

Estimación del efecto del glifosato sobre parámetros vitales de *Eisenia andrei*

Sandra A. Giunta & Haydeé S. Jáuregui

Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Jujuy.
sadrianagiunta@yahoo.com.ar

RESUMEN. El glifosato (C H NO P: N-fosfonometilglicina) es un herbicida no selectivo de amplio uso en agricultura para el control de malezas. Comercialmente, es presentado como una sal de isopropilamina combinado con surfactantes que facilitan la absorción y transporte a través de la planta. Tanto el ingrediente activo como los aditivos químicos de este herbicida representan una fuente potencial de toxicidad que pone en riesgo el equilibrio natural de los ecosistemas. En este estudio se evaluaron los efectos de cuatro concentraciones (0.4, 4, 40 y 400 mg/Kg sustrato) de glifosato sobre el crecimiento y la reproducción de *Eisenia andrei* durante 70 días. La biomasa total fue estimada como índice de crecimiento, la producción de cocones y número de crías/cocón como marcadores de reproducción. En esta investigación se calculó una LC₅₀ para *Eisenia andrei* de LC₅₀ de 44.62 ppm en suelo (17.848 mg pa/Kg de suelo) a los 14 días de iniciado el ensayo. Este agroquímico afecta la biomasa y la producción de crías en las concentraciones ensayadas.

1 INTRODUCCIÓN

La llegada de la Revolución Verde produjo un incremento mundial en el uso de plaguicidas para sostener cultivos intensivos. La actividad agrícola continua tiende a desmejorar la calidad del suelo y la aplicación repetida de plaguicidas puede traer efectos deletéreos para el ecosistema y la salud humana (Muthukaruppan et al. 2005, Förster et al. 2006, Casabé et al. 2007). La actividad agropecuaria ha experimentado en las últimas décadas importantes procesos de transformación, lo cual ha significado un aumento de las áreas cultivadas tanto en productos de consumo humano como forrajero y forestal (Dyson 1999). Esta situación ha implicado un aumento en la liberación de plaguicidas, ya sean naturales o de síntesis, imprescindibles para el control de plagas, principalmente en los procesos de producción intensivos (Groome 1998). Los plaguicidas por lo tanto son sustancias que permiten eliminar, controlar y manejar plagas, lo que presupone una elevada toxicidad al menos para esos organismos. Evidentemente la actividad de estas sustancias tóxicas sobre la especie objetivo no es considerada un problema, ya que en ello se basa su eficacia y la razón de su utilización. Sin embargo, los problemas derivan de la falta de selectividad, ya que en la liberación de estas

sustancias la toxicidad se extiende a otras especies no objetivos. Estos efectos no intencionados sobre otros organismos, obliga a realizar valoraciones previas a modo de minimizar los impactos sobre ellos y los diferentes compartimentos ambientales (Arregui 1997). Los organismos no destinatarios del control químico pueden servir para determinar si existen secuelas negativas del uso de plaguicidas en el ambiente (Vargas et al. 2001). Se han desarrollado diferentes protocolos de bioensayos para determinar el efecto de plaguicidas sobre distintos componentes biológicos (Calow 1993, Vega et al. 1999, Werner et al. 2000). Los parámetros de toxicidad aguda más comúnmente empleados son la concentración letal media (CL₅₀) (mg o µg/ L), la dosis letal media (DL₅₀) (mg o µg/ Kg) y el tiempo letal medio (TL₅₀ - hr). Las lombrices de tierra son un grupo de anélidos terrestres que presentan una serie de características que las convierten en modelos biológicos apropiados para evaluar toxicidad por productos químicos en el ambiente. Entre ellas, su amplia distribución geográfica, posición clave en la cadena trófica, abundancia en varios tipos de suelo, hábitat y hábitos alimenticios, así como su elevada tasa de reproducción y facilidad de cultivo en condiciones experimentales (Saint-

