

EFFECTOS TÓXICOS DE LOS INSECTICIDAS CLORPIRIFOS Y TEFLUTRINA SOBRE LA LOMBRIZ DE TIERRA (*Lumbricus terrestris* L.)

Toxic effects of the insecticides chlorpyrifos and tefluthrin on earthworms (*Lumbricus terrestris* L.)

Rosana Giménez^{1*}, Angela Della Penna¹ y Ezequiel Odello²

ABSTRACT

In order to evaluate the ecotoxicity of chlorpyrifos and tefluthrin on the earthworm *Lumbricus terrestris* L., a laboratory test was carried out based on the guidelines of the International Organization of Biological Control (IOBC). The earthworms were collected by hand sorting from a soil free of pesticides of the Agronomy Faculty, University of Buenos Aires, Argentina, and placed in sterilized soil, in complete darkness, at 12°C for five days, and fed with dry white clover (*Trifolium repens* L.) leaves. Earthworms larger than 1.5 g without clitellum were placed in a Daniel's funnel with ten dry leaves of white clover on the surface. The treatments were: 1) control, unchlorinated water; 2) chloroacetamid solution (97.37%) 30 mg L⁻¹; 3) chlorpyrifos (emulsifiable concentrate, EC, 48%) 5 L ha⁻¹ or 50 mg L⁻¹; 4) tefluthrin (EC 5%) 2 L ha⁻¹ or 20 mg L⁻¹. A completely randomized experimental design with ten replicates was used. During 15 days of the assay the variables analyzed were: live weight change, individual activity and earthworm survival. The increase of earthworm weight was 0.285, 0.280 and 0.300 g in the 15 days of treatments 1, 3 and 4, respectively, with no significant differences between treatments, as well as the number of leaves withdrawn per day 0.61, 0.369, 0.555, and 0.425, respectively. The survival rates were: 100, 20, 100 and 90%, in treatments 1, 2, 3 and 4, respectively, being only affected by chloroacetamid. Chlorpyrifos and tefluthrin were not toxic for *L. terrestris* at the current dose (P < 0.05).

Key words: ecotoxicology, earthworms, pesticides.

RESUMEN

Para evaluar la ecotoxicidad de clorpirifos y teflutrina sobre *Lumbricus terrestris* L., se realizó una prueba de laboratorio, basada en el protocolo de la Organización Internacional de Control Biológico (IOBC). Las lombrices fueron recolectadas a mano en un suelo libre de plaguicidas, en el campo de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina, y colocadas en suelo esterilizado, en condiciones de oscuridad y 12°C durante cinco días, alimentadas con hojas secas de trébol blanco (*Trifolium repens* L.). Se colocó una lombriz mayor a 1,5 g sin clitelo por embudo de Daniel, con diez hojas secas de trébol blanco sobre la superficie. Los tratamientos fueron: 1) testigo, agua no clorada; 2) 30 mg L⁻¹ de solución de cloroacetamida (97,37%); 3) clorpirifos (EC 48%) 5 L ha⁻¹ ó 50 mg L⁻¹; 4) teflutrina (EC 5%) 2 L ha⁻¹ ó 20 mg L⁻¹. El ensayo tuvo diseño completamente aleatorizado con diez repeticiones. Durante los 15 días de ensayo las variables analizadas fueron: variación de peso, actividad individual y supervivencia de lombrices. El incremento de peso de las lombrices fue 0,285; 0,280 y 0,300 g en 15 días en los tratamientos 1, 3 y 4 respectivamente, y no hubo diferencias significativas entre los mismos así como en la cantidad de hojas retiradas al día, que fue de 0,61; 0,369; 0,555 y 0,425, respectivamente. La supervivencia fue de 100; 20; 100; y 90% en los tratamientos 1, 2, 3 y 4, respectivamente, siendo afectada sólo por cloroacetamida. Clorpirifos y teflutrina no fueron tóxicos a las dosis evaluadas (P < 0,5).

Palabras clave: ecotoxicología, lombriz de tierra, plaguicidas.

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Avenida San Martín 4453, C.P.C 1417 DES, Buenos Aires, Argentina. E-mail: pdella@agro.uba.ar rgimenez@agro.uba.ar *Autor para correspondencia.

² Asesor independiente.

Recibido: 22 de febrero de 2003. Aceptado: 1 de agosto de 2003.

