

SUSCEPTIBILIDAD DE *Octolasion cyaneum* (ANNELIDA: OLIGOCHAETA, LUMBRICIDAE) EXPUESTA A CLORPIRIFOS EN CONDICIONES DE LABORATORIO

SERGIO EZEQUIEL RAFAEL; CARLA SALVIO*; PABLO LUIS MANETTI; NATALIA LILIANA CLEMENTE & ALICIA NOEMÍ LÓPEZ

Recibido: 03-12-14

Recibido con revisiones: 17-08-15

Aceptado: 17-08-15

RESUMEN

Los oligoquetos terrestres participan en los servicios ecosistémicos del suelo y son considerados potenciales indicadores de la salud del suelo. El uso creciente de plaguicidas puede traer efectos deletéreos sobre los mismos. Por lo tanto, en este trabajo se determinaron: 1) la evasión y/o atracción de *Octolasion cyaneum* (Oligochaeta, Lumbricidae) ante la presencia de Clorpirifos y 2) los efectos letales y subletales del insecticida sobre *O. cyaneum*. Se realizaron bioensayos ecotoxicológicos de evasión, toxicidad subletal y reproducción con 5 dosis de Clorpirifos y el testigo, sin tratamiento químico. Se determinó que la proporción de individuos en la zona tratada como la relación entre el peso en la zona tratada y el peso total de *O. cyaneum* no difirieron con las distintas dosis del insecticida después de las 48 horas ($p > 0,05$). Es decir, no se observó una respuesta evasiva de *O. cyaneum* con respecto a Clorpirifos. Con las diferentes dosis del insecticida se obtuvieron 238 individuos vivos de *O. cyaneum* y 2 muertos. A su vez, un 33% de los organismos presentaron cambios morfológicos como enrollamiento y coloración en el tegumento. A los 28 días después de la aplicación (DDA), el porcentaje de daño aumentó a medida que la dosis de Clorpirifos se incrementó ($p = 0,051$). La biomasa en peso húmedo (mg) de *O. cyaneum* no varió entre las dosis a los 7, 21 y 28 DDA, mientras que sí a los 14 DDA ($p = 0,004$). Tanto el número de cocones como de juveniles de *O. cyaneum* hallados fueron en promedio bajos en todos los tratamientos e incluso en el testigo. Por lo tanto, Clorpirifos no provocó una respuesta evasiva como tampoco un efecto letal sobre *O. cyaneum* pero, dependiendo de la dosis de aplicación, causó cambios morfológicos y en la biomasa de estos organismos.

Palabras clave. Bioensayos; insecticida; lombrices.

SUSCEPTIBILITY OF *Octolasion cyaneum* (ANNELIDA: OLIGOCHAETA, LUMBRICIDAE) EXPOSED TO CHLORPYRIFOS UNDER LABORATORY CONDITIONS

ABSTRACT

Earthworms participate in soil ecosystem services and are considered potential indicators of soil health. The use of insecticides in agriculture may negatively affect the population of these earthworms. The aim of this study was to evaluate: 1) the avoidance and / or attraction of *Octolasion cyaneum* (Oligochaeta, Lumbricidae) in the presence of Chlorpyrifos and 2) the lethal and sublethal effects of this insecticide on *O. cyaneum*. Avoidance, sublethal toxicity and reproduction bioassays were performed with 5 doses of Chlorpyrifos and a control with no chemical treatment. The proportion of individuals in the treated area, measured as the ratio of the weight of the treated area and the total weight of *O. cyaneum* did not differ among the different doses after 48 hours ($p > 0.05$). Therefore, there was no avoidance response of *O. cyaneum* to Chlorpyrifos. With different Chlorpyrifos doses, 238 individuals of *O. cyaneum* resulted alive and 2 dead, whereas 33% of the organisms presented morphological changes such as coiling and skin coloration. Twenty-eight days after application (DAA), damage percentage increased as the dose of Chlorpyrifos was higher ($p = 0.051$). Wet weight biomass (mg) of *O. cyaneum* did not differ between doses 7, 21 and 28 DAA, whereas it did vary 14 DAA ($p = 0.004$). Across all treatments including the controls, both *O. cyaneum* cocoons and juveniles numbers, were, on average, low. Therefore, Chlorpyrifos did not cause an avoidance behaviour response or a lethal effect on *O. cyaneum*. However, depending on the application rate, Chlorpyrifos produced morphological and biomass changes on these organisms.

Key words. Bioassays; insecticide; earthworms.

INTRODUCCIÓN

Dentro de los organismos benéficos que integran la macrofauna edáfica, los oligoquetos megadrilos, conocidos vulgarmente como lombrices, son considerados potenciales indicadores de la salud del suelo (Lavelle *et al.*, 1998; Lavelle *et al.*, 2006) y representan hasta el 92% de la biomasa animal de los suelos de varios ecosistemas (Belfroid, 1994, en Ricardo *et al.*, 2010). Estos organismos causan importantes modificaciones en el suelo, ya que intervienen en los ciclos biogeoquímicos y en la dinámica de la materia orgánica, aumentan la disponibilidad de nutrientes para las plantas, mejoran la estructura del suelo y afectan la diversidad y la actividad de los niveles tróficos inferiores (Lavelle *et al.*, 2006). A su vez, realizan orificios denominados bioporos que contribuyen a aumentar la infiltración del agua y la aireación, mejoran el drenaje y evitan la compactación del suelo (Edwards, 2004; Sanchez-Hernandez, 2006). De esta manera, participan en los servicios ecosistémicos del suelo (Lavelle *et al.*, 1998; Lavelle *et al.*, 2006).

