



Efectos individuales y en mezclas de glifosato y clorpirifos sobre organismos indicadores en un ecosistema a pequeña escala

Effects of glyphosate and chlorpyrifos applied alone and in combination on indicator organisms in a small-scale ecosystem

Efeitos individuais e de mistura de glyphosate e clorpirifos em organismos indicadores em um ecossistema de pequena escala

Carla Salvio^{1*}, Juan Amand de Mendieta¹, Alicia Noemí López¹ y Pablo Luis Manetti¹

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata – Unidad Integrada Balcarce. Ruta 226 km 73,5, Balcarce, Buenos Aires, Argentina CP: 7620.

salvio.carla@inta.gob.ar

DOI: <https://doi.org/10.35305/agro39.e020>

Recibido: 13/10/2021 Aceptado 06/06/2022

Resumen

Se evaluó el efecto individual y en mezclas de glifosato y clorpirifos sobre *Octolasion cyaneum*, *Porcellio scaber* y *Brassica napus*. La unidad experimental consistió en un cilindro de PVC con 3 kg de suelo y se introdujeron 10 individuos de *O. cyaneum*, 8 de *P. scaber* y 10 semillas de *B. napus*. Los tratamientos fueron: 960, 4800 y 9600 g de glifosato ha⁻¹, 576, 2880 y 5760 g de clorpirifos ha⁻¹ y sus combinaciones. El diseño fue completamente aleatorizado con 6 repeticiones y el bioensayo se realizó en una cámara a 20±2 °C y con un fotoperiodo de 14 h de luz: 10 h de oscuridad. A los 28 días después de la aplicación (DDA) de los agroquímicos, el número de *O. cyaneum* vivas no varió entre los tratamientos (p = 0,307). Los porcentajes mayores de daños sobre *O. cyaneum* se hallaron con clorpirifos (p = 0,021). La proporción de *O. cyaneum* en el rango de profundidad solo difirió entre 0 - 10 cm (p = 0,031). A los 5, 7 y 28 DDA, el porcentaje mayor de *P. scaber* muertos se obtuvo con clorpirifos (p < 0,05), hallándose valores superiores a 70 %. El porcentaje de emergencia a los 7 días después de la siembra (DDS) como el porcentaje de plantas totales, altura, peso fresco y seco de las plantas de *B. napus* difirieron entre los tratamientos a los 28 DDS (p < 0,001), obteniéndose los valores mayores con clorpirifos. Clorpirifos, solo o en mezclas con glifosato, causó efecto letal sobre *P. scaber* y efectos subletales tanto sobre *O. cyaneum* como en *B. napus*.

Palabras clave: organismos benéficos edáficos; fitosanitarios; microcosmo

Abstract

The objective of this work was to evaluate the effects of applying glyphosate and chlorpyrifos alone or in combination on *Octolasion cyaneum*, *Porcellio scaber*, and *Brassica napus*. The experimental unit consisted of a PVC cylinder filled with 3 kg of soil into which 10 individuals of *O. cyaneum*, 8 of *P. scaber* and 10 seeds of *B. napus* were introduced. The treatments were: glyphosate alone (960, 4800 and 9600 g ha⁻¹), chlorpyrifos alone (576, 2880 and 5760 g ha⁻¹), and their combinations, following a completely randomized experimental design with six replications. The bioassay was performed in a chamber at 20 ± 2 °C, with a 14 h light: 10 h darkness photoperiod. At 28 days after application, the number of live *O. cyaneum* did not vary between treatments (p = 0.307). The highest percentages of damage to *O. cyaneum* were found with chlorpyrifos (p = 0.021). The proportion of *O. cyaneum* in the depth range only differed between 0-10 cm (p = 0.031). At 5, 7 and 28 days after application, the highest percentage of dead *P. scaber* was obtained with chlorpyrifos (p < 0.05), with values higher than 70%. Regarding *B. napus*, significant differences (p < 0.001) between treatments were found both in emergence percentage 7 days after sowing, and in total number of plants, plant height, fresh weight and dry weight percentages 28 days after sowing, the highest values obtained with chlorpyrifos. In conclusion, chlorpyrifos, alone or with glyphosate, caused lethal effects on *P. scaber* and sublethal effects on both *O. cyaneum* and *B. napus*.



Keywords: edaphic beneficial invertebrates; pesticides; microcosm

Resumo

Os efeitos individuais e mistos de glyphosate e clorpirifos em *Octolasion cyaneum*, *Porcellio scaber* e *Brassica napus* foram avaliados. A unidade experimental consistiu de um cilindro de PVC com 3 kg de solo e foram introduzidos 10 indivíduos de *O. cyaneum*, 8 de *P. scaber* e 10 sementes de *B. napus*. Os tratamentos foram: 960, 4800 e 9600 g de glifosato ha⁻¹, 576, 2880 e 5760 g de clorpirifos ha⁻¹ e suas combinações. O delineamento foi inteiramente casualizado com 6 repetições e o bioensaio foi realizado em câmara a 20 ± 2 ° C e com fotoperíodo de 14 h de luz: 10 h de escuridão. Aos 28 dias após a aplicação (DAA), o número de *O. cyaneum* vivo não variou entre os tratamentos (p = 0,307). As maiores porcentagens de dano em *O. cyaneum* foram encontradas com clorpirifos (p = 0,021). A proporção de *O. cyaneum* na faixa de profundidade diferiu apenas entre 0 - 10 cm (p = 0,031). Aos 5, 7 e 28 DAA, o maior percentual de *P. scaber* morto foi obtido com clorpirifos (p < 0,05), encontrando-se valores superiores a 70%. A porcentagem de emergência aos 7 dias após a semeadura (DAS) como porcentagem de plantas totais, altura, massa fresca e seca de plantas de *B. napus* diferiu entre os tratamentos aos 28 DAS (p < 0,001), obtendo os maiores valores com clorpirifos. Em conclusão, clorpirifos, sozinho ou com glyphosate, causou efeito letal em *P. scaber* e efeitos subletais em *O. cyaneum* como em *B. napus*.

Palavras chave: organismos benéficos edáficos; fitossanitários; microcosmo

Introducción

El uso de fitosanitarios en los sistemas de cultivos impacta indirectamente sobre los organismos no blanco causando daños irreversibles ([Reinecke y Reinecke, 2007](#); [Müller, 2018](#)). Dentro de los organismos no blanco se encuentran los invertebrados edáficos que desempeñan funciones cruciales en el ecosistema suelo ya que proveen de servicios ecosistémicos ([Lavelle et al., 2006](#); [Manono, 2016](#)). Estos contribuyen a mantener la estructura y fertilidad del suelo, intervienen en la descomposición de la materia orgánica y en el ciclado de los nutrientes, producen un aumento en la aireación y en el drenaje del suelo y, en consecuencia, promueven el crecimiento de las plantas ([Liu et al., 2019](#)). Entre los invertebrados edáficos, se encuentran los oligoquetos, comúnmente llamado lombrices, que son elementos clave en aquellos procesos ya que la descomposición se ve favorecida por la acción de microorganismos endosimbiontes que viven su intestino. En consecuencia, a los oligoquetos terrestres (lombrices) ([Plaas et al., 2019](#); [Pelosi et al., 2021](#)) y los isópodos ([Niemeyer et al., 2018](#), [Madzaric et al., 2018](#)) se los considera bioindicadores de los factores antropogénicos de estrés. En los suelos del Sudeste Bonaerense se ha observado que *Octolasion cyaneum* (Savigny) (Annelida: Oligochaeta: Lumbricidae) y *Porcellio scaber* (Latreille) (Crustacea: Isopoda) son organismos abundantes y son considerados como organismos de prueba en los bioensayos ecotoxicológicos ([Salvio et al., 2015a](#); [Salvio et al., 2015b](#)).

Si bien, es imprescindible estudiar los efectos perjudiciales de los fitosanitarios sobre los organismos benéficos del suelo resulta de importancia evaluar aquellos efectos sobre los cultivos no blanco ([Matsumura, 1987](#)). Entendiendo como cultivo no blanco a aquellas especies de plantas que están involuntariamente expuestas a la acción de los fitosanitarios. Los efectos sobre estos cultivos no blanco pueden ser directos o indirectos debido a que provocan un cambio significativo en la supervivencia, la sanidad o en la reproducción de las especies de plantas no objetivo o provocan un cambio en la comunidad de esas plantas ([Marrs et al., 1989](#)). Asimismo, los cultivos pueden manifestar distintos síntomas de exposición ante aplicaciones indeseadas a los fitosanitarios como por ejemplo la exoderiva. Por esto, las plantas pueden ser utilizadas como bioindicadores de evaluación de la toxicidad tanto en los ecosistemas acuáticos como terrestres ([Azevedo et al., 2005](#)). En este

contexto, *Brassica napus* (Linneo) (Brassicaceae) se encuentra entre las especies más comúnmente utilizadas en la evaluación del riesgo medioambiental ([Santos et al., 2011c](#)).

