

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESTUDIOS DE ECOTOXICIDAD SOBRE LAS LOMBRICES *Eisenia fetida*  
DE LOS FUNGICIDAS UTILIZADOS PARA EL MANEJO DE FUSARIOSIS DEL  
TRIGO

por

Mariana PÉREZ POLANCO

TRABAJO FINAL DE GRADO  
presentado como uno de los requisitos  
para obtener el título de Ingeniera  
Agrónoma.

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2022

Trabajo final de grado aprobado por:

Director/a:

-----  
Dra. Gabriella Jorge Escudero

Tribunal:

-----  
Dra. Verónica Cesio

-----  
Dra. Diana Miguez

-----  
Dr. Carlos Pérez

Fecha: 21 de diciembre de 2022

Estudiante:

-----  
Mariana Pérez Polanco

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco por este trabajo final y la culminación de un proceso de gran aprendizaje.

Gracias a mí tutora y cotutora Gabriella Jorge y Diana Miguez, y a Latitud - Fundación LATU por permitir realizar los experimentos en sus instalaciones. A los productores y productoras que me facilitaron materiales e información durante este periodo Alfonso Carriquiry, Mauricio Vives y Marta Thomson.

Gracias a la Universidad de la República del Uruguay, gratuita, autónoma y cogobernada. Y a la Asociación de Estudiantes de Agronomía, a las y los compañeras/os de todas las épocas que hicieron, hacen y harán ese espacio de construcción, dónde pensar la vida universitaria y la producción de alimentos. El movimiento estudiantil me sostuvo y formó durante mis años en esta casa de estudios.

Gracias a mis cariños más cercanos en la vida, que me han acompañado, un abrazo apretado de festejo: a mi familia especialmente a mi papá Roberto, mi mamá Adriana, mi abuela Nélide y mis hermanas Ceci, Dani y Vero, a Martina y a Charo. A Mariana, Camila, Edgardo y Emma. Y a las gurisas, Lucia C. y Lucía R.

## TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS .....	vi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. FUNGICIDAS EN EL CONTROL DE FUSARIOSIS .....	2
2.1.1. Definiciones y generalidades .....	2
2.1.2. Fungicidas en Uruguay .....	3
2.1.3. Fusariosis de la espiga de trigo .....	3
2.2. TOXICIDAD DE LOS FUNGICIDAS Y SUS EFECTOS ADVERSOS .....	5
2.2.1. Toxicidad de combinación de químicos .....	6
2.2.2. Efectos adversos de los fungicidas.....	7
2.3. BIOENSAYOS DE TOXICIDAD.....	10
2.3.1. Tipos de bioensayos de toxicidad.....	10
2.3.2. Normas ISO y Environment Canada (2007).....	10
2.3.3. <i>Eisenia</i> y su uso en ensayos de toxicidad .....	11
2.4. LOMBRICES COMO POTENCIAL CONTROLADOR BIOLÓGICO EN FUSARIOSIS .....	12
2.5. REGULACIÓN DEL USO DE AGROQUÍMICOS.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1. ACONDICIONAMIENTO PREVIO.....	17
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y RECOLECCIÓN DE DATOS EN BIOENSAYOS DE CRECIMIENTO Y REPRODUCCIÓN. ....	20
3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y RECOLECCIÓN DE DATOS EN BIOENSAYOS AGUDOS. ....	21
3.4. PROCESAMIENTO DE DATOS.....	22
4. RESULTADOS .....	24
4.1. TEST DE REPRODUCCIÓN Y CRECIMIENTO.....	24

4.2. TEST DE TOXICIDAD AGUDA .....	27
5. DISCUSIÓN.....	31
5.1. TEST DE REPRODUCCIÓN Y CRECIMIENTO.....	31
5.2. TEST DE TOXICIDAD AGUDA .....	33
6. CONCLUSIONES Y REFLEXIONES FINALES.....	34
7. RESUMEN.....	35
8. SUMMARY.....	37
9. BIBLIOGRAFÍA .....	39
10. ANEXOS.....	47

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura de los dos isómeros de Triazoles.....	3
Figura 2. Concentraciones basadas en series logarítmicas recomendadas para bioensayos de toxicidad. ....	19
Figura 3. Número de juveniles a los 56 días según tratamientos en bioensayo de reproducción y crecimiento 1 y 2. Concentraciones crecientes de Swing Plus y Prosaro siendo cero las concentraciones recomendadas como dosis de aplicación a campo. Las concentraciones siguientes (-1; 1; 2; 3) fueron calculadas en base a serie logarítmica (Fig. 2). Las barras indican desvío estándar. ....	26
Figura 4. Lombrices adultas con constricciones y exceso de mucus.....	27
Figura 5. Porcentaje de mortalidad de lombrices según concentración (mg kg-1) de Prosaro en TA1. ....	28
Figura 6. Porcentaje de mortalidad de lombrices según concentración (mg kg-1) de Prosaro en TA2.....	29
Tabla 1. Toxicidad aguda y crónica para Swing Plus, Prosaro y Cibencarb .....	18
Tabla 2. Concentraciones de Prosaro (P) y Swing Plus (SP) en bioensayos de reproducción y crecimiento .....	20
Tabla 3. Concentraciones de Prosaro (P) en bioensayos agudos.....	20
Tabla 4. Mortalidad y variación de biomasa según los diferentes tratamientos para los test de reproducción y crecimiento 1 y 2.....	25
Tabla 5. Estimación de IC <sub>10</sub> e IC <sub>25</sub> (mg.kg-1).....	26
Tabla 6. Masa inicial y final (g.) de las lombrices sobrevivientes en el bioensayo agudo 1 (TA1) y bioensayo agudo 2 (TA2) .....	29

## 1. INTRODUCCIÓN

Los fungicidas comerciales son formulados compuestos por un principio activo responsable de la acción directa y comprobada y otros ingredientes declarados como "inertes" y protegidos por las empresas que los comercializan. Son múltiples y documentados los efectos tóxicos de los fungicidas, tanto en el ecosistema como en la salud de las personas. Para el ingreso de productos a Uruguay no es necesaria la declaración de toxicidad para lombrices (MGAP, s.f.), ser vivo que cumple un rol vital en la estructura del suelo y de la vida.

La Fusariosis de trigo es una enfermedad importante para cultivos de invierno, causada por *Fusarium graminearum* (forma imperfecta) de *Gibberella zeae* (forma perfecta), que provoca pérdidas de rendimiento y de calidad del grano. Por las condiciones de humedad de la primavera uruguaya aparece casi todos los años y es compleja de manejar, acrecentada por sistemas de siembra directa que dejan rastrojo sobre el suelo. Requiere un manejo integral para minimizar el riesgo de contenidos no deseables de micotoxinas deoxinivalenol (DON) producidas por este hongo; para el control químico se recomiendan fungicidas triazoles solos o en mezclas (metconazol, epoxiconazol, prothioconazole y tebuconazol).

Este trabajo se realizó en el marco de una investigación más amplia publicada en la tesis de Doctorado de Gabriella Jorge Escudero (2018) en la cual, en primera instancia se relevó las poblaciones de lombrices en los agroecosistemas del Uruguay, y luego se comprobó el control biológico realizado por lombrices para la Fusariosis de trigo al enterrar el rastrojo. Ante este hallazgo, cabe priorizar un manejo que aumente las poblaciones en el suelo; y es necesario preguntarse particularmente, en qué medida los agroquímicos utilizados en la producción agrícola convencional afectan la vida y desarrollo de las lombrices. Los objetivos de este trabajo son evaluar los efectos crónicos y de reproducción de dos formulados comerciales (Prosaro y Swing Plus) en *Eisenia fetida* y evaluar los efectos letales o agudos para el fungicida comercial Prosaro en *Eisenia fetida*.

Aunque no es el objetivo de este estudio problematizar los agrotóxicos enclave de cambio de paradigma, la presente tesis expone algunas consecuencias y efectos no deseados en la aplicación de fungicidas, ésta es una de las causas de insostenibilidad del modelo de agricultura nacido con la Revolución Verde y sostenido por el sistema capitalista. También parte de la discusión aborda la dificultad de observar el mundo natural desde el punto de vista de la ciencia reduccionista.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. FUNGICIDAS EN EL CONTROL DE FUSARIOSIS

#### 2.1.1. Definiciones y generalidades

Los fungicidas, junto a los herbicidas, insecticidas, bactericidas, entre otros conocidos como plaguicidas, son mezclas de sustancias que tienen como objetivo prevenir, destruir o controlar plagas o especies que perjudiquen la cadena productiva desde la producción hasta la comercialización de los alimentos (OMS y FAO, 2015). Se los puede encontrar bajo diversidad de denominaciones: productos fitosanitarios, curas, remedios, agrotóxicos; siendo este último el único que permite problematizar y generar conciencia del riesgo asociado. Algunos productores llaman “veneno” a los insecticidas y “remedios” a los fungicidas, estas denominaciones no coinciden con los niveles de peligrosidad, por lo tanto son erróneas (Serrato y Huerta, citados por CEUTA, 2006).

La palabra fungicida proviene del latín fungus -hongo- y cida del origen -matar-, es decir, que destruye hongos (RAE, 2019). La formulación comercial está compuesta por un principio activo que es responsable de la acción directa y comprobada sobre un hongo y coadyuvantes varios. Estos últimos tienen como objetivos colaborar en la penetración a las células objetivo, aumentar la actividad del principio activo y dejarlo más disponible, o aumentar su eficiencia según forma de aplicación prevista; son declarados como productos inertes, a pesar de ser sustancias que reaccionan y son protegidos por las empresas que los comercializan (OMS y FAO, 2015).

Los fungicidas se dividen en sistémicos y de contacto según su grado de penetración a las células vegetales. Los de contacto evitan que los hongos penetren en los tejidos de una planta, dentro de estos se encuentran los más antiguos cuyos principios activos son el azufre y el cobre (Lyr, 1987). La mayoría de los fungicidas que aparecieron a partir de 1960 son sistémicos, actúan penetrando las células fúngicas y algunos tienen movimiento dentro de la planta; también se puede clasificar los fungicidas por cuan específicos son en su accionar, aquellos que actúan en un solo sitio o en una enzima o proteína del hongo y los multisitios que afectan varios sitios metabólicos del hongo (Mondino, 2002).



Los triazoles son fungicidas sistémicos, que penetran las células y se mueve a través del xilema y su modo de acción es la inhibición de la biosíntesis del esterol, componente esencial de la membrana celular fúngica (Wegulo et al., 2012). Su estructura química es un anillo con dos o tres átomos de nitrógeno y la fórmula que los representa es  $C_2H_3N_3$  (Kamrin, 1997)

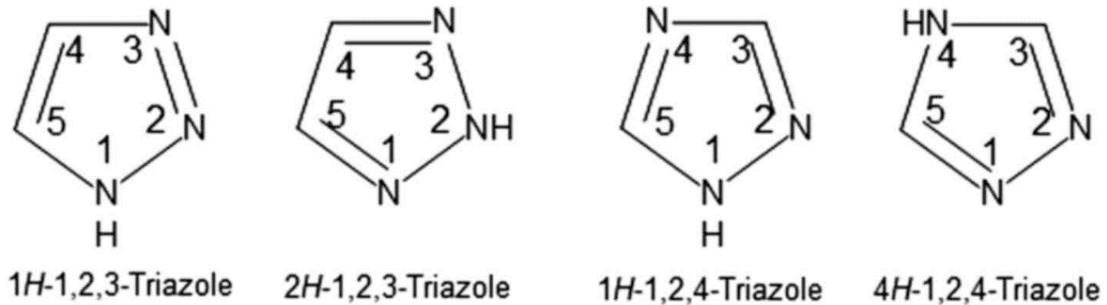


Figura 1. Estructura de los dos isómeros de Triazoles.

**Fuente:** tomado de Kamrin (1997).

### 2.1.2. Fungicidas en Uruguay

Los fungicidas se encuentran ampliamente distribuidos en el Uruguay, y son un insumo muy utilizado en la agricultura convencional. Las importaciones en el periodo 2010-2021 fueron en promedio 27.037.269 dólares anuales, siendo el segundo plaguicida en importancia luego de los herbicidas. En ese periodo, en concordancia con la actividad agrícola de secano, tuvo un crecimiento en las importaciones al inicio que luego se mantuvo estable (MGAP. DGSA, s.f.). En 2021, último dato publicado a la fecha, el país importó un total de 1.698.736 L. de fungicidas, que significó 24.117.349 dólares siendo 13,61% de las importaciones de plaguicidas totales en ese año (MGAP. DGSA, s.f.).

### 2.1.3. Fusariosis de la espiga de trigo

Una de las principales enfermedades fúngicas que se vio acrecentada por la tecnología de siembra directa y aumentó los requerimientos de control químico en el país y a nivel mundial es la Fusariosis de la espiga de cebada y trigo o golpe blanco, con pérdidas de rendimiento de hasta 50% (Mazzilli et al., 2007).

Esta es una enfermedad causada por una o varias especies de hongo *Fusarium*, la más frecuente es *Fusarium graminearum* (forma imperfecta) de *Gibberella zeae* (forma perfecta) (Díaz de Ackermann, 1996). Es un parásito facultativo que sobrevive como saprófito en los residuos luego de la cosecha, las esporas (ascosporas) son diseminadas por viento o gotas de lluvia y el clima húmedo favorece el crecimiento y la esporulación del hongo. Previo a la expansión de la siembra directa, al laborear y enterrar el rastrojo, se conseguía un efecto de control mecánico.

Las condiciones que se dan en primaveras húmedas facilitan la infección desde la antesis, siendo ésta la etapa de mayor susceptibilidad en el trigo (McMullen et al., 2012). La sintomatología se observa en la espiga de la planta enferma cuando pierde clorofila y se tornan descoloridas, apareciendo luego una coloración rojiza salmón que corresponde a los conidios del hongo (Díaz de Ackermann, 1996).

La fusariosis disminuye el rendimiento y sobretodo, la calidad del grano, ya que produce micotoxinas que provocan daños a los seres humanos y animales (Díaz de Ackermann, 1996). Las toxinas predominantes asociadas son Zearalenona (ZEN) y Deoxinivalenol (DON), que provocan el rechazo del alimento, pudiendo causar problemas inmunológicos, irritaciones de la piel, alteraciones gástricas, abortos, alteraciones hematológicas y teratogénicas y cáncer en humanos (McMullen, et. al., 2012, Díaz de Ackermann, 1996). El límite máximo aceptado de DON en Uruguay es de 1 mg kg<sup>-1</sup> (1 ppm) en harina de trigo (MGAP, 2001) y para subproductos y productos elaborados en base a trigo un límite de 10 mg kg<sup>-1</sup> (10 ppm) para las materias primas destinadas a la elaboración de alimentos para animales (MGAP, 2001).

