Leemput, L.; Swysen, E.; Woestenborghs, R.; Michielsen, L.; Meuldermans, W.; Heykants, J. 1989. On the terrestrial toxicity of the fungicide imazalil (enilconazole) to the earthworm species *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 18(3): 313-320.
79. Xiao, N. W.; Song, Y.; Ge, F.; Liu, X. H.; Ou-Yang, Z. Y. 2006. Biomarkers responses of the earthworm *Eisenia fetida* to acetochlor exposure in OECD soil. *Chemosphere*. 65(6): 907-912.
80. Yamane, A. N.; Okada, M.; Sudo, R. 1984. The growth inhibition of planktonic algae due to surfactants used in washing agents. *Water Research*. 18(9): 1101-1105.
81. Young, S. 1984. Glyphosate plus adjuvants. *Horticultural Abstracts*. 54 (6): 305-319.