Los bioensayos ecotoxicológicos representan una herramienta útil para indicar si en determinadas condiciones un fitosanitario es perjudicial o no sobre un organismo. Entre aquellos se encuentran los que se realizan en microcosmos, también denominados ecosistema terrestre a pequeña escala. El microcosmo se define como una unidad de suelo, donde el sustrato utilizado puede ser tratado con un fitosanitario o no, en el cual se introducen varios organismos con el fin de evaluar los efectos de los contaminantes en los niveles diferentes de organización biológica ([Buch et al., 2013](#)). Este tipo de bioensayo permite, con algunas limitaciones, integrar lo que ocurre en los ensayos toxicológicos sobre varias especies en condiciones de laboratorio y lo que ocurre en condiciones de campo ([Løkke y Van Gestel, 1998](#)). Asimismo, proporcionan un realismo mayor en la interacción de los organismos no blanco y los fitosanitarios ([De Laender et al., 2009](#)).

En el marco socio-económico de la producción agrícola de Argentina, los organismos no blanco están expuestos a aplicaciones crecientes de productos fitosanitarios ([SENASA, 2021](#)) que directa o indirectamente llegan al suelo. Glifosato junto con clorpirifos son los plaguicidas más utilizados en sistemas bajo siembra directa (SD) ([Casabé et al., 2007](#); [Sasal et al., 2015](#)). El glifosato pertenece al grupo químico de las fosfometilglicinas y es de amplio espectro, sistémico y es utilizado como herbicida de post-emergencia de malezas para barbechos químicos y labranza cero ([CASAFE, 2021](#)). Se comercializa en la forma de concentrados solubles de sales como isopropanolamina, monoamónica, trimetilsulfonio y potásica del ácido N- (fosfometil) glicina. El producto comercial que se dispone para su uso consiste en formulados que contienen al glifosato como principio activo junto con diversas sustancias como coadyuvantes y surfactantes, necesarias para permitir que el herbicida ingrese en la planta blanco ([Di Fiori, 2014](#)). Generalmente, se considera un herbicida de toxicidad baja para peces, aves, mamíferos e invertebrados en comparación con otros agentes de protección de cultivos. Su modo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano ([Arregui y Puricelli, 2008](#)), ya que es un potente inhibidor de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (a la que comúnmente se hace referencia como EPSP sintasa o EPSPS, por sus siglas en inglés). Por otro lado, clorpirifos es un insecticida organofosforado que posee un amplio espectro de acción sobre los artrópodos plagas y por tal motivo, se lo emplea para el control de insectos en una amplia variedad de escenarios agrícolas ([CASAFE, 2021](#)). Es un insecticida neurotóxico que actúa sobre el sistema nervioso central inhibiendo la acción de la AChE, enzima acetilcolinesterasa que regula la actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina (ACh). Sin embargo, desde el 2023 y de acuerdo a la resolución 414/2021 quedará prohibida la comercialización y uso de productos fitosanitarios formulados a base de clorpirifos etil y metil en todo el territorio nacional.

Actualmente, en el Sudeste de la provincia de Buenos Aires, no se han estudiado los efectos de los plaguicidas, aplicados de forma individual o en mezclas, sobre las lombrices, los isópodos y los cultivos no blanco y la mayoría de los estudios de impacto provienen de otras regiones del mundo ([Santos et al., 2011a, b](#)). Por ello, el objetivo del trabajo fue evaluar los efectos individuales y en mezclas de los formulados glifosato y clorpirifos sobre la mortalidad y los parámetros biológicos de *O. cyaneum* y *P. scaber* y los parámetros de desarrollo y crecimiento de *B. napus*. Por lo tanto, se supone que las dosis mayores de clorpirifos y glifosato + clorpirifos producen efectos letales en *O.*

cyaneum y *P. scaber* y las dosis mayores de glifosato y glifosato + clorpirifos causan efectos subletales en el desarrollo del cultivo de *B. napus*.

Materiales y métodos

1. Recolección y mantenimiento del material biológico:

para los bioensayos se recolectaron individuos adultos de *O. cyaneum* (con clítelos) de un lote bajo SD e individuos adultos de *P. scaber* extraídos manualmente en un monte de *Eucalyptus* sp. Ambos sitios de extracción están ubicados en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Balcarce, Argentina (37°45'S; 58°18'O, 120 m.s.n.m.). Una vez extraídos del suelo los individuos de *O. cyaneum* se colocaron en recipientes de plástico blanco de 36,5 cm de largo x 24,5 cm de ancho con 10 cm de suelo húmedo ([Salvio et al., 2015b](#)). Los ejemplares de *P. scaber* se colocaron en grupos de 10 en recipientes de plástico transparente de 9,3 cm de diámetro y 6,4 cm de altura con una base de yeso de París para mantener la humedad. Se alimentaron con residuos vegetales provenientes del lugar de extracción ([Faber et al., 2011](#)). Los recipientes con los individuos de ambas especies se llevaron a una cámara de cría a 20 ± 2 °C y un fotoperiodo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad para su aclimatación. Los individuos de *O. cyaneum* y *P. scaber* se seleccionaron en función de su peso para lo cual debieron pesar entre 300-600 mg y 40-60 mg, respectivamente. Para ellos, los individuos se pesaron con una balanza analítica electrónica de alta precisión (= 0,001 g).

2. Ecosistema terrestre a pequeña escala (ETPE) o microcosmo:

La unidad experimental (UE) consistió en un recipiente cilíndrico de PVC de 12 cm de diámetro y 40 cm de altura. La parte inferior del recipiente se cubrió con una tela de voile sostenida con una banda elástica para asegurar el drenaje de agua y evitar el escape de las lombrices. Mientras que, el borde superior interno de cada UE se aplicó una pequeña línea de grasa de litio para evitar la huida de los isópodos. En cada UE se colocó 3 kg de suelo tamizado y se llenó el recipiente hasta una altura de 32 cm. El suelo que se utilizó fue colectado de una pastura con más de 30 años sin aplicación de agroquímicos. Las propiedades físicas y químicas del suelo empleado fueron 5,1 % de materia orgánica; 20,9 % de arcilla; 34,9 % de limo; 44,2 % de arena; pH = 7,7 (1:2.5 en agua); conductividad $0,6 \text{ mmhos cm}^{-1}$, capacidad de intercambio catiónica (C.I.C.) $29,3 \text{ meq } 100 \text{ g}^{-1}$ y una densidad aparente de $1,2 \text{ g cm}^{-3}$ ([Studdert y Echeverría, 2000](#)). Las unidades experimentales se condicionaron a capacidad de campo al iniciar el bioensayo. En cada UE se colocaron 10 individuos de *O. cyaneum*, 8 de *P. scaber* y se sembraron 10 semillas de *B. napus*. También, se agregó 4,7 g de residuos vegetales de trigo sobre la superficie del suelo (equivalente a $4160 \text{ kg MS ha}^{-1}$).

3. Tratamientos:

Se utilizó un herbicida, glifosato (G) (48% de ingrediente activo (i.a.) y 35,6% de equivalente ácido, concentrado soluble, Panzer® Dow AgroSciences) y un insecticida, clorpirifos (C) (48% de i.a., concentrado emulsionable, Lorsban® Dow AgroSciences). Los tratamientos consistieron en la dosis recomendada (DR) de campo según el marbete de cada ingrediente activo, cinco y diez veces la DR (5DR y 10DR), la mezcla de ambos ingredientes activos a la DR, 5DR y 10DR, y un testigo sin aplicación de dichos agroquímicos. Los tratamientos fueron los siguientes: 1) 712 (**DRG**); 2) 3560

(5DRG); 3) 7120 g de i.a. / ha de G (10DRG); 4) 516 (DRC); 5) 2880 (5DRC); 6) 5760 (10DRC) g de i.a. ha⁻¹ de C; 7) 712+516 (DRG + DRC); 8) 3560+2880 (5DRG + 5DRC); 9) 7120+5760 (10DRG + 10DRC) g de i.a. ha⁻¹ de G + C y 10) testigo. Cabe aclarar que en el testigo se encontraban todos los organismos, es decir, *O. cyaneum*, *P. scaber* y *B. napus*. Cada tratamiento químico se aplicó homogéneamente sobre la superficie del suelo mediante un pulverizador manual a gatillo. Cada dos días se asperjó el suelo con agua destilada simulando una lluvia de 5 ml para mantener el suelo con humedad. El diseño fue completamente aleatorizado con seis repeticiones por tratamiento y el bioensayo se llevó a cabo en condiciones controladas 20 ± 2°C y un fotoperiodo de 14h de luz: 10 h de oscuridad. La duración total del bioensayo fue de 28 días después de la aplicación (DDA) de tratamientos.