Las condiciones climáticas, el tipo de suelo, la topografía, la vegetación y las prácticas de manejo afectan a los oligoquetos. Dentro de las prácticas de manejo, el laboreo del suelo tiene los mayores efectos sobre su distribución y abundancia (Stinner & House, 1990). Sin embargo, el uso creciente de plaguicidas puede traer efectos deletéreos sobre los mismos, y a largo plazo, conducir al desarrollo de daños irreversibles tanto en la estructura como en la función del suelo (Muthukaruppan *et al.*, 2005; Casabé *et al.*, 2007; Reinecke & Reinecke, 2007). Entre los insecticidas más utilizados, en la Argentina como en otras partes del mundo, se encuentra Clorpirifos (Jergentz *et al.*, 2005; Sandahl *et al.*, 2005; Micucci & Taboada, 2006; Casabé *et al.*, 2007). Éste es un insecticida organofosforado que posee un amplio espectro de acción sobre los artrópodos plagas y por tal motivo, se lo emplea para el control de insectos en una amplia variedad de escenarios agrícolas (CASAFE, 2009). Debido a que su uso es generalizado, los oligoquetos terrestres se encuentran expuestos a la acción tóxica de este insecticida (Reinecke *et al.*, 2002).

Una manera de evaluar el riesgo de los químicos sobre los oligoquetos es mediante bioensayos de toxicidad (Connell, 1997). *Eisenia fetida* es la especie más utilizada en estos bioensayos porque posee un ciclo de vida corto, alta tasa de fecundidad, facilidad de cría en condiciones de laboratorio y sensibilidad elevada a los químicos (Lowe & Butt, 2007). Sin embargo, su desventaja principal es que

no se encuentra presente en los suelos cultivados, por lo cual se deberían tener en cuenta otras especies como bioindicadores. En este sentido, *Octolasion cyaneum* es abundante y representativa de los suelos del sudeste bonaerense (Salvio, 2012). Es una especie endogéica y su valor indicativo es medio-alto, siendo sensible a ambientes con niveles bajos de materia orgánica y a las perturbaciones causadas por los sistemas de labranza convencional (Momo & Falco, 2010). Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo fueron: determinar la evasión y/o atracción de *O. cyaneum* ante la presencia de Clorpirifos y evaluar los efectos letales y subletales del insecticida sobre *O. cyaneum* mediante bioensayos de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Para la realización de los bioensayos se recolectaron ejemplares de la especie *O. cyaneum* clitelados en lotes agrícolas ubicados en la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Balcarce, Argentina (37°45' S; 58°18' O, 120 m snm). Los individuos clitelados recolectados se introdujeron en recipientes plásticos de 36,5 x 24,5 cm con 10 cm de suelo a capacidad de campo, proveniente de una pastura sin aplicación de agroquímicos por más de 30 años. Las características físicas y químicas del suelo fueron las siguientes: 6% de materia orgánica; 43,4% de arcilla; 30% de limo; 26,6% de arena; pH=6,2 y conductividad 0,22 mmhos cm⁻¹ presentando dicho suelo una textura franco. Los recipientes se colocaron durante dos semanas en una cámara de cría a 20 ± 2 °C y un fotoperiodo 14L: 10O, para la aclimatación de los individuos, siendo alimentadas con restos orgánicos vegetales.

Clorpirifos

Para los bioensayos se utilizó Clorpirifos (0,0-dietilfosforotioato de 0-3,5,6-tricloro-2-piridilo ó 0,0-dietil-0-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato) marca comercial Lorsban 48EC® (concentrado emulsionable, 48% de ingrediente activo (i.a.)). Se probaron dosis diferentes de aplicación considerando una de la dosis recomendada en el campo. Para lograr cada una de las dosis de i.a. por kg de suelo seco, se realizaron diluciones del insecticida en agua destilada, teniendo en cuenta que el peso de suelo de una hectárea a 5 cm y con una densidad aparente de 1,2 Mg m⁻³ equivale a 600.000 kg. Las aplicaciones del insecticida disuelto en agua se realizaron con un pulverizador manual sobre una capa fina y uniforme de suelo de 5 cm de altura sobre un paño de nylon de 50 cm por 50 cm de lado. Luego para lograr una incorporación adecuada del producto al sustrato se realizaron 20 movimientos de las partes laterales del paño hacia el centro.

Bioensayo de evasión

El bioensayo se realizó siguiendo las metodologías modificadas por Amorim *et al.* (2005) y Loureiro *et al.* (2005). La unidad experimental (UE) consistió en un recipiente plástico rectangular de 18 cm de largo x 12 cm de ancho y 12 cm de altura, provisto de una tapa plástica perforada a fin de permitir el intercambio gaseoso y evitar la pérdida excesiva de humedad. El diseño fue completamente aleatorizado con 4 repeticiones y se llevó a cabo en una cámara a 20 ± 2 °C y un fotoperiodo 14L: 10O. Los tratamientos fueron: 0, 144, 288, 576, 720 (dosis recomendada de aplicación), 1152, 1440, 2304, 2880, 4320 y 5760 g de i.a. Clorpirifos ha⁻¹.

