



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DEL GLIFOSATO EN LA TOXICIDAD DEL
COBRE SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA REPRODUCCIÓN DE LA LOMBRIZ DE
TIERRA CALIFORNIANA *Eisenia andrei* (ANNELIDA: OLIGOCHAETA)
(Modalidad: Tesis de Grado)

ADRIANA JOSE CASTILLEJO PEREDA

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CUMANÁ, 2020

INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DEL GLIFOSATO EN LA TOXICIDAD DEL
COBRE SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA REPRODUCCIÓN DE LA LOMBRIZ DE
TIERRA CALIFORNIANA *Eisenia andrei* (ANNELIDA: OLIGOCHAETA)

APROBADO POR:

Profa. Elena Marcano
Asesora

Profa. Leida Marcano
Coasesora

Profa. Patricia Velásquez
Jurado

Profa. Ahieska Liscano
Jurado

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE FIGURAS	III
RESUMEN	IV
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	6
Obtención y acondicionamiento de las lombrices	6
Diseño experimental	7
Bioensayos de exposición de toxicidad letal con glifosato y cobre	7
Bioensayos de exposición de toxicidad subletal con glifosato, cobre y mezclas de glifosato y cobre	9
Crecimiento	10
Biomasa	10
Concentración de proteínas totales	10
Reproducción	11
Análisis estadístico	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
Crecimiento	13
Biomasa	13
Concentración de proteínas totales	20
Reproducción	31
Número de ootecas	31
Porcentaje de eclosión de las ootecas	38
Tiempo de eclosión de las ootecas	39
Número de lombrices emergidas por ooteca	42
CONCLUSIONES	46
RECOMENDACIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48
APÉNDICES	60
HOJAS DE METADATOS	64

DEDICATORIA

A mis padres y a mi hermano, porque todo lo bueno que he alcanzado es gracias a ustedes; les debo mis logros, mis triunfos y mi camino al éxito. Gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en todo momento.

Los amo...

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la sabiduría y fuerza brindada durante toda esta etapa de mi vida, gracias por permitirme cumplir esta meta.

A mi tutora, la profesora Elena Marcano, por permitirme culminar esta etapa de mi formación a su lado, cuyo profesionalismo y experiencia marcaron en mí un compromiso de superación constante.

A mi co-asesora, la profesora Leida Marcano, por permitir que su experiencia en el área de la Ecotoxicología me guiaran durante el desarrollo de esta investigación, para usted mi más sincera admiración.

Al profesor José Imery, por su apoyo incondicional. Para él mi más profunda admiración, estima y respeto por permitir que su experiencia, consejos y pasión por la ciencia me motivaran.

A la familia Pereda-Castillo, por abrirme las puertas de su hogar y de esta manera ayudarme a culminar mi formación académica.

A Solmaira Senior, por su amistad incondicional, por estar siempre en las buenas y no tan buenas y por impulsarme con sus palabras de motivación para lograr superar todos los obstáculos, te quiero amiga.

A Celys González, gracias por el apoyo brindado, te quiero mucho.

A mi prima Daisy Michelle, gracias infinitas por tu aporte y por ser fuente de motivación para lograr esta meta, te quiero.

A mi casa de estudio, gracias a la **UNIVERSIDAD DE ORIENTE** por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de concluir una etapa más en mi formación no solo académica sino también personal.

A mis compañeros de estudio, Manuel Centeno, Juan Centeno, Nicolangelo Fiore, Jesús Boada, Josleidy Betancourt, Darwin Rangel, Rauxelis Rodríguez, Geraldine Rodríguez y Loreannys Salazar por la ayuda brindada durante el desarrollo de esta investigación.

A Eudar Cabello y Johnielys Alcalá, quienes me acompañaron no solamente en el crecimiento intelectual sino también en el personal por haber estado ahí, en los momentos tristes y alegres, por tener siempre tendida su mano amiga. Los quiero mucho chicos, siempre estarán en mi mente y corazón.

A los Profesores, a cada uno de ustedes que durante este recorrido tuve la dicha de conocerlos, infinitas gracias por los conocimientos y consejos dados. En especial a los profesores: **Ángel Fariña, Patricia Velásquez, Saraí Acuña y Edgar Zapata**.

Y finalmente gracias a todas aquellas personas que de alguna manera u otra formaron parte de este sueño. **MIL GRACIAS A TODOS...**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ubicación de la estación experimental de Biotecnologías Agrícolas (recuadro blanco) de donde proceden los ejemplares de *E. andrei*..... 6
- Figura 2. Biomasa de *E. andrei* juveniles controles y expuestas por 42 días a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 3 g de cobre/kg de sustrato y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato).. 14
- Figura 3. Concentración de proteínas totales en *E andrei* juveniles controles y expuestas por 42 días a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 3 g de cobre/kg de sustrato y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato).. 21
- Figura 4. Número de ootecas depositado por *E. andrei* controles y expuestas por 42 días a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5 g de sobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 3 g de cobre/kg de sustrato y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato).. 32
- Figura 5. Tiempo de eclosión de las ootecas depositadas por *E. andrei* controles y expuestas por 42 días a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 3 g de cobre/kg de sustrato y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato).. 40
- Figura 6. Número de lombrices emergidas por ooteca eclosionada por *E. andrei* controles y expuestas por 42 días a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 3 g de cobre/kg de sustrato y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato).. 43

RESUMEN

En este estudio se evaluaron los efectos del glifosato, Cu y mezclas de ambos en la reproducción y el crecimiento de *E. andrei* expuesta a suelos con el herbicida (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), el metal (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y mezclas de ambos (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 3 g de cobre/kg de sustrato y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato) durante 7, 21 y 42 días. Para evaluar el efecto de estos químicos sobre la biomasa, se tomó el peso en gramos (g) de los anélidos y la concentración de proteínas totales haciendo uso del tejido corporal. El efecto del GFS, Cu y mezclas sobre la reproducción se realizó utilizando lombrices de tierra cliteladas haciendo uso de parámetros reproductivos tales como, número de ootecas depositadas, tiempo de incubación de las ootecas, porcentaje de eclosión y el número de individuos eclosionados de las ootecas depositadas por *E. andrei* sujetas a las dosis subletales de los químicos. Durante las tres primeras semanas de exposición la biomasa incrementó en las lombrices sujetas a todos los tratamientos, asociados estos resultados con un efecto de hormesis. Mientras que descensos en el peso de los organismos expuestos demuestran que en tiempos prolongados de exposición el efecto de hormesis puede ser revertido debido al gasto energético invertido en hacerle frente a la exposición de los químicos. Las concentraciones de proteínas presentes en el tegumento de las lombrices expuestas a los químicos variaron en función al tiempo y los tratamientos, encontrándose concentraciones más elevadas a los 21 días del bioensayo los cuales se asociaron probablemente con la activación de los mecanismos encargados de contrarrestar la toxicidad causada por los químicos. Descensos en la puesta de ootecas, números de lombrices por ootecas e incrementos en el tiempo de incubación se asociaron posiblemente a la acción del glifosato, Cu y mezclas de ambos sobre estructuras reproductivas como el clitelo, al efecto directo de EROs generadas por acción del glifosato y el Cu con la formación de gametos, al desvío de los recursos normalmente disponibles para la reproducción hacia las funciones de detoxificación para aumentar las probabilidades de supervivencia de los organismos y al debilitamiento del mecanismo de defensa antioxidante a medida que avanza la exposición. Los biomarcadores de crecimiento y reproducción evaluados en *E. andrei* fueron sensibles a la exposición de los químicos y las respuestas obtenidas en las lombrices luego de la exposición al herbicida y el metal permitieron inferir que las concentraciones de glifosato utilizadas no atenuaron la toxicidad del Cu en las lombrices de tierra.

Palabras clave: crecimiento, reproducción, *E. andrei*, cobre, glifosato.

INTRODUCCIÓN

El glifosato [N-(fosfonometil) glicina] es un herbicida empleado en la agricultura para erradicar malezas que afectan el desarrollo de cultivos de importancia económica para el hombre, como los de café, maíz, cacao y soja (Devine *et al.*, 2008). La acción herbicida la ejerce mediante la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil-3-shikimatofosfato-sintasa (EPSPS) que participa en la síntesis de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina y triptófano; esenciales para la síntesis de proteínas y crecimiento de las plantas (Piola *et al.*, 2013). A pesar de que la USEPA (1993) señala que el glifosato no exhibe toxicidad, varias formulaciones comerciales a base de glifosato han generado efectos tóxicos en animales, los cuales se asocian más a los aditivos químicos inertes como la sal de isopropilamina y el tensioactivo polioxietileno amina (POEA) que al propio glifosato (Aguiar *et al.*, 2016).

En organismos terrestres, la bioacumulación y la toxicidad de las sustancias químicas depende de la fracción disponible de los compuestos en el suelo, la cual a su vez, requiere de factores físicos, químicos y biológicos. En este sentido, se ha evidenciado que la biodisponibilidad del glifosato disminuye con la presencia de iones metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} y Cd^{2+}), ácidos húmicos y otras partículas con las que se puede formar complejos estables y, con la biodegradación por microorganismos, principalmente por bacterias, las cuales degradan eficientemente al herbicida, utilizándolo como fuente de P, C y N (Maqueda *et al.*, 2017). De gran interés resultan las interacciones que ocurren entre los grupos funcionales del glifosato y los metales pesados, ya que estas afectan el potencial de toxicidad de ambos cuando se aplican conjuntamente en los suelos (Zaller *et al.*, 2014).

En varios estudios se ha examinado la interacción del glifosato con iones metálicos y los efectos de ambos sobre los organismos. Wang *et al.* (2009a) reportaron que la presencia del cobre (Cu) disminuye el efecto inhibitorio del herbicida sobre la germinación, el crecimiento de brotes y la elongación de raíces de *Triticum* sp (trigo). Eker *et al.* (2006) demostraron que en *Helianthus annuus* L, el uso de los metales Fe y el Mn inhiben la actividad herbicida del glifosato por limitación de su absorción y

traslocación en hojas tratadas, y reportaron adicionalmente que la presencia de residuos del herbicida en las plantas puede derivar en complicaciones en la nutrición con Fe y Mn esto debido a la formación de complejos glifosato-metales poco solubles en los tejidos vegetales.