Denis et al. 1999, Booth et al. 2001, Dhainaut et al. 2001, Sauvé et al. 2002, Hamman et al. 2003, Homa et al. 2005, Sauvé et al. 2005, Olchawa et al. 2006). Las lombrices de tierra (Annelida: Oligochaeta) se hallan entre los invertebrados más abundantes del suelo, representando un 92% de la biomasa de los mismos (Belfroid 1994; Yasmin et al. 2007). Las lombrices afectan directamente la persistencia de los plaguicidas en el suelo ya que pueden metabolizarlos en su intestino generando otros compuestos tóxicos; arrastrarlos hacia capas más profundas donde no pueden ser extraídos o bien absorberlos en sus tejidos, con la posibilidad de transferirlos a través de la red trófica (Muthukaruppan et al. 2005, Yasmin et al. 2007). Desde 1989 se investiga, en Jujuy, la utilización de plaguicidas en las actividades agrícolas y la presencia de residuos de estos terapicos en alimentos. Está demostrada la amplia utilización de ellos así como la extrema toxicidad de los más usados. En los últimos quince años el grado de toxicidad de los fungicidas ha disminuido mientras que la toxicidad de los herbicidas se mantiene aunque se utilizan con mayor frecuencia. Por otra parte los insecticidas aplicados actualmente son más tóxicos que los utilizados en campañas anteriores por lo que aumenta el riesgo para el hombre y el ecosistema (Bovi Mitre et al. 1995, 2000). Todas estas razones imponen medir el impacto producido por los plaguicidas sobre ecosistemas terrestres y acuáticos, utilizando bioensayos sencillos y prácticos que permiten caracterizar muestras ambientales contaminadas por estos tóxicos, lo que contribuirá a tomar medidas para disminuir la problemática del uso indiscriminado de agroquímicos. El objetivo de este trabajo es determinar los efectos tóxicos del plaguicida glifosato sobre la lombriz *Eisenia andrei* (Annelida: Oligochaeta), bioindicador de contaminación.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los organismos de ensayo pertenecen a la especie *Eisenia andrei* (Bouché 1972), obtenidos de un lombricario privado de la Localidad de San Pedro, provincia de Jujuy. Estos ejemplares se aclimataron y criaron en el Laboratorio de Ensayos Biológicos (BIOLAB) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Jujuy. Se utilizaron contenedores fabricados con bastidores de madera cubiertos con malla metálica, con dimensiones de 30 x 15 x 30 cm. El sustrato se preparó con estiércol equino y tierra del monte en partes iguales. Con el fin de reproducir lombrices con anterioridad a los

ensayos, se colocaron en cajas de cría 50 a 100 gusanos adultos y se seleccionaron después de los 14 días. Estos animales se utilizaron para lotes de reproducción adicionales. Las lombrices nacidas de los capullos se utilizaron en los ensayos, cuando alcanzaron la madurez sexual, indicada por la presencia de clitelo, aproximadamente a los tres meses y con un peso entre 500 a 600 mg. El glifosato (CHNOP: N-fosfometilglicina) es un herbicida no selectivo de amplio uso en agricultura para el control de malezas. Comercialmente, es presentado como una sal de isopropilamina combinado con surfactantes que facilitan la absorción y transporte a través de la planta. Tanto el ingrediente activo como los aditivos químicos de este herbicida representan una fuente potencial de toxicidad que pone en riesgo el equilibrio natural de los ecosistemas. Es adsorbido fuertemente por el suelo por lo que prácticamente es inmóvil. Por su alta solubilidad puede contaminar aguas superficiales. Los métodos y las concentraciones estándares utilizados para los bioensayos se seleccionaron de acuerdo al protocolo de la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD 1984) y de la US-EPA (Agencia de Protección Ambiental de EEUU (ISO 1993, 1996, 1999). Para calcular la masa en función del principio activo se utilizó la concentración del producto comercial según aparece en el robinete:

Glyfos 48 (48%), 2.08 g producto comercial/L
(1g de principio activo pa)

Los ensayos se realizaron con concentraciones de 0.4, 4, 40 y 400 mg pa/Kg de sustrato en peso seco. Como sustrato básico de ensayo se utilizó un suelo artificial definido por la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD 1984), según se indica:

Sustrato básico:

- 10% de turba esfúnea (con un pH cercano a 5.5 sin restos visibles de plantas y finamente molida).
- 20% de arcilla de caolinita, con más de un 50% de caolinita.
- 69% de arena de cuarzo industrial (predominando la arena fina, en la que más del 50% de sus partículas eran de un tamaño de 0.15 a 0.2 mm).
- 1% de carbonato cálcico, pulverizado y químicamente puro, que se añadió con el fin de que el valor del pH sea de 6.0 ± 0.5 .