4. Muestreo y procesamiento de datos.

Al finalizar el bioensayo se procedió a extraer cada uno de los organismos a evaluar, en primera instancia se recolectaron las plantas de *B. napus*, luego los individuos de *P. scaber* y por último, se extrajo el suelo del cilindro para revisar los individuos de *O. cyaneum*. En este último caso para encontrar los especímenes se separó el suelo en capas visualmente homogéneas de 1-4 mm de espesor sobre una bandeja de manera manual para contabilizar y visualizar a los individuos.

- Mortalidad y parámetros biológicos sobre *O. cyaneum*.

A los 28 DDA se evaluaron las siguientes variables: el número de individuos vivos y el cambio de peso (diferencia entre el peso inicial y el final de los individuos a los 28 DDA en cada microcosmo). Además, se analizó la proporción de los individuos en tres niveles de profundidad de suelo en cada microcosmo: 0 – 10 cm, 10 – 20 cm y 20 – 32 cm. Para ello se procedió a retirar el bloque de suelo de cada UE sin disturbarlo y luego se separó el mismo en los tres niveles de profundidad seleccionados.

Los cambios morfológicos observados sobre las lombrices se clasificaron según la escala de Salvio *et al.* (2015a) en las siguientes categorías (total 5): 1) sin daño; 2) daño leve (cambio de color en la totalidad del cuerpo del organismo); 3) daño moderado (decoloración de la parte posterior del cuerpo del organismo); 4) daño severo (desprendimiento de la parte posterior del cuerpo) y 5) daño total (muerte del organismo). Se determinó el porcentaje de daño (PD) en función de las dosis de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$PD (\%) = \left[\frac{\sum(n \cdot v)}{CM \cdot N} \right] \cdot 100,$$

siendo n el número de organismos por cada categoría (cada categoría corresponde a la escala de daño vista con anterioridad, total 5), v el valor numérico de cada categoría, CM el valor de la categoría mayor y N el número total de organismos por tratamiento.

- Mortalidad y parámetros biológicos sobre *P. scaber*:

se observó la proporción de individuos muertos a los 2, 5, 7, 14 y 28 DDA y se analizó como parámetro de mortalidad (%).

- Parámetros de desarrollo y crecimiento de *B. napus*.

Se determinó el porcentaje de emergencia a los 7 días después de la siembra (DDS) y el porcentaje de plantas totales (como el número de plantas en cada microcosmo al finalizar el ensayo / el número total

(10) *100), la altura (cm/planta), el peso fresco y seco (mg/planta) a los 28 DDS. Para ello las plantas fueron contabilizadas y cortadas a ras del suelo para obtener el peso fresco y seco luego del secado en estufa de circulación forzada de aire durante 48h.

Análisis estadístico:

todas las variables se evaluaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA), previa validación del supuesto de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene ($\alpha=0,05$). Cuando se detectaron diferencias entre los tratamientos de las variables se realizó la prueba de mínima diferencia significativa (MDS) para el porcentaje de daño y proporción de los individuos en los niveles de profundidad y la prueba de Dunnett ($\alpha=0,05$) para las restantes variables evaluadas. Los análisis de todas las variables se realizaron con el programa R 3.4.3 ([R Development Core Team, 2017](#)).

Resultados y discusión

A los 28 DDA, el número de individuos vivos de *O. cyaneum* no difirió entre los distintos tratamientos ($p = 0,307$). De un total de 540 organismos expuestos a los diferentes tratamientos solamente se encontraron 14 individuos muertos. El 41 % de los individuos vivos presentaron algún tipo de cambio morfológico entre tratamientos. El daño más frecuentemente visualizado fue el cambio de coloración en la totalidad del cuerpo ([Figura 1a](#)). Otros síntomas observados fueron lesiones en el tegumento, decoloración de la parte posterior del cuerpo y pérdida de dicha parte ([Figuras 1b, c y d](#), respectivamente).



Figura 1. Síntomas de *Octolasion cyaneum*: **A)** cambio de coloración del organismo tratado en comparación con el testigo, **B), C), D) y E)** proceso de transición de la decoloración en la parte posterior del cuerpo del organismo y pérdida de dicha región y **F)** abultamiento cercano a la zona clitelar y lesiones en el tegumento.

Varios autores demuestran que clorpirifos no produce efectos letales sobre los oligoquetos. En efecto, Salvio *et al.* (2015a), Kaspar (2014) y Rafael *et al.* (2015) demostraron que dosis comprendidas entre 144 a 5760 g de i.a. ha⁻¹ del insecticida no causan mortalidad sobre *O. cyaneum*. Asimismo, Iannacone y Alvariño (2004) y Casabé *et al.* (2007) detectaron que el insecticida a dosis menores a las probadas en este bioensayo e incluso inferiores a las DR, no afecta la supervivencia de otra especie como es *Eisenia fetida*. No obstante, Tiwari *et al.* (2019) en el oligoqueto *Eudrilus eugeniae* encuentran una mortalidad superior a un 70% con dosis mayores a la recomendada del insecticida, aunque la exposición al mismo fue sobre papel de filtro.

Similarmente a lo observado con clorpirifos, en los tratamientos donde se aplicó glifosato no se observó mortalidad sobre *O. cyaneum*. En efecto, Salvio *et al.* (2015b) no detectaron efectos letales sobre *O. cyaneum* a la DR a campo del mismo herbicida. Asimismo, Iacovelli *et al.* (2017) tanto a la DR de glifosato como a 5DR y 10DR tampoco hallaron mortalidad sobre *O. cyaneum*. Similares resultados se informaron sobre *E. fetida* expuesta a diferentes dosis del herbicida (von Mérey *et al.*, 2016). Sin embargo, considerando el mismo género, García-Torres *et al.* (2014) reportaron un 100 % de mortalidad sobre *Octolasion tyrtaeum* expuestas a 50.000 mg kg⁻¹ del herbicida. Cabe aclarar que son concentraciones muy superiores a las encontradas en el campo y a las utilizadas en el presente trabajo.

Si bien, se encuentran varios estudios realizados con clorpirifos y glifosato sobre los oligoquetos todos consideran la aplicación individual de cada fitosanitario y no se encuentra información disponible sobre el efecto combinado cuando dichos agroquímicos se aplican en mezcla. No obstante, Santos *et al.* (2011a) demostraron que tanto las dosis individuales como la mezcla de glifosato y dimetoato no causan efectos letales sobre *E. andrei*. Considerando que dimetoato es un organofosforado como clorpirifos el efecto que ocasiona es similar sobre los oligoquetos. Es decir, en mezcla con glifosato no afecta la supervivencia de los oligoquetos. Por lo tanto, considerando los resultados obtenidos en este trabajo permitieron demostrar que las dosis mayores de clorpirifos y glifosato + clorpirifos no causaron efectos letales en *O. cyaneum*.

Con respecto al porcentaje de daño sobre *O. cyaneum* se observaron diferencias significativas entre los tratamientos a los 28 DDA ($p = 0,021$) (Tabla 1). Los mayores daños se hallaron con clorpirifos, tanto solo como en mezcla con glifosato, mientras que el porcentaje menor se detectó con 5DRG (Tabla 1). Cabe aclarar que en los organismos del tratamiento testigo no se observaron daños visibles y por lo tanto, el porcentaje de daño en el testigo no se calculó.

Tabla 1. Variables evaluadas sobre *Octolasion cyaneum* (promedio \pm desvío estándar) en los diferentes tratamientos con glifosato (G) y clorpirifos (C) a los 28 días después de la aplicación.