Cada UE se dividió con un divisor plástico removible en dos mitades iguales (Loureiro *et al.*, 2005). Se colocaron primeramente en una mitad del recipiente 750 g de suelo control (sin aplicación) mientras que en la otra mitad se colocaron 750 g de suelo con una de las dosis de i.a. homogéneamente distribuido. Posteriormente, se removió el divisor y se colocaron 10 individuos clitelados de *O. cyaneum* entre 300 y 600 mg en el centro del recipiente. Luego de 48 horas se separaron cuidadosamente las dos fracciones de suelo con el divisor y se cuantificaron y pesaron en una balanza analítica electrónica (precisión = 0,001 g) los individuos presentes en cada lado. Aquellos individuos que fueron seccionados por el divisor plástico, se contabilizaron como medio individuo de cada lado (ISO, 2005).

Los resultados se expresaron como respuesta neta (RN) de acuerdo a la fórmula propuesta por Amorim *et al.* (2005):

$$RN(\%) = [(C - T)/N] * 100$$

donde C = es el número de individuos observados en el suelo control, T = es el número de individuos observados en el suelo tratado con el insecticida y N = el número total de individuos en cada UE. En los diferentes tratamientos, una RN positiva (+) indica evasión al plaguicida, ya que hay mayor cantidad de individuos en la mitad del recipiente correspondiente al suelo control. Una RN negativa (-) indica atracción y una RN igual a cero no respuesta (Amorim *et al.*, 2005; ISO, 2005).

Teniendo en cuenta la cantidad de individuos presentes en cada sector de la UE, se calculó la proporción de individuos en la zona tratada (P_{zt}) como $P_{zt} = T/N$, siendo T el número de individuos observados en la mitad del recipiente correspondiente al suelo tratado y N el número total de individuos en cada UE. En base al peso de los individuos en cada lado del recipiente determinado al finalizar los bioensayos, se calculó la relación entre el peso en la zona tratada y el peso total (RP) de la siguiente manera: $RP = P_t / P_t$, donde P_t = peso total de los

individuos en la zona tratada y P_t = peso del total de los individuos al finalizar el bioensayo.

Bioensayos de toxicidad subletal y reproducción

Los bioensayos se efectuaron siguiendo la metodología modificada por ISO (1993). La UE consistió de un recipiente plástico de 11,5 cm de diámetro y 11 cm de altura provisto de una tapa perforada para permitir el intercambio gaseoso, en la cual se colocaron 750 g de suelo con el i.a. y 10 individuos de *O. cyaneum*. Los tratamientos fueron los siguientes: 0, 720 (dosis recomendada de aplicación), 1440, 2880, 4320 y 5760 g de Clorpirifos ha⁻¹. El diseño fue completamente aleatorizado con 4 repeticiones y se llevó a cabo en una cámara a 20 ± 2 °C y un fotoperiodo 14L: 10O. Las observaciones se efectuaron a los 7, 14, 21 y 28 días después de la aplicación (DDA) y se determinaron: el número de individuos vivos y/o muertos, cambios morfológicos (%) y la biomasa en peso húmedo (mg). A los 56 DDA se determinó el número de cocones y de juveniles.

Los cambios morfológicos observados a los 28 DDA se clasificaron en: 1) sin daño; 2) daño leve (cambio de color en la totalidad del cuerpo del organismo); 3) daño moderado (enrollamiento del organismo); 4) daño severo (desprendimiento de la parte posterior del cuerpo) y 5) daño total (muerte del organismo). Se determinó el porcentaje de daño ponderado promedio (PD) de acuerdo a la fórmula de Townsend & Herberger (1943) adaptada:

$$PD(\%) \equiv [\sum(n * v)/CM * N] * 100$$

donde n = es el número de organismos por cada categoría, v = valor numérico de cada categoría, CM = valor de la categoría mayor y N = número total de individuos en cada UE.

Las variables evaluadas en los bioensayos de evasión, de toxicidad subletal y reproducción se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) previa validación del supuesto de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene ($\alpha = 0,05$). En caso de detectar diferencias entre las medias se realizó la prueba de mínima diferencia significativa (MDS) ($\alpha = 0,05$). Los análisis se realizaron con el programa R 3.1.1. (R Development Core Team, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayo de evasión

Se determinó que no hubo diferencias en la proporción de individuos de *O. cyaneum* en la zona tratada entre los tratamientos luego de las 48 horas ($p = 0,068$) (Tabla 1).

Tabla 1. Proporción de individuos en la zona tratada y relación entre el peso en la zona tratada y el peso final de *Octolasion cyaneum* (promedio \pm desvío estándar) con las distintas dosis de Clorpirifos (g i.a. ha⁻¹).

Table 1. Proportion of individuals in the treated area and ratio of weight in the treated area and the final weight of *Octolasion cyaneum* (average \pm standard deviation) with different doses of Chlorpyrifos (g a.i. ha⁻¹).

Variables	Dosis de Clorpirifos (g i.a. ha ⁻¹)									
	144	288	576	720	1152	1440	2304	2880	4320	5760
Proporción de individuos en la zona tratada	0,75 \pm 0,17 a	0,41 \pm 0,20 a	0,53 \pm 0,12 a	0,35 \pm 0,23 a	0,56 \pm 0,18 a	0,57 \pm 0,22 a	0,57 \pm 0,13 a	0,52 \pm 0,02 a	0,66 \pm 0,20 a	0,72 \pm 0,05 a
Relación entre el peso en la zona tratada y peso final	0,67 \pm 0,19 a	0,45 \pm 0,21 a	0,53 \pm 0,12 a	0,35 \pm 0,24 a	0,62 \pm 0,16 a	0,56 \pm 0,22 a	0,59 \pm 0,03 a	0,53 \pm 0,05 a	0,61 \pm 0,21 a	0,72 \pm 0,05 a

Letras iguales indican diferencias no significativas entre los tratamientos en cada fila (MDS, $p > 0,05$).