El sustrato de ensayo fue preparado con el sustrato básico, la sustancia de ensayo (herbicida) y agua desionizada. El sustrato control sólo

contenía sustrato básico y agua. Se utilizaron recipientes de vidrio (cubiertos adecuadamente con membranas plásticas con pequeñas perforaciones para su aireación) de 1000cc de capacidad. En cada receptáculo se dispuso 500g de sustrato básico para el control y la misma cantidad de sustrato de ensayo para cada concentración a evaluar. Se mantuvieron en cámaras climatizadas, a una temperatura de 20 (\pm 2°C) y con luz continua. Se realizaron ensayos con períodos de tiempo diferentes para evaluar las variaciones en el peso, la supervivencia de los organismos, la transformación del sustrato orgánico y la producción de crías.

2.1. Estudios de toxicidad aguda

Se adicionaron 10 lombrices adultas, de peso similar en cada recipiente y se realizaron 4 réplicas. La primera observación se realizó a las 96 hr y la segunda observación se llevó a cabo a los 7 días del comienzo del ensayo para evaluar la mortalidad de las lombrices. Por vaciamiento del medio en un recipiente de vidrio, se separaron las lombrices observándose reacciones a los estímulos mecánicos. Posteriormente se volvieron a depositar en cada contenedor para continuar la evaluación de los efectos del herbicida. A los 14 días de comenzado el ensayo se volvieron a contar, separando las lombrices vivas y observando sus reacciones a los estímulos mecánicos. Los individuos fueron lavados, secados y pesados en forma individual para calcular variaciones en la biomasa.

2.2. Estudios de toxicidad subcrónica

Se adicionaron 10 lombrices con peso y tamaño similares en cada uno de los recipientes, haciendo 4 réplicas por ensayo. A los 28 días se contaron las lombrices vivas. Fueron lavadas, secadas y pesadas en forma individual para calcular variaciones en la biomasa. Las lombrices se alimentaron a los 7 días de iniciado el ensayo con la adición de 5 g de estiércol equino por recipiente.

2.3. Estudios de toxicidad crónica

En cada recipiente de ensayo se adicionaron 10 lombrices y 5g de estiércol equino/semana. Se realizaron 4 réplicas por ensayo. La primera observación se realizó a las 4 semanas. Se removieron las lombrices adultas, observando sus reacciones a los estímulos mecánicos. Las lombrices vivas se lavaron, secaron y pesaron para calcular las variaciones en su biomasa. En todos los ensayos, 3 horas antes de adicionar las lombrices, se colocaron en contenedores de vidrio con papel de filtro humedecido con agua destilada.

2.4. Ensayos para evaluar el comportamiento reproductivo

Se utilizaron contenedores fabricados con bastidores de madera cubiertos con malla metálica, con dimensiones de 30 x 15 x 30 cm. El sustrato se preparó con estiércol equino y tierra del monte en partes iguales. En ellos se dispuso una siembra inicial de 50 lombrices adultas. Se utilizó un diseño experimental al azar con 4 repeticiones por cada unidad experimental (control y herbicida). Para evaluar la reproducción de las lombrices, se registró tiempo de incubación, eclosión y número de organismos por cápsula. Cada 7 días, coincidiendo con la alimentación y el registro de datos, se recolectaron las cápsulas. Se colocaron en el interior de frascos de plásticos con tapa a rosca, a los que se realizaron perforaciones para la aireación. Se adicionaron 10 cápsulas por frasco. Se consideró como día 0 al momento que se separaron las cápsulas de los contenedores de madera. El periodo de incubación fue determinado mediante observaciones en los días 14 y 21; los porcentajes de eclosión y número de crías por cápsula se realizaron el día 21. Se colocaron los contenedores en un baño de agua a 55 °C por 20 minutos. Las lombrices subieron y fueron fácilmente colectadas para su conteo.

2.5. Determinación de la descomposición de materia orgánica

Para la determinación de la descomposición de materia orgánica y la actividad alimentaria de las lombrices, se enterraron en los contenedores bolsas de nylon con materia orgánica en su interior, con perforaciones de 3mm, al inicio del ensayo. Cada bolsa contenía 35g de estiércol equino compostado en su interior. La descomposición de materia orgánica se estimó por la variación de peso al final del ensayo. A los 2 meses se retiraron las bolsas, se observó y analizó la actividad biótica del suelo a través de mediciones de peso seco del contenido remanente de materia orgánica.