El control de esta enfermedad es importante y difícil de realizar en todas las zonas húmedas del mundo, aparece en Uruguay, con distinta incidencia, todos los años. Requiere un manejo integral para minimizar el riesgo de contenidos no deseables de micotoxinas en el grano y en el producto final (INIA, 2014). Para el control químico de Fusariosis de la espiga en trigo, los fungicidas recomendados por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, 2014) son triazoles solos o en mezclas (metconazol, epoxiconazol, protioconazole y tebuconazol).

Los productores de trigo orgánico en Uruguay no han tenido mayores inconvenientes con esta enfermedad. En la cooperativa GRANECO<sup>1</sup> los productores manejaban el suelo labrado por lo que al enterrar el rastrojo disminuían el inóculo inicial; en el predio biodinámico “La Pequeña”<sup>2</sup> situado en el litoral del país, se realiza una

1 Mauricio Vives. 2018. Com. personal.

2 Martha Thomson. 2022. Com. personal.

rotación que permite implantar luego de una pradera y un tratamiento con sílice de cuerno (cuarzo) en floración y una semana previo a la cosecha para prevenir y tratar en caso que haya infección. Ambos casos utilizan la variedad Tijereta.

## 2.2. TOXICIDAD DE LOS FUNGICIDAS Y SUS EFECTOS ADVERSOS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los agroquímicos según su capacidad de producir daño agudo a la salud, esta clasificación está basada en la dosis letal media (DL 50) aguda, por vía oral o dérmica en ratas (OMS, 2020).

La DL50 aguda es la cantidad de sustancia que es necesario ingerir (dosis letal oral aguda) o estar en contacto con la piel (dosis letal dérmica aguda) una sola vez para producir la muerte del 50% de los animales en ensayo de toxicidad (OMS, 2020). Puede realizarse esta prueba con varios tipos de exposición, siendo los más utilizados dermal y oral y se expresa en  $\text{mg kg}^{-1}$  de peso del animal. A través de estos ensayos surge la clasificación en categorías: Ia sumamente peligrosos, Ib muy peligrosos, II moderadamente peligrosos, III poco peligrosos y IV productos que normalmente no ofrecen peligro. Son identificados en la etiqueta con colores rojo (muy tóxico y tóxico), amarillo (moderadamente peligroso), azul (poco peligroso) y verde (normalmente no ofrecen peligro) (FAO, 2019).

Otros índices estadísticos toxicológicos utilizados para reflejar el efecto de una sustancia son la Concentración Letal (LC, sigla en inglés), la Concentración de Menor Efecto Observado (LOEC, por su sigla en inglés), la Concentración Sin Efecto Observado (NOEC, por su sigla en inglés) y la concentración a la que reduce la performance (ICp, por su sigla en inglés) (Environment Canada, 2007). La primera es calculada mediante un análisis estadístico del porcentaje de mortalidad, con una confianza de 95%, a determinado tiempo de exposición; el más usado es LC50 en la cual muere 50% de los individuos testeados, pero también se puede usar LC20. Se expresa en % o  $\text{mg kg}^{-1}$  de sustancia usada en el experimento, sustrato o suelo (Environment Canada, 2007). La LOEC corresponde a la concentración más baja en la cual se ve un efecto adverso mientras que NOEC es la concentración más alta de una sustancia o material de prueba en que no se observó ningún efecto adverso; ambos deben presentar diferencias estadísticamente significativas en los organismos de prueba, con relación al control (Environment Canada, 2007). En test de reproducción y crecimiento, el ICp estima la concentración en la cual se reduce significativamente (con 95% de confianza) la performance o el número de

juveniles nacidos durante el bioensayo en determinado porcentaje, por ejemplo en IC<sub>10</sub> esta reducción es de 10% y en IC<sub>25</sub> corresponde a 25% (Environment Canada, 2007).

### 2.2.1. Toxicidad de combinación de químicos

Como se mencionó en la sección 1.2, el producto comercial es más que el compuesto químico responsable de la acción comprobada sobre el hongo; el formulado puede contener varias sustancias agregadas como solventes, humectantes y surfactantes llamados a veces de “inertes”. A pesar de esta denominación algo confusa, los ingredientes inertes dentro de un fungicida son componentes que acompañan al ingrediente activo y tienen actividad; algunos son altamente tóxicos, e incluso han sido eliminados de las listas de permitidos por tener efectos adversos en la reproducción o ser potencialmente cancerígenos, presentar genotoxicidad, altamente persistentes y bioacumulativos en el ambiente (Nagy et al., 2020).

El efecto tóxico de estos compuestos adicionales se puede comprobar fácilmente al comparar distintos fungicidas con igual principio activo y CL50 distinta (Cepeda y Carlosama, 2016). Estudios hechos en células humanas demuestran que los productos comerciales pueden ser hasta mil veces más tóxico que el principio activo, se han constatado modificaciones sobre la actividad mitocondrial, la membrana celular y en enzimas en concentraciones 300 a 600 veces más bajas que las aplicaciones de campo (Mesnage et al., 2014).

Por ello la toxicidad de una formulación comercial depende del principio activo y de las sustancias asociadas al mismo, pudiendo realizarse ajustes en la clasificación de un producto si el compuesto tiene mayor o menor riesgo que el ingrediente o ingredientes activos (OMS, 2020).

Generalmente, la aplicación simultánea de productos es efectuada en muchos casos, para ahorrar energía y horas de trabajo. Al aplicar varios productos que contienen más de una sustancia química (emitidos conjuntamente o no) y que se presentan al mismo tiempo juntos en el ambiente, puede haber interacciones. Para mezclas de similares modos de acción se puede estimar el efecto al ambiente sumando los mismos y para mezclas que actúan de manera independiente se estima teóricamente cada componente por separado; en ambos casos se debe asumir que los químicos de la mezcla no interactúan entre sí. Si bien en algunos casos coincide con la realidad, la mayoría de las sustancias químicas interactúan de alguna manera, generando un “efecto cocktail” o toxicidad de mezclas y puede afectar tanto al ambiente como a los seres humanos. Una interacción toxicológica

existe cuando la exposición a dos o más sustancias químicas resulta en una respuesta distinta a la esperada de cada una por sí sola (UE. CE, 2012).

Los efectos en la toxicidad de las mezclas pueden ser antagónicos, sinérgicos o neutros, efectos que son prácticamente impredecibles dada la escasez de estudios que consideren efectos ambientales, y la salud humana (Tornisiello et al., 2013). El efecto cocktail se observa tanto en productos comerciales, donde se observa la combinación de principio activo con otros ingredientes; como en mezclas de principios activos (Mesnage et al., 2014). Relyea (2009) comprobó para comunidades acuáticas, mayor mortalidad que la esperada a bajas concentraciones (2-16 ppb) según los efectos previstos tomando cada principio activo por separado.

Como si resultara poco esta caja negra de resultados por la combinación simultánea de tóxicos, las aplicaciones son repetidas varias veces durante un mismo ciclo de cultivo, lo que indica que los ensayos de toxicidad realizados en cada producto podrían subestimar la situación real de la agricultura mundial (Van Hoesel et al., 2017)

### 2.2.2. Efectos adversos de los fungicidas

El uso de fungicidas causa problemas ecológicos, ese efecto depende fundamentalmente de la toxicidad del producto; sobre todo los más antiguos, tienen su efecto negativo ampliamente documentado (Migliani y Bisht, 2019). Se estima que menos del 0,1% de los plaguicidas aplicados en cultivos, ya sean de contacto o sistémicos, alcanzan la plaga objetivo; el resto de producto alcanza a organismos no blanco (Pimental, 1995). Así llega a los distintos componentes del ecosistema: agua, suelo y seres vivos, entre ellos vegetales, animales, microorganismos y seres humanos.

Los triazoles afectan la salud humana, son disruptores del sistema endocrino, encargado de la regulación hormonal y por lo tanto esencial para el metabolismo y crecimiento así como el sueño, la reproducción y el estado de ánimo. En particular, este grupo de fungicidas inhiben la actividad de la enzima aromatasa, lo cual disminuye la producción de estrógenos y aumenta la disponibilidad de andrógenos (Mnif et al., 2011).

En Uruguay no existen estudios específicos sobre la toxicidad de fungicidas en personas, los estudios engloban a todos los agrotóxicos en general. Un estudio realizado por el Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico (CIAT) y Facultad de Química sobre plaguicidas declara que se recibe, en promedio, un caso de intoxicación aguda por día y muestra que 17% de las intoxicaciones son moderados y graves y la circunstancia que más se repite, es la intoxicación laboral aguda; predominando ésta en

departamentos del interior del país con predominancia de actividad agrícola (Taran et al., s.f.). Estos mismos autores mencionan que, en general la evolución del número de casos entre 2002 y 2011 (siendo en promedio de 378 consultas anuales) no muestra un paralelismo con las importaciones, a excepción de los herbicidas; pero sí detectan como factores determinantes de la intoxicación condiciones de trabajo inseguras, fácil acceso de parte de niñas y niños y la consideración de estas sustancias como agentes suicidas.

Los casos de intoxicación crónica denunciados al Banco de Seguros del Estado (BSE) y registrados por CIAT fueron 4% de un total de 2606 casos en el periodo 2002-2011, y son siempre laborales por ser donde ocurre la exposición repetida y prolongada; asimismo deberían considerarse como posibles efectos crónicos las intoxicaciones agudas leves ocurridas en el trabajo. Es altamente probable que exista un subregistro de efectos crónicos en la salud, debido a la falta de conocimiento de los trabajadores e incluso del personal médico sobre los síntomas asociados, los cuales se puede confundir con otras patologías, pero que se encuentran explicados en aumentos de enfermedades a nivel nacional como cáncer, malformaciones congénitas, entre otras (Taran et al., s.f.).

#### 2.2.2.1. Efectos en el ecosistema

En el ecosistema los fungicidas y los distintos químicos se adhieren y compartimentan en agua, suelo y seres vivos según sus características químicas y cómo se produce su descomposición. Los triazoles no son fuertemente adsorbidos por las partículas del suelo, en suelos arcillosos su descomposición puede demorar una semana y depende de los microorganismos presentes (Kamrin, 1997). La microbiota del suelo asociada al reciclaje de nutrientes disminuye ante las aplicaciones de fungicidas; la diversidad de hongos del suelo y en particular las micorrizas se ven afectadas negativamente, al afectar los procesos respiratorios de las mismas y sus membranas (Chi-Chu, 2010).

Luego de la descomposición química del triazol en la matriz suelo puede alcanzar las aguas subterráneas a las dos semanas y una vez que llegan allí son muy estables, pudiendo permanecer más de veintiocho semanas. Las plantas pueden absorberlo fácilmente por sus raíces y traslocarlo, pudiendo metabolizarlo luego de un mes (Kamrin, 1997).

Durante la aplicación del fungicida, el mismo alcanza a los organismos objetivo, aquellos que justifican la aplicación y también llega a otros seres no objetivo o “non-target” organismos, los cuales interceptan igualmente la sustancia química. Es así que

estos agrotóxicos afectan fisiológicamente a plantas no objetivo inhibiendo el fotosistema II, en pequeñas dosis aumenta la población de cianobacterias fijadoras de Nitrógeno y en altas dosis es fitotóxica para las mismas (Petit et al., 2012).

Dentro de los organismos no objetivo presentes en el suelo, se encuentran las lombrices, las cuales son fundamentales para tener suelos con características físico químicas favorables. Esta macrofauna en conjunto con la microbiota del suelo son claves en su sostenibilidad y funcionalidad, generan canales que airean mientras fragmentan la materia orgánica y depositan su materia fecal que colabora en la estructura y fertilidad; así mismo la generación de ácidos húmicos y fitohormonas que quedan disponibles para las plantas puede aumentar el rendimiento de los cultivos (Singh, 2018).

Migliani y Bisht (2019) reportan trabajos que evidencian efectos negativos tanto en test de sobrevivencia, reproducción y el metabolismo de distintos pesticidas sobre lombrices. Estos efectos se encuentran estrechamente relacionados con su exposición, no solo a través de la piel sino por procesos de absorción, metabolismo y excreción por la ingestión de tierra y alimentos contaminados. El proceso depende también de la hidrofobicidad del pesticida y del contenido de materia orgánica del suelo (Katagi y Ose, 2015).

En particular, los triazoles afectan el metabolismo de las lombrices, destruyendo sus células. Resultados de un estudio bioquímico e histopatológico arrojaron que, a determinadas concentraciones, el contenido de proteínas varió significativamente en el tratamiento con triazol en comparación con el control. Mientras la epidermis se destruyó, se vio que la disposición de la capa muscular lisa se desordenó y algunas células se desintegraron con el aumento de la concentración de triazoles mientras que algunos organismos en estudio mostraron pycnosis celular, citoplasma teñido, y alteraciones en el núcleo (Gao et al., 2013). Estos fungicidas se destacan también por ser bioacumulados por las lombrices en sus tejidos y potencialmente trasladarse en la cadena alimenticia, el tebuconazol precisa más de treinta y seis días para ser eliminado, después de ser biotransformado y metabolizado por la lombriz (Yu et al., 2012).

Estos resultados sobre las afecciones de los tóxicos son generados a través de bioensayos de toxicidad, que permiten conocer el grado de afectación a organismos no objetivo y sus efectos no deseados en general.



## 2.3. BIOENSAYOS DE TOXICIDAD

### 2.3.1. Tipos de bioensayos de toxicidad

Los bioensayos de ecotoxicidad son pruebas donde se expone organismos, en este caso lombrices, a cierta sustancia tóxica para determinar su efecto. Estos estudios permiten medir efectos letales o de toxicidad aguda y efectos subletales, dentro de los que se encuentran los de efectos en la reproducción y crecimiento y los de fuga o escape.

Los bioensayos de toxicidad aguda se realizan mediante la exposición durante 14 días (con variantes de 48 y 72 horas) de lombrices adultas o juveniles, la exposición puede ser directa por inmersión, aplicación tópica, inyección o contacto con papel embebido en la solución; a través del alimento colocando a voluntad o forzándolas; y por medio del sustrato ya sea sílice, suelo natural o artificial (Environment Canada, 2007). En el ensayo realizado para esta tesis se colocó la solución con fungicida sobre suelo artificial estandarizado, haciendo una simulación de la aplicación a campo del mismo.

Dentro de los ensayos que miden la toxicidad subletal se encuentran los de toxicidad crónica o de reproducción y crecimiento y los de fuga. Los primeros son de exposición durante 56 días y permite determinar los efectos de la exposición prolongada de lombrices adultas de *E. andrei* y su progenie, éste ensayo requiere un periodo largo de trabajo de laboratorio e incubación (ISO, 2012). Esa es la mayor debilidad comparativa, en tiempos y costos asociados, con respecto a los ensayos de fuga que permiten conocer el rechazo a los productos químicos en poco tiempo (48h) con un alto nivel de sensibilidad (ISO, 2012). En este trabajo se realizó un test de reproducción y crecimiento que permitió observar tanto ootecas como lombrices juveniles.