Con respecto a la relación entre el peso en la zona tratada y el peso total de *O. cyaneum* no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0,107$) (Tabla 1).

En términos de los valores promedio de respuesta neta (RN), los organismos presentaron atracción al insecticida,

siendo los porcentajes mayores de 50% y 45% con 144 y 5760 g i.a. ha⁻¹, respectivamente. Sin embargo, con 720 g i.a. ha⁻¹, se observó un 30% de evasión (Fig. 1). A su vez, se obtuvo 100% de supervivencia de los individuos.

De forma similar a los resultados obtenidos, Giménez *et al.* (2004) determinaron que la actividad (medida como

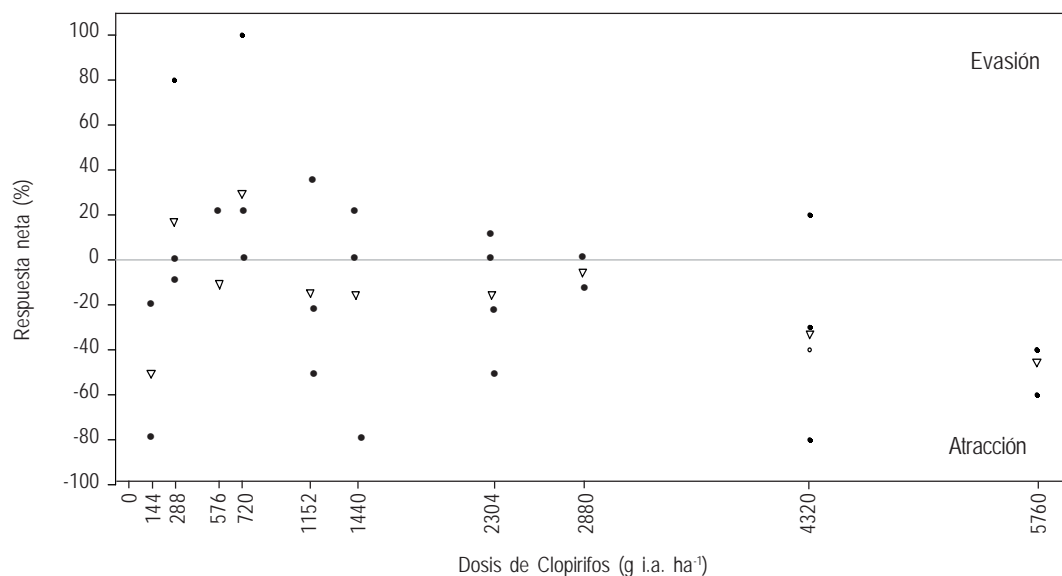


Figura 1. Respuesta neta (%) de *Octolasion cyaneum* luego de las 48 horas con las diferentes dosis de Clorpirifos (g i.a. ha⁻¹). Círculo lleno: repeticiones. Triángulo: promedio.

Figure 1. Net response (%) of *Octolasion cyaneum* after 48 hours with different doses of Chlorpyrifos (g a.i. ha⁻¹). Full circles: repetitions. Triangle: average.

desplazamiento en la búsqueda del alimento) de *Lumbricus terrestris* no es afectada con 2400 g i.a. ha⁻¹ de Clorpirifos. Reinecke & Reinecke (2007), en un estudio a campo, no obtuvieron diferencias significativas en la densidad de las lombrices luego de la aplicación de 270 y 1500 g i.a. ha⁻¹. Sin embargo, encontraron una densidad mayor de lombrices en áreas sin cultivar donde la concentración de Clorpirifos es menor. Relacionando estos resultados con los obtenidos en este bioensayo, con dosis similares se encontró que la proporción de lombrices estuvo comprendida entre 0,4 y 0,6 en la zona tratada con el insecticida. De esta manera, se confirmaría que Clorpirifos no produjo evasión con las dosis utilizadas. Por su parte, Piola *et al.* (2009) no observaron una respuesta de evasión de *E. andrei* con 240 y 960 g de Clorpirifos ha⁻¹. A su vez, Hodge *et al.* (2000) en condiciones de campo, determinaron que *Aporrectodea caliginosa* no presenta una respuesta de evasión significativa ante la presencia de 800 g de Clorpirifos ha⁻¹ y 2400 g de Diazinon ha⁻¹. Resultados similares encontraron Casabé *et al.* (2007) sobre *E. andrei* expuesta a 620 g de Clorpirifos ha⁻¹. En efecto, en este estudio no se observó una respuesta de evasión significativa de *O. cyaneum* con las dosis diferentes del insecticida y por lo tanto, los organismos no evitaron al insecticida ya que la proporción de organismos no difirió entre los tratamientos (Tabla 1).

Sin embargo, varios estudios han demostrado que *E. fetida* muestra con Clorpirifos una respuesta de evasión con

dosis comprendidas entre 0,04 a 0,08 g de i.a. kg⁻¹ de suelo (equivalente a 24 y 48 x 10³ g de i.a. ha⁻¹, respectivamente) (Zhou *et al.*, 2007; García Santos & Keller-Forrer, 2011). En cambio, en la mayoría de las dosis de este bioensayo con *O. cyaneum*, se observó un efecto contrario, es decir, presentó atracción o no respuesta al insecticida. Estas diferencias pueden deberse a que aquellos autores obtuvieron una respuesta de evasión con dosis de Clorpirifos superiores.