2.6. Análisis estadístico

Las pruebas de toxicidad aguda y las respuestas subletales y letales para *Eisenia andrei* se evaluaron en un diseño experimental completamente aleatorio (DCA) en la asignación de las concentraciones. La eficacia de los tratamientos se evaluó a través de un Análisis de Varianza de dos factores, con modelos lineales con interacción y sin interacción. Cuando existieron diferencias significativas entre las réplicas se realizaron comparaciones por pares con los test de Tukey y Dunnet. El nivel de

significancia fue de $p < 0.05$ en todos los tratamientos. La LC_{50} se calculó usando el programa computarizado del método Probit, Versión 1.5 (US-EPA, 1990). El modelo de regresión de la relación concentración-respuesta fue verificado usando el estadístico Chi-cuadrado. Para la evaluación del herbicida seleccionado se utilizaron las siguientes variables:

- Variación en el peso de las lombrices.
- Supervivencia de los individuos
- Número de crías por cápsula.
- Degradación de la materia orgánica y actividad alimentaria de las lombrices.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La toxicidad se evalúa mediante bioensayos que consisten en exponer organismos vivos a sustancias tóxicas a diferentes concentraciones y registrar los efectos sobre los mismos. Se determina para cada concentración el número de organismos afectados, dato con el que se pueden establecer el parámetro LC_{50} (Concentración letal media) que corresponde a la concentración de tóxico que mata el 50% de los organismos ensayados. La exposición de las lombrices a suelos y sedimentos contaminados produce el contacto directo con su epidermis, lo que ocasiona un daño dérmico o la absorción de tóxicos por esta vía, al grado de provocar la muerte. La mortalidad en estos organismos es determinada por la falta de movimiento en respuesta a estímulos táctiles definidos en su porción final. Los ensayos para evaluar la ecotoxicidad del glifosato en la supervivencia de *E. andrei* durante 14 días a diferentes concentraciones, se muestran en la Figura 1.

Los ensayos para evaluar la ecotoxicidad del glifosato en la supervivencia de *E. andrei* durante 70 días a diferentes concentraciones, se muestran en la Figura 2.

Los ensayos con lombrices son ampliamente reconocidos como pruebas para evaluar la toxicidad de suelos contaminados (Wilson et al. 2002). Cuando se tienen concentraciones subletales que afectan el crecimiento o reproducción de la lombriz (como representante de los organismos del suelo), esta respuesta puede ser empleada como un centinela de procesos destructivos que pudieran presentarse en el suelo (Neuhauser et al. 1990). Muchos plaguicidas se acumulan en la porción superficial del suelo donde la densidad de población de organismos es máxima, provocando en mayor o menor escala alteraciones relevantes (Stadler, 1998).

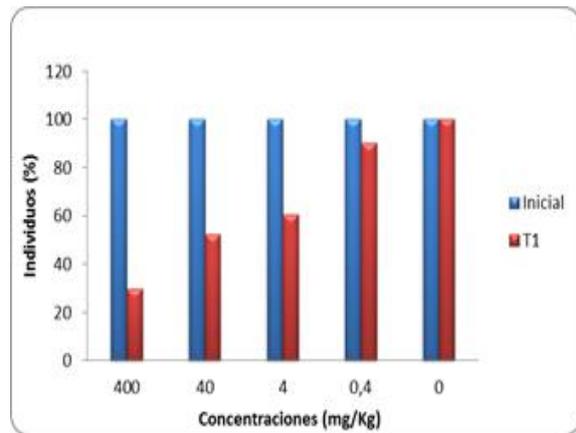


Figura 1. Porcentajes de individuos vivos de *E. andrei* a los 14 días de iniciado el ensayo. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05

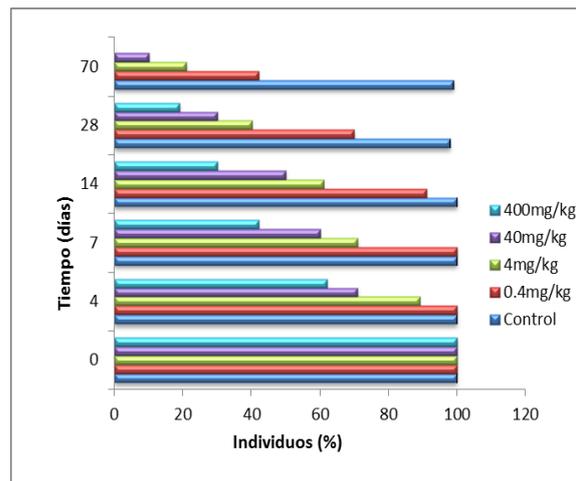


Figura 2. Porcentaje de supervivencia de *E. andrei* durante 70 días de tratamiento con diferentes concentraciones de glifosato. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05

La tasa de variación porcentual en el peso con respecto al grupo control de *E. andrei*, durante 96 hr y 70 días, a diferentes concentraciones del glifosato, se muestran en la Figura 3 y 4, respectivamente.