Uno de los metales que habitualmente coexiste con el glifosato en suelos es el Cu, cuya acción contaminante es común en los ecosistemas terrestres. La contaminación causada por este metal puede originarse por el uso de fungicidas a base de Cu en donde la deposición continua del metal puede favorecer la acumulación gradual del mismo en superficies horizontales del suelo (Wang *et al.*, 2009b), constituyendo un peligro potencial para los seres vivos y los sistemas ecológicos cuando se encuentra en altas concentraciones. A pesar de su esencialidad como cofactor de muchas enzimas como las Cu/Zn superóxido dismutasa (Cu/ZnSOD), citocromo-c-oxidasa mitocondrial y monooxigenasas, tiene la capacidad de producir radicales libres y especies reactivas del oxígeno (EROs), que en definitiva conllevan al establecimiento de una situación de estrés oxidativo en los organismos (Zheng *et al.*, 2013), condiciones que se agravan con la acumulación del metal en los distintos eslabones de la cadena trófica, lo que pone en riesgo la salud de los ecosistemas, incluyendo la del ser humano (Unrine *et al.*, 2010; Chigbo y Batty, 2013).

Las lombrices de tierra se incluyen dentro del grupo de animales que pueden resultar afectados por la aplicación del glifosato (Sánchez-Moreno *et al.*, 2014). Estos anélidos son excelentes biomonitores para evaluar toxicidad de sustancias químicas en el medio terrestre (OCDE, 2004; Zhang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018). Su hábito alimenticio y su morfología, acompañada de la presencia de un tegumento corporal altamente poroso y permeable que favorece el contacto directo con el sustrato donde se depositan sustancias tóxicas, convierten a las lombrices de tierra en organismos vulnerables a la acción perjudicial de una variedad de contaminantes químicos (Gavinelli *et al.*, 2017; Das *et al.*, 2018).

El desarrollo de estudios, utilizando lombrices como sensores biológicos, ha sido de gran interés en Ecotoxicología durante el monitoreo de los riesgos asociados a la contaminación de los suelos dado que, permite dilucidar los efectos en organismos

representativos de los ambientes perturbados, a través del uso de respuestas biológicas conocidas como índices de estrés tóxico o biomarcadores (De la Torre *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2006). El empleo de estos índices es cada vez mayor en Ecotoxicología debido a que informan sobre la magnitud de la exposición a sustancias químicas, ayudan a comprender sus mecanismos de toxicidad y contribuyen además, a la caracterización fisiológica de los organismos de áreas impactadas, una vez estimados los efectos subletales tras la exposición a uno o más contaminantes (Mekahlia *et al.*, 2016).

Entre los biomarcadores, los evaluados a nivel de individuos son de gran relevancia ecológica; esto debido a que permiten el desarrollo de medidas de protección y saneamiento del deterioro ambiental una vez que el perjuicio, asociado a la contaminación causada por sustancias químicas, se manifiesta en los ecosistemas (Pernia *et al.*, 2008).

Se han publicado algunos estudios en los que, mediante el uso de biomarcadores, se han evaluado los efectos del glifosato en las lombrices de tierra. Zhou *et al.* (2013) reportaron que en *Eisenia foetida*, la exposición al glifosato mostró una baja toxicidad al no afectar parámetros sensibles para evaluar toxicidad de pesticidas como la biomasa, la producción de cocones y las actividades enzimáticas de la superóxido dismutasa (SOD) y de la catalasa (CAT). En *Eisenia ssp.* la exposición al herbicida glyphosan provocó incrementos en los niveles de glutatión reducido (GSH) y de enzimas dependientes de GSH, asociados con incrementos en los niveles de malondialdehído (MDA), sugiriendo la importancia de GSH como mecanismo de defensa antioxidante para controlar los efectos perjudiciales asociados con la incorporación y metabolismo del herbicida a nivel intracelular (Marcano *et al.*, 2017). Un descenso en el crecimiento y aumentos en el tiempo de madurez y de la mortalidad de *Aporrectodea caliginosa* se observó luego de repetidas aplicaciones del glifosato en suelos, en intervalos de dos semanas (Springett y Gray, 1992).

Específicamente en el oligoqueto *Lumbricus variegatus*, se encontró que las actividades de la GST y SOD incrementaron significativamente después de la exposición a 0,05 mg/L de glifosato puro y de la formulación comercial Roundup Ultra, evidenciando la participación de este sistema de biotransformación en la detoxificación

de los dos productos, aun cuando el aumento fue mayor en el caso del producto comercial. Indican estos resultados que tanto el ingrediente activo como el surfactante POEA promueven efectos perjudiciales a bajas concentraciones, atribuyéndose estas respuestas a un posible efecto sinérgico de los aditivos químicos de la formulación, resaltando por tanto la importancia de no subestimar los efectos de los adyuvantes y surfactantes presentes en las formulaciones que, en muchos casos, resultan más dañinos que el propio ingrediente activo (Contardo-Jara *et al.*, 2009).

Los efectos de la interacción del glifosato con metales pesados en suelos también han sido evaluados en lombrices de tierra. En *E. foetida* un estudio sobre la toxicidad aguda del glifosato y del Cu demostró que la presencia del herbicida reduce significativamente la toxicidad del metal sobre estos anélidos. La tasa de mortalidad disminuyó drásticamente y la tasa de captación del metal fue casi inhibida en lombrices tratadas con Cu y en presencia del glifosato, adicionalmente la actividad de la SOD, el contenido de GSH y la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) también disminuyeron hasta valores similares a los de los controles (Zhou *et al.*, 2012). En un estudio similar realizado por Zhou *et al.* (2013), los resultados encontrados coinciden con los reportados por los mismos autores anteriormente, sustentando que la toxicidad del Cu en lombrices de tierra puede ser reducida en presencia del glifosato. En este sentido, los autores observaron que el crecimiento y la producción de ootecas se recuperó cuando la absorción del Cu por las lombrices de tierra disminuyó. Además, incrementos en las actividades de la SOD y de la CAT y el contenido de MDA producto de la exposición al Cu alcanzaron valores normales cercanos a los de los controles luego de la exposición al glifosato. Los autores señalan que los efectos tóxicos observados en las lombrices expuestas al Cu fueron atenuados en presencia del glifosato posiblemente por la habilidad que posee el herbicida de formar complejos estables e inmóviles con el metal dado sus fuertes efectos quelantes, lo que disminuye la biodisponibilidad de Cu en suelos.

En Venezuela, varios autores han reportado la acción individual de metales pesados y diferentes pesticidas, incluyendo el glifosato sobre respuestas biológicas en lombrices de tierra (Marcano, 2006; Polo *et al.*, 2011; Granadillo y Marcano, 2013;

Marcano *et al.*, 2013; Cortesía *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2016; Marcano *et al.*, 2017); sin embargo, poco se conoce de los efectos de la exposición conjunta al glifosato y metales en organismos representativos del suelo. Debido a tales consideraciones, y aunado a la importante controversia existente sobre el potencial tóxico del glifosato y su acción quelante sobre metales pesados surgió el interés por desarrollar la presente investigación, orientada a evaluar los efectos del glifosato, cobre y mezcla de ambos químicos en el crecimiento y la reproducción de la lombriz de tierra *Eisenia andrei*.

METODOLOGÍA

Obtención y acondicionamiento de las lombrices

Los ejemplares de la lombriz de tierra *E. andrei* se obtuvieron de la estación experimental de Biotecnologías Agrícolas, adscrita al Laboratorio de Genética, Departamento de Biología, Universidad de Oriente, la cual se ubica en el sector Alejandría, calle Las Lucías, parcela 1, vía al vivero “Loló”, Cumaná, estado Sucre, a 10°26’32’’ N y 64°09’14’’ O (Figura 1). Las lombrices seleccionadas se mantuvieron en su sustrato original (compost), preparado a base de los materiales de partida: 65% v/v de bagazo de caña de azúcar seco y triturado, 15% v/v de gallinaza seca y pulverizada, 15% v/v de hojas frescas de *Moringa oleífera* y 5% v/v de suspensión de microorganismos eficientes. Estas muestras se conservaron durante dos semanas en cajas plásticas humedecidas bajo condiciones controladas en la oficina N° 401 ubicada en el cuarto piso del edificio de Ciencias. El pH del sustrato permaneció en $7,4\pm 0,2$, la temperatura en $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa en 35% (Andrade, 2018). La temperatura de la sala donde se mantuvo el pie de cría de las lombrices osciló entre $30\pm 2^{\circ}\text{C}$. Posterior a este período, para los bioensayos de toxicidad y estimar los parámetros de crecimiento, se seleccionaron organismos sexualmente inmaduros mientras que para evaluar parámetros reproductivos se escogieron lombrices adultas ya cliteladas.



Figura 1. Ubicación de la estación experimental de Biotecnologías Agrícolas (recuadro blanco) de donde proceden los ejemplares de *E. andrei*. Imagen satelital captada a través del programa Google Earth Pro.

Diseño experimental

En una primera fase se realizó un bioensayo de toxicidad letal agudo por siete días con glifosato y cobre, en donde se obtuvieron las concentraciones letales media del herbicida y del metal (CL₅₀), que representan las concentraciones de los tóxicos de prueba en las que muere el 50% de los organismos expuestos (Walker *et al.*, 2012). En una segunda fase, se realizaron dos bioensayos de toxicidad subletal distintos durante un período de seis semanas. En el primer bioensayo mediante la exposición de lombrices de tierra juveniles a glifosato, cobre y a dos mezclas de glifosato y cobre se evaluaron los efectos sobre el crecimiento de los anélidos. Para el segundo bioensayo se seleccionaron lombrices de tierra adultas, con el clitelo bien desarrollado. Con este se evaluaron los efectos tóxicos del glifosato, el cobre y de dos mezclas de glifosato y cobre sobre la reproducción de *E. andrei*. Para estos últimos, se seleccionaron de la CL₅₀ tanto del glifosato y del cobre, dos concentraciones subletales que representaron el 17 y 35% de la CL₅₀ del herbicida y del metal que garantizaron un 100% de sobrevivencia de los organismos durante el tiempo de exposición. Para determinar los efectos de la interacción del glifosato con el cobre las lombrices de tierra se sometieron a dos mezclas que se prepararon por combinaciones de las concentraciones subletales del herbicida y del metal (Mez1: 35% de la CL₅₀ del glifosato + 17% de la CL₅₀ del cobre y Mez2: 17% de la CL₅₀ del glifosato + 35% de la CL₅₀ del cobre). Las combinaciones de las concentraciones subletales de glifosato y cobre se realizaron de tal manera que quedo en una primera mezcla una concentración alta de glifosato y una baja de cobre y en una segunda mezcla una concentración baja de glifosato y una alta de cobre.