### 2.3.2. Normas ISO y Environment Canada (2007)

Estos bioensayos cuyo objetivo es obtener información sobre los efectos de los contaminantes en el suelo, se encuentran estandarizados mediante normativas a nivel mundial. Se describen a continuación las normativas tomadas en este trabajo, las cuales se seleccionaron por ser aquellas más utilizadas y con poder comparativo frente a otros estudios.

La Organización Internacional de Estandarización (ISO por su sigla en inglés, International Organization for Standardization) es la que genera las normas o estándares ISO, con el objetivo de asegurar calidad, seguridad y eficiencia de productos y servicios.



Está presente en 193 países y hay más de 22.000 normas ISO en la actualidad que abarcan distintas industrias, tecnología, agricultura y salud, entre otras (Qué es ISO, s.f.).

La normativa presentada en la Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests (Environment Canada, 2007) es desarrollada y publicada por el Ministerio de Ambiente de Canada y describe procedimientos detallados y condiciones necesarias para realizar pruebas ecotoxicológicas con lombrices *Eisenia andrei*, *Eisenia fetida* (a partir de ahora *E. fetida*) y *Lumbricus terrestris* (*L. terrestris*).

Este tipo de ensayos reduccionistas son sumamente precisos y han sido evaluados en múltiples ocasiones, sin embargo se les puede hacer una gran crítica acerca de las condiciones en las cuales se realizan y del organismo vivo utilizado. Las condiciones de laboratorio son totalmente homogéneas durante el ensayo y distintas a las que luego se dan a campo, dada la variabilidad climática cambian las dinámicas de los agroquímicos y las poblacionales, tanto de las lombrices como sus interacciones con otros seres vivos.

### 2.3.3. *Eisenia* y su uso en ensayos de toxicidad

La lombriz más utilizada para estos ensayos de toxicidad es *E. fetida* por su facilidad en el manejo y crianza en laboratorio y por su ciclo reproductivo corto y conocido, por este motivo son consideradas un modelo biológico ideal en ensayos de toxicidad de pesticidas en el ecosistema del suelo y monitoreo ambiental (ISO, 2012, Environment Canada, 2007, Gao et al., 2013).

Sin embargo, algunas de las críticas mencionadas en el apartado anterior se pueden asociar a los hábitos de vida de las mismas. Las lombrices pueden ser clasificadas en tres grupos según sus hábitos de vida: epígeas, anécicas y endógeas (Bouché, 1977). Las primeras habitan la superficie del suelo donde se concentra materia orgánica en descomposición; entre ellas están las *E. fetida* utilizadas para el vermicompostaje o lombricompostaje. Las anécicas generan galerías verticales consumen restos vegetales que suben a buscar a la superficie, estas son las más conocidas por ejemplo *L. terrestris*. Finalmente, las endógeas se mantienen sin subir a la superficie, generan galerías irregulares, poseen falta de pigmentación ya que no están expuestas al sol, están generalmente asociadas a la rizósfera donde se alimentan de microorganismos (Jorge Escudero, 2018).

El uso de *E. fetida* ha sido cuestionado porque esta especie epígea no se encuentra generalmente en zonas de cultivo donde se aplican agrotóxicos. Si bien en Uruguay hay escasos antecedentes sobre comunidades de lombrices en sistemas agrícolas (Grosso y

Brown, 2007), se sabe que *E. fetida* es una lombriz exótica que no se encuentra en nuestros suelos a excepción de tambos, jardines y montes forestales, con alta materia orgánica en descomposición (Jorge Escudero, 2018). Otras especies como *Aporrectodea caliginosa*, de grupo ecológico endógeo, que se encuentra en campos cultivados, ha mostrado ser más sensible que las *Eisenia spp.* (Pelosi et al., 2013). Adicionalmente, se descubrió que los arácnidos e isópodos son más sensibles a los insecticidas; y los nematodos, de los cuales hay varios grupos benéficos, a los fungicidas, en comparación con *E. fetida* (Daam et al., 2011).

La mayoría de los estudios de toxicidad con lombrices están hechos sobre insecticidas y sobre plaguicidas muy tóxicos y antiguos, la mayoría realizados en la década de 1980. Hay pocos datos sobre la toxicidad de los triazoles en las lombrices a pesar del hecho de que dichos datos son considerados críticos para evaluar su destino y los posibles efectos tóxicos en los organismos del suelo (Gao et al., 2013).

Se vieron efectos adversos en distintos niveles con triazoles en lombrices, al realizar ensayos bioquímicos e histopatológicos se vio aumentos significativos de proteínas e inhibición en la acción de la enzima glutatión-peroxidasa la cual protege las células del daño oxidativo. El examen histopatológico mostró que las células de la epidermis se destruyeron a concentraciones de 1,47-23,50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de fungicidas triazoles, la capa muscular lisa tuvo efectos negativos como desintegración celular, condensación y contracción del núcleo y citoplasma dañado a mayores concentraciones (Gao et al., 2013). Experimentos similares desarrollados por Zhang et al. (2020) determinaron que, a concentraciones de 0,5 y 50  $\text{mg kg}^{-1}$  de tebuconazol existen desregulaciones enzimáticas y mitocondriales produciendo desajustes en el metabolismo, estrés oxidativo y daño genético. En cuanto a la reproducción, los autores encontraron una desregulación en la producción de Annetocina (péptido relacionado a la secreción hormonal de las lombrices).

#### 2.4. LOMBRICES COMO POTENCIAL CONTROLADOR BIOLÓGICO EN FUSARIOSIS

Como se mencionó anteriormente el *Fusarium sp.* es actualmente el desafío productivo más importante para el cultivo de trigo, el control químico como única herramienta resultaría no sólo ineficiente sino también con un costo ambiental muy alto. Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas eficientes y más adecuadas ambientalmente, entre ellas el control a través de lombrices.

Se puede considerar a las lombrices como herramienta para el control de esta enfermedad relacionando su eficiencia para el control del patógeno con su grupo ecosistémico. Según una revisión realizada por Jorge Escudero (2018) existen un total de veinticinco enfermedades fúngicas y parásitos en veintiuna especies vegetales con evidencia de control biológico a través de lombrices proponiendo distintos mecanismos.

Los mecanismos pueden ser directos o indirectos sobre el patógeno, los directos son por ingestión o por acción mecánica y química; por ingestión se da el consumo preferencial de microorganismos y sus estructuras que luego de pasar por el tracto digestivo son liberadas con menor tasa de sobrevivencia y germinación, mientras que la acción directa mecánica y química se debe a la ruptura mecánica de las hifas y la modificación química dada por los fluidos que libera. Los mecanismos indirectos pueden ser mediados por el suelo, por organismos benéficos o por las plantas; las lombrices modifican el suelo aumentando su porosidad y cambiando por lo tanto su concentración de oxígeno, esta mejora realizada por las lombrices se ve potenciada por el aumento de microorganismos asociados al tracto digestivo de las mismas. Por último, aumentan la biomasa de las plantas al dejar los nutrientes más disponibles y modificar la estructura del suelo; eso aumenta la rizosfera y las concentraciones de microorganismos benéficos para las mismas (Jorge Escudero, 2018).

En la revisión bibliográfica que realizó Jorge Escudero (2018) describe y sistematiza el efecto benéfico de distintas lombrices para enfermedades de trigo como Fusariosis de trigo (*Fusarium culmorum*, *F. graminearum*), además de otras enfermedades como Damping off (*Rhizoctonia solani*.), Pudrición radical (*Gaeumannomyces graminis var. tritici*) y Mancha ocular del trigo (*Tapesia yallundae*, *Oculimacula yallundae*.). En estos casos las lombrices redujeron la disponibilidad del patógeno por ingestión de las hifas, provocando una mayor disponibilidad de Nitrógeno y Zinc y mejorando la estructura del suelo mejorando así la defensa de la planta, incorporaron el rastrojo infectado, promovieron la actividad microbiana benéfica, en cada caso.

El control de fusariosis del trigo se vería beneficiado por la incorporación del rastrojo infectado al suelo y promoción de la actividad microbiana a través de la secreción de mucus con gran concentración de compuestos biodisponibles (Jorge Escudero, 2018). *Lombricus terrestris* en interacción con los microorganismos del suelo son capaces de degradar de manera eficiente tanto el *Fusarium* como el DON en el rastrojo (Oldenburg et al., 2008).

Estudios recientes realizados en el país por Jorge Escudero (2018) estudiaron el potencial de las lombrices *Glossoscolex rione* (endógea, nativa) y *Lombricus friendi*

(anécica, exótica) presentes en agroecosistemas de trigo en Uruguay. Los resultados revelaron que *L. friendi* redujo más del 30 % del rastrojo en superficie, mientras el tratamiento con *G. rione* no se diferenció del control. A su vez se comprobó que las lombrices no se ven afectadas negativamente por el hongo, ni por sus toxinas asociadas (Jorge Escudero, 2018).

Estos últimos estudios contribuirían al manejo mediante control biológico como parte de un manejo integral de la fusariosis de la espiga de trigo; pero para que funcione dentro del paquete del control integrado debe ser compatible con el uso de fungicidas y otros agrotóxicos y como se describió anteriormente muchos de éstos generan graves daños para las lombrices, entre otros organismos. Para la combinación de estas herramientas, es necesaria una reglamentación acorde, en la cual se incluyan ensayos de toxicidad de los fungicidas sobre los organismos responsables del control biológico, en este caso las lombrices.

## 2.5. REGULACIÓN DEL USO DE AGROQUÍMICOS

Cada vez hay más pruebas respecto al daño que producen los agrotóxicos y la población mundial exige regulación no solo respecto a los límites de residuos de los fitosanitarios en alimentos, sino también datos de seguridad que declaren la toxicidad de los mismos y permita adoptar medidas de protección de la salud de los trabajadores y del medio ambiente.

Algunos países como los de la Unión Europea (UE) han regulado y reforzado la reglamentación considerada de las más estrictas en cuanto a registro, evaluación, autorización y restricción de las sustancias y mezclas químicas (Reglamento de la Comisión REACH, por su sigla en inglés). Esta reglamentación si bien ha sido bien evaluada internacionalmente, es criticada por no contemplar efectos en la disponibilidad de alimentos sanos y la economía en zonas rurales, no contemplar la posibilidad de adecuación a la forma de producir, la renta, el empleo; y por sobretodo la falta de inclusión durante el proceso de las organizaciones agrarias (Ramos, 2010).

Uno de los elementos para la toma de decisiones en cuanto al uso de estos productos son los ensayos toxicológicos. El Reglamento 2015/830 (UE. CE, 2015) determina los requisitos de la ficha de datos de seguridad de plaguicidas registrados en la UE; en cuanto a las clases de peligro debe aparecer información toxicidad aguda y lesiones cutáneas, oculares, respiratorias; mutagenicidad en células germinales; carcinogenicidad; toxicidad para la reproducción y toxicidad específica de determinados órganos por

exposición única y repetida. Se deben presentar datos de ensayos realizados con organismos terrestres y/o acuáticos, entre los primeros incluye microorganismos y organismos macro terrestres con importancia medioambiental específicamente aves, abejas y plantas. Además, esta reglamentación reconoce la posible ausencia de datos, en dicho caso debe ser mencionado claramente en la hoja de seguridad (UE. CE, 2015).

En Uruguay el MGAP es quien controla materias primas y productos de uso agropecuario, y la Dirección General de Servicios Agrícola (DGSA) el organismo estatal dentro del MGAP responsable de regular el registro, control y venta de plaguicidas de uso agrícola, así como controlar el uso y aplicación de los mismos (Neme et al., 2010). En general, se toman reglamentaciones internacionales y europeas de referencia; para el registro de un formulado comercial se exige que se declaren en la etiqueta la toxicidad para peces, animales domésticos, abejas y humanos, en este caso actúa específicamente el CIAT quien elabora una escala de toxicidad y recibe denuncias de intoxicaciones desde el CIAT (MGAP, s.f.).

Hace falta información que refuerce la toma de decisiones para definir su uso. La regulación nacional ha tendido en varias oportunidades a restringir e incluso eliminar algunos productos de efectos tóxicos y altamente tóxicos; sin embargo, en el último tiempo se han autorizado la ampliación del uso de productos químicos. Algunos de los principios activos descritos en la Resolución Ministerial N°1.129 (MGAP. DGSA, 2022) son declarados como moderadamente tóxicos para lombrices.

Para el control de enfermedades fúngicas en agricultura convencional se utilizan fungicidas, formulados tóxicos que causan graves efectos no deseados en distintos seres u objetivos no blanco, entre los que se encuentran las lombrices. Las lombrices, además de tener un efecto benéfico en la estructura del suelo y el crecimiento vegetal, puede controlar algunos fitopatógenos. Para poder acceder al servicio ecosistémico brindado por las mismas para el control de enfermedades, hay que estudiar de qué maneras son afectadas por los insumos utilizados en la agricultura. De ese razonamiento surge la importancia de hacer test de toxicidad con los formulados comerciales que darán una mejor información sobre el efecto de lo aplicado a campo, idealmente se debería exigir estos ensayos para la autorización y venta de estos productos.

La presente tesis expone algunas consecuencias y efectos no deseados en la aplicación de fungicidas y agrotóxicos en general, el estudio ecotoxicológico de formulaciones comerciales sobre lombrices sería el primer paso para tomar una decisión acerca de su uso cuando se pretenda tener lombrices y seres vivos en el suelo. Aunque no es el objetivo de este estudio problematizar los agrotóxicos en clave de cambio de

paradigma, al hacer esta revisión bibliográfica surgieron múltiples investigaciones con claros efectos colaterales negativos de los mismos que evidencian la insustentabilidad del sistema de producción actual.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron cuatro bioensayos ecotoxicológicos (tests), dos de reproducción y crecimiento en 2017 y en 2018, y dos agudos en 2018 y en 2020 (de ahora en más TRC1 y TRC2, y TA1 y TA2, respectivamente). Todos los bioensayos fueron realizados bajo las normas descritas en las Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests (Environment Canada, 2007), ISO 11268-1:2012 y 11268-2:2012 según correspondiera.

Para cada uno se hizo un acondicionamiento previo del material biológico y de las instalaciones, se preparó el sustrato y la solución de los fungicidas comerciales a utilizar. Se realizó primero el TRC1 con un rango de cinco diluciones de escala logarítmica en base diez y luego, en base a la discusión preliminar de resultados se determinó un rango más acotado de concentración de producto comercial a utilizar en los bioensayos agudos. Finalmente, se validaron los datos obtenidos utilizando las normas ya citadas y se procesaron estadísticamente para reportar resultados.