Tratamientos (g de i.a. ha ⁻¹)	Porcentaje de daño	Cambio de peso (%)	Proporción en el rango		
			0 - 10 cm	10 - 20 cm	mayor a 20 cm
712 G	3,3 \pm 3,7 bc	89,0 \pm 12,9	0,05 \pm 0,08 bc	0,45 \pm 0,21 a	0,48 \pm 0,26 a
3560 G	1,0 \pm 1,6 c	89,1 \pm 08,5	0,03 \pm 0,05 bc	0,62 \pm 0,18 a	0,35 \pm 0,19 a
7120 G	7,0 \pm 4,0 abc	99,3 \pm 11,8 *	0,08 \pm 0,11 bc	0,47 \pm 0,15 a	0,43 \pm 0,20 a
516 C	8,5 \pm 5,7 ab	77,6 \pm 11,9	0,26 \pm 0,19 a	0,55 \pm 0,27 a	0,18 \pm 0,27 a
2880 C	10,6 \pm 8,3 a	92,8 \pm 16,8	0 c	0,53 \pm 0,38 a	0,45 \pm 0,38 a
5760 C	10,6 \pm 5,0 a	84,2 \pm 12,7	0 c	0,22 \pm 0,26 a	0,75 \pm 0,24 a
712 G + 516 C	12,0 \pm 4,6 a	79,9 \pm 07,0	0,15 \pm 0,23 abc	0,30 \pm 0,28 a	0,50 \pm 0,28 a
3560 G + 2880 C	10,2 \pm 5,2 a	74,7 \pm 03,5	0,16 \pm 0,18 ab	0,42 \pm 0,15 a	0,38 \pm 0,22 a
7120 G + 5760 C	11,6 \pm 10,0 a	81,8 \pm 13,7	0,17 \pm 0,16 abc	0,43 \pm 0,25 a	0,38 \pm 0,26 a
Testigo		79,6 \pm 01,8	0,12 \pm 0,06 abc	0,70 \pm 0,21 a	0,18 \pm 0,20 a

Letras iguales indican diferencias no significativas entre los tratamientos (MDS, $\alpha = 0,05$).

* indica diferencias significativas con respecto al testigo (Dunnett, $\alpha = 0,05$).

En relación a los síntomas que se observan en las lombrices expuestas a clorpirifos, Kaspar (2014) describió en *O. cyaneum* alteraciones similares a las halladas en este estudio con dosis comprendidas entre 144 y 1428 g de i.a. ha⁻¹. Asimismo, Salvio *et al.* (2015a) con dosis similares del insecticida, detectan sobre *O. cyaneum* decoloración total del cuerpo y en los segmentos posteriores una porción aplanada que luego se desprendió. Síntomas similares fueron obtenidos sobre *O. cyaneum* por Rafael *et al.* (2015) con dosis comprendidas entre 720 y 5760 g de clorpirifos ha⁻¹. Por otra parte, Rao *et al.* (2003) y Tiwari *et al.* (2019) hallaron los mismos síntomas sobre *E. fetida* y *E. eugeniae*, respectivamente, ambas especies expuestas a clorpirifos a dosis comprendidas entre 0,003 a 0,005 mg kg⁻¹.

En el presente estudio con la DRG se encontró un porcentaje de daño menor sobre *O. cyaneum* con respecto a clorpirifos solo o en mezcla (Tabla 1). En cambio, Iacovelli *et al.* (2017) no hallaron cambios morfológicos sobre *O. cyaneum* a la DR de glifosato ni a dosis superiores. Varios estudios por otro lado (Correia y Moreira, 2010; Maitre *et al.*, 2012; Buch *et al.*, 2013) reportan que las dosis de glifosato comprendidas entre 2000 y 6000 g de i.a. ha⁻¹ ocasionan enrollamiento, secreción de fluido celómico, ruptura intestinal y descomposición del cuerpo sobre los oligoquetos. No obstante, en el presente estudio sólo en una minoría de los individuos se observaron algunos de los síntomas citados anteriormente. Si bien se observó que, tanto en la mezcla de los plaguicidas como en la aplicación individual de clorpirifos, el porcentaje de daño fue significativamente mayor (Tabla 1), siendo éste el causante mayoritario de los síntomas observados sobre *O. cyaneum*.

El cambio de peso a los 28 DDA varió entre los tratamientos ($p = 0,015$) (Tabla 1). Solamente se observó en dicha variable un valor de 24 % más alto en el peso de los oligoquetos con 10DRG respecto al testigo (Tabla 1).

En coincidencia con este estudio, Kaspar (2014) encontró que el peso de *O. cyaneum* disminuye un 13 % con respecto al testigo con dosis comprendidas entre 144 a 1728 g de i.a. ha⁻¹ de clorpirifos. De manera similar, Salvio *et al.* (2015a) observaron una reducción en el peso de la misma especie expuesta a dosis de 120 a 1440 g de i.a. ha⁻¹ del insecticida. Sin embargo, considerando la misma especie Rafael *et al.* (2015) no evidencian diferencias en el peso de *O. cyaneum* a dosis comprendidas

entre 720 y 5760 g ha⁻¹ de clorpirifos. En general y teniendo en cuenta otras especies de lombrices, clorpirifos disminuye el peso de estos organismos ([Yasmin y D' Souza, 2007](#); [Zhou et al., 2011](#)).

Es controversial el efecto que glifosato puede causar en el peso de los oligoquetos. Considerando la misma especie *O. cyaneum*, [Salvio et al. \(2015b\)](#) no observaron cambios en su peso con dosis de glifosato similares al presente trabajo. De la misma manera, [Iacovelli et al. \(2017\)](#) a la DRG, 5DRG y 10DRG del herbicida no hallaron cambio de peso de *O. cyaneum*. Teniendo en cuenta *E. fetida*, tanto [Zhou et al. \(2013\)](#) como [von Mérey et al. \(2016\)](#) no observaron diferencias en la pérdida de peso. Contrariamente, [Correia y Moreira \(2010\)](#) y [Piola et al. \(2013\)](#) obtuvieron disminución de peso en *E. andrei* expuesta a glifosato, aunque con dosis superiores a las aplicadas en este estudio. En el presente estudio se obtuvo un 24 % más en el peso de los oligoquetos con 10DRG comparado con el valor del control. Por un lado, dicho resultado puede ser explicado porque el herbicida al tomar contacto con el suelo es rápidamente adsorbido y se adhiere fuertemente a la materia orgánica quedando inmóvil en el suelo ([Gómez Ortiz et al., 2017](#)). De esta manera, el herbicida no queda biodisponible y; por ende, no causa efecto adverso sobre los oligoquetos. Pero por otro lado al ser una dosis de aplicación elevada, 10DRG, los restantes componentes del formulado pudieron haber influido sobre la actividad de los oligoquetos. Es decir, la dosis elevada del herbicida pudo afectar a las lombrices volviéndolas más activas y; por ende, realizar una mayor descomposición de la materia orgánica, ingerir más alimento y de esta manera lograr un mayor cambio de peso ([Tabla 1](#)).

En general, en presencia de clorpirifos se observó que los organismos presentaban una movilidad reducida y en consecuencia, una evidente disminución de los bioporos. Mientras que, en ausencia del insecticida se visualizaron galerías debido a una actividad mayor de los organismos. En efecto, [Gupta y Sundararaman \(1991\)](#) observaron que los organofosforados reducen la capacidad de las lombrices para construir galerías debido a un efecto neurotóxico que causa descoordinación muscular. A su vez, [Santos et al. \(2011b\)](#) observaron un comportamiento similar sobre *E. andrei* con dimetoato.

Por otra parte, la proporción de individuos de *O. cyaneum* en el rango comprendido entre 0 - 10 cm de suelo varió entre los tratamientos ($p = 0,031$) ([Tabla 1](#)). Con la DRC se encontró la proporción mayor de lombrices. Mientras que, no se hallaron individuos en la capa más superficial con 5DRC y 10DRC. A su vez, la mezcla de glifosato y clorpirifos, a sus distintas dosis, no mostró diferencias con el testigo ([Tabla 1](#)). Las proporciones de individuos de *O. cyaneum* en los rangos de profundidad comprendidos entre 10 - 20 cm ($p = 0,152$) y 20 - 32 cm de suelo ($p = 0,059$) no variaron entre los tratamientos ([Tabla 1](#)). En el testigo, más del 70 % de los organismos se encontraron en el rango de 10 - 20 cm de profundidad de la columna de suelo del microcosmo ([Tabla 1](#)). Dicho resultado debe considerarse como una distribución normal de esta especie endogeica y las posibles desviaciones de este patrón de comportamiento deben interpretarse como una respuesta a las condiciones desfavorables ([Lowe y Butt, 2008](#)).