INTRODUCCIÓN

La lombriz de tierra, *Lumbricus terrestris* L. (Oligochaeta, Lumbricidae), cumple un importante papel en los agroecosistemas al promover el desarrollo de las raíces (Edwards y Lofty, 1980), y conducir a una mayor capacidad de infiltración de agua (Hoogerkamp *et al.*, 1983; Edwards *et al.*, 1988). También, la actividad de las lombrices y sus desechos contribuyen a la estabilidad del suelo, lo que dependerá del origen de éste y de su composición (Schrader *et al.*, 1997). Por su actividad, estos organismos producen cambios fisicoquímicos y biológicos en el suelo y pueden causar variaciones en la densidad, diversidad, estructura y actividad de los microorganismos, y en la comunidad de la fauna presente alrededor de su hábitat (Brown, 1995). Organismos pequeños con limitada habilidad para moverse dentro del suelo pueden beneficiarse con los largos desplazamientos de las lombrices. Las interacciones benéficas entre éstas, la microflora y fauna pesan más que los efectos negativos potenciales (Brown, 1995).

L. terrestris vive aproximadamente 4 años, es hermafrodita, en comparación con otras lombrices es poco prolífica, y habita preferentemente en terrenos cuya humedad varía de 40 a 45% de agua útil y temperatura entre 10 y 12°C (Ferruzzi, 1986). Su población es afectada por prácticas agrícolas como labranzas, rotación, retención de rastrojos, drenaje, aplicación de fertilizantes, encalado, uso de plaguicidas, etc. (Baker *et al.*, 1994).

Se ha investigado la toxicidad de distintos productos fitosanitarios sobre las lombrices. Se han registrado cambios significativos en el comportamiento, en la biomasa y en la reproducción de *L. terrestris* producidos por el insecticida paratión. En contraste, en el mismo estudio, el herbicida diurón no evidenció efecto alguno sobre lombrices terrestres (Bauer *et al.*, 1997). Bajas a moderadas concentraciones del herbicida terbutilazina y del insecticida carbofurano indujeron alteraciones fisiológicas sobre *L. terrestris*, *Eisenia fetida* Savigny y *E. andrei* Bouché (Viswanthan *et al.*, 1997). En

Iowa, EE.UU., al evaluar la toxicidad de diferentes insecticidas granulados aplicados al suelo, estudios en laboratorio y en campo mostraron que clorpirifos fue menos tóxico que terbufos, fonofos, carbofurano y forato para *L. terrestris*, siendo el carbofurano el producto más tóxico (Culy y Berry, 1995). Ebing y Haque (1983) estudiaron el efecto del fungicida benomil y del insecticida carbofurano sobre lombrices, y encontraron mayor toxicidad para *L. terrestris* en comparación con *E. fetida*.

Clorpirifos y teflutrina son insecticidas ampliamente usados en Argentina en el control de gusanos de suelo. Clorpirifos (concentrado emulsionable, EC, 48%) se recomienda para el control de gusanos alambre (*Conoderus* spp. L.) y gusanos blancos (*Diloboderus abderus* Sturm.) en cereales cultivados en la región pampeana, a dosis de 4 a 6 L de producto comercial (p.c.) ha⁻¹, aplicado al suelo y luego incorporado con rastra de discos. El insecticida teflutrina (EC 5%) se usa para controlar los mismos insectos de suelo, así como para mosca de la semilla (*Delia* spp.), larvas de gorgojos (*Pantomorus* spp.), y orugas cortadoras (*Agrotis* spp.), aplicado a dosis de 2 - 3 L p.c. ha⁻¹ (CASAFE, 2001).

El objetivo del presente ensayo fue determinar si los insecticidas clorpirifos y teflutrina producen efectos tóxicos sobre la lombriz de tierra (*L. terrestris*) aplicados al suelo a las dosis recomendadas habitualmente para el control de insectos del suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó basándose en el protocolo de la Organización Internacional de Control Biológico (IOBC) (Bieri, 1989) con algunas modificaciones que se indican.

En la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina, se recolectaron lombrices de la especie *Lumbricus terrestris* L. en terrenos libres de plaguicidas. Se seleccionaron individuos en estado juvenil, con una biomasa superior a 1,5 g y sin clitelo. En la sala de aislamiento, en oscuridad total, se preparó un lumbricario en terrinas cerradas con una malla

metálica fina, diámetro de apertura de 1,2 mm. El sustrato de las terrinas fue el suelo de donde se extrajeron las lombrices del horizonte superficial, capa arable, esterilizado con calor seco, y mantenido con un contenido de humedad de 40 a 45%. Las lombrices permanecieron cinco días para su aclimatación en el sustrato, y se alimentaron con hojas secas de trébol blanco (*Trifolium repens* L). Luego se seleccionaron por tamaño a fin de lograr que el grupo de individuos utilizados fuera homogéneo.