#### 3.1. ACONDICIONAMIENTO PREVIO

El material biológico fueron lombrices adultas de la especie *E. fetida*, las mismas se mantuvieron en el laboratorio de Suelos y Aguas de Facultad de Agronomía, sede Sayago y los test de ecotoxicidad se montaron en el Módulo 8 de Biotecnología del Laboratorio Tecnológico del Uruguay LATU, en la ciudad de Montevideo.

Se obtuvieron inicialmente individuos juveniles y adultos de *E. fetida* de la Unidad Demostrativa de Compostaje (UDC) en Facultad de Agronomía y se criaron durante cuatro semanas en contenedores de 50\*33\*28 cm. en una cámara de temperatura controlada a  $20 \pm 2^\circ$  C. Las lombrices fueron alimentadas con estiércol vacuno de base pastoril de un predio agroecológico, se regaron con agua desionizada semanalmente, manteniendo el sustrato con humedad suficiente para que las partículas del mismo no quedaran adheridas al cuerpo de las lombrices.

El sustrato para los experimentos se realizó con 10% de *Sphagnum sp.* (Kekkila®, Finlandia) tamizado sin plantas visibles, 20% de caolinita y 70% de arena seca lavada y tamizada. Se mezclaron los materiales secos previo al montaje, se agregó 1% de estiércol bovino rehidratado, 2,5 g. de Carbonato de Calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) por cada 500 g. de sustrato seco y se humedeció a 60% de capacidad de campo. Se evaluó pH luego de reposo

de diez horas, ajustando el mismo 6 con CaCO<sub>3</sub>). El sustrato se mantuvo igual para todos los bioensayos. Cada unidad experimental llevó 0,6 kg. de sustrato seco.

Para los TRC se utilizaron dos fungicidas comerciales Swing Plus, de BASF® (27,5% Metconazol y 37,5% Epoxiconazol) y Prosaro de BAYER® (12,5% Tebuconazol y 12,5% Prothioconazol); mientras que para los TA solo se utilizó este último. Las características toxicológicas de los compuestos en estos fungicidas comerciales pueden observarse en la tabla 1. En todos los bioensayos se realizó además un control negativo con agua desionizada y un control positivo con Cibencarb de Cibeles® (40-45% Carbendazim). (tabla 1)

Tabla 1. Toxicidad aguda y crónica para Swing Plus, Prosaro y Cibencarb

Fungicida comercial	Principios activos	Toxicidad aguda, 14 días LC50 (mg kg <sup>-1</sup> )	Categoría Toxicidad Aguda	Toxicidad Crónica 14 días/8 sem. NOEC, reproducción (mg kg <sup>-1</sup> )	Categoría Toxicidad Crónica
Swing plus	metconazole	> 500	MODERADA	0,9	MODERADA
	epoxiconazole	> 500	MODERADA	0,084	ALTA
Prosaro	tebuconazole	1381	BAJA	10	MODERADA
	protioconazole	> 1000	BAJA	1,33	MODERADA
Cibercarb	carbendazim	5,4	ALTA	1	MODERADA

**Fuente:** elaborado en base a IUPAC (2022b, 2022c, 2022d, 2022e).

Para el primer ensayo TRC1 la solución stock se formuló emulsionando cada producto comercial en 10 mL de agua y se diluyó en base a recomendación de Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests (Environment Canada, 2007), según se muestra en la figura 2, dentro del rango que abarca la dosis de aplicación a campo recomendada según etiqueta. Se determinó el volumen de cada aspersión simulando una aplicación a campo, para lo cual se consideró del campo una profundidad de suelo de 5 cm. y una densidad aparente promedio de 1,2 Mg/ha (tabla 2).

El TCR1 permitió acotar el rango de concentración de fungicidas a utilizar en TA1 y TA2. En resultados preliminares de TCR1 se observó que solo las dosis más altas



(100 L/ha. - 1000 L/ha.) generaron entre 80% - 100% de mortalidad. Esto determinó que se hicieran posteriormente cinco diluciones entre los dos tratamientos con mayor concentración (100 y 1000 veces la dosis recomendada).

Es así, que para el TA1 y TA2 se calcularon las concentraciones buscando una serie logarítmica tal que entraran 3 concentraciones intermedias (P1.8, P3.2 y P5.6) entre P102 y P103 (ver figura 2 y tablas 2 y 3). La solución stock que se utilizó fue el mismo formulado emulsionado en 20mL de agua y se siguieron los mismos supuestos de densidad y volumen de suelo al aplicar la solución al sustrato.

### Logarithmic Series of Concentrations Suitable for Toxicity Tests\*

Column (Number of concentrations between 10.0 and 1.00, or between 1.00 and 0.10)\*\*

1	2	3	4	5	6	7
10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
3.2	4.6	5.6	6.3	6.8	7.2	7.5
1.00	2.2	3.2	4.0	4.6	5.2	5.6
0.32	1.00	1.8	2.5	3.2	3.7	4.2
0.10	0.46	1.00	1.6	2.2	2.7	3.2
	0.22	0.56	1.00	1.5	1.9	2.4
	0.10	0.32	0.63	1.00	1.4	1.8
		0.18	0.40	0.68	1.00	1.3
		0.10	0.25	0.46	0.72	1.00
			0.16	0.32	0.52	0.75
			0.10	0.22	0.37	0.56
				0.15	0.27	0.42
				0.10	0.19	0.32
					0.14	0.24
					0.10	0.18
					0.13	
					0.10	

Figura 2. Concentraciones basadas en series logarítmicas recomendadas para bioensayos de toxicidad.

**Fuente:** tomado de Environment Canada (2007).

Tabla 2. Concentraciones de Prosaro (P) y Swing Plus (SP) en bioensayos de reproducción y crecimiento

	P10 <sup>-1</sup>	P10 <sup>0</sup>	P10 <sup>1</sup>	P10 <sup>2</sup>	P10 <sup>3</sup>	SP10 <sup>-1</sup>	SP10 <sup>0</sup>	SP10 <sup>1</sup>	SP10 <sup>2</sup>	SP10 <sup>3</sup>
L/ha	0,1	1	10	100	1000	0,15	1,5	15	150	1500
uL/kg	0,17	1,67	16,7	167	1670	0,25	2,5	25	250	2500
mg/kg	0,17	1,67	16,7	167	1670	0,25	2,5	25	250	2500

P10<sup>-1</sup>; 0; 1; 2; 3 muestra las distintas concentraciones utilizadas. P10<sup>0</sup> expresa la dosis recomendada de aplicación por el fabricante. SP10<sup>-1</sup>; 0; 1; 2; 3 muestra las distintas concentraciones utilizadas. SP10<sup>2</sup> expresa la dosis recomendada de aplicación por el fabricante.

Tabla 3. Concentraciones de Prosaro (P) en bioensayos agudos.

Tratamientos	P1	P1.8	P3.2	P5.6	P10
L/ha	100	180	320	560	1000
uL/kg	167	300,6	534,4	935,2	1670
mg/kg	163,66	294,59	523,71	916,5	1636,6

P1, P1.8, P3.2, P5.6, P10 muestra las distintas concentraciones utilizadas. P1 expresa 100 veces la dosis recomendada de aplicación por el fabricante.

### 3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y RECOLECCIÓN DE DATOS EN BIOENSAYOS DE CRECIMIENTO Y REPRODUCCIÓN.

Los TCR1 y TCR2 se realizaron en cámara de ambiente controlado a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , con un ciclo de luz/oscuridad de 16:8 h. durante 56 días.

Cada bioensayo contó con doce tratamientos y cinco bloques o repeticiones, los tratamientos fueron cinco concentraciones distintas de dos fungicidas comerciales: Swing Plus y Prosaro (tabla 2), un control negativo con agua desionizada y un control positivo con Cibencarb como sustancia de referencia; para el primer bioensayo se usó la concentración utilizada a campo de 0,412 mg kg<sup>-1</sup> en base a una dosis de campo recomendada para *Fusarium* de trigo de 0,5 L/ha. y en el segundo se aplicó 2,47 mg kg<sup>-1</sup> reportada como LC50 para carbendazim en suelo artificial (Ellis et al., 2007), que se

encuentra además dentro del rango recomendado por ISO (1998) de 1-5 mg kg<sup>-1</sup> de sustrato seco.

Se utilizaron como unidades experimentales sesenta recipientes de 1,5 L. con 0,6 kg. de sustrato seco y se le agregó en surcos 5 g. (peso seco) de estiércol vacuno humedecido. Se aplicó por única vez cada tratamiento al inicio del experimento, por aspersión sobre el sustrato para asemejar las condiciones de aplicación a campo (según la descripción realizada en la sección 3.1). Cada recipiente se mantuvo una hora bajo campana, luego se le colocó film cubriendo a cada uno.

El día 0 del experimento se colocaron, previamente lavadas, secadas y pesadas, diez lombrices cliteladas<sup>3</sup> y homogéneas en tamaño en cada recipiente; la masa promedio de cada individuo el día que se montó fue 0,37 g. en TRC1 y 0,25 g. en TRC2. Luego de colocarlas, se observó su aspecto y comportamiento asociado a movilidad durante una hora luego de depositarlas en el sustrato y se realizaron orificios en el film para el intercambio gaseoso. Durante todo el experimento, semanalmente se adicionó estiércol y agua, de modo de mantener la humedad con una variación menor al 10% respecto a la humedad inicial, verificando la misma por diferencia de masa.

A los 28 días, las lombrices cliteladas fueron retiradas, lavadas y secadas cuidadosamente, se pesaron y preservaron en alcohol. Los recipientes fueron conservados cuatro semanas más en la cámara de ambiente controlado, conservando las condiciones de alimento y humedad anteriormente descritas. El día 56 se desarmó el bioensayo, se contabilizaron las lombrices juveniles y se registró su masa luego de lavadas y secadas.

### 3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y RECOLECCIÓN DE DATOS EN BIOENSAYOS AGUDOS.

Los TA1 y TA2 se realizaron en una cámara de ambiente controlado a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , con un ciclo de luz/oscuridad de 16:8 h. durante 14 días.

Para observar sobrevivencia se determinaron siete tratamientos y cinco repeticiones o bloques. Se testearon cinco dosis de Prosaro (tabla 3), un control negativo con agua deionizada y un control positivo con Carbendazim a razón de 2,47mg kg<sup>-1</sup>, reportada como LC50 para en suelo artificial (Ellis et al., 2007). Se utilizaron para eso treinta y cinco recipientes de 1,5 L. de capacidad con 0,6 kg. de sustrato seco con 5g. (peso seco) de estiércol vacuno humedecido. Se aplicó por única vez la concentración de cada

tratamiento mediante aspersión sobre el sustrato y se dejó reposar una hora cada recipiente bajo campana, luego se le colocó film cubriéndolos y se dejó en cámara por 24hs.

El día 0 del experimento se colocaron, previamente lavadas, secadas y pesadas, diez lombrices *E. fetida* homogéneas en tamaño en cada recipiente; su masa promedio por individuo para TA1 y TA2 fue 0,33 g y 0,34 g respectivamente. Luego de depositarlas en el sustrato y realizar orificios en el film para que haya intercambio gaseoso, se observó durante una hora el aspecto y comportamiento asociado a movilidad de las lombrices y se registró.

Se mantuvieron los recipientes en cámara de atmósfera controlada durante dos semanas y luego de ese tiempo se retiraron y contabilizaron las sobrevivientes, se lavaron, secaron, pesaron y preservaron algunas en alcohol, para posibles futuros estudios de efectos morfológicos e histológicos y otros en freezer para posibles futuros estudios de bioacumulación.

#### 3.4. PROCESAMIENTO DE DATOS

La información generada de forma amplia, los procedimientos específicos y adaptados quedaron disponibles para el grupo de trabajo que desarrolla la temática. Los datos cualitativos no se procesaron ni compararon por falta de información publicada al respecto, se encuentran disponibles como observaciones anexas al experimento. Los datos cuantitativos de todos los ensayos se ordenaron en un archivo Excel para reportarlos según las normas de la Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests (Environment Canada, 2007), ISO 11268-1:2012 y 11268-2:2012.

Estos últimos se analizaron estadísticamente con la ayuda del programa Infostat (Di Rienzo et al., 2020). Aquellos que se encontraban por fuera de lo esperado se eliminaron según la regla de Grubb's (Grubbs, 1969) la cual propone calcular la diferencia entre el dato y el valor medio del tratamiento, dividido el desvío estándar y si los resultados exceden -1,67, (valor de tabla en el caso de 5 repeticiones con una confianza de 95%) se reemplazan por el valor de la media.

La variable "mortalidad" para el bioensayo agudo se consideró cuantitativa discreta (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) mientras que "variación de la biomasa", "descendencia" y "masa de la descendencia" se tomaron como variables cuantitativas continuas para los bioensayos agudo y de crecimiento y reproducción. Se compararon los tratamientos teniendo como factor aleatorio los bloques.

Para estimar la CL50 a partir de la mortalidad se utilizó un modelo lineal generalizado simple con distribución binomial; mientras que para analizar las variables continuas se usaron modelos lineales mixtos, verificándose la normalidad de los residuos mediante el test de Shapiro-Wilk's y luego se compararon las medias de los tratamientos usando un test de comparación múltiple (LSD Fisher) con 0,05% de significancia.

Los valores de IC<sub>10</sub> e IC<sub>25</sub> se estimaron mediante el ajuste de curvas de dosis-respuesta según las ecuaciones descritas a continuación. El modelo logístico es un caso particular del modelo de hormesis donde el parámetro "h" adopta el valor 0. Para comprobar la existencia de un efecto de hormesis se comparó ajuste de distintas curvas mediante el valor del Akaike's Information Criterion (AIC), seleccionando el modelo con menor valor en este indicador. Los parámetros de estas curvas fueron estimados iterativamente mediante mínimos cuadrados no lineales y sus intervalos de confianza se calcularon mediante el método de perfilado de la verosimilitud.

Modelo de hormesis:

$$Y = t \times [1 + (h \times C)] \div \{1 + [(p + (h \times C)) \div (1 - p)] \times (C \div IC_p)^b\}$$

Donde:

Y = variable dependiente (número de juveniles)

t = la intercepción con y

h = describe el efecto de hormesis (generalmente entre 0.1 and 1)

C = la concentración de producto como logaritmo

p = valor de "p" (0.25 para 25% y 0.10 para 10%)

IC<sub>p</sub> = el IC<sub>p</sub> para el conjunto de datos

b = parámetro estimado, entre 1-4 que define la forma de la ecuación

Modelo logístico:

$$Y = t \div \{1 + [p \div (1 - p)] \times (C \div IC_p)^b\}$$

Donde:

Y = variable dependiente (número de juveniles)

t = la intercepción con y

p = valor de "p" (0.25 para 25% y 0.10 para 10%)

C = the test concentration as a logarithm

IC<sub>p</sub> = el IC<sub>p</sub> para el conjunto de datos

b = parámetro estimado, entre 1-4 que define la forma de la ecuación

#### 4. RESULTADOS

Los resultados se presentan separados según tipo de bioensayo y año. Se validaron los bioensayos según los requisitos de las normas ISO 11268-1:2012 y 11268-2:2012. Para TRC1 y TRC2 se constató que el control negativo cumpliera con: número de juveniles mínimo por contenedor de 30, un coeficiente de variación de descendencia menor a 30% y menos de 10% de mortalidad de adultos. Para validar TA1 y TA2 se consideró para el control negativo: porcentaje de mortalidad menor o igual a 10%.