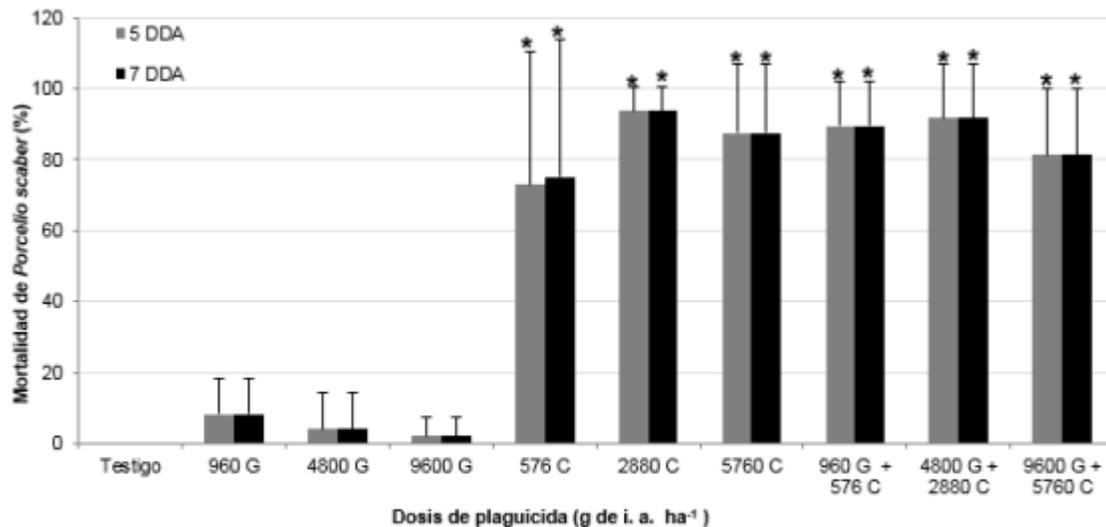
Si bien, [Santos et al. \(2011a\)](#) no observaron diferencias sobre la distribución en el perfil del suelo de *E. andrei* expuesta a 180 a 1800 g i.a. ha⁻¹ de dimetoato, detectaron que al incrementar la dosis del insecticida la proporción de *E. andrei* disminuye en la capa superior (0 - 10 cm). Una posible causa es que las lombrices evadieron el insecticida. En coincidencia y en este estudio, con 5DRC y 10DRC del insecticida se observó ausencia de los organismos en el rango de profundidad comprendido entre 0 - 10 cm ([Tabla 1](#)). Varios estudios han determinado la evasión de las lombrices al exponerlas a clorpirifos ([De Silva y Van Gestel, 2009](#); [García Santos y Keller-Forrer, 2011](#)). Ahora bien, con DRC

se encontró la proporción mayor de lombrices (27 %) en los primeros 10 cm de profundidad, y en coincidencia con Santos *et al.* (2011b) con la DR de dimetoato detectan el mismo número de individuos en dicho estrato de suelo. Es decir, las lombrices con la DR de aplicación presentan una atracción al insecticida. En efecto, Rafael *et al.* (2015) determinaron que *O. cyaneum* expuesta a la DR del insecticida, 576 g de i.a. ha⁻¹, presenta un 10 % de atracción al fitosanitario.

Teniendo en cuenta las dosis diferentes de glifosato se observó que la distribución de las lombrices fue similar entre ellas y semejante al testigo (Tabla 1). Asimismo, Salvio *et al.* (2015b) no observan comportamiento evasivo sobre *O. cyaneum* con dosis similares. Con respecto a la combinación de glifosato y clorpirifos no se encuentra información disponible. Sin embargo, Santos *et al.* (2011a) utilizando dosis combinadas de glifosato + dimetoato (1020 + 180 a 10200 + 1800 g de i.a. ha⁻¹) no encuentran diferencias en la distribución espacial de *E. andrei* en los siguientes estratos de suelo: 0 - 10 cm y 10 - 20 cm. Asimismo, Iacovelli *et al.* (2017) no detectaron diferencias en la distribución espacial de *O. cyaneum* con la aplicación individual y combinada de glifosato y un insecticida sulfoxaflor, perteneciente a las familias de las Sulfoximinas.

La mortalidad de *P. scaber* tanto a los 5 como a los 7 DDA varió entre los tratamientos ($p < 0,001$) (Figura 2). Se observó que la mortalidad fue significativamente mayor con clorpirifos solo o en combinación con glifosato, hallándose valores superiores a un 70 % ($p < 0,05$). Mientras que, con las dosis diferentes de glifosato la mortalidad no se diferenció en relación con el testigo ($p > 0,05$) (Figura 2). A los 28 DDA, el porcentaje de individuos muertos difirió entre los tratamientos ($p < 0,001$), observándose en todos los tratamientos evaluados la misma mortalidad obtenida que a los 7 DDA.

Figura 2. Mortalidad de *Porcellio scaber* (%) en los diferentes tratamientos con glifosato (G) y clorpirifos (C) a los 5 y 7 días después de la aplicación (DDA).



* indica diferencias significativas con respecto al testigo (Dunnett, $\alpha = 0,05$).

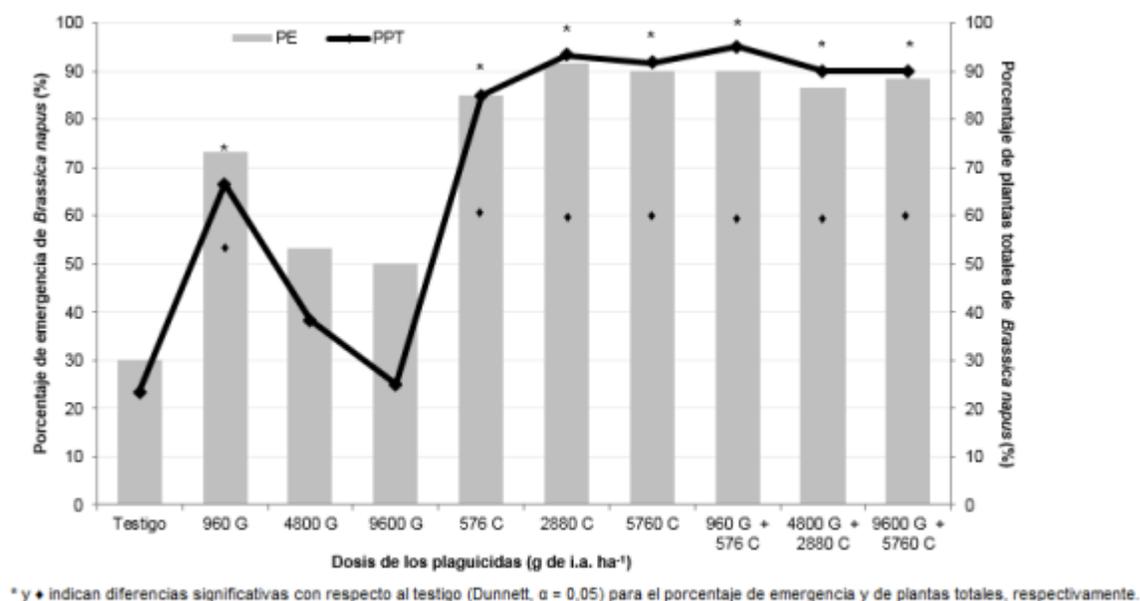
Considerando el efecto de clorpirifos, Salvio *et al.* (2015c) observaron que 1440 g de i.a. ha⁻¹ del insecticida produce un 88 % de mortalidad del isópodo *Armadillidium vulgare* (Latreille). En comparación y en el presente estudio con las diferentes dosis de clorpirifos se obtuvo un porcentaje de muertos superior a 85 % (Figura 2). Ahora bien, considerando el organofosforado dimetoato se obtienen resultados similares sobre *Porcellionides pruinosus* en comparación con clorpirifos (Santos *et al.*, 2011a). Los síntomas de intoxicación causados por clorpirifos en *P. scaber* fueron: hiperactividad, parálisis y luego la muerte. Síntomas similares fueron reportados por Lourerio *et al.* (2009) y Salvio *et al.* (2015a).