Bioensayo de toxicidad subletal y reproducción

De los 240 individuos de *O. cyaneum* utilizados en este estudio se obtuvieron 238 individuos vivos y 2 muertos, pero se observó que 33% de los mismos presentaron cambios morfológicos. A los 28 DDA, el porcentaje de daño (PD) difirió entre los tratamientos con respecto al testigo ($p = 0,051$), obteniéndose que el PD aumentó a medida que la dosis de Clorpirifos se incrementó (Tabla 2). El PD mayor, correspondiente a 15,62%, se obtuvo con 5760 g i.a. ha⁻¹, diferenciándose de los restantes tratamientos ($p < 0,05$) (Tabla 2).

Considerando la misma especie *O. cyaneum* pero con dosis diferentes de Clorpirifos, comprendidas entre 120 a 1728 g de i.a. ha⁻¹, Salvio *et al.* (2013) obtuvieron solamente 5 individuos muertos y Kaspar (2014) ningún individuo muerto, de un total de 240 individuos expuestos respectivamente. Es decir que, Clorpirifos tanto a la dosis de aplicación recomendada como a las dosis superiores no causó un efecto letal sobre *O. cyaneum* en los bioensayos

Tabla 2. Porcentaje de daño (%) y biomasa de *Octolasion cyaneum* (mg) (promedio \pm desvío estándar) en los diferentes tratamientos con Clorpirifos (g i.a. ha⁻¹) a los 7, 14, 21 y 28 días después de la aplicación (DDA).

Table 2. Damage percentage (%) and biomass *Octolasion cyaneum* (mg) (average \pm standard deviation) in the different treatments with Chlorpyrifos (g a.i. ha⁻¹) at 7, 14, 21 and 28 days after application (DAA).

Dosis (g i.a. ha ⁻¹)	Porcentaje de daño (%)		Biomasa de <i>Octolasion cyaneum</i> (mg)			
	28 DDA	7 DDA	14 DDA	21 DDA	28 DDA	
Testigo	---	441,4 \pm 47,7 a	409,6 \pm 12,7 bc	370,5 \pm 35,6 a	319,1 \pm 36,9 a	
720	2,8 \pm 3,3 b	493,2 \pm 28,4 a	491,2 \pm 23,5 a	449,9 \pm 30,4 a	387,4 \pm 29,9 a	
1440	2,9 \pm 4,3 b	468,7 \pm 54,1 a	450,2 \pm 42,4 ab	412,0 \pm 43,3 a	343,0 \pm 25,4 a	
2880	3,5 \pm 7,0 b	486,2 \pm 48,3 a	444,2 \pm 52,6 ab	396,7 \pm 37,9 a	366,4 \pm 49,1 a	
4320	7,1 \pm 5,8 ab	420,7 \pm 61,8 a	378,8 \pm 33,0 c	401,8 \pm 32,1 a	349,9 \pm 30,2 a	
5760	15,6 \pm 12,4 a	466,9 \pm 60,0 a	420,6 \pm 22,9 bc	387,5 \pm 25,8 a	343,9 \pm 36,6 a	

Letras iguales indican diferencias no significativas entre los tratamientos en cada fila (MDS, $p > 0,05$).

realizados en el presente trabajo. Asimismo, O'Halloran *et al.* (1999), Booth *et al.* (2001) e Iannaccone & Alvaríño (2004) detectaron que el insecticida, a dosis menores que las probadas en este bioensayo e incluso inferiores a la dosis recomendada de aplicación, no afecta la supervivencia de *E. fetida*. También, Giménez *et al.* (2004) observaron que 2400 g de Clorpirifos ha⁻¹ no afecta la supervivencia ni el crecimiento de los juveniles de *L. terrestris*.

Uno de los efectos subletales de los organofosforados sobre las lombrices es el enrollamiento de los organismos intoxicados, debido a que se altera la función muscular, afectando la locomoción y en consecuencia la alimentación. Además, el enrollamiento interfiere en la reproducción ya que los organismos tienen dificultad para encontrar su pareja y por ende, la cópula se realiza de un modo anormal impidiendo la expulsión de los espermatozoides (Bustos-Obregón & Goicochea, 2002; Espinoza Navarro & Bustos-Obregón, 2005). En concordancia con estos autores, los síntomas observados en este bioensayo fueron enrollamiento y cambios de coloración en el tegumento. A su vez, se observó una actividad menor de los organismos expuestos a las diferentes dosis del insecticida.

La mayoría de los estudios sugieren que el tegumento constituye una de las vías de ingreso de las sustancias tóxicas que producen cambios morfológicos sobre los organismos (Saxe *et al.*, 2001; Jager *et al.*, 2003; Vijver *et al.*, 2005). En efecto, Salvio *et al.* (2013) observaron que un 35% de los organismos de *O. cyaneum* expuestos a las diferentes dosis de Clorpirifos presentan cambios morfológicos, siendo en su mayoría la decoloración en la totalidad del cuerpo. Además, en la minoría de los individuos se produjo un abultamiento cercano a la región clitelar y lesiones en el tegumento como así también enrollamiento, ondulaciones del cuerpo y producción excesiva de mucus que provocan lentitud en sus movimientos. Síntomas similares fueron hallados por Rao *et al.* (2003) con Clorpirifos sobre *E. fetida*. Además, observaron que los organismos se muestran agitados e inquietos luego de superar los efectos tóxicos de Clorpirifos y requieren para su recuperación energía que se obtiene de la autólisis producida en la región posterior del cuerpo (Ramaswami & Subbram, 1992). Asimismo, Hackenberger *et al.* (2008) y Reddy & Rao (2008) hallaron los mismos síntomas sobre *E. fetida* expuesta a Temefos y Profenofos. En este estudio se observaron síntomas similares sobre *O. cyaneum* y por lo tanto, estos cambios morfológicos demuestran la susceptibilidad de *O. cyaneum* ante este insecticida. Por lo tanto, la aplicación reiterada del insecticida puede afectar a las poblaciones de lombrices

y en consecuencia, conducir a mediano y largo plazo al desarrollo de daños irreversibles tanto en la estructura como en la función del ecosistema suelo (Muthukaruppan *et al.*, 2005; Reinecke, 2007).