Se usaron como unidades experimentales embudos de Daniel (Bieri, 1989) contruidos de polietileno de alta densidad con un diámetro de 12 cm y bordes verticales de 1 cm. En la parte superior se colocó como tapa un aro de plástico y una malla de alambre fino que permitió la entrada de aire. El sustrato se colocó hasta el borde superior del embudo y en el extremo inferior se fijó un tubo de silicona de 30 cm de longitud sellado con un tapón para eliminar el exceso de agua. Como modificación del protocolo IOBC, la base del embudo y el tubo de silicona se protegieron con un tubo de polietileno negro para asegurar la permanencia de las lombrices en la oscuridad.

El embudo se llenó al ras con suelo suavemente compactado. Con un barreno de metal de 3,5 mm de diámetro se abrió un canal vertical en el centro del sustrato, creando una madriguera continua desde la superficie del suelo hasta el extremo final del embudo. Se colocaron 10 hojas de trébol blanco sobre el suelo, secadas previamente en estufa, para cada lombriz. Luego, cada uno de los tratamientos se pulverizó sobre los embudos y se introdujo una lombriz en cada unidad experimental, en la que permanecieron por 15 días hasta la finalización del ensayo. Para la aplicación de los tratamientos se usó un pulverizador manual logrando una cobertura de 70 gotas cm^{-2} . Las unidades experimentales estaban instaladas en una sala de aislamiento en oscuridad total y 12 a 15°C. Diariamente el sustrato se regó con agua destilada mediante un aspersor manual, manteniendo el suelo con aproximadamente 45% de humedad.

Los tratamientos fueron: testigo sin tratar, pulverización con agua destilada; cloroacetamida (97,37%) 30 mg producto comercial (p.c.) L^{-1} ; clorpirifos (EC 48%) 5 L p.c. ha^{-1} ó 50 mg L^{-1} ; teflutrina (EC 5 %) 2 L p.c. ha^{-1} ó 20 mg L^{-1} . La cloroacetamida es recomendada en los protocolos de la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD), la Organización para la Cooperación Económica Europea (OECE) y la IOBC como tratamiento estándar en ensayos de laboratorio, por ser una sustancia con efectos letales cuantificables, y porque a través de ensayos repetidos en el tiempo, permite saber si hay cambios en la susceptibilidad de la población en estudio y caracterizar la población de un lumbricario (OECD, 1984; OECE, 1985; Bieri, 1989).

Se usó un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA), con diez repeticiones por tratamiento. Se analizaron las siguientes variables: a) Variación en el peso de las lombrices: se pesó cada individuo en una balanza de precisión, antes de ser introducido en los embudos y después de finalizados los tratamientos. En el tratamiento con cloroacetamida este parámetro no se analizó, debido a la elevada mortalidad observada, lo que imposibilitó la segunda medición del peso de un número significativo de individuos; b) Actividad de los individuos mediante el recuento diario de hojas “retiradas”: se considera que una hoja es “retirada” luego de finalizada la incorporación en la madriguera (Bieri, 1989). A los siete días las hojas retiradas fueron reemplazadas. Se determinó un cociente entre el número de hojas retiradas y la cantidad de días que permaneció con vida cada individuo; y c) Supervivencia de lombrices: en cada inspección se evaluó el estado de las lombrices, y se anotó el número de individuos muertos, los que se retiraron junto con las unidades experimentales. Los resultados se sometieron a ANDEVA ($p = 0,05$) y a la prueba de Tukey ($p = 0,05$ y $0,01$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las variaciones en el peso de las lombrices, en el número de hojas retiradas y en la supervivencia de los oligoquetos en los diferentes tratamientos del ensayo se presentan en el Cuadro 1. Las variaciones en el peso de los individuos durante el período en que fueron sometidos a los tratamientos, mostraron que en todos los casos, las lombrices aumentaron de peso, pero sin diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos con clorpirifos y teflutrina ($F = 0,047$; $P = 0,927$) (Cuadro 1).

El ANDEVA realizado sobre el número de hojas retiradas por día indicó que no hubo diferencias entre los tratamientos ($F = 2,651$; $P = 0,069$) (Cuadro 1).

La supervivencia de *L. terrestris* sólo se vio afectada en el tratamiento con 30 mg L⁻¹ de cloroacetamida. El 80% de los individuos murió durante los 15 días de exposición a este compuesto ($F = 22,69$; $P = 0,004$) (Cuadro 1). El test de Tukey mostró que en el tratamiento con cloroacetamida se produjo una mortalidad significativamente mayor que en los tratamientos testigo, clorpirifos y teflutrina (Figura 1).