En el caso de TRC1 el coeficiente de variación del control negativo fue de 46% y hay un contenedor con 10% de mortalidad de adultas. Estos datos se validaron luego de ser identificados como atípicos según la regla de Grubb's (Grubbs, 1969) y fueron corregidos por el promedio de los datos correspondientes.

En el caso de datos para las variables "variación de biomasa", "descendencia" y "masa de descendencia" que no se ajustaron al modelo normal, se realizaron los análisis estadísticos como modelos lineales mixtos apostando a la robustez del modelo, según Schielzeth et al. (2020), quienes alientan a utilizar estos modelos cuando el conjunto de datos es grande o la repetibilidad es alta.

Luego de una hora de observar el aspecto y comportamiento de las lombrices, se vio que en los recipientes con mayor concentración de ambos fungicidas comerciales y para la mayoría de los individuos, movimientos rápidos y constricciones derivando en la muerte de los individuos.

##### 4.1. TEST DE REPRODUCCIÓN Y CRECIMIENTO

Para ambos formulados comerciales la concentración más alta (SP<sup>3</sup> y P<sup>3</sup>) provocó un porcentaje de mortalidad a los 28 días igual o mayor a 84%, mientras que las otras concentraciones se mantuvieron por debajo de 8%. La biomasa de lombrices adultas al día 28 mostró diferencias significativas sólo en el caso de la mayor concentración de SP y P del TCR2 ( $p=0,0105$ ;  $F=4,05$  para P y  $p<0,0001$ ,  $F=33,83$  para SP) (tabla 4).

Tabla 4. Mortalidad y variación de biomasa según los diferentes tratamientos para los test de reproducción y crecimiento 1 y 2

Bioensayo	% mortalidad		% variación de biomasa	
	TRC1	TRC2	TRC1	TRC2
Cntrl -	2	0.4	26.1	43
SP <sup>-1</sup>	0	0	17.1	54.7
SP <sup>0</sup>	4	0	12.9	50.7
SP <sup>1</sup>	6	0	21.4	45.5
SP <sup>2</sup>	8	6	22.5	49.9
SP <sup>3</sup>	84	100	20.1	0
P <sup>-1</sup>	6	0	17.4	51.5
P <sup>0</sup>	2	0	9.1	42.3
P <sup>1</sup>	2	0	14.4	55.2
P <sup>2</sup>	6	0	23	57.4
P <sup>3</sup>	88	88	15	113

En cuanto a la descendencia, tanto para SP como para P en TRC1 y TRC2, los datos se ajustaron al modelo de hormesis, asimismo las concentraciones SP<sup>3</sup> (68,8 mg kg<sup>-1</sup> de metconazol y 93,8 mg kg<sup>-1</sup> de epoxiconazol) y P<sup>3</sup> (208,3 mg kg<sup>-1</sup> de tebuconazol y protioconazol) tuvieron un número de juveniles significativamente menor que el control. En la biomasa de las lombrices juveniles al día 56 solo se observa una diferencia significativa para la mayor concentración de P (P<sup>3</sup>) en TRC2 ( $p=0,0006$ ;  $F=7$ ). Si bien esta variable no presentó distribución normal, para analizarla se apeló a la robustez del modelo según (Schielzeth et al., 2020).

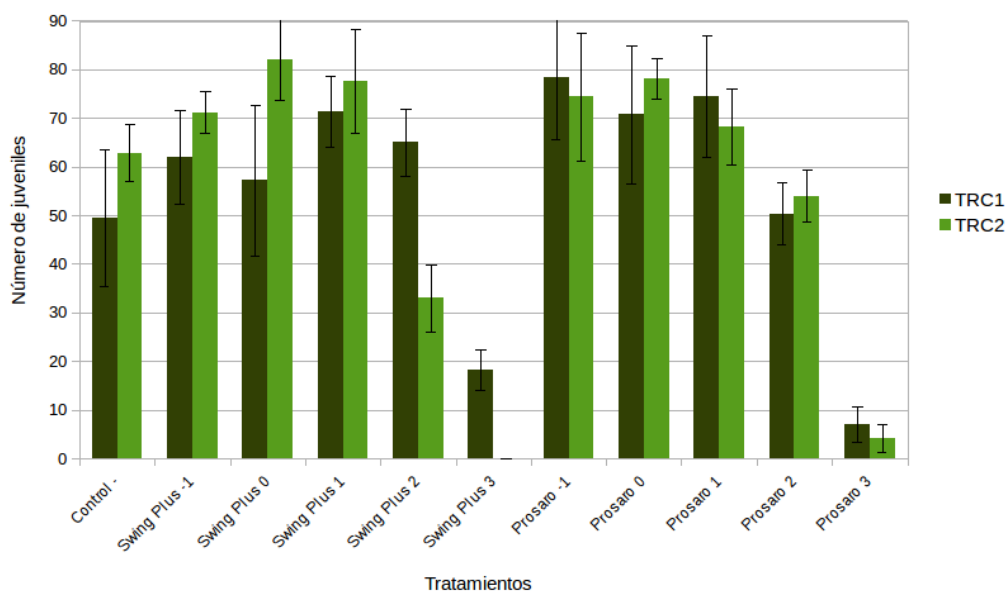


Figura 3. Número de juveniles a los 56 días según tratamientos en bioensayo de reproducción y crecimiento 1 y 2. Concentraciones crecientes de Swing Plus y Prosaro siendo cero las concentraciones recomendadas como dosis de aplicación a campo. Las concentraciones siguientes (-1; 1; 2; 3) fueron calculadas en base a serie logarítmica (Fig. 2). Las barras indican desvío estándar.

El valor medio de IC<sub>10</sub> e IC<sub>25</sub> para P fue menor que para SP (Tabla5). Se partió del dato en log de concentración ug/kg, al cual se llegó a través del ajuste por el modelo de hormesis.

Tabla 5. Estimación de IC<sub>10</sub> e IC<sub>25</sub> (mg.kg-1)

	IC <sub>10</sub>	IC <sub>25</sub>
TRC1	(mg kg-1)	
Prosaro	<b>133,3</b> (20,13-1776)	<b>318,1</b> (47,57-4685,58)
Swing-Plus	<b>1544,2</b> (153,28-37132,38)	<b>4282,3</b> (451,35-260991,92)
TRC2	(mg kg-1)	
Prosaro	<b>71,7</b> (16,15-331,04)	<b>164,4</b> (40,54-798,11)
Swing-Plus	<b>22,7</b> (18,21-314,90)	<b>138,7</b> (40,53-751,63)



Se observaron malformaciones en distintos individuos de tres unidades experimentales (figura 4)

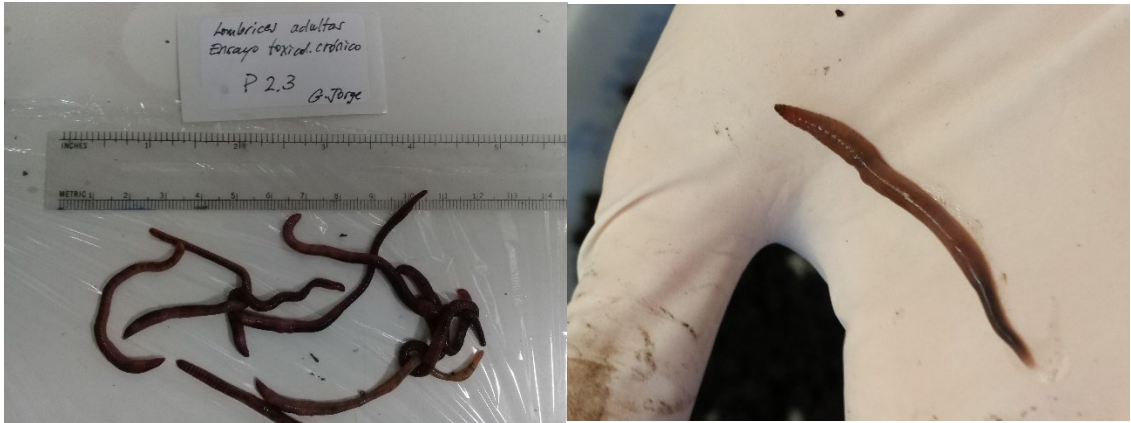


Figura 4 Lombrices adultas con constricciones y exceso de mucus

#### 4.2. TEST DE TOXICIDAD AGUDA

La CL50 (14 días) para P es de 1790,48 mg kg<sup>-1</sup> y 1116,67 mg kg<sup>-1</sup> en TA1 y TA2 respectivamente. En TA1 y TA2 se observa aumento en la mortalidad a medida que aumenta la concentración de P, entre la concentración más baja y más alta utilizadas (163,66 mg kg<sup>-1</sup> y 1636,6 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, correspondiente a 100 y 1000 L/ha) (figura 4 y 5). En el TA2 el C+ superó la mortalidad media de 80%.

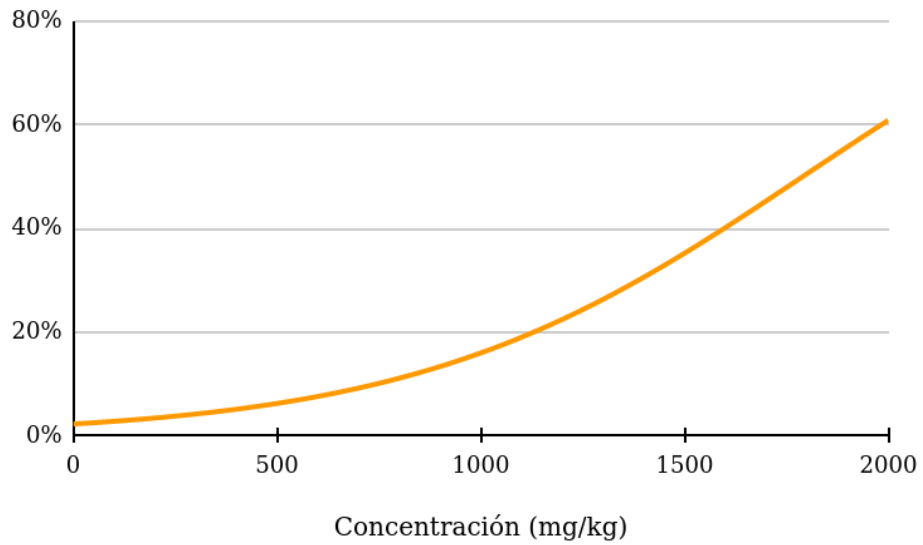


Figura 5. Porcentaje de mortalidad de lombrices según concentración (mg kg<sup>-1</sup>) de Prosaro en TA1.

Para ambos bioensayos se puede observar una disminución en la biomasa media para el caso de las mayores concentraciones. No obstante, para TA1 no se ven diferencias significativas en la variación de biomasa de las lombrices ( $p=0,4873$ ;  $F=0,92$ ); mientras que en el TA2, las biomásas medias finales de P10 y en C+ fueron similares y menores al resto de los tratamientos ( $p=0,0134$ ;  $F=3,9$ ) (tabla 6).

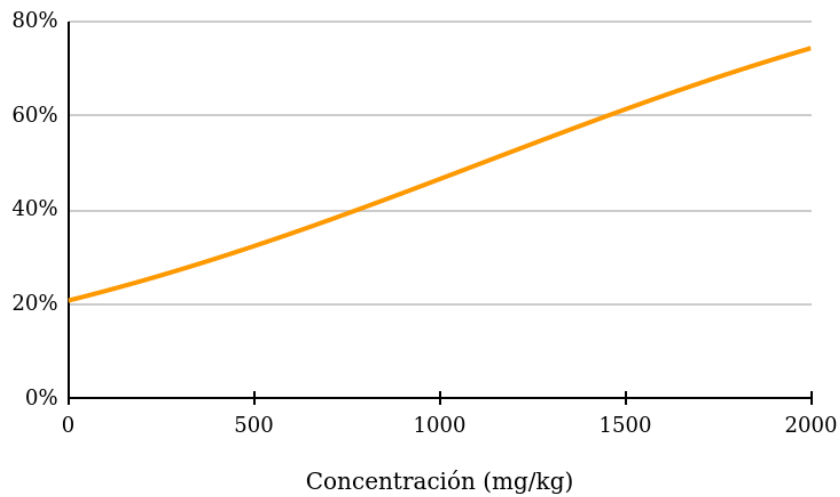


Figura 6. Porcentaje de mortalidad de lombrices según concentración (mg kg<sup>-1</sup>) de Prosaro en TA2

Se quitaron datos de tratamientos en los cuales se constató un error de procedimiento; en el tratamiento P3.2 del bioensayo 2 se verificó un error en la dilución y en TA2, el tratamiento P5,6 se utilizó el método de Grubbs (1969) para datos fuera de lo esperado con varianzas altas.

Tabla 6. Masa inicial y final (g.) de las lombrices sobrevivientes en el bioensayo agudo 1 (TA1) y bioensayo agudo 2 (TA2)

	TA1		TA2	
Tratamiento	masa inicial (g.)	masa final (g.)	masa inicial (g.)	masa final (g.)
Cntrl-	3,46	3,35	3,28	3,89
P1	3,43	3,37	3,53	3,98
P1,8	3,35	3,21	3,42	3,78
P3,2	3,32	3,03	3,39	0,71
P5,6	3,22	2,66	3,38	2,27
P10	3,11	1,34	3,38	0,84

Concentraciones crecientes de Prosaro (P) siendo P1 y P10 100 y 1000 veces la concentración recomendada como dosis de aplicación a campo. Las concentraciones siguientes (1,8; 3,2; 5,6; 10) fueron calculadas en base a una serie logarítmica (Fig. 2)

## 5. DISCUSIÓN

En los bioensayos de reproducción y crecimiento las principales observaciones fueron el efecto de hormesis, es decir de aumento de performance a bajas dosis, y que la concentración recomendada a campo tanto para Swing Plus como para Prosaro no tuvo efecto en la performance a los 56 días, medida tanto a través de la reproducción como de la biomasa de la primera generación.