Bioensayos de exposición de toxicidad letal con glifosato y cobre

Un total de 10 lombrices de tierra repartidas en cinco réplicas de dos organismos cada una, se expusieron a cada concentración a probar del herbicida y del cobre. Para el bioensayo de toxicidad letal agudo se usaron recipientes plásticos de 350 cm³ de capacidad en donde se colocaron 200 g de sustrato con las características anteriormente descritas. En cada uno de los envases del grupo experimental que se trató durante siete

días con el herbicida se añadieron 60 mL de la formulación comercial Glifomax, preparada a diferentes concentraciones (3; 4,5; 6; 7,5 y 9 g de glifosato/kg de sustrato) y seguidamente se procedió a mezclar para facilitar la distribución homogénea del herbicida en el sustrato. Un grupo experimental distinto de lombrices de tierra fue sometido por separado a diferentes concentraciones de cobre (6; 7,5; 9; 10,5; 12 y 13,5 g de cobre /kg de sustrato) bajo las mismas condiciones descritas para la exposición al Glifomax. Un grupo adicional de 10 lombrices colocadas en recipientes con el sustrato humedecido únicamente con agua como control.

Durante el bioensayo se realizaron registros diarios del pH y la temperatura, (valores promedios de $7,4\pm 2$ y $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ respectivamente), así como también se monitoreo la sobrevivencia de los organismos controles y expuestos. Se consideraron como organismos muertos aquellos que no presentaron ninguna respuesta sostenida a la estimulación mecánica. Los resultados fueron analizados por el método binomial (Stephan, 1977) para calcular las CL_{50} y luego seleccionar las concentraciones subletales.

Durante el bioensayo de toxicidad letal con el herbicida no se produjo mortalidad en los individuos del grupo control, sin embargo, en los grupos expuestos a las concentraciones más elevadas de 6; 7,5 y 9 g de glifosato/kg de sustrato se observó una rápida mortalidad entre las 24 y 72 horas de exposición, la cual fue aumentando con los días de exposición hasta alcanzar el 100% de mortalidad al finalizar el bioensayo. Para las concentraciones más bajas de glifosato de 3 y 4,5 g de glifosato/kg de sustrato se observó un porcentaje de mortalidad de 20 y 30% respectivamente entre las 72 y 120 horas de exposición. A través del método binomial se determinó para el herbicida una CL_{50} de 5,21 g de glifosato/kg de sustrato.

A partir de los porcentajes de mortalidad por *E. andrei* durante la exposición a diferentes concentraciones de cobre se determinó una CL_{50} igual a 8,71 g de cobre/kg de sustrato. Durante el bioensayo de toxicidad letal con el metal los organismos controles manifestaron una supervivencia del 100%. En el grupo expuesto a la concentración más elevada de cobre de 13,5 g de cobre/kg de sustrato se observó una mortalidad de 100% a las 48 h de exposición. Lombrices expuestas a concentraciones intermedias de 9; 10,5 y

12 g de cobre/kg de sustrato exhibieron un porcentaje de mortalidad de 60% dejando de mostrar una respuesta sostenida a la estimulación mecánica a las 24 horas de exposición, haciéndose más notable la mortalidad entre las 72 y 144 horas del bioensayo. Anélidos tratados con las concentraciones más bajas de cobre exhibieron un porcentaje de mortalidad del 10% a las 72 y 96 horas de exposición respectivamente.

Bioensayos de exposición de toxicidad subletal con glifosato, cobre y mezclas de glifosato y cobre

Para evaluar los efectos del glifosato, cobre y mezclas de glifosato y cobre sobre el crecimiento, un total de 720 lombrices de tierra juveniles y sin presentar apariencias de desarrollo de clitelo se distribuyeron en seis grupos; cada uno conformado por diez réplicas de 12 lombrices cada una. Para la exposición con glifosato, cobre y con las mezclas de ambos, se seleccionaron dos concentraciones subletales para cada tóxico de prueba, que representaron el 17 y 35% de cada CL_{50} . Dos grupos de anélidos se expusieron a 0,9 y 1,8 g de glifosato/kg de sustrato, designadas como GFS1 y GFS2 respectivamente, dos grupos se trataron con 1,5 y 3,0 g de cobre/kg de sustrato, referidos como Cu1 y Cu2 y finalmente dos grupos de anélidos se sometieron a las mezclas de 0,9 g de glifosato/kg de sustrato con 3 g de cobre/kg de sustrato y 1,8 g de glifosato/kg de sustrato con 1,5 g de cobre/ kg de sustrato, estas últimas consideradas como Mez1 y Mez2. Un grupo de 120 lombrices de tierra distribuidas de igual manera y con el sustrato humedecido con agua representó el tratamiento control.

Los efectos del glifosato, el cobre y de las dos mezclas de glifosato y cobre sobre la reproducción de *E. andrei* se determinaron mediante el desarrollo de un segundo bioensayo de exposición subletal. Para esto, 300 lombrices de tierra adultas con el clitelo bien desarrollado se distribuyeron en seis grupos de 50 organismos cada uno; estos a su vez se colocaron en cinco réplicas con 10 lombrices cada una. Cada grupo de anélidos representó las lombrices de tierras que estuvieron sujetas a los diferentes tratamientos experimentales descritos anteriormente. Un grupo de 50 lombrices adultas cuyo sustrato fue humedecido con agua como grupo control.

Para ambos bioensayos el sustrato de las réplicas correspondientes a los

tratamientos de exposición de las lombrices de tierra fue humedecido con 60 mL de las soluciones de herbicida, del cobre y de las mezclas de glifosato y cobre. El sustrato del tratamiento control siempre se humedeció con 60 mL de agua libre de glifosato y cobre. Con la finalidad de garantizar el suministro apropiado de nutrientes y mantener constantes las concentraciones del herbicida y del metal en el sustrato, cada dos semanas se realizaron recambios del sustrato de los grupos tratados y controles para mantener las concentraciones del herbicida, metal, mezclas, humedad y alimento (OECD, 2004).

Crecimiento

Biomasa

El crecimiento en las lombrices de tierra sujetas a los diferentes tratamientos durante el bioensayo fue evaluado estimando la biomasa de los organismos. Para esto, de seis réplicas de cada tratamiento experimental se seleccionaron por muestreo aleatorio grupos de 4 lombrices. Luego, fue estimada la biomasa del individuo por separado y por grupo de cuatro organismos haciendo uso de una balanza digital. Este procedimiento se realizó al inicio de la experimentación y a las semanas 1, 3 y 6 de los bioensayos de exposición.

Concentración de proteínas totales

De cada grupo de 4 lombrices, escogidas de seis réplicas de cada tratamiento experimental para estimar la biomasa, se seleccionaron 2 organismos para cuantificar el contenido de proteínas. Para la extracción de las proteínas, las lombrices de tierra se lavaron con solución fisiológica al 0,9%, se colocaron en planchas de hielo para adormecerlas (FONACIT, 2011), se les extrajo el tracto digestivo por presión sobre el tegumento de la región ventral haciendo uso de pinzas de disección, se lavaron nuevamente en solución fisiológica y se picaron en trozos pequeños realizando “pooles” del tejido muscular. Seguidamente los tejidos se homogenizaron en una proporción 1:9 m/v en una solución tampón de fosfato de potasio 20 mM pH 7,5 a 4°C. Se realizaron centrifugaciones posteriormente a 4 500 x g por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante

resultante se utilizó para determinar el contenido de proteínas totales en el tegumento corporal por el método de Lowry *et al.* (1951). La mezcla de reacción que se utilizó para la cuantificación presentaba un volumen final de un mL y consistía de 50 μ L del sobrenadante, 50 μ L de agua, 800 μ L del reactivo R₁ (reactivo de Biuret) y 100 μ L del reactivo R₂ (reactivo de Folin-Ciocalteu). Los cálculos se realizaron a partir de una curva de calibración preparada con albúmina de suero bovino como estándar (ASB: 10 mg/mL Sigma 9048-46-8). Los resultados se expresaron en mg por gramos de masa húmeda (mg/g.m.h).

Reproducción

La condición reproductiva de las lombrices de tierra de los grupos controles y de aquellas sujetas a las dos concentraciones de glifosato, de cobre y a las dos combinaciones de ambos se evaluó haciendo un seguimiento semanal del número de ootecas colocadas, su tiempo de incubación, el porcentaje de eclosión y del número de individuos que emergieron de cada una de ellas durante seis semanas (OECD, 2004). El número de ootecas puestas de las lombrices de cada grupo experimental fue registrado cada siete días durante seis semanas. Para esto, todas las lombrices de tierra de cada uno de los grupos fueron removidas por separado del sustrato contentivo en cada envase y estos fueron examinados minuciosamente, las ootecas encontradas por grupo se extrajeron y las lombrices fueron regresadas nuevamente a los sustratos de sus grupos respectivos libres de cocones. De cada grupo experimental, se seleccionaron veinte ootecas. Para tal fin, las ootecas se colocaron por separado en envases pequeños con un poco de sustrato y debidamente identificados.