La concentración letal media (CL₅₀) a los 14 días para cloroacetamida en *E. fetida* se encuentra entre 20 y 80 mg L⁻¹ (OECD, 1984; OEEC, 1985). Por otra parte, Ma y Bodt (1993) determinaron que la CL₅₀ a los 14 días para *E. fetida* y *L.*

terrestris son similares. La dosis de cloroacetamida utilizada en este ensayo corresponde aproximadamente a la CL₅₀, sin embargo, esta dosis produjo una mortalidad muy superior en esta población, demostrando la alta susceptibilidad de la población natural utilizada. Esta susceptibilidad permaneció estable en el tiempo, ya que tomando lombrices de esta población a intervalos regulares de 30 días, durante 12 meses, se produjo un efecto de mortalidad del 80 +/-4%, por lo que consideramos que la población de lombrices utilizada resulta apta para realizar pruebas comparables en el tiempo.

Por otro lado, si bien *E. fetida* ha sido considerada como una especie ideal para pruebas de toxicidad aguda de plaguicidas en los protocolos estándar (OECD, 1984; OEEC, 1985) por su fácil crianza y reproducción en cautiverio, puede a veces no ser una especie ecológicamente representativa de la fauna del suelo (Ma y Bodt, 1993). *L. terrestris* cumpliría con el criterio de representatividad debido a su abundancia e importancia en suelos agrícolas (Bostrom y Lofs-Holmin, 1982). Las poblaciones de lombrices presentan una susceptibilidad diferente a xenobióticos según su origen y condiciones de vida, tal como se evidencia en este ensayo, lo que demuestra la importancia de realizar experimentos con organismos locales. Además, se deberá investigar en el futuro qué sucede con lombrices adultas y con la incorporación mecánica del insecticida clorpirifos al suelo luego de la aplicación, para emular las condiciones de aplicación reales.

Cuadro 1. Variación de peso, actividad y supervivencia de lombrices, *Lumbricus terrestris* L.
Table 1. Variation of weight, activity and survival of earthworms, *Lumbricus terrestris* L.

	Supervivencia (%)				Actividad (hojas día ⁻¹)				Variación de peso (g)			
	Control	Cloróa.	Clorp.	Teflu.	Control	Cloróa.	Clorp.	Teflu.	Control	Cloróa.	Clorp.	Teflu.
Promedio ¹	100	20	100	90	0,610	0,369	0,550	0,425	0,285	S/d	0,280	0,300
Varianza	0,000	0,178	0,000	0,100	0,017	0,022	0,054	0,059	0,016	S/d	0,021	0,018
DE	0,000	0,422	0,000	0,316	0,129	0,148	0,233	0,243	0,127	S/d	0,144	0,135
CV%	0,000	210,81	0,000	35,13	21,121	40,165	42,398	57,091	44,575	S/d	51,343	45,134

¹ Número de datos = 10; DE: desviación estándar; CV%: coeficiente de variación.

Cloróa.: cloroacetamida; Clorp.: clorpirifos; Teflu.: teflutrina.

S/d: sin datos, debido al reducido número de individuos al finalizar el ensayo.

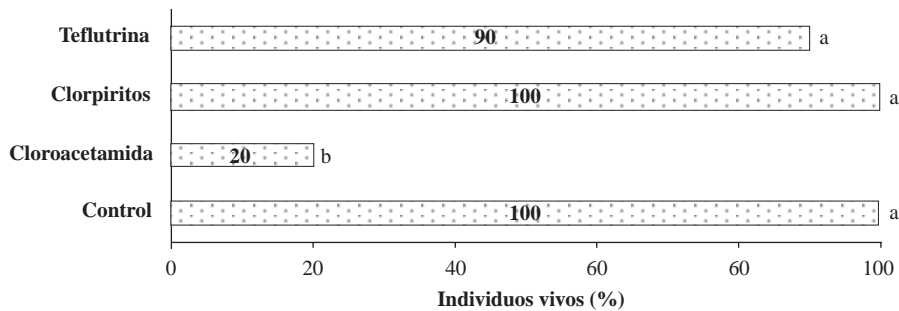


Figura 1. Porcentaje medio de supervivencia de *Lumbricus terrestris* L. durante 15 días de exposición a pesticidas.

Figure 1. Average survival percentage of *Lumbricus terrestris* L. during 15 days of exposition to pesticides.

Letras diferentes corresponden a medias que difieren significativamente según prueba de Tukey ($P = 0,05$).

CONCLUSIONES

En este estudio de laboratorio desarrollado con suelo agrícola con lombrices colectadas en el campo se estableció que los insecticidas clorpirifos y teflutrina, en las dosis recomendadas para el control de los insectos del suelo, no afecta la supervivencia de *L. terrestris* en estado juvenil.