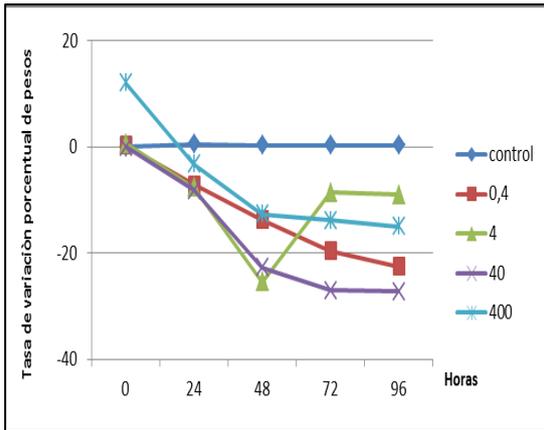


Figura 3. Tasa de variación porcentual en el peso de *E. andrei* con respecto al grupo control a las 96 hr de iniciado el ensayo en diferentes concentraciones de glifosato. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05

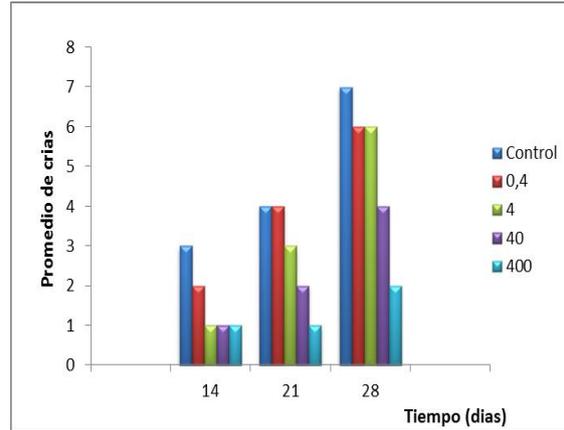


Figura 5. Registro del número promedio de crías por cápsula durante 28 días de exposición al glifosato. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05

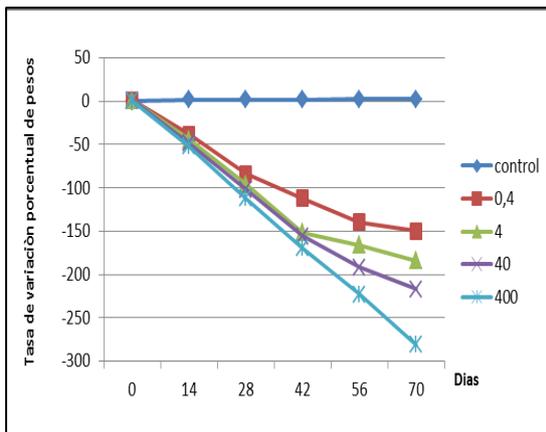


Figura 4: Tasa de variación porcentual en el peso de *E. andrei* con respecto al grupo control a los 70 días con diferentes concentraciones de glifosato. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05

Se muestra en la Figura 5 el ensayo para evaluar la reproducción de lombrices *E. andrei* en sustratos tratados con diferentes concentraciones del glifosato durante 28 días de tratamiento. Se registra el número de crías por cápsula en cada ensayo.

Los organismos vivos integran el efecto tóxico causado por la exposición a diferentes contaminantes, y responden de manera integral en sus diferentes niveles de organización (subcelular, celular, tejidos, órganos y sistemas) al efecto adverso de compuestos o mezclas de ellos. Los bioensayos proveen una medida más directa de la toxicidad ambiental relevante en los sitios contaminados que los análisis químicos, ya que integran la respuesta de los factores ambientales y de los compuestos tóxicos. Un parámetro muy importante para medir una de las actividades bióticas de las lombrices es su capacidad de transformar la materia orgánica en humus. La lombriz recicla en su aparato digestivo toda la materia orgánica. En la Figura 6 se comparan los resultados de la variación de peso de la materia orgánica en cada una de las bolsas. Este resultado se explica por la presencia o ausencia de lombrices y marca la importancia de las lombrices en la rápida incorporación de la materia orgánica en el suelo, cuando se encuentran en ambientes favorables.