Teniendo en cuenta las dosis de glifosato, el porcentaje de *P. scaber* muertos fue inferior a un 8 %, por lo tanto, el efecto perjudicial causado por el herbicida fue muy bajo sobre los organismos. En efecto, Santos *et al.* (2011a) con 1020, 5100 y 10200 g de glifosato ha⁻¹ observan en *P. pruinosus* una supervivencia superior a 80 %. Asimismo, Salvio *et al.* (2015c) e Iacovelli *et al.* (2017) detectaron que el glifosato, tanto con la DR como con dosis superiores, no detectan mortalidad sobre *A. vulgare*. Asimismo, hay que considerar que el formulado utilizado en este estudio no causó efecto letal sobre *P. scaber*. Este resultado es esperable en función del modo de acción y del tipo de herbicida aplicado. Es decir, tal efecto letal no se detectó debido que el organismo carece de la enzima blanco del herbicida. Además, la ausencia de efectos letales por otro lado estaría indicando que los aditivos presentes en el formulado tampoco tienen efectos sobre el organismo evaluado.

Por otra parte, con la combinación de clorpirifos y glifosato a sus distintas dosis se detectaron porcentajes superiores a un 80 % de *P. scaber* muertos, similares a los porcentajes obtenidos con clorpirifos solo (Figura 2). De esta manera, se confirmó que el insecticida es el que causa el efecto letal sobre los isópodos. En adición, Santos *et al.* (2011a) observaron que la mezcla de 180 + 1020 g de i.a. ha⁻¹ de dimetoato y glifosato produce un 73 % de mortalidad de *P. pruinosus* y con una dosis diez veces superior a la anterior se alcanza el 100 % de mortalidad. Este efecto letal se atribuye a la utilización del insecticida, ya que glifosato aplicado individualmente no causa efecto letal en estos organismos. De esta manera, se demostró que las dosis mayores de clorpirifos y clorpirifos + glifosato causaron efectos letales sobre *P. scaber*.

El porcentaje de emergencia (PE) en *B. napus* varió entre los tratamientos a los 7 DDS ($p < 0,01$) (Figura 3). Se observó que para clorpirifos, solo o en combinación con el herbicida, el PE fue superior a un 85 % ($p < 0,05$). Mientras que, 5DRG y 10DRG no se diferenciaron con respecto al testigo, siendo sus valores de PE aproximadamente un 50 % ($p > 0,05$) (Figura 3). Por otro lado, con DRG se observó un incremento significativo en el PE de *B. napus* ($p < 0,05$), siendo su valor de 73 %. En el porcentaje de plantas totales (PPT) se detectaron diferencias entre los tratamientos a los 28 DDS ($p < 0,001$) (Figura 3). Todos los tratamientos se diferenciaron del testigo ($p > 0,05$), a excepción de 5DRG y 10DRG (Figura 3).

Figura 3. Porcentaje de emergencia y de plantas totales de *Brassica napus* en los diferentes tratamientos con glifosato (G) y clorpirifos (C).



Teniendo en cuenta que el PPT se encuentra directamente relacionado con el PE, ambas variables se pueden explicar por factores similares. Por un lado, se observó que el PE y PPT disminuyeron con 5DRG y 10DRG debido posiblemente a un efecto fitotóxico del herbicida. Esto se evidenció porque en ambas variables con la DR no se diferenciaron del testigo, mientras que, 5DRG y 10DRG causaron una reducción significativa en PPT y PE (Figura 3). Otra causa posible, del efecto de glifosato sobre *B. napus*, es el daño que *P. scaber* realizó sobre el cultivo. Los daños consistieron en roído o corte total del hipocótilo de la plántula como consumo parcial o total de los cotiledones, causando en estos últimos el daño principal. Debido a que, los isopódos en los tratamientos en ausencia de clorpirifos no fueron controlados, se observó una supervivencia superior a 92 % y por consiguiente, provocaron los efectos perjudiciales sobre *B. napus* (Figura 2).

Con respecto a la altura de las plantas de *B. napus* (cm) se observaron diferencias entre los tratamientos a los 28 DDS ($p < 0,001$) (Tabla 2). Se observó que con clorpirifos, solo o combinado con el herbicida, se lograron mayores alturas de las plantas de *B. napus* en comparación al testigo ($p < 0,05$). Es decir, la altura presentó una tendencia similar que la observada con los variables PE y PPT. Este resultado está directamente relacionado con el número de *P. scaber* vivos en los tratamientos en los cuales solamente se aplicó el herbicida ocasionando perjuicios sobre el cultivo. Asimismo, con 5DRG y 10DRG se obtuvieron los menores valores de altura en las plantas de *B. napus* pero sin diferenciarse del testigo.

Tanto en el peso fresco (PF) como en el peso seco (PS) (mg) de las plantas de *B. napus* se encontraron diferencias entre los tratamientos a los 28 DDS ($p < 0,001$). Como se observa en la Tabla 2 solamente con las dosis distintas de clorpirifos se lograron los mayores valores de peso fresco y seco de las plantas de *B. napus* con respecto a los demás tratamientos. Estos resultados hallados están íntimamente relacionados con la presencia y/o ausencia de *P. scaber* durante los primeros estados de

desarrollo del cultivo. En consecuencia, cuanto más prolongado es el periodo de exposición de los isópodos sobre el cultivo mayor es el daño sobre las plantas.

Tratamientos (g de i.a. ha ⁻¹)	Altura (cm)	Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)
712 G	6,74±1,36	4,92 ± 1,31	0,35 ± 0,03
3560 G	3,75±2,40	2,47 ± 2,51	0,17 ± 0,14
7120 G	2,04±2,05	1,02 ± 1,23	0,22 ± 0,31
516 C	10,17±0,85*	7,15 ± 2,67*	0,56 ± 0,07*
2880 C	10,88±2,65*	8,83 ± 2,83*	0,63 ± 0,21*
5760 C	11,76±2,36*	9,95 ± 3,74*	0,66 ± 0,23*
712 G + 516 C	10,97±1,68*	6,20 ± 1,46	0,41 ± 0,10
3560 G + 2880 C	10,05±1,41*	5,23 ± 1,02	0,39 ± 0,09
7120 G + 5760 C	8,26±2,87*	4,32 ± 2,89	0,33 ± 0,12
Testigo	4,19±2,77	3,16 ± 3,00	0,18 ± 0,21

* indica diferencias significativas con respecto al testigo (Dunnnett, $p > 0,05$).

Tabla 2. Variables evaluadas sobre *Brassica napus* (promedio ± desvío estándar) en los diferentes tratamientos con glifosato (G) y clorpirifos (C)

De manera similar a lo observado en este estudio, Santos *et al.* (2011a) no encontraron diferencias en el porcentaje de germinación sobre *B. rapa* con 1020 g i.a. ha⁻¹ de glifosato, aunque sí en la altura y peso fresco de la especie. Asimismo, los autores observaron que con 5DRG y 10DRG el porcentaje de germinación disminuye, al igual que en el presente estudio (Figura 3). Sin embargo, dichos autores observaron que tanto la altura como el peso fresco no es afectada con dichas dosis. En contraposición, en el presente estudio estas dos variables disminuyeron con el aumento de las dosis de glifosato (Figura 3 y Tabla 2) debido a la presencia de los isópodos. Por otro lado, los menores valores hallados en la altura en las plantas de *B. napus* con 5DRG y 10DRG pero sin diferenciarse del testigo, puede ser debido posiblemente a un efecto fitotóxico del herbicida por el modo de acción del mismo. Es decir, el herbicida incrementa la formación de auxinas causando una reducción del crecimiento, ausencia de la dominancia apical y del crecimiento lateral (Arregui y Puricelli, 2008). Por otra parte, Santos *et al.* (2011c) encontraron que la altura de las plantas de *T. aestivum* y *B. napus* disminuyó pero con una dosis cien veces superior a la dosis recomendada de glifosato.

A su vez, Santos *et al.* (2011c) encontraron que el porcentaje de germinación de *B. rapa* no varía con 1020 g i.a. ha⁻¹ de glifosato y con una dosis cien veces superior a aquella, ya que el herbicida al tomar contacto con el suelo se adhiere fuertemente a la materia orgánica quedando inmóvil en el suelo (Gómez Ortiz *et al.*, 2017). Asimismo, se detectó que dosis menores en relación con la DR de glifosato disminuye la producción de semillas sobre *B. rapa*, aunque no afecta el peso seco de la especie (Olszyk *et al.*, 2010).

Por otro lado, el PE de *B. napus* mostró con la DRG un aumento significativo respecto al testigo y con las dosis mayores del herbicida. Se ha reportado que el herbicida posee una respuesta de tipo hormesis sobre las variables de crecimiento de las plantas. El término hormesis es un fenómeno caracterizado por estimulación a bajas dosis e inhibición con altas dosis de un principio activo. Es decir, que glifosato aplicado en dosis bajas puede aumentar el crecimiento de las plantas o en este caso el porcentaje de emergencia. Este efecto estimulador o hormético se ha informado en las dosis bajas de glifosato sobre *Saccharum* spp. (caña de azúcar) (Silva *et al.*, 2009) y *Lolium multiflorum* (raigrás) (Gismano, 2020).