Análisis estadístico

Luego de comprobar los supuestos de normalidad de datos y homogeneidad de varianzas, se realizaron análisis de varianzas doble con réplicas para demostrar si existían diferencias significativas en las respuestas de crecimiento y reproducción de acuerdo a los químicos y tiempos de exposición. Se aplicó la prueba de contraste de

rangos múltiples de Duncan, sólo en aquellos casos en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Los datos que no cumplieron con los supuestos del análisis de varianza se analizaron a través de la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los análisis se realizaron empleando el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5 en ambiente Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento

Biomasa

La Figura 2 muestra la biomasa en *E. andrei* juveniles tratadas durante 42 días con dos concentraciones de la formulación comercial de glifosato (Glifomax), dos concentraciones de cobre y dos mezclas de glifosato y cobre. La exposición al herbicida, al metal y a las mezclas de ambos, produjo diferencias significativas en las biomasa de las lombrices de tierra en comparación con el grupo control (Anova_{Químico}, $F_s=17,72$; $p<0,001$), a través de los diferentes períodos de exposición (Anova_{Tiempo}, $F_s=41,39$; $p<0,001$), ejerciendo ambos factores un efecto conjunto significativo sobre la biomasa de los anélidos (Anova_{Interacción}, $F_s=3,62$; $p<0,001$).

Durante las tres primeras semanas de exposición la biomasa de *E. andrei* incrementó en todos los tratamientos, observándose los mayores valores promedios a los 7 días en las lombrices tratadas con GFS2 ($1,44\pm 0,41$ g) y Cu1 ($1,43\pm 0,33$ g) en comparación con el grupo control ($0,77\pm 0,08$ g) y, en las tratadas con GFS1 ($1,32\pm 0,21$ g) y GFS2 ($1,36\pm 0,26$ g) a los 21 días. A los 42 días de exposición, solo en las lombrices del tratamiento con GFS1 ($1,15\pm 0,17$ g) hubo incremento en la biomasa en comparación con el control ($0,76 \pm 0,18$ g), mientras que en las tratadas con Cu1 ($0,61\pm 0,23$ g), Mez1 ($0,40\pm 0,14$ g) y Mez2 ($0,50\pm 0,13$ g) la biomasa descendió.

Los resultados de biomasa encontrados para *E. andrei* permiten inferir que las concentraciones subletales probadas no fueron lo suficientemente altas para ejercer un efecto perjudicial en el crecimiento de los organismos durante las primeras semanas de exposición a glifosato, cobre y a mezclas de glifosato y cobre, causando, por el contrario, un efecto estimulante sobre el crecimiento de las lombrices expuestas a todos los tratamientos desde los 7 hasta los 21 días. Es probable que, tales concentraciones le permitan a la especie activar un proceso de adaptación al medio, mediado por ajustes bioquímicos que protegen la homeostasis celular y favorecen el crecimiento aún en presencia de los químicos, es decir, un efecto de hormesis (Givaudan *et al.*, 2014). En este sentido, se conoce el efecto hormético como una respuesta común en los

organismos expuestos a diferentes concentraciones de potenciales contaminantes químicos caracterizado por su estimulación a dosis bajas de estos (Southan y Erlich, 1943).

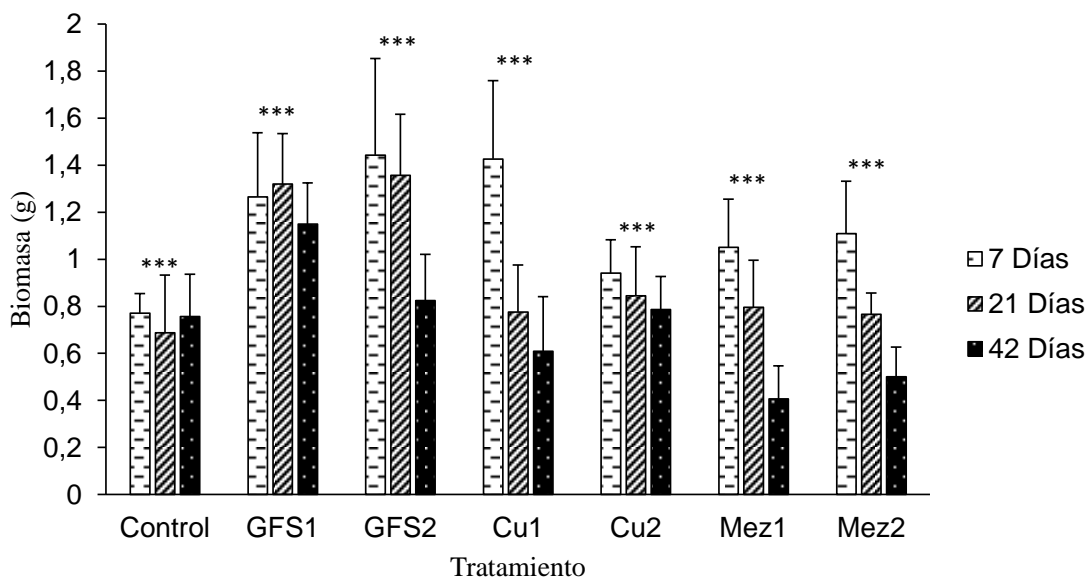


Figura 2. Biomasa de *E. andrei* juveniles controles y expuestas por 42 días a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 3 g de cobre/kg de sustrato y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato). Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar. *** indican un $p < 0,001$.

El fenómeno de hormesis ha sido observado en un amplio rango de organismos, como bacterias, hongos, plantas y animales, se evidencia porque la exposición a concentraciones bajas de un químico produce una respuesta adaptativa o un efecto benéfico en las células u organismos que incrementa la resistencia al desarrollo de un estrés severo inducido por factores químicos y, un cambio posterior a la inhibición de ésta, con el aumento de la concentración y el tiempo de exposición al estresor químico (Cedergreen *et al.*, 2007; Cedergreen, 2008; López-Díaz *et al.*, 2013).

En relación a lo anterior, se ha reportado que las dosis que provocan un efecto hormético tienden a variar dependiendo del individuo y sus características (Kouda e Iki, 2010), e involucran la activación de mecanismos bioquímicos tales como la expresión de

una gran cantidad de genes que codifican para enzimas con función antioxidante, factores de crecimiento, proteínas enlazadoras de metales como las metalotioneínas, entre otros (Calabrese *et al.*, 2011). En este contexto, diversos estudios han señalado que una de las respuestas protectoras que se activan por la exposición de los organismos a metales pesados y herbicidas tiene que ver con la modificación de enzimas antioxidantes, ya que estas se encargan de mantener la homeostasis redox interna de la célula evitando que el desarrollo de patologías oxidativas detengan procesos importantes como el crecimiento (Lukkari *et al.*, 2004).

En el presente estudio, los valores de biomasa en lombrices de tierra estuvieron siempre incrementados en aquellas expuestas a ambas dosis de glifosato. Esta variable aunque exhibió un descenso al final del bioensayo (42 días), estadísticamente no fue diferente al grupo control, el cual presentó valores de biomasa por debajo de los valores encontrados para ambos grupos tratados con el herbicida. Un argumento adicional a la hormesis válido para justificar el aumento del crecimiento en presencia del glifosato estaría relacionado con la estimulación de la respiración microbiana en el sustrato por parte del herbicida y su posterior biodegradación por los microorganismos, disminuyendo a través de esta su biodisponibilidad, absorción por parte de las lombrices y toxicidad (Vereecken, 2005; Al-Rajab y Hakami, 2014). Posiblemente como resultado de la degradación microbiana se aportaron elementos esenciales como fósforo (P), carbono (C) y nitrógeno (N) adicionales a los nutrientes que se obtienen de la degradación microbiana de la materia orgánica presente en el suelo, los cuales siendo aprovechados por los anélidos pudieron favorecer su crecimiento (Domínguez *et al.*, 2016). Acorde con esto, Ratcliff *et al.* (2006) señalan que a una concentración muy alta de 5000 mg de glifosato/kg de sustrato mejora significativamente el crecimiento microbiano y las características de fertilidad de los suelos.

Resultados similares a los del presente estudio fueron reportados por Marcano *et al.* (2009), quienes evidenciaron incrementos de biomasa en *Eisenia* spp. durante las tres primeras semanas de exposición a dos concentraciones subletales de glifosato (0,096 y 0,96 g de glifosato/kg de sustrato). Buch *et al.* (2013) evaluaron durante 14 días la toxicidad de 0,047 g de glifosato/kg de sustrato en *E. andrei* y *Pontocolex corethrusus* y

observaron en ambas especies de lombrices de tierra un comportamiento de evitación del herbicida a la concentración probada y que la biomasa no fue afectada. Domínguez *et al.* (2016) estudiaron la toxicidad aguda del principal metabolito del glifosato, el ácido aminometilfosfónico (AMPA), sobre la biomasa de *E. andrei* y reportaron un efecto hormético, con una pérdida alta de biomasa para lombrices controles (15,41%), una intermedia (9,32-11,05%) a las concentraciones más bajas del AMPA (100 a 500 µg/kg) y un descenso menor del crecimiento (5,98-7,26%) a las tres dosis más altas probadas (750 a 2 500 µg/kg de sustrato). Los autores concluyeron que la mayor pérdida de biomasa en los controles estuvo acompañada por la inversión de energía en reproducción de los anélidos mientras que la exposición al AMPA estimuló el crecimiento de las lombrices de tierra y la activación de mecanismos de ajustes bioquímicos para hacer frente al tóxico y garantizar su supervivencia.

Un reporte similar de hormesis en el crecimiento de lombrices de tierra expuestas a un pesticida diferente al glifosato fue hecho por Jeyanthi *et al.* (2016). Luego de exponer a *Eudrilus eugeniae*, *Perionyx ceylanensis* y *Perionyx excavatus* a una concentración subletal de carbaril de 0,012 g/kg de sustrato los investigadores concluyeron que la concentración no genera toxicidad alguna, ejerciendo una estimulación positiva de la biomasa. Durante la exposición más prolongada a concentraciones más altas de 0,025 y 0,05 g de carbaril/kg de sustrato observaron descensos en la tasa de crecimiento. Los autores atribuyeron la primera respuesta al fenómeno de hormesis, destacando el potencial de las especies para tolerar bajas concentraciones del pesticida y su incapacidad para desintoxicar y excretarlo a dosis altas a medida que transcurrió el tiempo de exposición.