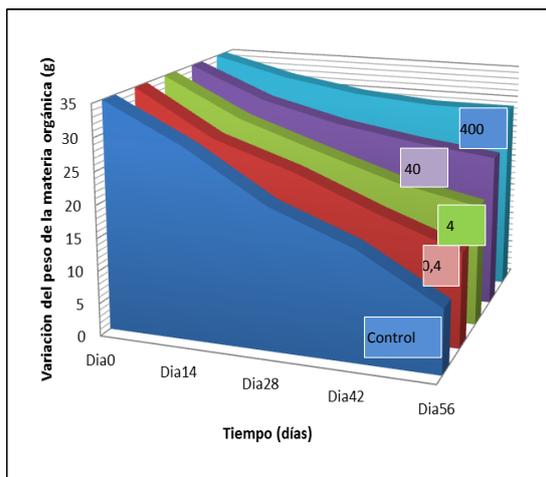


Figura 6. Variación del peso de la materia orgánica colocada en bolsas durante la alimentación de lombrices. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05

Las concentraciones de 40 y 400 mg/Kg de glifosato afectaron significativamente la actividad normal de las lombrices lo que se evidencia en la variación de peso de materia orgánica remanente en las bolsas. Sin embargo, si comparamos con el grupo control se observa que todas las concentraciones ensayadas muestran efecto negativo en la descomposición de la materia orgánica por parte de las lombrices. Las lombrices son una parte importante de los ecosistemas terrestres. En un suelo típico, el 80% de los animales corresponde a las lombrices de tierra. Según datos aportados por Marcano (2009) la variación del peso de *Eisenia ssp* se ve afectado a partir de la segunda semana de comenzado el ensayo con glifosato en concentraciones de 96 y 960 mg/Kg sustrato. Esto posiblemente se asocie con la abundancia en el sustrato provisto. Sin embargo, en este estudio se observan variaciones significativas en el peso desde la primera semana y se puede relacionar con la disminución en la actividad de descomposición de la materia orgánica por las lombrices. En investigaciones llevadas a cabo por Giménez (2006), se observó que la exposición de lombrices *Eisenia foetida* a concentraciones de campo del herbicida glifosato, provoca como mínimo una mortalidad del 50% de individuos, además de lesiones intestinales importantes en las lombrices sobrevivientes. En otros estudios realizados por Dermott (1992) se determinó en test de toxicidad aguda (96 hr de exposición) que el glifosato tiene una LC_{50} para *Limnodrilus variegatus* de 189.70 mg/L en medio líquido. Según Borgman (1989), la concentración letal

media para *Hyalella azteca* es de 6.20 mg/L. Esta amplitud en el rango de concentraciones letales marca la diferencia de sensibilidad de los distintos organismos a este herbicida, como se puede observar al analizar los resultados obtenidos en este trabajo. En esta investigación se calculó una LC_{50} para *Eisenia andrei* de 44.62 ppm en suelo (17.848 mg pa/Kg de suelo) a los 14 días de iniciado el ensayo. Si evaluamos el porcentaje de supervivencia de individuos de *Eisenia andrei* en los diferentes tratamientos observamos en las pruebas de toxicidad subcrónica (28 días) que a concentraciones de 400 mg pa/Kg de sustrato sobrevive el 20% de los individuos; con concentraciones de 40 mg pa/Kg el 30%; con 4 mg pa/Kg el 40% y con 0.4 mg pa/Kg el 73% de los individuos. En cambio, si se analizan los datos obtenidos en ensayos crónicos (70 días) se observa un descenso significativo en el número de sobrevivientes (Fig 2), siendo sólo de un 43% en dosis bajas (0.4 mg pa/Kg). Se evidencia una notable diferencia en la tolerancia de las especies al químico en cuestión. Los valores de LC_{50} obtenidos con glifosato mostraron un claro contraste en la capacidad de tolerancia entre los invertebrados aquí empleados y los utilizados por otros autores. Con respecto a la variación porcentual en los pesos en ensayos agudos, presentan diferencias significativas si se comparan las diferentes concentraciones (Prueba de Tukey). Se observa disminución en el peso durante las distintas horas de tratamiento (Fig 3). A los 14 días de iniciada la prueba los resultados obtenidos muestran que las medias marginales estimadas por el modelo, comparadas de a pares, presentan diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento control y las cuatro concentraciones de glifosato (Fig 4). Este resultado es coincidente con el de la prueba de comparación de las medias observadas, utilizando la prueba de Dunnett. Los ensayos subcrónicos (42 días) y los crónicos (70 días) muestran diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento control y las concentraciones 4, 40 y 400 mg pa/Kg de glifosato (Fig 4). Se observa una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones 0.4 y 40 mg/Kg de sustrato (Fig. 4). En cuanto al número promedio de crías por cápsula durante 28 días de exposición al herbicida se observa que en concentraciones bajas es de un 15% menos que el grupo control, a 40 mg/ Kg es de un 43% menos y con 400 mg/Kg es de un 72% menos si se compara con el grupo testigo (Fig 5). En otras investigaciones, la exposición a los suelos tratados con glifosato muestreados a 24 horas del tratamiento produjo una disminución significativa ($p < 0.001$) en la actividad alimentaria de lombrices *Eisenia*