Si bien, no se encuentran estudios realizados con clorpirifos sobre los efectos ocasionados en *B. napus* hay varios trabajos con otros organofosforados. En efecto, con el insecticida dimetoato Hanley y Whiting (2005) no encontraron efecto sobre la germinación de colza. De la misma manera, Santos *et al.* (2011a, b) informaron que a la DR de dimetoato no causa efecto sobre el peso fresco y la altura de colza. Asimismo, otros estudios realizados en el campo utilizando la DR de dimetoato no produjo efecto perjudicial sobre el crecimiento de varias especies de *Brassica* (Sarwar *et al.*, 2003; Rana *et al.*, 2007). Si bien, los efectos observados aquí son con otro organofosforado, los resultados sobre *B. napus* son muy parecidos con los detectados en el presente estudio.

Con respecto a la aplicación en mezcla de glifosato y clorpirifos, Santos *et al.* (2011a) observaron que tanto la altura como el peso fresco de *B. rapa* no son afectados con 1020 y 180 g de i.a. ha⁻¹ de glifosato y dimetoato, respectivamente. Similares resultados fueron obtenidos en este estudio (Tabla 2), pero utilizando clorpirifos en la mezcla. Mientras que, Santos *et al.* (2011a) detectaron que 5 y 10 DR de glifosato + dimetoato disminuye la altura y el peso fresco de *B. rapa*, en este estudio la combinación de glifosato + clorpirifos a sus diferentes dosis no afectó la altura de *B. napus*, mientras que el peso fresco no se diferenció del testigo (Tabla 2). Por lo expuesto, se evidenció que las dosis mayores de glifosato y glifosato + clorpirifos ocasionaron efectos subletales en el desarrollo del cultivo de *B. napus*.

Conclusiones

En el agroecosistema los fitosanitarios suelen estar presentes de manera conjunta y, por lo tanto, su impacto sobre los organismos edáficos puede ser sinérgico, acumulativo o antagónico dependiendo de su naturaleza química, la estructura como el mecanismo de acción. Tal condición representa un efecto indeseable para la vida de estos organismos. Sin embargo, en el presente estudio se demostró que tanto los fitosanitarios utilizados de manera individual como en mezclas binarias, clorpirifos y glifosato no causan mortalidad sobre *O. cyaneum*, aunque el insecticida solo o en mezclas ocasiona cambios morfológicos sobre los oligoquetos y mortalidad sobre *P. scaber*. Con respecto a *B. napus* 5DRG y 10DRG del herbicida afecta el porcentaje de emergencia, las plantas totales y la altura. De esta manera se evidenció que el insecticida, solo o con el herbicida, causa efecto letal sobre *P. scaber* y efectos subletales sobre *O. cyaneum* como en *B. napus*. Cabe destacar que el herbicida a DRG permitió obtener un porcentaje de emergencia mayor que el testigo sin los efectos indeseados de clorpirifos sobre *O. cyaneum*.



Referencias

ARREGUI, M.C., PURICELLI, E. (2008). Mecanismo de acción de plaguicidas. Acquaint, Rosario, Argentina. 208 p.

AZEVEDO, H., GOMES, C., PINTO, G., FERNANDES, J., LOUREIRO, S., SANTOS, C. (2005). Cadmium effects on sunflower growth and photosynthesis. *Journal of Plant Nutrition*, 28(12), 2211-2220.

Buch, A. C., Brown, G. G., Niva, C. C., Sautter, K. D. y Sousa, J. P. (2013) Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontosclex corethrurus* (Müller, 1857) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972). *Applied Soil Ecology*, 69, 32-38.

CASABÉ, N., PIOLA, L., FUCHS, J., ONETO, M. L., PAMPARATO, L., BASACK, S., JIMÉNEZ, R., MASSARO, R., PAPA, J. C. Y KESTEN, E. (2007) Ecotoxicological assessment of the effects of Glyphosate and Chlorpyrifos in an Argentine soya field. *Journal Soils Sediments*, 7(4), 232-239.

CASAFE. (2021) Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. Versión Digital de la Guía de Productos Fitosanitarios - CASAFE - Disponible en: https://guiaonline.casafe.org/index.php/ms_session_manager [Acceso: 15 de julio de 2021].

CORREIA, F.V. Y MOREIRA, J.C. (2010) Effects of Glyphosate and 2,4-D on Earthworms (*Eisenia fetida*) in Laboratory Tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85, 264-268.

De Laender, F., De Schamphelaere, K.A.C., Vanrolleghem, P.A. y Janssen, C. R. (2009) Comparing ecotoxicological effect concentrations of chemicals established in multi-species vs. single-species toxicity test systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 310-315.

DE SILVA, P. M. C. S. Y VAN GESTEL, C. A. M. (2009) Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. *Chemosphere*, 77, 1609-1613.

DI FIORI, E. (2014). Impacto conjunto de dos agentes antropogénicos de cambio ambiental: efecto del herbicida glifosato y del mejillón invasor *Limnoperna fortunei* en ecosistemas de agua Dulce. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Argentina. 190p.

FABERI, A.J., LÓPEZ, A.N., CLEMENTE, N. Y MANETTI, P.L. (2011) Importance of diet in the growth, survivorship and reproduction of the no-tillage pest *Armadillidium vulgare* (Crustacea: Isopoda). *Revista Chilena de Historia Natural*, 84, 407- 417.

GARCIA SANTOS, G. Y KELLER-FORRER, K. (2011). Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia. *Chemosphere*, 84(5), 651-656.

GISMANO, L. (2020) Control de *Lolium multiflorum* (raigrás) Presumiblemente Resistente a Glifosato. Tesis de postgrado, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. 77p.

GÓMEZ ORTIZ, A.M., OKADA, E., BEDMAR, F. Y COSTA, J.L. (2017). Sorption and desorption of glyphosate in Mollisols and Ultisols soils of Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(10), 2587-2592.

GUPTA, S. K. Y SUNDARARAMAN, V. (1991) Correlation between burrowing capability and AChE activity in the earthworm, *Pheretima posthuma*, on exposure to carbaryl. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 46(6), 859-865.

KASPAR, J. (2014) *Susceptibilidad de Octolasion cyaneum* (Saveny, 1826) (Annelida, Oligochaeta, Lumbricidae) a la exposición de los insecticidas más utilizados en agricultura [tesis de grado, Universidad Nacional de Mar del Plata]. 44p.



HANLEY, M. E. Y WHITING, M. D. (2005) Insecticides and arable weeds: effects on germination and seedling growth. *Ecotoxicology*, 14, 483-490.

IACOVELLI, J., SALVIO, C., MANETTI, P.L., CLEMENTE, N.L. Y FABERI, A.J. (2017) Efecto combinado de Glifosato y Sulfoxaflor sobre *Octolasion cyaneum* (Annelida, Oligochaeta: Lumbricidae). V Congreso Nacional de Ecología y Biología de Suelo, Noviembre 2017, Luján, Argentina. 8p.

IANNACONE, J. Y ALVARIÑO, L. (2004) *Eisenia fetida* (Savegny, 1826) (Annelida: Lumbricidae) como modelo ecotoxicológico para evaluar lindano y clorpirifos. *Acta Zoológica Lilloana*, 48(1-2), 5-12.

LAVELLE, P., DECAËNS, T., AUBERT, M., BAROT, S., BLOUIN, M., BUREAU, F., MARGARIE, P., MORA, P. Y ROSSI, J. P. (2006) Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology*, 42, 3-15.

LIU, T., CHEN, X., GONG, X., GRIFFITHS, B.S., HU, F. Y LIU, M. (2019) Earthworms coordinate soil biota to improve multiple ecosystem functions. *Current Biology*, 29, 3420–3429.

LØKKE, H. Y VAN GESTEL, C.A.M. (1998) *Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests*. John Wiley y Sons, Chichester.

LOWE, C.N. Y BUTT, K.R. (2008) Life cycle traits of the parthenogenetic earthworm *Octolasion cyaneum* (Savigny, 1826). *European Journal of Soil Biology*, 44, 541- 544.

MAITRE, M.I., RODRÍGUEZ, A.R., MASIN, C.E. Y RICARDO, T. (2012) Evaluation of earthworms present on natural and agricultural-livestock soils of the center northern Litoral santafesino, República Argentina. In R. P. Soundararajan (Ed.), *Pesticides Advances in Chemical and Botanical Pesticides* (pp. 13-38). Tech Janeza Trdine, Rijeka, Croatia.