Similar a lo que se observó con el herbicida, el tratamiento de *E. andrei* con ambas concentraciones de cobre también propició una respuesta estimuladora (hormesis) del crecimiento a los 7 y 21 días de exposición, sin embargo, esta variable exhibió un descenso durante la última semana de exposición (42 días) a la dosis más baja del metal, sugiriendo que durante la exposición temprana, los anélidos pueden controlar la toxicidad del metal evitando efectos perjudiciales sobre la biomasa. Resultados similares a los de la presente investigación fueron reportados por Spurgeon *et al.* (2004), quienes

observaron un efecto estimulador del cobre (0,16 mmol/g) y del cadmio (0,11 μ moles/g) sobre el crecimiento de *Lumbricus rubellus* juveniles y una inhibición o decrecimiento posterior luego de una exposición prolongada a una concentración de 1,5 μ moles/g para el último metal pesado. De igual manera, Jeyanthi *et al.* (2016) reportaron un efecto benéfico en la biomasa de *Eudrilus eugeniae*, *Peronyx caylanensis* y *Peronyx excavatus* cuando son expuestas a 0,079 g de plomo/kg de sustrato.

Sustentando los resultados de esta investigación, Givaudan *et al.* (2014) señalan que la tendencia observada en el escenario de exposición a bajas concentraciones durante corto plazo es muy probable que sea revertido y se convierta en una reducción significativa del crecimiento durante un tiempo más prolongado de exposición. Sugiere el efecto perjudicial observado en el crecimiento de los anélidos durante la exposición prolongada a Cu1, que los mecanismos de compensación propuestos para controlar la toxicidad del metal son sólo funcionales por cortos períodos de exposición. Posiblemente este patrón de respuesta está relacionado con los costos de tolerancia al cobre demandados en los organismos para mantener la homeostasis de metal a nivel celular.

En los animales, uno de los mecanismos más costosos energéticamente es la producción de proteínas (Wieser y Krumschnabel, 2001). En este sentido, descensos en la biomasa de las lombrices por la exposición a Cu1 posiblemente se encuentren asociados al desvío de los recursos energéticos normalmente asignados al crecimiento de los organismos hacia la activación de los mecanismos de detoxificación y excreción demandantes de energía que permiten hacer frente a la toxicidad del metal (Casabé *et al.*, 2007).

En relación a lo anterior, muchas investigaciones han reportado que los anélidos poseen la capacidad de acumular grandes cantidades de metales pesados en sus tejidos y han descrito que el control de la toxicidad que estos exhiben puede estar asociado con la inducción de la síntesis de proteínas de alto peso molecular ricas en grupos sulfídrilos (SH) como las metalotioneínas y otras proteínas que enlazan metales y pequeños péptidos como el glutatión reducido (GSH), biomoléculas que cumplen papeles preponderantes en el metabolismo y excreción de metales pesados. Por otro lado, la

síntesis de proteínas que conforman el sistema de defensa antioxidante enzimático también tienen lugar en los organismos a fin de mantener los niveles fisiológicamente apropiados de las moléculas que conjugan y eliminan EROs generadas tras el ingreso de metales pesados. Mosleh *et al.* (2007) describen que la toxicidad debida a metales pesados pudiera estar asociada a la inhibición de la síntesis de metalotioneínas, debilitando así su excreción, provocando consecuentemente una elevada acumulación de metales que aumenta el efecto perjudicial en los tejidos de los organismos expuestos. Esta última aseveración podría explicar el descenso observado en la biomasa de *E. andrei* expuesta a Cu al final del bioensayo (42 días).

Algunos estudios previos en los que se ha evaluado el crecimiento de lombrices de tierra han reportado pérdidas de peso en organismos expuestos a metales pesados. Se incluyen en estos el trabajo de Spurgeon *et al.* (2004), quienes evidenciaron que la exposición de *L. rubellus* a una concentración de cobre de 10,07 mmol/g ejerce un efecto perjudicial en la biomasa de la lombriz de tierra y lo atribuyen al debilitamiento de los mecanismos bioquímicos encargados de controlar la toxicidad del metal. Holmstrup *et al.* (2011), también demostraron que *Dendrobaena veneta* cuando habita un medio contaminado con metales pesados presenta un margen de crecimiento bajo asociado con bajas reservas de lípidos y cuerpos de azúcares. Descensos en los pesos de *E. andrei* luego de exponerse a una concentración subletal de 2 g de plomo/kg de sustrato fueron descritos por Luo *et al.* (2014). Así mismo, para *E. foetida* juveniles Zaltauskaite y Sodiene (2014) reportaron una reducción significativa del peso cuando es expuesta a 296 µg/g de cadmio y 911 µg/g plomo respectivamente, atribuyendo que tales resultados posiblemente se deben a una mayor asignación de los recursos energéticos hacia los mecanismos de desintoxicación y excreción de metales pesados más no a su crecimiento.

Similar a los resultados de la presente investigación, Fisker *et al.* (2011) reportaron el crecimiento de la lombriz de tierra *Dendrobaena octaedra* cuando se encuentra en suelos contaminados por metales pesados como el cobre y asociaron el incremento del crecimiento por individuo con el desarrollo de una resistencia a la exposición del metal, adaptación asociada posiblemente con aumentos en la síntesis de

metalotioneínas y otras proteínas enlazadoras que mitigan la toxicidad de metales. No obstante, la exposición de la misma especie por un período prolongado produjo descensos en la biomasa debido a los posibles costos de tolerancia que implican contrarrestar la toxicidad del metal, asociados con la síntesis de metalotioneínas (Fisker *et al.*, 2012).

Las respuestas en las lombrices de tierra a la acción individual de una sustancia química se han reportado en muchos estudios, en cambio el efecto de mezclas complejas en estos anélidos ha sido poco investigada aun cuando en el mundo natural los contaminantes típicamente coexisten y son capaces de unirse (Dzul, 2016). Específicamente, el glifosato y el cobre son frecuentes en los suelos, comúnmente al coexistir interactúan potencialmente entre ellos alterando su función y modificando y/o complicando el mecanismo de acción tóxico que pueden expresar en los organismos (Hussain *et al.*, 2009). Diferentes estudios han reportado que una vez que el herbicida glifosato ingresa al ambiente, su destino en el suelo va a depender de factores fisicoquímicos, como la formación de complejos con iones metálicos (Morillo *et al.*, 1997). De su estructura, los grupos funcionales amino, carboxilo y fosfonato son quienes específicamente pueden actuar como agentes quelantes efectivos de cationes metálicos di y trivalentes, entre ellos el cobre, y formar complejos estables (Abate *et al.*, 1999; Steenbergen *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006).

Tsui *et al.* (2005) y Zhou *et al.* (2013) señalan que la capacidad de acomplejamiento o quelación entre el glifosato y el cobre, puede cambiar la solubilidad, interferir con su biodisponibilidad, bioacumulación y mecanismos de toxicidad de ambos sobre los organismos. En relación a esto último, varios estudios han evidenciado que los efectos individuales o combinados de dos o más químicos, pueden ser mayores o menores dependiendo de la dosis individual o combinada, la química de los compuestos y la respuesta metabólica de los organismos (Shi *et al.*, 2007; Boobis *et al.*, 2008). Permiten deducir los resultados encontrados en la biomasa de *E. andrei* expuesta a las mezclas de glifosato y cobre que las concentraciones subletales probadas de ambos compuestos durante los diferentes periodos de exposición no provocaron la ocurrencia de interacción de estos en el suelo y subsecuente formación de complejos entre el

glifosato y el cobre, favoreciendo de este modo que cada uno quedara biodisponible por separado y tras su captación por los anélidos posiblemente les permitió responder de forma similar a su exposición individual de los tratamientos, con incrementos de biomasa entre los 7 y 21 días y descensos a los 42 días del tratamiento con el herbicida y el metal.

Los descensos observados en la biomasa de las lombrices expuestas a ambas mezclas en la última semana de exposición, posiblemente estén relacionados a los costos de tolerancia generados para mantener la homeostasis del cobre, el cual durante la exposición individual tuvo un efecto perjudicial en la biomasa de *E. andrei*. Es probable que la respuesta obtenida para ambas mezclas por las lombrices de tierra estuviera mediada por el efecto del metal, permitiendo inferir que la capacidad protectora del glifosato ante la toxicidad del Cu mencionada en los estudios de Zhou *et al.* (2012; 2013) no ocurre a las concentraciones probadas en la especie utilizada en este estudio. Estos autores observaron en sus trabajos que la exposición simultánea a ambos contaminantes ayudó a recuperar el peso de los anélidos previamente afectados tras una exposición individual al cobre y concluyeron que tales resultados se debieron a la formación de complejos estables entre el herbicida y metal y a la disminución de la biodisponibilidad del Cu.

Concentración de proteínas totales

El análisis estadístico reveló que el tratamiento con los químicos no ejerció un efecto significativo sobre la concentración de proteínas totales en el tegumento de las lombrices de tierra (Anova_{Químico} $F_s=1,47$; $p>0,05$), mientras que la concentración de proteínas totales varió significativamente a los 7, 21 y 42 días del bioensayo (Anova_{Tiempo}, $F_s=86,56$; $p<0,001$). No obstante, la exposición a las concentraciones del herbicida, el metal y sus mezclas durante los distintos períodos afectaron simultáneamente de manera significativa el contenido de proteínas totales en *E. andrei* (Anova_{Interacción}, $F_s=19,26$; $p<0,001$).

Durante el tratamiento de las lombrices de tierra con glifosato, cobre y sus mezclas se observó una mayor concentración de proteínas totales a los 21 días de

exposición de los anélidos. En este período, la concentración de proteínas encontrada en el tegumento osciló en un valor promedio de $166,43 \pm 32,72$ mg/g.m.h, el cual fue un 19,89 y 39,42% más elevado que los encontrados a los 7 y 42 días de exposición, cuyas concentraciones de proteínas totales fueron de $133,33 \pm 40,90$ y $100,83 \pm 26,83$ mg de proteínas/g.m.h (Figura 3).