foetida. La preferencia o rechazo de los suelos tratados frente a suelos testigos, se ensayó luego de 3 días de exposición de ejemplares de *E. foetida andrei* en recipientes “ad hoc”. Las lombrices mostraron una tendencia significativa ($p < 0.05$) a evitar los suelos tratados con glifosato muestreados a 10 días del tratamiento (Giménez et al. 2006). En un estudio con *Eisenia foetida*, en suelo artificial a concentraciones 500 mg de Roundup® D-pa/Kg de suelo seco, se encontraron elongación, hipotonía, lasitud y reblandecimiento de las lombrices. El nivel sin efecto observable NOEC a 14 días, se fijó en 158 mg de Roundup® D-pak /Kg de suelo seco (IBR, 1.991a). En otro estudio con *Eisenia foetida*, en suelo natural arenoso, se evidenció una ligera toxicidad, con signos similares a los arriba descriptos, y un nivel sin efecto observable - NOEC a 14 días de 500 mg de Roundup® /Kg de suelo seco (IBR, 1.991b). El glifosato tiene una moderada persistencia con una vida media típica (TD_{50} , tiempo requerido para la desaparición de la mitad de la cantidad inicial de una sustancia en un medio determinado) de 47 días (Wauchope et al. 1992). Para los estudios de laboratorio, la vida media típica del glifosato en suelo se observa alrededor de 25 días (Ahrens 1994a).

5 BIBLIOGRAFÍA

- Ahrens WA. 1994a. Glyphosate. In: Herbicide handbook., Seventh Edition. Weed Science Society of America. 149-152
- Arregui MC. 1997. Carrera de Especialización: Manejo de Agroquímicos. Módulo VII Los Plaguicidas y el Ambiente. p 14.
- Belfroid AC. 1994. Toxicokinetics of hydrophobic chemicals in earthworms. Validation of the equilibrium partitioning theory. Ph.D. Thesis. The Netherlands.
- Booth LH. O'Halloran K. 2001. A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Ecotoxicol Environ Saf*, 20: 2494–2502.
- Borgmann U. Ralph KM y Norwood WP. 1989. Toxicity test procedures for *Hyaella azteca*, and chronic toxicity of cadmium and pentachlorophenol to *H. azteca*, *Gammarus fasciatus*, and *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18(5): 756.764.
- Bovi Mitre MG. Ruggeri MA. y Singh J. 1995. Uso de plaguicidas en la Provincia de Jujuy. *Proyección Año 9 N°19*:16-25.
- Bovi Mitre MG. Giunta SA. De Pascuale N. y Jáuregui HS. 2000. Detection of toxic residues of Zineb in tomatoes of popular consumption. *Revista Internacional. Información Tecnológica.* ISSN.0716-0756. Vol.10. N° 2:159-162.
- Calow P. 1993. *Handbook of ecotoxicology.* Blackwell Science Ltd. Vol. I : 478
- Casabé N. Piola L. Fuchs J. Oneto ML. Pamparato L. Basack S: Jiménez R. Massaro R. Papa JC Kesten E. 2007. Ecotoxicological Assessment of the Effects of Glyphosate and Chlorpyrifos in an Argentine Soya Field. *J. Soil Sci.* (7 4):232-239.
- Dermott R. Munawer M. 1992. A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbricus variegatus*. *Hydrobiologia* 235-236:407 414.
- Dhainaut A. Scaps P. 2001. Immune defenses and biological responses induced by toxics in Annelida. *Can. J. Zool*, vol.79, n° 2: 233–253
- Dyson T. 1999. World foods trends and prospects to 2.025. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5.929-5.936.
- Förster B. García M. Francimari O. Römbke J. 2006. Effects of carbendazim and lambda-cyhalothrin on soil invertebrates and leaf litter decomposition in semi-field and field tests under tropical conditions (Amazônia, Brazil). *EJSOBI.* 42(1): 171-179.
- Gimenez RA. Fuchus J. Piola L. Casabe N. Massaro R. Papa JC. Onelo M. Basack S. Pamparato M. Kesten E. 2006. Impacto de Agroquímicos sobre la actividad biológica del suelo. Resumen expandido. 3° Congreso de Soja. MERCOSUR. Mercosoja 2006.
- Groome H. 1998. Investigación agropecuaria y agricultura sustentable: Algunos interrogantes. En: Genes en el laboratorio y en la fábrica. A. Duán, J Riechmann eds. Trotta Editorial, Madrid. pp 141-152.
- Hamman A. Momo F. Duhour A. Falco L. Sagario M. Cuadrado M. 2003. Effects of UV radiation on *Eisenia fetida* populations. *Pedobiología*, 47 : 842-845.