Con respecto a la biomasa en peso húmedo de *O. cyaneum* no se obtuvieron diferencias entre los tratamientos a los 7, 21 y 28 DDA ($p > 0,05$) (Tabla 2). Sin embargo, a los 14 DDA la biomasa difirió entre los tratamientos ($p = 0,004$), lográndose el peso menor con las dos dosis mayores de Clorpirifos ha⁻¹, pero sin diferenciarse de la biomasa en el tratamiento testigo. Con 720 g de Clorpirifos ha⁻¹, la dosis habitual de aplicación, el doble y el triple se obtuvo una biomasa mayor de *O. cyaneum* con respecto a los restantes tratamientos a los 14 DDA (Tabla 2).

De manera similar a los resultados obtenidos en este estudio, Salvio (2012) observó que al exponer a *O. cyaneum* a dosis diferentes de Clorpirifos, las cuales variaron desde 120 a 1440 g i.a. ha⁻¹, se redujo su biomasa tanto a los 7 como a los 28 DDA. La biomasa mayor de *O. cyaneum* se obtuvo en el testigo y la menor con 120 g i.a. ha⁻¹. En coincidencia, Zhou *et al.* (2007) observan que la ganancia de peso de *E. fetida* es menor cuando son expuestas a dosis comprendidas entre 0,005 y 0,080 g Clorpirifos kg⁻¹ de suelo (equivalente a 3×10^3 y 48×10^3 g de i.a. ha⁻¹, respectivamente). Por su parte, Zhou *et al.* (2011) detectan sobre la misma especie una reducción significativa en el peso a partir de 0,020 g de Clorpirifos kg⁻¹ de suelo (equivalente a 12×10^3 g de i.a. ha⁻¹) con respecto al control. Asimismo, Booth *et al.* (2000) obtienen una disminución significativa en el peso de *A. caliginosa* cuando se exponen a 0,004 y 0,028 g de Clorpirifos kg⁻¹ de suelo (equivalente a $2,4 \times 10^2$ y $16,8 \times 10^2$ g de i.a. ha⁻¹, respectivamente). Por otro lado, demuestran que la maduración de los juveniles está influenciada por la exposición a las distintas dosis del plaguicida, siendo más lenta en los organismos expuestos a la concentración mayor.

También, De Silva *et al.* (2010) observaron una reducción en la biomasa, la abundancia y la tasa de descomposición de los residuos de *Perionyx excavatus* y *Megascolex* sp expuestas a 2112 y 4224 g de Clorpirifos ha⁻¹ después de los tres meses de su aplicación. Además, informan que los efectos del insecticida son específicos para las especies de lombrices, así *P. excavatus* que es epigeica es más afectada que *Megascolex* sp. que es endogeica. Esto se debe a que esta última, vive en galerías profundas y sube a la superficie sólo para alimentarse, por lo que sufre una menor exposición al Clorpirifos.

Comparando estos estudios con los resultados obtenidos en este bioensayo, se observó que Clorpirifos no afectó la biomasa de *O. cyaneum* a los 7, 21 y 28 DDA (Tabla 2).

En cuanto a los parámetros reproductivos de *O. cyaneum* a los 56 DDA, los valores hallados fueron en promedio bajos en todos los tratamientos e incluso en el testigo. Se obtuvieron 2 cocones en el testigo, mientras que en la dosis mayor de Clorpirifos no se encontró ningún cocón, y por ende el número de juveniles siguió la misma tendencia. Por lo expuesto, no se determinó el efecto de este insecticida sobre estos parámetros reproductivos. Una causa posible de estos resultados es que durante la experiencia se observó una pérdida generalizada del clitelo en los organismos en todos los tratamientos, e incluso en el testigo, a partir de los 14 DDA. Esto se debería a las condiciones ambientales durante los 2 meses previos al momento de recolección de los ejemplares, las cuales fueron temperaturas bajas (temperatura media del aire de 10,5 °C) y reducido contenido hídrico del suelo por precipitaciones escasas. Estas condiciones adversas a las cuales estuvieron expuestos los organismos durante este período, habrían ocasionado que los mismos ingresen en una fase de diapausa facultativa, interrumpiendo su reproducción. Por lo tanto, esto explicaría una producción casi nula de cocones y de juveniles de *O. cyaneum*.