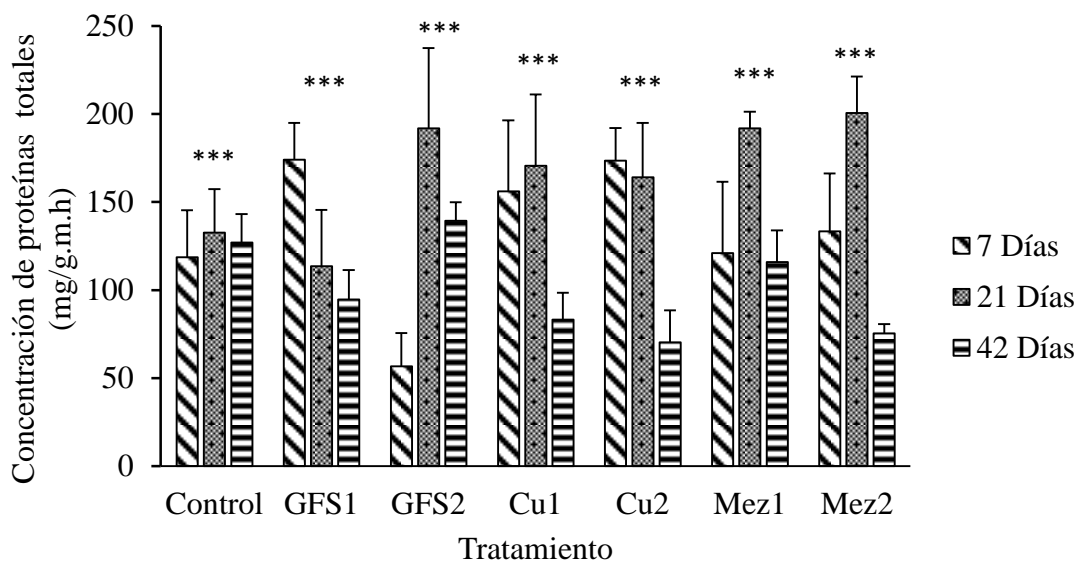


Figura 3. Concentración de proteínas totales en *E. andrei* juveniles controles y expuestas por 42 días a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 3 g de cobre/kg de sustrato y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato). Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar. ***indican un $p < 0,001$.

A los 7 días de exposición, se observaron en lombrices sujetas a la mayoría de los tratamientos incrementos en la concentración de proteínas totales comparado con el grupo no expuesto (Control= $118,56 \pm 26,80$ mg/g.m.h), siendo más significativo el aumento en aquellos organismos tratados con GFS1 y Cu2 (GFS1= $174,05 \pm 20,84$; Cu2= $173,55 \pm 18,47$ mg de proteínas/g.m.h). Sólo el tratamiento con GFS2 produjo durante este período un descenso del 52% en el contenido de proteínas totales ($56,67 \pm 18,98$ mg de proteínas/g.m.h).

El mayor aporte al contenido de proteínas observado a los 21 de tratamiento estuvo dado por incrementos en las concentraciones de estas en *E. andrei* sujeta a la mayoría de los tratamientos químicos, a excepción de lombrices de tierra tratadas con GFS1 quienes mostraron en este período un descenso en el contenido de proteínas al comparar con el grupo no expuesto (Control= $132,66 \pm 24,64$; GFS1= $113,48 \pm 31,98$ mg de proteínas/g.m.h).

El valor promedio más bajo en la concentración de proteínas fue observado a los 42 días de exposición en las lombrices expuestas a GFS2, cuyo valor promedio fue $139,28 \pm 10,64$ mg de proteínas/g.m.h comparado con el grupo control con un valor de $126,96 \pm 16,19$ mg de proteínas/g.m.h.

Los valores encontrados para las concentraciones de proteínas totales evidencian la sensibilidad de estas biomoléculas tras la incorporación del glifosato y cobre en las lombrices de tierra, permitiendo recomendar su empleo como biomarcador sensible para evaluar contaminación ambiental a causa de la deposición inadecuada en suelos del herbicida y el metal. Este parámetro varió en los anélidos de acuerdo al tiempo de exposición y en función de los tóxicos y las dosis probadas, demostrando que *E. andrei* posee la habilidad de modular este tipo de respuesta bioquímica frente a una condición de estrés químico inducida por la exposición a suelos contaminados.

Durante la exposición temprana, la concentración de proteínas totales fue diferente en las lombrices de tierra expuestas a GFS1 y a GFS2. A pesar de que a los 7 días las proteínas totales incrementaron en lombrices de tierra expuestas a GFS1, valores más elevados para este parámetro se observaron a los 21 días de exposición a GFS2 al comparar con el grupo control. Las diferencias encontradas en la concentración de proteínas totales a los 7 y 21 días de tratamiento con el herbicida podrían estar asociadas con su biodisponibilidad en el sustrato, la cual media la captación por los anélidos dependiendo del tiempo y de la dosis de exposición así como también la activación de los diferentes mecanismos de protección que desarrollan los organismos para hacerle frente al herbicida, evitar a corto plazo efectos tóxicos y contribuir a su crecimiento.

La ruta más efectiva en las lombrices de tierra para el ingreso de químicos es mediante la ingestión de partículas de suelo en comparación con la captación a través del

tegumento (Morgan *et al.*, 2002; Sturzemaum *et al.*, 2004). La aplicación del glifosato en suelo contribuye a un aumento en la respiración microbiana y como consecuencia de su biodegradación por microorganismos disminuye su biodisponibilidad (Domínguez *et al.*, 2016). En este sentido, es posible que incrementos observados en la concentración de proteínas a los 7 días de exposición en lombrices tratadas con GFS1 se deban a una menor tasa de biodegradación microbiana del herbicida en el suelo, una mayor biodisponibilidad y posterior captación por los anélidos, que permitió la inducción temprana a una dosis baja de los mecanismos de protección alternativos encargados de hacerle frente a la toxicidad del herbicida.

En el período de exposición de 7 días, se observó un comportamiento distinto en las concentraciones de proteínas de las lombrices expuestas al GFS2. Puede atribuirse esta respuesta al hecho de que al ser una concentración más elevada de glifosato la presente en el sustrato provoca una unión más fuerte con la materia orgánica, por lo que la absorción de esta con el herbicida, principalmente a través del epitelio digestivo con la alimentación detiene la activación de defensas celulares, generando una respuesta tóxica que a corto plazo inhibe la síntesis de proteínas. Este efecto fue compensado a los 21 días de exposición, por lo que incrementos observados durante este tiempo pudiesen estar relacionados con la activación de las defensas celulares como parte del efecto hormético, que permitió contrarrestar la toxicidad generada a los 7 días de exposición.

La toxicidad del glifosato se expresan después de su absorción en el organismo y la acción perjudicial del herbicida está relacionada con la producción de metabolitos altamente tóxicos como las especies reactivas del oxígeno (EROs), que pueden actuar como catalizadores de reacciones oxidativas, causando daños a macromoléculas biológicas importantes como ADN, proteínas y lípidos cuando estas, sobrepasan los niveles fisiológicamente apropiados en los tejidos de los mecanismos bioquímicos como como las defensas antioxidantes que facilitan superar parcial o totalmente el estrés resultante de la exposición (Givaudan *et al.*, 2014; Marcano *et al.*, 2017).

Algunos estudios han evidenciado que las lombrices de tierra para sobrevivir al estrés de los contaminantes vertidos al sustrato desarrollan estrategias bioquímicas relacionadas con la activación de defensas celulares que involucran aumentos en las

concentraciones de proteínas (Fisker *et al.*, 2013; Givaudan *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2015). Aumentos observados a los 7 y 21 días en la concentración de proteínas totales en *E. andrei* expuesta a glifosato sugieren el ingreso y posterior activación de los mecanismos encargados de contrarrestar su acción tóxica. En este contexto, Givaudan *et al.* (2014) reportaron que en lombrices de tierra expuestas a herbicidas, la síntesis de enzimas que participan en los mecanismos de defensas antioxidantes contribuye a un aumento en la concentración de proteínas y aceleran los mecanismos de detoxificación de los químicos, permitiéndoles a los anélidos una mejor adaptación fisiológica al estrés causado por la exposición.

Efectos similares de la exposición al glifosato sobre la concentración de proteínas totales en lombrices de tierra han sido descritos en otras investigaciones. Dzul y Rendón (2017), señalaron aumentos en las concentraciones de proteínas totales en *E. foetida* cuando fue expuesta a 0,01; 0,1 y 0,5 g de glifosato/kg de sustrato. Similarmente, Salvio *et al.* (2016) expusieron a *Octolasion cyaneum* durante 28 días a 134 y 535 µg de glifosato/kg de sustrato y asociaron los incrementos encontrados en las concentraciones de proteínas con la activación de defensas celulares como las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatona peroxidasa (GPx) y glutatona reductasa (GR), las cuales resultaron estimulados probablemente por un incremento en la producción de EROs durante la exposición al herbicida.

A pesar de que los incrementos de peso observados en las lombrices expuestas al glifosato durante las tres primeras semanas de exposición podrían constituir una alternativa útil de aporte energético para la síntesis y activación de los mecanismos bioquímicos capaces de metabolizar el herbicida y hacer frente a su toxicidad (Lankadurai *et al.*, 2013), algunos estudios han demostrado que las defensas celulares encargadas de contrarrestar la toxicidad del glifosato con participación proteica pueden ser afectadas por la generación excesiva de EROs, metabolitos que muestran reactividad frente a blancos de acción molecular como las proteínas (Ahmad *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2003). En el presente estudio, a los 42 días de exposición se observó en las lombrices de tierra sujetas al tratamiento con el glifosato que las concentraciones de proteínas totales estuvieron por debajo de los valores exhibidos por el grupo control,

posiblemente por ser un período de exposición prolongado la capacidad de resistencia a la toxicidad del herbicida disminuye. Tales descensos podrían estar asociados con la acción directa de EROs derivadas de la transformación enzimática de glifosato sobre proteínas involucradas en el proceso de traducción en los anélidos (Tai *et al.*, 2008).

Descensos en las concentraciones de proteínas totales luego de la exposición al glifosato han sido señalados en otros organismos. Avigliano (2018), reportó para juveniles de *Callinectes sapidus* (cangrejo azul), *Cherax quadricarinatus* (crustáceo), *Neohelice granulata* (cangrejo) y *Neocardina dadivi* (gamba de agua dulce) expuestos a 10 y 40 mg de glifosato/L durante 60 días descensos en las concentraciones de proteínas en el músculo y posteriormente descensos en el peso de los organismos. Este autor concluyó, que aun cuando en tiempos prolongados de exposición los organismos desvían la energía necesaria para los procesos de crecimiento hacia el funcionamiento de los sistemas de detoxificación, la acción de estos últimos a fin de incrementar la resistencia a la toxicidad del herbicida durante exposiciones por mucho tiempo se debilita y no permite que los mecanismos antioxidantes encargados de hacerle frente a la exposición trabajen adecuadamente, siendo su capacidad superada por EROs generadas mediante el ingreso del glifosato en el organismo provocando daños a biomoléculas como las proteínas.