- Homa J. Olchawa E. Stürzenbaum S. Morgan J. Plytycz B. 2005. Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metals ions. *Environ Pollut.*, 13 : 275-280.
- IBR (1991a). Final Report - Acute toxicity in earthworms according to OECD 207 - test article: "Technical isopropilamine salt of glyphosate = MON 0139" (Project No. 80-91-2078-0090). Hannover, International Bioresearch
- IBR (1991b). Final Report - Acute toxicity in earthworms according to OECD 207 - test article: "Roundup®" (Project No. 80-91-0599-00-90). Hannover, International Bioresearch.
- Marcano L. Quiaro S. Polo A. Marcano E. Efectos del herbicida Glifosato sobre el Crecimiento y la reproducción de la lombriz de tierra *Eisenia* Spp. (Annelida: Oligochaeta). *Biologist (Lima)*. Vol. 7 N° 1-2, Special Issue, Jan-Dec 2009. 72
- Muthukaruppan GS. Janardhanan HS, Vijayalakshmi GS. 2005. Sublethal Toxicity of the Herbicide Butachlor on the Earthworm *Perionyx sansibaricus* and its Histological Changes. *JSS* 5(2): 82-86
- Neuhauser EF. Callahan CA. 1990. Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to sublethal concentrations of organic chemicals. *Soil Biol. Biochem.* 22: 175-179.
- OECD: Organization for Economic Cooperation and Development. 1984. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 207. Earthworm Acute Toxicity Test. Paris.
- Olchawa E. Bzowka M. Stürzenbaum S. Morgan A. Plytycz B. 2006. Heavy metals affect de coelomocyte-bacteria balance in earthworm: Environmental interactions between abiotic and biotic stressors. *Environ. Pollut.*, 142 : 373-381.
- Saint-Denis M. Narbonne J. Arnaud C. Thybaud E. Ribera D. 1999. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo(a)pyrene. *Soil. Biol. Biochem.*, 31: 1837-1846.
- Sauvé S. Hendawi P. Fournier M. 2002. Phagocytic responses of terrestrial and aquatic invertebrates following in vitro exposure to trace elements. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 57 : 21-29.
- Sauvé S. Fournier M. 2005. Age-specific immunocompetence of the earthworm *Eisenia andrei*: exposure to methylmercury chloride. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 60 (1) : 67-72.
- Stadler T. 1998. Bioindicadores de la contaminación de suelos: efectos secundarios de insecticidas sobre la fauna edáfica. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia*. *Revista Ecotoxicología*, Nueva Serie N° 153:1-10. Buenos Aires, Argentina.
- US-EPA (Agencia de Protección Ambiental de EEUU (ISO 1993, 1996,1999).
- Vargas RM. Ubillo AF. 2001. Toxicidad de pesticidas sobre enemigos naturales de plagas agrícolas. *Agricultura Téc. (Chile)* 61: 35-41
- Vega MM. Urzelai A. Angulo E. 1999. Minimum data required for deriving soil quality criteria from invertebrate ecotoxicity experiments. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:1304-1310
- Wauchope RD, Buttler TM, Hornsby AG, Augustijn-Beckers PW, Burt JP. 1992. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Rev Environ Contam Toxicol.* 123:1-155
- Werner I. Deanovic LA. Connor V. Vlaming VD. Bailey HC. Hinton DE. 2000. Insecticide-caused toxicity to *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera) in the Sacramento- San Joaquín River Delta, California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 19:215-227
- Wilson JJ. Hathcer J. Goudey JS. 2002. Ecotoxicological endpoints for contaminated site remediation. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanità* 38(2): 143-147.
- Yasmin S. D'Souza D. 2007. Effect of Pesticides on the Reproductive Output of *Eisenia fetida*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 79: 529-532.