MANONO, B. (2016) Agro-ecological role of earthworms (Oligochaetes) in sustainable agriculture and nutrient use efficiency: a review. *Journal of Agriculture and Ecology Research International*, 8(1), 1-18.

MARRS, R.H., WILLIAM, C.T., FROST, A.J. Y PLANT, R.A. (1989) Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. *Environmental Pollution*, 59, 71-86.

MATSUMURA, F. (1987) Comparative metabolism of mixtures of chemicals by animals, plants and microorganisms and their significance in alteration of pollutants in the environment. En: Vouk, V. B., Buttler, G. C., Upton, A. C., Parke D. V. y Asher A. C. (Eds.), *Methods for Assessing the Effects of Mixtures of Chemicals*. John Wiley and Sons, Chichester, 509-522.

MADZARIC, S., KOS, M., DROBNE, D., HOCEVAR, M. Y KOKALJ, A.J. (2018) Integration of behavioral tests and biochemical biomarkers of terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) is a promising methodology for testing environmental safety of chars. *Environmental Pollution*, 234, 804-811.

MÜLLER, C. (2018) Impacts of sublethal insecticide exposure on insects — Facts and knowledge gaps. *Basic and Applied Ecology*, 30, 1–10.

NIEMEYER, J.C., BENEDET DE SANTO, F., GUERRA N., FILHO, A.M.R. Y PECH, T. M. (2018) Do recommended doses of glyphosate-based herbicides affect soil invertebrates? Field and laboratory screening tests to risk assessment. *Chemosphere*, 198, 154-160.

PELOSI, C., BERTRAND, C., DANIELE, G., COEURDASSIER, M., BENOIT, P., NÉLIEU, S., LAFAY, F., BRETAGNOLLE, V., GABA, S., VULLIET, E. Y FRITSCH, C. (2021) Residues of currently used pesticides in soils and earthworms: A silent threat? *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 305, 107167.



PIOLA, L., FUCHS, J., ONETO, M. L., BASACK, S., KESTEN, E. Y CASABÉ, N. (2013) Comparative toxicity of two glyphosate-based formulations to *Eisenia andrei* under laboratory conditions. *Chemosphere*, 91, 545-551.

PLAAS, E., MEYER-WOLFARTH, F., BANSE, M., BENGTSSON, J., BERGMANN, H., FABER, J., POTTHOFF, M., RUNGE, T., SCHRADER, S. Y TAYLOR, A. (2019) Towards valuation of biodiversity in agricultural soils: A case for earthworms. *Ecological Economics*, 159, 291-300.

OLSZYK, D., PFLEEGER, T., LEE, H.E. Y PLOCHER, M. (2010) Phytotoxicity assay for seed production using *Brassica rapa* L. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6, 725-734.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. (2017) R: A language and environment for statistical computing. r Foundation for statistical computing, Vienna, Austria. Version R 3.4.3.

RAFAEL, S.E., SALVIO, C., MANETTI, P.L., CLEMENTE, N.L. Y LÓPEZ, A.N. (2015) Susceptibilidad de *Octolasion cyaneum* (Annelida: Oligochaeta, Lumbricidae) expuesta a clorpirifos. *Revista Ciencia del Suelo*, 33(2), 173-181.

RANA, Z.A., SHAZHAD, M.A., MALIK, N.A. Y SALEEM, A. (2007) Efficacy of different insecticides and DC-Plus against mustard aphid, *Lipaphis erysimi* (Kalt). *Journal of Agricultural Research*, 45, 221-224.

RAO, J.V., PAVAN, Y.S. Y MADHAVENDRA, S.S. (2003) Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 296-301.

REINECKE, S. Y REINECKE, A. (2007) Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, 92-101.

SALVIO, C., MANETTI, P.L., CLEMENTE, N.L., MENONE, M. Y LÓPEZ, A.N. (2015a) Toxicidad subletal de clorpirifos sobre *Octolasion cyaneum* (Annelida: Oligochaeta, Lumbricidae). *Agriscientia*, 32(2), 131-138.

SALVIO, C., MENONE, M., RAFAEL, S., ITURBURU, G. Y MANETTI, P.L. (2015b) Survival, reproduction, avoidance behavior and oxidative stress biomarkers in the earthworm *Octolasion cyaneum* exposed to glyphosate. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, doi: 10.1007/s00128-015-1700-8.

SALVIO, C., MANETTI, P.L., CLEMENTE, N.L. Y LÓPEZ, A.N. (2015c) Efectos de clorpirifos, cipermetrina y glifosato sobre *Milax gagates* (Mollusca: Pulmonata) y *Armadillidium vulgare* (Crustacea: Isopoda). *Ciencias Agronómicas*, 26(2), 43-48.

SANTOS, M.J.G., FERREIRA, N.G.C., SOARES, A.M.V.M. Y LOUREIRO, S. (2011a) Evaluation of the joint effect of glyphosate and dimethoate using a small-scale terrestrial ecosystem. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 74, 1994-2001.

SANTOS, M.J.G., FERREIRA, N.G.C., SOARES, A.M.V.M. Y LOUREIRO, S. (2011b) Evaluation of the combined effects of dimethoate and spirodiclofen on plants and earthworms in a designed microcosm experiment. *Applied Soil Ecology*, 48, 294-300.

SANTOS, M.J.G., SOARES, A.M.V.M. Y LOUREIRO, S. (2011c) Joint toxicity of three plant protection products to *Triticum aestivum* (L.) and *Brassica rapa* (L.). *Journal Soils Sediments*, 11, 990-999.

SARWAR, M., AHMAD, N., SIDDIQUI, Q.H. Y RAJPUT, A.A. (2003) Efficiency of different chemicals on canola strain rainbow (*Brassica napus* L.) for aphids control. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2, 831-833.



SASAL, M.C., DEMONTE, L., CISLAGHI, A., GABIOUD, E. A., OSZUST, J.D., WILSON, M.G., MICHLIG, N., BELDOMÉNICO, H.R. Y REPETTI, M.R. (2015) Glyphosate loss by runoff and its relationship with phosphorus fertilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, doi:10.1021/jf505533r.

SENASA. (2021) Listado actualizado a agosto de 2021. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/productosveterinarios-fitosanitarios-y-fertilizantes/registro-nacional-de-terapeutica-vegetal> [Acceso: 15 de agosto de 2021].

SILVA, M.A., ARAGÃO, N.A., BARBOSA, M.A., MARQUES, J.E. Y DOMINGUES, C.S. (2009) Efeito hormótico de glifosate no desenvolvimento inicial de cana-de-açúcar. *Bragantia, Campinas*, 68 (4), 973-978.

STUDDERT, G.A. Y ECHEVERRÍA, H.E. (2000) Maíz, girasol y soja en los sistemas de cultivo del sudeste bonaerense. En: Andrade F. H. y Sadras V. (Eds.), *Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja*. EEA Balcarce INTA-FCA, UNMdP, Balcarce, Argentina, 407-437.

TIWARI, R.K., SINGH, S. Y PANDEY R.S. (2019) Assessment of acute toxicity and biochemical responses to chlorpyrifos, cypermethrin and their combination exposed earthworm, *Eudrilus eugeniae*. *Toxicology Reports*, 6, 288–297.

von Mérey, G., Manson, P., Mehrsheikh, A., Sutton, P. y Levine, S.L. (2016) Glyphosate and aminomethylphosphonic acid chronic risk assessment for soil biota. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35 (11), 2742–2752.

YASMIN, S. Y D'SOUZA, D. (2007) Effect of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79(5), 529-532.

ZHOU, S., DUAN, C., GI MICHELLE, W.H., YANG, F. Y WANG, X. (2011) Individual and combined toxic effects of cypermethrin and chlorpyrifos on earthworm. *Journal of Environmental Sciences*, 23(4), 676-680.

ZHOU, C.F., WANG, Y.J., LI, C.C., SUN, R.J., YU, Y.C. Y ZHOU, D.M. (2013) Subacute toxicity of copper and glifosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Pollution*, 180, 71-77.

SALVIO, C.; DE MENDIETA, J. A.; MANETTI, P. L. . (2022). Efectos individuales y en mezclas de glifosato y clorpirifos sobre organismos indicadores en un ecosistema a pequeña escala. *Revista Ciencias Agronómicas*, (39), e020. <https://doi.org/10.35305/agro39.e020>



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).