En los ensayos agudos, el principal resultado encontrado fue que se comprobó una mayor toxicidad (CL-14 días) del formulado Prosaro que la registrada para los principios activos de este formulado en bioensayos agudos previos, lo cual evidencia que se necesitan más estudios para evaluar el efecto de los agrotóxicos comerciales y sus combinaciones, no solo de sus principios activos por separado, sino además considerar la escala temporal, es decir estudiar los efectos a mediano y largo plazo para las poblaciones de lombrices.

### 5.1. TEST DE REPRODUCCIÓN Y CRECIMIENTO

La hormesis presentada por la respuesta de las lombrices a los productos comerciales probados en los bioensayos de reproducción y crecimiento realizados, implica una estimulación en la reproducción a bajas concentraciones (Environment Canada, 2007). Este modelo de respuesta a múltiples dosis desarrollado a mediados de 1880 por Hugo Schulz, se ha constatado en numerosas especies de plantas, animales y microorganismos (Calabrese y Baldwin, 1997). Las lombrices muestran hormesis ante distintos estímulos estresantes como suelos ácidos (Wu et. al., 2020) y plaguicidas. Domínguez et al. (2016) encontraron hormesis en dosis bajas de Ácido aminometilfosfónico (AMPA), principal componente de la degradación del glifosato.

Al hacer el ejercicio teórico de sumar los NOEC de los principios activos (IUPAC, 2022b, 2022c, 2022d, 2022e), se debería ver efecto en la población al aplicar 10 veces la dosis recomendada de SP y 100 veces la dosis recomendada en P (tabla 1); aunque, el NOEC y el LOEC son los indicadores más utilizados históricamente, son poco precisos en estudios de múltiples concentraciones, es por eso que, aunque no permita realizar una comparación en este estudio se calculó el ICp que es una estimación con 95% de confianza (Environment Canada, 2007).

La reducción del 10% y 25% de la performance de las lombrices (a los 56 días), es mucho mayor a la concentración aplicada a campo según la dosis recomendada por

etiqueta de ambos formulados comerciales para Fusariosis de trigo, mostrando valores estimados de  $IC_{10}$  en concentraciones 1000 veces mayor a la dosis de campo recomendada. Los resultados presentados contrastan con los obtenidos por Zhang et al. (2020), quienes hallaron efectos a nivel del ARN mitocondrial y bioquímico con concentraciones levemente por encima de lo aplicado a campo de tebuconazol al aplicar Prosaro (0,5 y 50 mg kg<sup>-1</sup>).

También se observan diferencias de sensibilidad en los organismos, según los  $IC_p$  calculados para cada TRC que podrían deberse al estado inicial de las lombrices ya que el primer bioensayo las mismas presentaron una media de biomasa de 0,12 g. más por individuo que en el segundo bioensayo. Esta situación nos permitió ver cómo el producto químico afectó de forma diferencial distintos estratos poblacionales, afectando más a los individuos de menor tamaño, estresados por menores recursos alimenticios.

Durante los TRC se observaron las lombrices tanto juveniles como adultas, obteniendo información cualitativa no comparable por falta de investigaciones similares sistematizadas y/o publicadas. Al retirar las lombrices adultas en tres unidades experimentales se observaron individuos con malformaciones y exceso de mucus; mientras que, durante el conteo de juveniles, en los casos donde luego se constató hormesis, los individuos eran más pequeños. Estos posibles efectos pueden tener otras implicancias no constatadas a nivel fisiológico o reproductivo en el posterior desarrollo de las lombrices.

El primer ensayo de reproducción y crecimiento permitió ajustar las técnicas para el bioensayo agudo y acotar el rango de concentración de productos utilizados. Para el análisis estadístico no se consideraron los datos del control positivo (C+) ya que no fue significativa la mortalidad en el bloque, habiendo utilizado una concentración de Carbendazim que correspondía a la recomendación de etiqueta para Fusariosis de trigo y se pudo constatar que dicha concentración estaba fuera de lo recomendado por la ISO (1998). Para el siguiente ensayo, se aplicó Carbendazim en una concentración dentro de los rangos recomendados por la ISO (1998), no obstante, como control positivo tampoco satisfizo las expectativas. Una explicación puede ser que según IUPAC (2022a) la LC50 (14 días) de esta sustancia es 5,4 mg kg<sup>-1</sup> de sustrato, mientras que la norma ISO utilizada (ISO, 1998) recomendaba entre 1-5 mg kg<sup>-1</sup> de sustrato; actualmente la norma ISO (2012) recomiendan el ácido bórico como sustancia alternativa de referencia.

## 5.2. TEST DE TOXICIDAD AGUDA

Este estudio demuestra que el efecto toxicológico agudo del Prosaro está subestimado si sólo se basa en los valores de CL50 de sus principios activos. Si consideramos un efecto sumatorio de éstos, en 14 días debería morir el 50% de la población a partir de 2381 mg kg<sup>-1</sup>, pero ambos bioensayos presentaron CL50 (14 días) para este producto comercial por debajo de 2000 mg kg<sup>-1</sup>. Mesnage et al. (2014) comprobó para células humanas, que los formulados comerciales son varios cientos de veces más tóxicos que los principios activos, demostrando mayor toxicidad en fungicidas y herbicidas por sobre los insecticidas.

Se pueden hacer algunas reflexiones respecto a la metodología que diferenciaría el nivel de exposición de las lombrices con los fungicidas tanto en un sentido como en otro. La aplicación durante el experimento fue realizada con aspersión simulando la aplicación a campo, pero sobre suelo desnudo, sin cultivo. Se observó que la mayoría de las muertes se dieron durante la primera hora del experimento, al colocar los individuos encima del sustrato. Por un lado, en la aplicación de campo las lombrices se encuentran cubiertas de suelo y/o por la materia vegetal, y en este caso en particular las aplicaciones se dan cuando la planta se encuentra espigada, por estos motivos se podría inferir una menor exposición de los individuos. Pero, por otro lado, se realizó una única aplicación y con un solo formulado comercial, mientras que a campo se recomiendan al menos dos aplicaciones de fungicida aplicaciones por cultivo y se pueden realizar mezclas para bajar el costo de la aplicación. Si bien estos ensayos, en conjunto con interés crítico científico acompañados de interés y decisión política pueden colaborar en una mayor regulación de los agrotóxicos, su carácter reduccionista no permite extrapolar los resultados a la complejidad de los agroecosistemas, lo que da cuenta del alto riesgo asociado a su aplicación.

## 6. CONCLUSIONES Y REFLEXIONES FINALES

En este trabajo de tesis se encontró que, si bien a nivel de laboratorio no se registraron efectos sobre el crecimiento y la población de lombrices para dosis de aplicación recomendadas a campo de los fungicidas Prosaro y Swing Plus, se ven efectos en aplicaciones menores y mayores fuera de lo esperado o reportado por los fabricantes. Se pudo comprobar que la toxicidad del Prosaro es mayor a la esperada por la sumatoria de los efectos de sus principios activos, por lo que podría existir algún efecto de sinergia en la toxicidad o un efecto de los otros ingredientes del formulado.

Existe una creciente demanda alimentos sin organismos genéticamente modificados ni productos de síntesis química (Cauci et al., 2015); así como, una población cada vez más conciente de la importancia en la calidad del agua y los potenciales riesgos de los plaguicidas en cuanto al alimento, el medio ambiente, la salud de los trabajadores agrícolas y vecinos (MGAP. DNDR. CHPNA, 2021). Es necesaria mayor información de las interacciones y los efectos a mediano y largo plazo que están teniendo los productos químicos utilizados en la producción agrícola.

Algunos países como los de la Unión Europea (UE) se encuentran regulando con mayor rigurosidad las sustancias y mezclas químicas que se comercializan; para considerar el efecto tóxico de éstas se han utilizado este tipo de bioensayos. Por otro lado en América latina, se han generado leyes y reglamentaciones impulsados y que contemplan la cosmovisión campesino e indígena, que llevarían a la no utilización de agrotóxicos.

En Uruguay, si bien se toman este tipo de reglamentaciones internacionales como referencia, el control que se hace sobre la manipulación y uso de agrotóxicos es poco o nulo. Actualmente, se encuentra aprobada la Ley N° 19.717 y en marcha un Plan Nacional para el fomento de la producción con bases Agroecológicas, iniciativa que se desarrolló gracias al movimiento agroecológico organizado; sin embargo es poco el apoyo político y económico brindado por los gobiernos hasta la fecha al cambio de modelo comparativamente con el apoyo brindado al sistema convencional de producción agropecuaria. Se debería considerar como prioritaria la investigación y desarrollo asociados al manejo de enfermedades como la Fusariosis de forma agroecológica dada la importancia que tiene el trigo en la alimentación, así como para la preservación de la vida en el suelo específicamente de las lombrices, siendo una necesidad producir alimentos sanos, de forma que no perjudiquen el ambiente ni deteriore la salud de los y las trabajadores y trabajadoras.



## 7. RESUMEN

Los fungicidas comerciales están compuestos por un principio activo responsable de la acción directa y comprobada que causa la muerte del hongo, y por ingredientes declarados como "inertes". Estos últimos, a pesar de lo que su nombre indica, pueden tener efectos para la salud humana, el ambiente y la biota del suelo. Para el ingreso de agroquímicos a Uruguay los bioensayos requeridos son solamente para el principio activo en peces y abejas; no siendo necesarios los ensayos en lombrices. Las lombrices son macrofauna del suelo que cumplen un rol fundamental en la estructura y biología del mismo, disminuyen algunas enfermedades fúngicas, entre ellas la Fusariosis de trigo, a través de la eliminación del inóculo inicial. Son necesarios estudios que evalúen los efectos tóxicos de los formulados comerciales sobre las lombrices. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar los efectos crónicos y de reproducción de dos formulados comerciales (Prosaro y Swing Plus) en *Eisenia fetida* y evaluar los efectos letales o agudos para el fungicida comercial Prosaro en *Eisenia fetida*. Se realizaron cuatro bioensayos ecotoxicológicos, dos de reproducción y crecimiento (TRC1 y TRC2) y dos agudos (TA1 y TA2), validados bajo las normas ISO correspondientes y las descritas por Environment Canada (2007). Todos se realizaron en cámara de ambiente controlado a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , con un ciclo de luz/oscuridad de 16:8 h. durante 56 días los TRC y 14 días los TA. Para los ensayos de reproducción y crecimiento se utilizaron 5 diluciones en una escala logarítmica de base 10, cubriendo desde un décimo de la dosis de campo a la dosis de campo  $\times 10^3$ . En base a los resultados preliminares se determinó un rango más acotado de concentraciones del producto comercial utilizado en los ensayos agudos. En los bioensayos de reproducción y crecimiento se vio, para ambos formulados una estimulación en la reproducción a bajas concentraciones, mostrando un efecto de hormesis; sin efectos sobre la biomasa de la primera generación a los 56 días de ensayo para una concentración trasladable a la dosis de aplicación a campo. Los valores de concentración letal obtenida en los bioensayos agudos son; CL50 (14 días) para Prosaro de 1790,48 mg kg<sup>-1</sup> y 1116,67 mg kg<sup>-1</sup> en TA1 y TA2 respectivamente, evidenciaron una mayor toxicidad del formulado, que la registrada para los principios activos en bioensayos agudos previos. Este resultado contrasta con lo esperado ya que si consideramos un efecto sumatorio de los CL50 de los principios activos deberían morir el 50% de la población a partir de 2381 mg kg<sup>-1</sup>. Se necesitan más estudios para evaluar el efecto de los agrotóxicos comerciales y sus combinaciones, no solo de sus principios activos por separado, considerando una escala temporal mayor. Estos ensayos permiten visualizar el importante grado de incertidumbre que generan el uso de estos productos, respecto a la población de

lombrices pero también de otros seres; éste efecto debería considerarse en la peligrosidad del producto químico, tomando en cuenta los aportes directos e indirectos que realizan las lombrices a la biodiversidad en los suelos, incluyendo los aportes al bienestar humano denominados también servicios ecosistémicos.

Palabras clave: fungicidas, lombrices, ecotoxicología

## 8. SUMMARY

Commercial fungicides are composed of an active ingredient responsible for the direct and proven action that causes the death of the fungus, and ingredients declared as "inert". The latter, despite their name may have effects on human health, environment and soil biota. However, for the entry of agrochemicals into Uruguay the tests required for fish and bees consider only the toxicity of the active ingredient as a reference. In addition, ecotoxicity tests on worms are not a requirement. Earthworms are a group of soil macrofauna that play a fundamental role in soil structure, chemistry and biology, reducing some fungal diseases, including wheat *Fusarium* wilt, through the elimination of the initial inoculum. Hence, the need to evaluate which toxic effects commercial formulations have on worms. The objectives of this work were to evaluate the chronic and reproductive effects of two commercial formulations (Prosaro and Swing Plus) on *Eisenia fetida* and the lethal or acute effects of the commercial fungicide Prosaro on *Eisenia fetida*. Four ecotoxicological bioassays were performed, two for reproduction and growth (TRC1 and TRC2) and two acute (TA1 and TA2), validated under the corresponding ISO standards and those described by Environment Canada (2007). All were performed in a controlled environment chamber at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , with a light/dark cycle of 16:8 h. for 56 days the CRT and 14 days the TA. For the reproduction and growth trials, 5 dilutions were used on a base 10 logarithmic scale, covering from one tenth of the field dose to the  $\times 10^3$  field dose. Based on the preliminary results, a narrower range of concentrations of the commercial product used in the acute tests was determined. In the reproduction and growth bioassays, a stimulation in reproduction at low concentrations was seen for both formulations, showing a hormetic effect. No effects were observed on the biomass of the first generation at 56 days of the trial for a concentration equivalent to the field application dose. The lethal concentration values, LC50 (14 days) for Prosaro, obtained in the acute bioassays were (1790.48 mg kg<sup>-1</sup> and 1116.67 mg kg<sup>-1</sup> in TA1 and TA2 respectively) showed a greater toxicity of the formulation than that registered for the active ingredients in previous acute bioassays. This result contrasts with what was expected, since if we consider a summative effect of the LC50 of the active ingredients, a concentration of 2381 mg kg<sup>-1</sup> of the formulation would have been needed to cause the death of 50% of the population. More studies are needed to evaluate the effects of commercial pesticides and their combinations, not only of their active ingredients separately, and also considering longer time scales. These tests allowed us to visualize the significant degree of uncertainty generated by the use of these products, with respect to the earthworm population but also to other soil animals. This effect should be considered in the risk assessment of chemical

products, taking into account the direct and indirect contributions that earthworms make to biodiversity in soils, including contributions to human well-being, also called ecosystem services or functions.