Además, estos insecticidas no disminuyeron la actividad de las lombrices, incluyendo

alimentación y desplazamiento en busca de alimento, ni su crecimiento, expresado como aumento de peso vivo.

El control de larvas de los insectos del suelo *Conoderus* spp. y *Diloboderus abderus* con clorpirifos (CE 48%) 5 L de producto comercial (p.c.) ha⁻¹ aplicado al suelo y con teflutrina (EC 5%) para controlar *Agrotis* spp. a dosis de 2 L p.c. ha⁻¹ no afectarían a la población de lombrices jóvenes del suelo agrícola.

LITERATURA CITADA

- Baker, G.H., P.J. Carter, V.J. Barrett, G.P. Kilpin, J.C. Buckerfield, P.R. Dalby, C.E. Pankhurst, B.M. Doube, V.V.S.R. Gupta, and P.R. Grace. 1994. The introduction and management of earthworms to improve soil structure and fertility in South-Eastern Australia. p. 42-49. In Pankhurst, C.E., B.M. Doube, V.V.S.R. Gupta, and P.R. Grace (eds.). Soil biota, management in sustainable farming systems. CSIRO, Melbourne, Australia.
- Bauer, C., J. Rombke, and C.A. Edwards. 1997. Factors influencing the toxicity of two pesticides on three lumbricid species in laboratory test. Soil Biol. Biochem. 29:705-708.
- Bieri, M. 1989. Guidelines for the Daniel funnel test. A laboratory test to measure side effects of pesticides on the earthworms *Lumbricus terrestris* L. Guidelines for testing the effects of pesticides on beneficial organisms: description of the test methods. IOBC/WPRS Bull 1992:139-144. Ed. Hassan S.A., Darmstadt, Germany.
- Bostrom, U.L., and A. Lofs-Holmin. 1982. Testing side effects of pesticides on soil fauna, a critical literature review. 70 p. 12th Report of the Swedish University of Agricultural Sciences and Department of Ecology and Environmental Research. Alnarp, Sweden.
- Brown, G. 1995. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? The significance and regulation of biodiversity. Plant Soil 170:1, 209-231.
- CASAFE. 2001. Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina. 1600 p. Tomo II 10^a edic. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE), Buenos Aires, Argentina.
- Culy, M.D., and E.C. Berry. 1995. Toxicity of soil-applied granular insecticides to earthworms populations in cornfields. Down to Earth 50(2): 20-25. Ed. Dow AgroSciences, Midland, Michigan, USA.

- Ebing, W., and A. Haque. 1983. Toxicity determination of pesticides to earthworms in the soil substrate. *J. Plant Dis. and Prot.* 90:395-408.
- Edwards, C.A., and J.R. Lofty. 1980. Effects of earthworms inoculation upon the root growth of direct drilled cereals. *J. Appl. Ecol.* 17:533-543.
- Edwards, W. M., M. J. Shipitalo, and L.D. Norton. 1988. Contribution of macroporosity to infiltration into a continuous corn no-tilled watershed: Implications for contaminant movement. *J. Contam. Hydrol.* 3:193-205.
- Ferruzzi, C. 1986. *Manual de lombricultura*. 121 p. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, España.
- Hoogerkamp, M., H. Roggar, and H.J.P. Eusakers. 1983. Effect of earthworms on grassland on recently reclaimed polder soils in the Netherlands. p. 85-105. *In* Satchell, J.E. (ed.). *Earthworms ecology from Darwin to vermiculite*. Chapman and Hall, London, UK.
- Ma, W.C., and J. Bodt. 1993. Differences in toxicity of the insecticide chlorpyrifos to six species of earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) in standardized soil test. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50:864-870.
- OECD. 1984. Earthworm, acute toxicity tests. Guideline for testing of chemicals N° 207 (Adopted April 1984). 9 p. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Paris, France.
- OEEC. 1985. Methods for the determination of ecotoxicity. Toxicity for earthworms: Artificial soil test. Annex V. Part C. OEEC Directive 79/831. DG XI/128/82 (final), European Economic Communities, Brussels, Belgium.
- Schrader, S., H.Q. Zharg, and C.A. Edwards. 1997. Earthworms casting: stabilization or destabilization of soil structure. *Soil Biol. Biochem.* 29:469-475.
- Viswanthan, R., M. Herrchen, W. Kordel, and I. Scheunert. 1997. Physiological basis in the assessment of ecotoxicity of pesticides to soil organisms. *Experimental and theoretical approaches in environmental chemistry*. *Chemosphere* 35:323-334.