A pesar que en este estudio por factores biológicos no se determinaron los efectos adversos sobre los parámetros reproductivos, existe evidencia suficiente que lo confirma. En efecto, Salvio (2012) obtuvo un número de cocones y juveniles de *O. cyaneum* mayor en el testigo, mientras que los valores son menores con dosis comprendidas desde 120 a 1440 g i.a. ha⁻¹ de Clorpirifos a los 56 DDA. Asimismo, Booth *et al.* (2000) como Zhou *et al.* (2007) observaron que Clorpirifos afecta de manera significativa a la reproducción de *E. fetida*, debido a que el número de cocones es menor con dosis comprendidas entre 0,004 y 0,080 g de Clorpirifos kg⁻¹ de suelo. Del mismo modo, tanto en experiencias de laboratorio como de campo, Booth & O'Halloran (2001) encuentran que *A. caliginosa* presenta una disminución significativa en la viabilidad y producción de cocones con 0,028 g de Clorpirifos kg⁻¹ de suelo. Además, Alshawish *et al.* (2004) observan un impacto significativo en la fecundidad de *A. caliginosa* con 0,050 g i.a. kg⁻¹ de Clorpirifos. Resultados similares encontraron Zhou *et al.* (2011), quienes obtienen una disminución significativa en el número de cocones y de juveniles de *E. fetida* después

de ocho semanas de exposición. Por otra parte, Casabé *et al.* (2007) no obtienen diferencias en la producción de cocones entre los suelos tratados con 620 g de Clorpirifos kg⁻¹ con respecto a los controles.

CONCLUSIÓN

En los bioensayos de laboratorio realizados, Clorpirifos, tanto la dosis actualmente utilizada en el campo e incluso superior, no provocó una respuesta evasiva como tampoco un efecto letal sobre *O. cyaneum*. Sin embargo, el insecticida produjo cambios morfológicos en un 33% de los organismos de *O. cyaneum* con las diferentes dosis empleadas y en la biomasa de aquellos organismos. De esta manera, *O. cyaneum* se comportó de manera adecuada como bioindicador del posible impacto ambiental ocasionado por la aplicación de los plaguicidas presentando un potencial elevado para futuros estudios ecotoxicológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alshawish, SA; Al Mohamed & GA Nair. 2004. Prolonged toxicity of sub-lethal dosages of chemical pesticides on the body mass and cocoons of *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826) (Oligochaeta: Lumbricidae) inhabiting Benghazi, Libya[J]. *Proc. Nat. Acad. Sci. India* 74(B): 123-133.
- Amorim, MJB; J Römke & AMVM Soares. 2005. Avoidance behaviour of *Enchytraeus albidus*: effects of benomyl, carbendazim, phenmedipham and different soil types. *Chemosphere* 59: 501-510.
- Belfroid, AC. 1994. Toxicokinetics of hydrophobic chemicals in earthworms. Validation of the equilibrium partitioning theory. Ph.D. Thesis. Utrecht University, The Netherlands.
- Booth, LH; VJ Heppelthwaite & K O'Halloran. 2000. Growth, development and fecundity of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* after exposure to two organophosphates. *N. Z. Plant Protect.* 53: 221-225.
- Booth, LH; S Hodge & K O'Halloran. 2001. Use of biomarkers in earthworms to detect use and abuse of field applications of a model organophosphate pesticide. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67: 633-640.
- Booth, LH & K O'Halloran. 2001. A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(11): 2494-2502.
- Bustos-Obregón, E & RI Goicochea. 2002. Pesticide soil contamination mainly affects earthworm male reproductive parameters. *Asian J. Androl.* 4(3): 195-199.
- Casabé, N; L Piola; J Fuchs; ML Oneto; L Pamparato; S Basack; R Jiménez; R Massaro; JC Papa & E Kesten. 2007. Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. *J. Soils Sediments* 7(4): 232-239.