Por otro lado, resultados encontrados en las concentraciones de proteínas totales en lombrices de tierra durante la exposición al cobre evidencian en *E. andrei* la habilidad que tiene el metal de inducir cambios en función de la dosis y del tiempo de exposición sobre los valores de estas biomoléculas. Gaur y Adholeya (2004) señalan que los metales pesados son de difícil eliminación, que al no ser biodegradables ni metabolizables tienen una semivida biológica muy larga y una vez dentro de los organismos su tráfico se encuentra mediado por celomocitos del fluido celómico y moléculas quelantes de metales que permiten su transporte desde y hacia los tejidos donde se mantienen bioacumulados hasta su ulterior excreción a través de los nefridios (Sürzenbaum *et al.*, 2001; Sturzbaum *et al.*, 2004; Homa *et al.*, 2005; Fisker *et al.*, 2013).

Los anélidos poseen mecanismos adaptativos que le permiten mantener las concentraciones intracelulares de metales pesados apropiadas y controlar su toxicidad asociada a daños oxidativos. Se incluyen entre estos la reducción del transporte de metales a través de las membranas celulares, incrementos en la salida de metales hacia el exterior de las células, compartimentalización en lisosomas o cloragosomas, inducción de la síntesis de metalotioneínas o metaloproteínas similares y formación de complejos proteínas-metal (Sturzbaum *et al.*, 2004). Incrementos en los valores de las concentraciones de proteínas totales encontrados en lombrices de tierra a los 7 y 21 días de exposición al cobre podrían ser explicados a través de la inducción de la síntesis de proteínas de bajo peso molecular con un alto contenido de cisteína (Cys) y otros ligandos proteicos ricos en grupos -SH con alta afinidad por metales.

Varios estudios han demostrado que en lombrices de tierra la resistencia a metales pesados como el cobre y el control de su toxicidad puede estar relacionado con una mayor expresión de proteínas de bajo peso molecular como las metalotioneínas, ricas en grupos -SH, que tienen una alta capacidad de acomplejación y excreción del cobre y que además cumplen funciones antioxidantes al captar los iones libres del metal reduciendo así su toxicidad (Dallinger *et al.*, 2000; Fisker *et al.*, 2013; Mustonen *et al.*, 2014). Se incluyen entre las lombrices de tierra en las que la inducibilidad y aislamiento de metalotioneínas y otras metaloproteínas ha estado asociada con incrementos en las concentraciones de proteínas luego de la exposición a metales pesados a *L. rubellus*, *E. foetida*, *L. variegatus*, *L. terrestris* y *Dendrobaena rubidus* (Suzuki *et al.*, 1980; Furst y Nguyen, 1984; Hernandez *et al.*, 2016).

Un cambio bioquímico adicional que podría estar asociado al aumento en las concentraciones de proteínas encontradas durante la exposición temprana de *E. andrei* al cobre es la activación de los mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos, evitando el desarrollo de patologías oxidativas que detienen procesos importantes como el crecimiento de los organismos y permiten como respuesta biológica su adaptación al suelo tratado con el cobre. En este contexto, Domy (2001) y Gaete *et al.* (2010) han descrito que gran parte de los efectos tóxicos y deletéreos de este metal están mediados por los electrones desapareados que presenta en sus orbitales externos, los cuales pueden

actuar como radicales libres y por su participación en vías que tienden a acelerar reacciones redox en las células una vez que iones libres del metal interactúan mediante reacciones Fenton y Haber-Weiss con EROs como el H_2O_2 y formar O_2^- y $\cdot\text{OH}$, considerados como dañinos radicales oxigenados. Es la capacidad que tiene este metal de provocar sobreproducción de EROs y la actuación de estas como catalizadores en las reacciones oxidativas de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas con un subsecuente daño prooxidativo a macromoléculas biológicas, lo que en definitiva puede conllevar al establecimiento de una situación de estrés oxidativo (Ratkevicius *et al.*, 2003).

Similarmente a los resultados de la presente investigación otros estudios han reportado incrementos en las concentraciones de proteínas totales luego de la exposición de lombrices de tierra a metales pesados. En relación a lo anterior, Gaete *et al.* (2010) reportaron para *E. foetida* expuesta a 0,094 y 0,96 g de Cu/kg de sustrato aumentos en las concentraciones de proteínas en etapa temprana de exposición y atribuyeron los resultados a la posible síntesis de metalotioneínas y otras proteínas encargadas de acomplejar el cobre para su eliminación y evitar perturbaciones oxidativas, permitiéndole al anélido sobrevivir al estrés. El mismo argumento fue utilizado por, Mosleh *et al.* (2006) luego de exponer al oligoqueto *Tubifex tubifex* a 50, 100 y 200 g de Cu/L durante 7 y 15 días y encontrar aumentos en las concentraciones de proteínas. Hernández *et al.* (2016) expusieron a *E. andrei* a 2,59 y 10,37 mg de Cd/kg de sustrato y señalaron que aumentos significativos en los valores de proteínas acompañados de aumentos en la concentración de metalotioneínas y de grupos tioles en la región media anterior y posterior de los anélidos demuestran la tolerancia mostrada por los organismos a suelos impactados por cadmio y constituyen mecanismos de defensa de primera línea efectivos contra la toxicidad del metal con funciones dirigidas a evitar perturbaciones oxidativas en los órganos de reproducción.

En este sentido, es probable que durante la última semana de exposición la absorción del cobre por *E. andrei* tratada con ambas dosis del metal fue alta, por lo que a largo plazo, la concentración intracelular del metal posiblemente fue más elevada; provocando efectos perjudiciales sobre las concentraciones de proteínas del tejido

muscular asociados con cambios en la eficiencia de los mecanismos de ajustes bioquímicos desarrollados por las células para mantener la homeostasis del metal.

Desde hace algunas décadas se ha venido señalando que los metales pesados en general pueden afectar a los ácidos nucleicos por interacción directa con ellos, afectando su síntesis, el proceso de transcripción de ARN, y afectando finalmente la síntesis de proteínas y el crecimiento de los organismos (Bertin y Averbeck, 2006). En relación a este planteamiento, se puede sugerir que los descensos encontrados en las concentraciones de proteínas de *E. andrei* durante la última semana de exposición a ambas dosis de cobre posiblemente se encuentran relacionados con un cambio en la síntesis de proteínas, entre estas metaloproteínas y péptidos con grupos –SH. Dallinger *et al.* (2000) señalan que el cobre una vez en el citoplasma de las células, se distribuye para su posterior acomplejación y detoxificación con proteínas y péptidos como la metalotioneína y el GSH, sugiriendo los resultados encontrados que el crecimiento, la reproducción y sobrevivencia de los organismos podría verse comprometida por exposición prolongada.

Otra hipótesis que explicaría los descensos en las concentraciones de proteínas en *E. andrei* por exposición al cobre estaría relacionada con una producción elevada de oxirradicales. Específicamente, las proteínas pueden ser oxidadas por las EROs y generarse como resultados de esta acción, la aparición de grupos carbonílicos y otras alteraciones tales como, la destrucción de aminoácidos más sensibles como la cisteína, triptófano, valina, fenilalanina y metionina, modificaciones en los grupos R de los aminoácidos, incremento del peso molecular por formación de asociaciones intermoleculares covalentes o hidrofóbicas y disminución del peso molecular por ruptura del esqueleto peptídico (Favier, 2002).

Se puede inferir que una sobreproducción de EROs durante la exposición prolongada al cobre pudo afectar por interacción inespecífica con proteínas y la eficiencia del sistema de defensa antioxidante enzimático en el tejido de las lombrices de tierra, causando desajustes en los niveles fisiológicos de las moléculas que conjugan radicales libres y/o afectando la cinética de enzimas antioxidantes. Rabideau (2001) señala que estas consecuencias pueden contribuir a que la sobreproducción de EROs

sobrepase aún más la capacidad de defensa antioxidante en los organismos, favoreciendo que se generen también daños oxidativos sobre ácidos nucleicos y lípidos los cuales interfieren con el crecimiento y otras funciones en los anélidos.

Descensos en las concentraciones de proteínas por exposición a largo plazo a metales pesados han sido reportados en diferentes investigaciones. Gaete *et al.* (2010) luego de encontrar durante la exposición temprana de *E. foetida* a 0,96 g de Cu/kg de sustrato incrementos en las concentraciones de proteínas observó a los 45 días descensos en las concentraciones de proteínas totales. Para la especie anterior, Zhang *et al.* (2013) reportaron resultados similares cuando fue sometida a 300 mg de aluminio/kg de sustrato durante un período de 28 días. Jeyanthi *et al.* (2016) señalaron que en *Perionyx ceylanensis* se produce una respuesta similar cuando es expuesta a 300 mg de plomo/kg de sustrato. Así mismo, Luo *et al.* (2014) describieron que la exposición de *E. andrei* a una concentración de 2 g de plomo/kg de sustrato provoca un descenso en la concentración de proteínas de los anélidos. Estos autores atribuyen los resultados a perturbaciones en el proceso metabólico normal de las células por acción de los iones libres de los metales pesados, lo cual causa un debilitamiento de los sistemas de control encargados de contrarrestar la toxicidad del metal, la degradación de proteínas participantes en los mecanismos de defensa antioxidante con el establecimiento subsecuente de una condición de estrés oxidativo.