Keywords: fungicides, earthworms, ecotoxicology

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Bouché, M. B. 1977. Strategies lombriciennes. Ecological bulletins. no. 25: 122 - 132.
2. Calabrese, E.; Baldwin, L. 1997. The dose determines the stimulation (and poison): Development of a chemical hormesis database. (en línea). International Journal of Toxicology. 16(6): 545 - 559. Consultado 16 nov. 2022. Disponible en <https://journals.sagepub.com/doi/epdf/10.1080/109158197226874>
3. Cauci, A.; Fajardo, G.; Muniz, F.; Piñeyro, C.; Britz, M. 2015. Conocimientos sobre organismos genéticamente modificados (OGM) y opiniones sobre el etiquetado de la población de Montevideo. (en línea). Montevideo, Udelar. s.p. Consultado 2 dic. 2022. Disponible en <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/17994/6/poster%20ogm%20%c3%baltimo%202015%20p.pdf>
4. Cepeda, C.; Carlosama, J. 2016. Determinación de la concentración letal 50 (CL50) en la lombriz californiana, *Eisenia foetida* (Lombricidae) de dos fungicidas de uso agrícola con el mismo principio activo (clorotalonil). Tesis Ing. Amb. Bogotá, Colombia. Universidad Santo Tomás. Facultad de Ingeniería Ambiental. 77 p.
5. CEUTA (Centro Uruguayo de Tecnologías Apropriadas, UY). 2006. Agrotóxicos en Uruguay: Miradas desde los afectados. Montevideo, DINAMA. 58 p.
6. Chi-Chu, L. 2010. Effect of pesticides on soil microbial community. (en línea). Journal of Environmental Science and Health, Part B. 45(5): 348 - 359. Consultado 5 jul. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1080/03601231003799804>
7. Daam, M.; Leitão, S.; Cerejeira, M.; Sousa, J. 2011. Comparing the sensitivity of soil invertebrates to pesticides with that of *Eisenia fetida*. Chemosphere. 85(6): 1040 - 1047. Consultado 13 jun. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.032>
8. Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, C. 2020. InfoStat versión 2020. (en línea). Córdoba, Universidad Nacional de Córdoba. Consultado oct. 2022. Disponible en <https://www.infostat.com.ar/>

9. Díaz de Ackermann, M. 1996. Golpe blanco de la espiga del trigo causado por *Gibberella zeae* (schw.) petch. estado perfecto de *Fusarium graminearum* Schw. In: Manejo de enfermedades en cereales de invierno y pasturas. Montevideo, INIA. pp. 79 - 86. (Serie técnica no. 74).
10. Domínguez, A.; Brown, G.; Sautter, K.; Ribas de Oliveira, C.; Carvalho de Vasconcelos, E.; Niva, C.; Bartz, M.; Bedano, J. 2016. Toxicity of ampa to the earthworm *Eisenia andrei* Bouché, 1972 in tropical artificial soil. (en línea). Scientific Reports. 6: 19731. Consultado dic. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1038/srep19731>
11. Ellis, S.; Hodson, M.; Wege, P. 2007. The influence of different artificial soil types on the acute toxicity of carbendazim to the earthworm *Eisenia fetida* in laboratory toxicity tests. European Journal of Soil Biology. 43(suppl. 1): 239 - 245. Consultado 24 jun. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.08.023>
12. Environment Canada, CA. 2007. Guidance document on statistical methods for environmental toxicity tests. 2a. ed. Ottawa. 280 p.
13. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2019. Guía de prevención y acción ante incidentes y accidentes en la manipulación de plaguicidas en agricultura extensiva, horti-fruticultura y forestal. (en línea). Montevideo, MVOTMA. 85 p. Consultado 20 may. 2022. Disponible en [https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/sites/ministerio-ambiente/files/documentos/publicaciones/Guia\\_Plaguicidas\\_compressed.pdf](https://www.gub.uy/ministerio-ambiente/sites/ministerio-ambiente/files/documentos/publicaciones/Guia_Plaguicidas_compressed.pdf)
14. Gao, M.; Song, W.; Zhang, J.; Guo, J. 2013. Effect on enzymes and histopathology in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by triazole fungicides. (en línea). Environmental Toxicology and Pharmacology. 35(3): 427 - 433. Consultado 27 jun. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.02.003>
15. Grosso, E.; Brown, G. 2007. Biodiversidad y ecología de las lombrices de tierra en el Uruguay. In: Brown, G.; Fragoso, C. eds. Minhocas na América Latina: Biodiversidade e ecologia. Londrina, Embrapa Soja. pp. 281 - 286.
16. Grubbs, F. 1969. Procedures for detecting outlying observations in samples. Technometrics. 11(1): 1 - 21.

17. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, UY). 2014. Nueva guía de manejo de la fusariosis en trigo. (en línea). Montevideo. Consultado 15 may. 2022. Disponible en <http://www.inia.uy/Paginas/Nueva-Guia-de-manejo-de-la-fusariosis-en-trigo.aspx>
18. ISO (International Organization Standardization, CH). 1998. Soil quality: Effects of pollutants on earthworms: Determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida/Eisenia andrei*. Norma ISO 11268-2. Ginebra. 16 p.
19. \_\_\_\_\_. 2012. Soil Quality: Effects of Pollutants on Earthworms: Part 1 Determination of Acute Toxicity to *Eisenia fetida/Eisenia andrei* and Part 2 Determination of Effects on Reproduction of *Eisenia fetida/Eisenia andrei*. Normas ISO 11268-1 & ISO 11268-2. Ginebra. 21 p.
20. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, US). 2022a. Carbendazim (Ref: BAS 346F). (en línea). Carolina del Norte. s.p. Consultado 20 may. 2022. Disponible en <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/116.htm>
21. \_\_\_\_\_. 2022b. Epoxiconazole (Ref: BAS 480F). (en línea). Carolina del Norte. s.p. Consultado 20 may. 2022. Disponible en <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/267.htm>
22. \_\_\_\_\_. 2022c. Metconazole. (en línea). Carolina del Norte. s.p. Consultado 20 may. 2022. Disponible en <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/451.htm>
23. \_\_\_\_\_. 2022d. Prothioconazole (Ref: JAU 6476 ). (en línea). Carolina del Norte. s.p. Consultado 20 may. 2022. Disponible en <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/559.htm>
24. \_\_\_\_\_. 2022e. Tebuconazole (Ref: HWG 1608). (en línea). Carolina del Norte. s.p. Consultado 20 may. 2022. Disponible en <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/610.htm>
25. Jorge Escudero, G. 2018. Potencial aporte de las lombrices en el control biológico de las lombrices en el control biológico de *Fusarium graminearum* en agroecosistemas uruguayos. Tesis Dr. Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 192 p.
26. Kamrin, M. 1997. Triazines and Triazoles. In: Pesticide profiles: Toxicity, environmental impact and fate. New York, CRC Press. pp. 335 - 373.

27. Katagi, T.; Ose, K. 2015. Toxicity, bioaccumulation and metabolism of pesticides in the earthworm. *Journal of Pesticide Science*. 40(3): 69 - 81. Consultado 13 may. 2022. Disponible en <https://www.researchgate.net/publication/279273863>
28. Lyr, H. 1987. *Modern Selective Fungicides: Properties, applications and mechanisms of action*. London, Longman. 383 p.
29. Mazzilli, S.; Pérez, C.; Ernst, O. 2007. Fusariosis de la espiga en trigo: características de la enfermedad y posibilidades de uso de modelos de predicción para optimizar el control químico. *Agrociencia (Uruguay)*. 11(1): 11 - 21.
30. McMullen, M.; Bergstrom, G.; Dill-Macky, R.; Shaner, G. 2012. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: Fusarium head blight. *Plant Disease*. 96(12): 1712 - 1728.
31. Mesnage, R.; Defarge, N.; Spirooux de Vendômois, J.; Séralini, G. E. 2014. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. (en línea). *BioMed Research International*. 2014: 179691. Consultado 21 dic. 2021. Disponible en <https://doi.org/10.1155/2014/179691>
32. MGAP (Ministerio Ganadería Agricultura y Pesca, UY). s.f. Solicitud de registro de Productos Fitosanitarios. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado 27 nov. 2022. Disponible en <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/tramites-y-servicios/servicios/solicitud-registro-productos-fitosanitarios>
33. \_\_\_\_\_. 2001. Resolución S/N/001 Límites máximos de DON en alimentos para animales. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado 15 may. 2022. Disponible en <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-sn001-limites-maximos-don-alimentos-para-animales>
34. MGAP. DGSA (Ministerio Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Servicios Agrícolas, UY). s.f. Importaciones fitosanitarios. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado 30 mar. 2022. Disponible en [https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2020-06/importaciones\\_fitosanitarios%202019.ods](https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2020-06/importaciones_fitosanitarios%202019.ods)



35. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2022. Resolución Ministerial N°1.129/022. (en línea). Montevideo. 6 p. Consultado 2 dic. 2022. Disponible en <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-n-1179022-dgsa-se-autoriza-ampliacion-uso-productos>
36. MGAP. DNDR. CHPNA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección Nacional de Desarrollo Rural. Comisión Honoraria del Plan Nacional para el Fomento de la Producción con Bases Agroecológicas, UY). 2021. Plan nacional para el fomento de la producción con bases agroecológicas. (en línea). Montevideo. 31 p. Consultado 20 nov. 2022. Disponible en <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/plan-nacional-para-fomento-produccion-bases-agroecologicas/plan-nacional>
37. Migliani, R.; Bisht, S. 2019. World of earthworms with pesticides and insecticides. (en línea). *Interdisciplinary Toxicology*. 12(2): 71 - 82. Consultado 20 jul. 2022. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7071835/>
38. Mnif, W.; Hadj Hassine, A. I.; Bouaziz, A.; Bartegi, A.; Thomas, O.; Roig, B. 2011. Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. (en línea). *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 8(6): 2265 - 2303. Consultado 28 jun. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.3390/ijerph8062265>
39. Mondino, P. 2002. Manejo de la resistencia a fungicidas. (en línea). *Horticultura*. no. extra 1: 130 - 139. Consultado 15 set. 2022. Disponible en [https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_hortint/hortint\\_2002\\_E\\_130\\_139BIS.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_hortint/hortint_2002_E_130_139BIS.pdf)
40. Nagy, K.; Duca, R. C.; Lovas, S.; Creta, M.; Scheepers, P. T. J.; Godderis, L.; Ádám, B. 2020. Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. (en línea). *Environmental Research*. 181: 108926. Consultado 29 may. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108926>
41. Neme, C.; Ríos, M.; Zaldúa, N.; Cupeiro, N. 2010. Aproximación a la normativa vigente sobre plaguicidas y sus impactos ambientales. (en línea).

- Montevideo, Vida silvestre. 27 p. Consultado 30 jun. 2022. Disponible en [http://vidasilvestre.org.uy/wp-content/uploads/2010/08/normativa\\_plaguicidas\\_Vida-Silvestre-Uruguay.pdf](http://vidasilvestre.org.uy/wp-content/uploads/2010/08/normativa_plaguicidas_Vida-Silvestre-Uruguay.pdf)
42. Oldenburg, E.; Kramer, S.; Schrader, S.; Weinert, J. 2008. Impact of the earthworm *Lumbricus terrestris* on the degradation of Fusarium-infected and deoxynivalenol-contaminated wheat straw. (en línea). *Soil Biology and Biochemistry*. 40(12): 3049 - 3053. Consultado 5 may. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.004>
43. OMS (Organización Mundial de la Salud, CH), FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2015. Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas. (en línea). Roma. 56 p. Consultado 10 may. 2020. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-i3604s.pdf>
44. \_\_\_\_\_. 2020. Clasificación recomendada por la OMS de los plaguicidas por el peligro que presentan y directrices para la clasificación de 2019. Ginebra. 92 p.
45. Pelosi, C.; Joimel, S.; Makowski, D. 2013. Searching for a more sensitive earthworm species to be used in pesticide homologation tests: A meta-analysis. *Chemosphere*. 90(3): 895 - 900.
46. Petit, A. N.; Fontaine, F.; Vatsa, P.; Clément, C.; Vaillant-Gaveau, N. 2012. Fungicide impacts on photosynthesis in crop plants. (en línea). *Photosynthesis Research*. 111: 315 - 326. Consultado 25 jun. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s11120-012-9719-8>
47. Pimental, D. 1995. Amounts of Pesticides Reaching Target Pests: Environmental Impacts and Ethics. (en línea). *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*. 8: 17 - 29. Consultado 28 jul. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1007/BF02286399>
48. Qué es ISO. s.f. (en línea). s.l., SPG Certificación. s.p. Consultado 12 may. 2022. Disponible en <https://www.certificadoiso9001.com/que-es-iso/>
49. RAE (Real Academia Española, ES). 2019. Fungicida. (en línea). In: *Diccionario de la lengua española*. Madrid. s.p. Consultado 10 may. 2020. Disponible en <https://dle.rae.es/fungicida?m=form>

50. Ramos, J. M. 2010. La nueva normativa europea sobre fitosanitarios y su influencia en la producción agraria. (en línea). Tesis Mag. Agroecología. Andalucía, España. Universidad de Andalucía. 151 p. Consultado 20 jun. 2022. Disponible en [http://www.osala-agroecologia.org/IMG/pdf/JOSE\\_MANUEL\\_RAMOS\\_SANCHEZ.pdf](http://www.osala-agroecologia.org/IMG/pdf/JOSE_MANUEL_RAMOS_SANCHEZ.pdf)
51. Relyea, R. A. 2009. A cocktail of contaminants: How mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. (en línea). *Oecologia*. 159(2): 363 - 376. Consultado 20 jul. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1213-9>
52. Schielzeth, H.; Dingemanse, N.; Nakagawa, S.; Westneat, D.; Alaguela, H.; Teplitsky, C.; Réale, D.; Dochtermann, N.; Garamszegi, L.; Araya-Ajoy, Y. 2020. Robustness of linear mixed-effects models to violations of distributional assumptions. (en línea). *Methods in Ecology and Evolution*. 11(9): 1141 - 1152. Consultado 23 set. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13434>
53. Singh, J. 2018. Role of earthworm in sustainable agriculture. In: Galanakis, C. ed. Sustainable food systems from agriculture to industry improving production and processing. Cambridge, Academic Press. pp. 83 - 122.
54. Taran, L.; Ortega, C.; Laborde, A. s.f. Intoxicaciones por plaguicidas agrícolas y veterinarios en el Uruguay. (en línea). Montevideo, Udelar. 31 p. Consultado 30 jun. 2022. Disponible en <https://www.toxicologia.hc.edu.uy/images/stories/estadisticas/Intoxicacion-por-Plaguicidas-en-el-Uruguay.pdf>
55. Tornisiello, V. L.; Botelho, R. G.; Alves, P. A. T.; Bonfleur, E. J.; Monteiro, S. H. 2013. Pesticide tank mixes: An environmental point of view. (en línea). In: Price, A.; Kelton, J. eds. *Herbicides: Current research and case studies in use*. London, IntechOpen. pp. 473 - 487. Consultado 20 jul. 2022. Disponible en <https://www.intechopen.com/chapters/44957>
56. UE. CE (Unión Europea. Comisión Europea). 2012. Comunicación de la comisión al Consejo: efectos de la combinación de productos químicos: Mezclas de productos químicos. (en línea). Bruselas. 11 p. Consultado 20 dic 2021. Disponible en <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:52012DC0252&from=SK>

57. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. 2015. Reglamento 2015/830 de la Comisión de 28 de mayo de 2015 por el que se modifica el Reglamento (CE) no 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH). (en línea). Diario oficial de la Unión Europea. 58: 8 - 31. Consultado 28 nov. 2022. Disponible en <https://www.boe.es/doue/2015/132/L00008-00031.pdf>
58. Van Hoesel, W.; Tiefenbacher, A.; König, N.; Dorn, V. M.; Hagenguth, J. F.; Prah, U.; Widhalm, T.; Wiklicky, V.; Koller, R.; Bonkowski, M.; Lagerlöf, J.; Ratzenböck, A.; Zaller, J. G. 2017. Single and combined effects of pesticide seed dressings and herbicides on earthworms, soil microorganisms, and litter decomposition. (en línea). *Frontiers in Plant Science*. 8: 215. Consultado 20 jul. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00215>
59. Wegulo, S.; Stevens, J.; Zwingman, M.; Baezinger, P. S. 2012. yield response to foliar fungicide application in winter wheat. (en línea). In: Dhanasekaran, D.; Thajuddin, N.; Panneerselvam, A. eds. *Fungicides for Plant and Animal Diseases*. London, IntechOpen. pp. 227 - 244. Consultado 10 may. 2022. Disponible en <http://www.intechopen.com/books/fungicides-for-plant-and-animal-diseases/yield-response-to-foliar-fungicide-application-in-winter-wheat>
60. Wu, J.; Ren, Z.; Zhang, C.; Heino, M.; Deng, T.; Wang, H.; Dai, J. 2020. Effects of soil acid stress on the survival, growth, reproduction, antioxidant enzyme activities, and protein contents in earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Science and Pollution Research*. 27: 33419 - 33428.
61. Yu, D.; Li, J.; Zhang, Y.; Wang, H.; Guo, B.; Zheng, L. 2012. Enantioselective bioaccumulation of tebuconazole in earthworm *Eisenia fetida*. (en línea). *Journal of Environmental Sciences*. 24(12): 2198 - 2204. Consultado 22 may. 2022. Disponible en [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)61053-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)61053-X)
62. Zhang, R.; Zhou, Z.; Zhu, W. 2020. Evaluating the effects of the tebuconazole on the earthworm, *Eisenia fetida* by H-1 NMR-Based untargeted metabolomics and mRNA assay. (en línea). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 194: 110370. Consultado 30 jun. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110370>

## 10. ANEXOS

### Cálculos para hacer la solución de Swing Plus a aplicar en ensayo TCR1 (opción 1)

<b>Swing Plus® OPCION 1</b> (Cálculo hecho para 500 g de suelo y disparos de 0,15 ml)	<b>Solución a aplicar</b>	<b>Fungicida</b>	<b>Fungicida</b>	<b>Concentración</b>
	ml	uL	Ml	
Volumen 2 aplicaciones	0.3	1.25		
<b>Volumen total</b>	<b>10</b>	<b>41.67</b>	0.04	0
		416.67	0.42	1
		4166.67	4.17	2
		<b>41666.67</b>	<b>41.67</b>	<b>3</b>

### Cálculos para hacer la solución de Prosaro a aplicar en ensayo TCR1 (opción 1)

<b>Prosaro® OPCION 1</b> (Cálculo hecho para 500 g de suelo y disparos de 0,15 ml)	<b>Solución a aplicar</b>	<b>Fungicida</b>	<b>Fungicida</b>	<b>Concentración</b>
	ml	uL	ml	
Volumen 2 aplicaciones	0.3	0.83		
<b>Volumen total</b>	<b>10</b>	<b>27.8</b>	0.03	0
		277.8	0.28	1
		2777.8	2.78	2
		<b>27777.8</b>	<b>27.78</b>	<b>3</b>

**Cálculos para hacer la solución de Swing Plus a aplicar en ensayo TCR1 (opción 2)**

<b>Swing Plus OPCION 2</b> (Cálculo hecho para 600 g de suelo y disparos de 0,11 ml)	Solución a aplicar	Fungicida	Fungicida	Agua	Concentración
	ml	uL	ml	ml	
48Volumen 28 aplicaciones					
Volumen total	20	10,0	0,010	19,990	0
	20	100,0	0,100	19,900	1
	20	1000,0	1,000	19,000	2
	20	10000,0	10,000	10,000	3

**Cálculos para hacer la solución de Prosaro a aplicar en ensayo TCR1 (opción 2)**

<b>Prosaro OPCION 2</b> (Cálculo hecho para 600 g de suelo y disparos de 0,11 ml)	Solución a aplicar	Fungicida	Fungicida	Agua	Concentración
	ml	uL	ml	ml	
Volumen 28 aplicaciones	3	1,00			
Volumen total	20	6,7	0,007	19,993	0
	20	66,7	0,067	19,933	1
	20	666,7	0,667	19,333	2
	20	6666,7	6,667	13,333	3

**Cálculos para hacer la solución de Cibencarb a aplicar en ensayo TCR1**

<b>Cibencarb OPCION 2</b> (Cálculo hecho para 600 g de suelo y disparos de 0,11 ml)	Solución a aplicar	Fungicida	Fungicida	Agua	Concentración
	ml	uL	ml	ml	
Volumen aplicaciones 28	3	0.50			
Volumen total	20	3.3	0.003	19,997	0

**Cálculos para hacer la solución de Prosaro a aplicar en ensayo TA**

<b>Prosaro CL<sub>50</sub></b> (Cálculo hecho para 600 g de suelo y aplicaciones de 0,11 ml)	Solución a aplicar	Fungicida	Serie Logarítmica Nº 3	Fungicida	Agua	Concentración
	ml	uL		ml	ml	
Volumen aplicaciones por recipiente 28	3	1				
Volumen total (todas las repeticiones)	30	1000,05	1	1,000	29,000	1
	30	1800,09	1,8	1,800	28,200	2
	30	3200,16	3,2	3,200	26,800	3
	30	5600,28	5,6	5,600	24,400	4
	30	10000,5	10	10,0005	20,000	5
				43,202	256,798	Total para 2 especies

**Concentración de control positivo a utilizar en TA**

<b>Cibencarb CL<sub>50</sub></b> (Cálculo hecho para 600 g de suelo y aplicaciones de 0,11 ml)	<b>Solución a aplicar</b>	<b>Fungicida</b>	<b>Fungicida</b>	<b>Agua</b>	<b>Concentración</b>
	ml	uL	ml	ml	
Volumen 28 aplicaciones	3	2,96			
Volumen total	20	19,7	0,020	19,980	

BASE DE DATOS DE LOS TCR Y TA

**Porcentaje de mortalidad de lombrices en TCR (%)**

	TCR1					TCR2				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Bloques	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Cntrl -	0	0	10	0	0	2	0	0	0	0
SP <sup>-1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SP <sup>0</sup>	0	0	10	0	10	0	0	0	0	0
SP <sup>1</sup>	10	10	0	0	10	0	0	0	0	0
SP <sup>2</sup>	20	20	0	0	0	10	10	0	0	10
SP <sup>3</sup>	80	80	90	70	100	100	100	100	100	100
P <sup>-1</sup>	10	10	0	10	0	0	0	0	0	0
P <sup>0</sup>	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
P <sup>1</sup>	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
P <sup>2</sup>	10	10	10	0	0	0	0	0	0	0
P <sup>3</sup>	80	80	100	90	90	80	100	90	90	80



**Masa total de lombrices, día 0. en TCR**

Bloques	TCR1					TCR2				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Cntrl -	3,87	3,33	3,78	3,33	3,91	2,99	2,44	2,81	2,54	2,26
SP <sup>-1</sup>	3,68	3,89	3,98	3,42	3,19	2,54	2,57	3	2,33	2,59
SP <sup>0</sup>	3,30	3,87	4,10	3,72	3,46	3,06	2,62	2,38	2,47	2,44
SP <sup>1</sup>	3,48	4,03	3,56	3,53	3,47	2,8	2,52	2,44	2,24	2,6
SP <sup>2</sup>	3,53	3,98	3,68	3,28	3,30	2,81	2,68	2,53	2,57	2,44
SP <sup>3</sup>	3,77	3,57	3,70	3,41	3,95	2,88	2,13	2,31	2,45	1,98
P <sup>-1</sup>	3,78	3,92	3,75	3,44	3,04	2,86	2,31	2,21	2,43	2,1
P <sup>0</sup>	3,78	4,02	3,51	3,75	3,67	2,89	2,63	2,43	2,33	2,39
P <sup>1</sup>	3,64	3,73	3,72	3,87	3,50	2,51	2,31	2,51	2,33	1,98
P <sup>2</sup>	3,93	3,65	3,41	3,60	3,91	2,92	2,51	2,46	2,32	2,2
P <sup>3</sup>	3,82	3,87	4,06	3,61	3,61	2,61	1,81	1,8	1,81	1,57

**Número de individuos y masa total TCR1**

Bloques	TCR1									
	1		2		3		4		5	
Tratamientos	n°	Peso (g)	n°	Peso (g)	n°	Peso (g)	n°	Peso (g)	n°	Peso (g)
Cntrl -	10	4,31	10	5,03	9	4,43	10	3,98	10	4,63
SP <sup>-1</sup>	10	4,06	10	4,21	10	4,61	10	4,37	10	3,94
SP <sup>0</sup>	10	3,92	10	4,27	9	3,99	10	4,10	9	3,66
SP <sup>1</sup>	10	4,04	9	4,49	10	4,33	10	4,42	9	3,76
SP <sup>2</sup>	10	4,40	8	3,29	10*	4,38	10	4,33	10	4,42
SP <sup>3</sup>	2	0,88	2	0,87	1	0,52	3	1,24	0	0,00
P <sup>-1</sup>	10*	4,11	9	4,09	10	4,15	9	3,29	10	4,42
P <sup>0</sup>	9	3,46	10	4,22	9	3,96	10	4,04	10	3,88
P <sup>1</sup>	10	3,85	10*	4,35	10	4,03	10	3,83	9	4,74
P <sup>2</sup>	10	4,78	9	4,08	9	4,34	10	4,23	10	4,31
P <sup>3</sup>	0	0,00	2	0,78	0	0,00	1	0,48	1	0,51

\*\*se observan deformaciones

**Número de individuos y masa total TCR2**

TCR2										
Bloques	1		2		3		4		5	
Tratamientos	n°	Peso (g)	n°	Peso (g)	n°	Peso (g)	n°	Peso (g)	n°	Peso (g)
Cntrl -	9	3,12	10	3,40	10	3,85	10	4,04	10	3,70
SP <sup>-1</sup>	10	3,45	10	3,82	10	4,67	10	4,30	10	3,85
SP <sup>0</sup>	10	3,68	10	3,79	10	4,11	10	4,07	10	3,69
SP <sup>1</sup>	10	3,51	10	3,39	10	3,81	10	3,91	10	3,56
SP <sup>2</sup>	9	3,27	9	3,57	10	3,93	10	3,77	9	3,74
SP <sup>3</sup>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
P <sup>-1</sup>	10	3,86	10	3,30	10	3,63	10	3,86	10	3,29
P <sup>0</sup>	10	3,83	10	3,89	10	3,95	10	3,04	10	3,30
P <sup>1</sup>	10	3,63	10	3,77	10	3,85	10	3,58	10	3,19
P <sup>2</sup>	10	4,14	10	3,83	10	3,82	10	3,93	10	3,69
P <sup>3</sup>	2	0,96	0	0,00	1	0,43	1	0,48	2	0,87

### Mortalidad y porcentaje de variación de masa en TA1

Tratamientos	Bloque	%mortalidad	mortalidad	%masa
Control -	1	0	0	1,18
Control -	2	0	0	-4,42
Control -	3	0	0	2,25
Control -	4	0	0	-1,02
Control -	5	0	0	6,96
Prosaro 1	1	0	0	0,00
Prosaro 1	2	0	0	4,44
Prosaro 1	3	0	0	9,42
Prosaro 1	4	0	0	-2,63
Prosaro 1	5	0	0	2,64
Prosaro 1,8	1	0	0	-6,87
Prosaro 1,8	2	10	1	0,61
Prosaro 1,8	3	20	2	14,98
Prosaro 1,8	4	0	0	6,17
Prosaro 1,8	5	0	0	7,52
Prosaro 3,2	1	0	0	6,19
Prosaro 3,2	2	10	1	-2,82
Prosaro 3,2	3	0	0	2,13
Prosaro 3,2	4	10	1	2,35
Prosaro 3,2	5	10	1	0,88
Prosaro 5,6	1	0	0	-2,54
Prosaro 5,6	2	30	3	-9,86
Prosaro 5,6	3	30	3	18,39
Prosaro 5,6	4	10	1	-1,74
Prosaro 5,6	5	20	2	2,86
Prosaro 10	1	30	3	-18,11
Prosaro 10	2	10	1	-1,08
Prosaro 10	3	60	6	-1,25
Prosaro 10	4	40	4	-4,76
Prosaro 10	5	70	7	8,55

### Mortalidad y porcentaje de variación de masa en TA2

Tratamientos	Bloque	%mortalidad	mortalidad	%masa
Control -	1	0	0	8,81
Control -	2	0	0	7,11
Control -	3	0	0	16,98
Control -	4	10	1	35,43
Control -	5	0	0	47,46
Prosaro 1	1	0	0	-4,68
Prosaro 1	2	0	0	25,21
Prosaro 1	3	0	0	14,12
Prosaro 1	4	0	0	20,70
Prosaro 1	5	0	0	11,01
Prosaro 1,8	1	10	1	-2,85
Prosaro 1,8	2	10	1	13,41
Prosaro 1,8	3	0	0	21,74
Prosaro 1,8	4	0	0	33,56
Prosaro 1,8	5	0	0	14,91
Prosaro 5,6	1	80	8	11,11
Prosaro 5,6	2	0	0	7,99
Prosaro 5,6	3	70	7	0,00
Prosaro 5,6	4	0	0	12,00
Prosaro 10	1	70	7	-9,56
Prosaro 10	2	80	8	11,11
Prosaro 10	3	30	3	-5,05
Prosaro 10	4	100	10	0,00
Prosaro 10	5	90	9	-52,03
Control +	1	100	10	0
Control +	2	100	10	0
Control +	3	30	3	-36,909
Control +	4	100	10	0
Control +	5	90	9	-7,821