- Casafe. 2009. Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina. 14^o ed. Cámara de Sanidad Agropecuaria y fertilizantes. 3079 p.
- Connell, DW. 1997. Basic concepts of environmental chemistry. Lewis Publishers - CRC Press, Boca Raton, FL. 506 p.
- De Silva, MPC; A Pathiratne & CAM Van Gestel. 2010. Toxicity of chlorpyrifos, carbofuran, mancozeb and their formulations to the tropical earthworm *Perionyx excavatus*. *Appl. Soil Ecol.* 44: 56-60.
- Edwards, CA. 2004. Earthworm Ecology, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, London. 441 p.
- Espinoza-Navarro, O & E Bustos-Obregón. 2005. Effect of malathion on the male reproductive organs of earthworms, *Eisenia fetida*. *Asian J. Androl.* 7(1): 97-101.
- García-Santos, G & K Keller-Forrer. 2011. Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia. *Chemosphere* 84: 651-656.
- Giménez, R; A Della Penna & E Odello. 2004. Efectos tóxicos de los insecticidas clorpirifos y terflurina sobre la lombriz de tierra (*Lumbricus terrestris* L.). *Agr. Tec.* 64(4): 347-352.
- Hackenberger, BK; D Jariæ-Perkušæ & S Stepiaæ. 2008. Effect of temephos on cholinesterase activity in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Ecotox. Environ. Saf.* 71: 583-589.
- Hodge, S; KM Webster; L Booth; V Hepplethwaite & K O'Halloran. 2000. Non-avoidance of organophosphate insecticides by the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae). *Soil Biol. Biochem.* 32: 425-428.
- Iannacone, J & L Alvarino. 2004. *Eisenia fetida* (Savegny, 1826) (Annelida: Lumbricidae) como modelo ecotoxicológico para evaluar lindano y clorpirifos. *Acta Zoológica Lilloana* 48(1-2): 5-12.
- ISO. 1993. Soil quality. Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Geneva, Switzerland. s.p.
- ISO. 2005. Soil Quality-Avoidance Test for Testing the Quality of Soils and Toxicity of Chemicals-Test with earthworms (*Eisenia andrei*). N° 17512, ISO, Geneva, Switzerland. s.p.
- Jager, T; RHLJ Fleuren; EA Hogendoorn & G De Korte. 2003. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Environ. Sci. Technol.* 37: 3399-3404.
- Jergentz, S; H Mugni; C Bonetto & R Schulz. 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61: 817-826.
- Kaspar, J. 2014. Susceptibilidad de *Octolasion cyaneum* (Saveny, 1826) (Annelida, Oligochaeta, Lumbricidae) a la exposición de los insecticidas más utilizados en agricultura. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. 44 p.
- Lavelle, P; T Decaens; M Aubert; S Barot; M Blouin; F Bureau; P Margarie; P Mora & JP Rossi. 2006. Soil invertebrates and ecosystem services. *Eur. J. Soil Biol.* 42: 3-15.
- Lavelle, P; B Pashanasi; F Charpentier; C Gilot; JP Rossi; L Derouard; J Andre; JF Ponge & F Bernier. 1998. Large-scale effects of earthworms on soil organic matter and nutrient dynamics. In: CA Edwards (ed.). Earthworm Ecology, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 103-122.
- Loureiro, S; AMVM Soares & AJA Nogueira. 2005. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environ. Pollut.* 138: 121-131.
- Lowe, CN & KR Butt. 2007. Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: A critical review. *Eur. J. Soil Biol.* 43: 281-288.
- Micucci, F & M Taboada. 2006. Soil physical properties and soybean (*Glycine max*, Merrill) root abundance in conventionally-and zero-tilled soils in the humid Pampas of Argentina. *Soil Till. Res.* 86: 152-162.
- Momo, FR & LB Falco. 2010. Las lombrices de tierra. En: FR Momo & LB Falco (eds). Biología y ecología de la fauna del suelo. Imago Mundi. Argentina. pp. 141-160.
- Muthukaruppan, G; S Janardhanan & GS Vijayalakshmi. 2005. Sublethal toxicity of the herbicide butachlor on the earthworm *Perionyx sansibaricus* and its histological changes. *J. Soils Sediments* 5(2): 82-86.
- O'Halloran, K; LH Booth; S Hodge; S Thomsen & SD Wratten. 1999. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to organophosphates: hierarchical tests. *Pedobiologia* 43: 646-651.
- Piola, L; J Fuchs; ML Oneto; S Basack; R Giménez; R Massaro; JC Papa; E Kesten & N Casabé. 2009. Biomarkers for the assessment of chlorpyrifos effects on earthworms and on soil functional parameters. *Pesq. Agropec. Bras.* 44(8): 874-880.
- R Development Core Team. 2014. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Version 3.1.1.
- Ramaswami, V & V Subbram. 1992. Effect of selected textile dye on the survival, morphology, and burrowing behavior of the earthworm *Polypheretima elongata*. *Bull. Environ. Contam. Toxol.* 48: 253-258.
- Rao, JV; YS Pavan & SS Madhavendra. 2003. Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. *Ecotox. Environ. Saf.* 54: 296-301.
- Reddy, NC & JV Rao. 2008. Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71: 574-582.
- Reinecke, AJ; MS Maboeta; LA Vermeulen & SA Reinecke. 2002. Assessment of lead nitrate and mancozeb toxicity in earthworms using the avoidance response. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68: 779-789.
- Reinecke, S & A Reinecke. 2007. Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66: 92-101.
- Ricardo, T; MI Maitre & AR Rodriguez. 2010. Efectos subletales de la Lambda-cialotrina sobre *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta, Lumbricidae). *Ci. Suelo* 28(1): 39-46.
- Salvio, C. 2012. Impacto de las prácticas agrícolas sobre poblaciones de *Milax gagates* y *Armadillidium vulgare* e invertebrados benéficos en soja bajo siembra directa. Tesis *Magister Scientiae*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. 134 p.
- Salvio, C; ML Menone; AN López; PL Manetti & NL Clemente. 2013. Cambios morfológicos de *Octolasion cyaneum* (Annelida, Oligochaeta, Lumbricidae) debido a la exposición a Clorpirifos. 9^o Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología de Suelos y 1^o Congreso Nacional de Biología Molecular de Suelos. Santiago del Estero, septiembre de 2013. 3 p.

- Sanchez-Hernandez, JC. 2006. Earthworm Biomarkers in Ecological Risk Assessment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 188: 85-126.
- Sandahl, J; D Baldwin; J Jenkins & N Scholz. 2005. Comparative thresholds for acetylcholinesterase inhibition and behavioral impairment in Coho salmon exposed to chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 136-145.
- Saxe, JK; CA Impellitteri; WJGM Peijnenburg & HE Allen. 2001. Novel model describing trace metal concentrations in the earthworm, *Eisenia andrei*. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4522-4529.
- Stinner, BR & GJ House. 1990. Arthropods and other invertebrates in conservation-tillage agriculture. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 299-318.
- Townsend, GR & JW Herberger. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiment. *Plant Disease Report* 34: 340-343.
- Vijver, MG; HT Wolterbeek; JPM Vink & CAM Van Gestel. 2005. Surface adsorption of metals onto the earthworm *Lumbricus rubellus* and the isopod *Porcellio scaber* is negligible compared to absorption in the body. *Sci. Total Environ.* 340: 271-280.
- Zhou, S; C Duan; H Fu; Y Chen; X Wang & Z Yu. 2007. Toxicity assessment for chlorpyrifos-contaminated soil with three different earthworm test methods. *J. Environ. Sci.* 19: 854-858.
- Zhou, S; C Duan; WH Gi Michelle; F Yang & X Wang. 2011. Individual and combined toxic effects of cypermethrin and chlorpyrifos on earthworm. *J. Environ. Sci.* 23(4): 676-680.