Aun cuando se ha informado cual tiende a ser el comportamiento de las proteínas en los anélidos cuando se encuentran expuestos a químicos de forma individual muy poco se conoce sobre el patrón que siguen las proteínas en las lombrices cuando estas son sometidas a la exposición de mezclas de químicos como glifosato y el cobre. Zhou *et al.* (2013) describen que la formación de complejos estables entre el glifosato y el cobre no provoca cambios en la concentración de proteínas en lombrices de tierra debido a la inhibición del efecto tóxico del metal por la acción quelante del herbicida. A pesar de la aseveración anterior, en la presente investigación evidencian los resultados encontrados que en las mezclas probadas, el herbicida y el metal ejercen sus efectos tóxicos por separado. Al igual que los valores de biomasa encontrados para las lombrices tratadas con ambas mezclas, las concentraciones de proteínas totales

incrementaron durante las tres primeras semanas de exposición y descendieron al final del tratamiento con ambas mezclas, sustentando la no ocurrencia de interacción entre ambos químicos.

Las concentraciones de proteínas totales más elevadas se encontraron a los 21 días del tratamiento de *E. andrei* con ambas mezclas de glifosato y cobre. Estos resultados podrían estar asociados a un incremento en la síntesis de proteínas que forman parte de los mecanismos de defensa celular que se encargan en los organismos de contrarrestar la toxicidad de ambos químicos. Un patrón en las concentraciones de proteínas totales en lombrices de tierra tratadas con las mezclas similar al encontrado para los anélidos expuestos a las dosis de glifosato y el metal por separado sugieren la no atenuación de la toxicidad del metal por la acción del herbicida, al contrario, pueden estar relacionado con una mayor expresión de las proteínas que le hacen frente a la toxicidad de cada compuesto por separado. Se incluyen entre estas, metaloproteínas que controlan la toxicidad del metal y enzimas antioxidantes encargadas de eliminar EROs generadas por exposición tanto del glifosato y el cobre (Santos *et al.*, 2011; Jinyu *et al.*, 2013; Homa *et al.*, 2015).

Descensos encontrados en las concentraciones de proteínas de *E. andrei* expuestas a ambas mezclas del glifosato y cobre similares a los hallados en lombrices de tierra tratadas con las dos concentraciones de cobre permiten inferir que el efecto tóxico del cobre en las mezclas no fue mediado por la acción del glifosato. Zhou *et al.* (2017) y Zhang *et al.* (2018) señalan que metales pesados y compuestos orgánicos cuando se encuentran simultáneamente en el suelo tienden a competir por la vía de entrada en lombrices de tierra como *E. foetida*, causando disminución en la tasa de ingreso y bioacumulación de uno de los químicos. En este sentido, se puede inferir que durante la exposición prolongada a las mezclas pudiese ocurrir una competencia entre el glifosato y el cobre y se impide la entrada del herbicida en igual proporción a la lombriz.

Tras el ingreso de metales en las lombrices, se bioacumulan en la fracción subcelular, provocando incrementos en sus concentraciones en compartimientos celulares que afectan las estrategias utilizadas por estos organismos para su detoxificación (Lanno *et al.*, 2004). En este orden de ideas, Spurgeon *et al.* (2005),

Zheng *et al.* (2013) y Zhang *et al.* (2014) sustentan que la producción incrementada de EROs y su acumulación provocan daños a componentes celulares como las proteínas, produciendo entre otros efectos cambios en la expresión génica con alteraciones en la síntesis de proteínas.

Reproducción

Número de ootecas

El número de ootecas depositadas por *E. andrei* controles y expuestas a dos concentraciones subletales de glifosato, cobre y sus mezclas durante 42 días se muestran en la Figura 4. Los diferentes tratamientos experimentales afectaron la colocación de ootecas en las lombrices de tierra durante los diferentes períodos de exposición. En la primera semana del bioensayo el número de ootecas depositado alcanzó un valor de 97 ootecas. La aparición de estas continuó de manera decreciente al transcurrir el tiempo en casi todos los grupos experimentales, exceptuando en los anélidos sometidos a Cu₂, los cuales no colocaron ootecas en la última semana, tiempo de exposición donde se alcanzó un valor de 65 ootecas depositadas (Anova_{Tiempo}, $F_s=2,32$; $p<0,05$). Durante el bioensayo, el grupo de lombrices de tierra controles colocó $171\pm 5,58$ ootecas; promedio que fue más elevado que el número colocado por los anélidos sujetos a los tratamientos con el herbicida, el metal y las mezclas de ambos (Anova_{Químico}, $F_s=56,40$; $p<0,001$). En los grupos expuestos las medias más bajas se reportaron para lombrices tratadas con las dos concentraciones de cobre (Cu₁= $27\pm 3,62$ y Cu₂= $17\pm 2,32$ ootecas) y con ambas mezclas del herbicida y el metal (Mez₁= $29\pm 1,94$ y Mez₂= $24\pm 1,27$ ootecas).

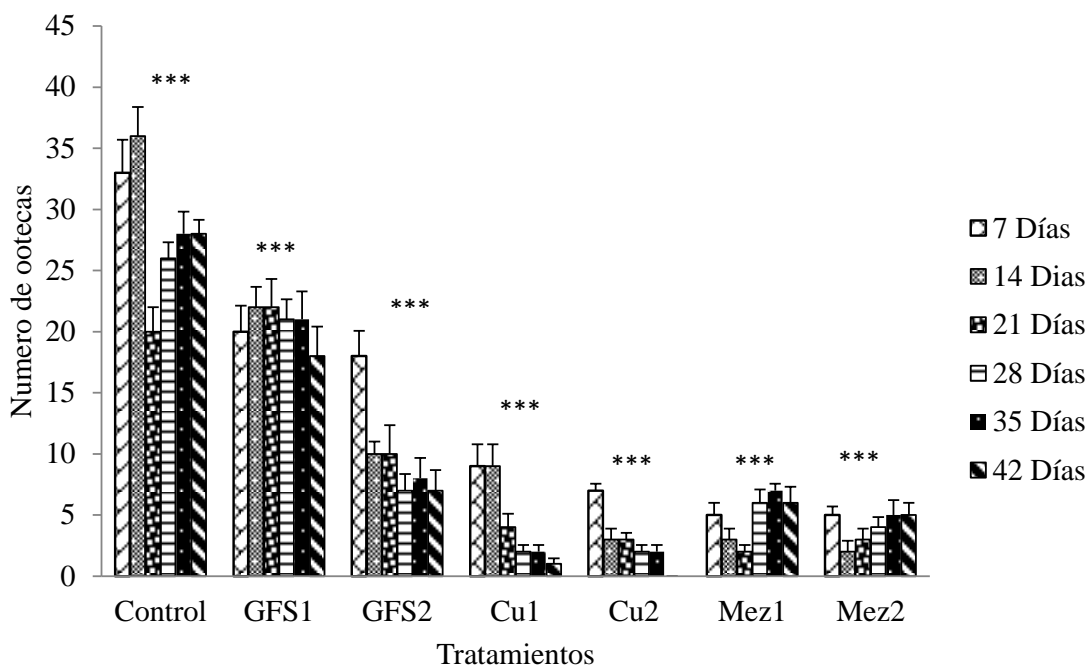


Figura 4. Número de ootecas depositado por *E. andrei* controles y expuestas por 42 días a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 3 g de cobre/kg de sustrato y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato). Las barras expresan las medias y la desviación estándar. *** indican un $p < 0,001$.

Los resultados evidencian que en *E. andrei* la capacidad reproductiva al igual que el crecimiento es afectada perjudicialmente por la exposición al glifosato, cobre y a las mezclas de ambos. El número de ootecas depositados por las lombrices varió de acuerdo a los tratamientos y los tiempos de exposición demostrando ser una respuesta útil para evaluar la toxicidad del herbicida y el metal en esta especie de anélido. Al respecto, desde hace años estudios han considerado el uso de parámetros del ciclo de vida como la sobrevivencia, el crecimiento y la reproducción por ser respuestas sensibles para evaluar toxicidad de productos químicos en suelos utilizando anélidos y han revelado que perturbaciones en la fertilidad de estos organismos pueden ser explicados a través de diferentes factores, entre los que incluyen un efecto indirecto asociado a las características del sustrato, la interferencia de metabolitos tóxicos con los mecanismos

reproductivos y la reducción del gasto de energía durante la reproducción y desvío hacia la detoxificación de compuestos químicos (Fisker *et al.*, 2013; Givaudan *et al.*, 2014).

Durante todo el bioensayo los promedios más elevados en el número de ootecas siempre se reportaron para las lombrices de tierra no expuestas a los químicos. Evidencian estos resultados que el bioensayo de toxicidad fue realizado en condiciones apropiadas que garantizan un estado fisiológicamente saludable en los organismos controles y favorece su reproducción. Givaudan *et al.* (2014) describen que propiedades del suelo como factores abióticos y un buen suministro de nutrientes son determinantes en el éxito reproductivo de las lombrices de tierra. En este sentido, una apropiada disponibilidad de nutrientes así como una adecuada temperatura, pH y humedad en el sustrato posiblemente fueron factores determinantes para una buena reproducción de los anélidos del grupo control, atribuyéndose especialmente a la presencia de un alto contenido de materia orgánica lo que permitió la asignación eficiente y suficiente de recursos energéticos para favorecer la fertilidad de *E. andrei* del grupo no tratado con químicos.

En relación a lo anterior, Polo *et al.* (2011) estudiaron la composición de macro y micronutrientes de un sustrato utilizado para el cultivo de lombrices y destacaron que un alto contenido de materia orgánica, C, N y P contribuye a la reproducción de *E. foetida*. West *et al.* (2003) descubrieron que la producción de ootecas por lombrices está relacionada con la capacidad que poseen estos anélidos de asignar recursos energéticos para la reproducción, encontraron un descenso en el número de ootecas depositado por *L. rubellus* en suelos con bajos contenidos de calcio y concluyeron que el estrés que se genera en el sustrato relacionado con un bajo contenido de nutrientes incapacita a los anélidos para asignar recursos energéticos a la reproducción debido a que son desviados para incrementar las posibilidades de sobrevivencia de la especie como el crecimiento.

Vidal y Horne (2003) y Hernandez *et al.* (2016) han descrito que las lombrices de tierra poseen la capacidad de incorporar contaminantes y bioacumularlos en la región media posterior como una estrategia de desintoxicación, basada en su inmovilización a fin de evitar la diseminación a otros tejidos y proteger a su vez el tejido reproductivo. En este contexto, los descensos observados en la fertilidad de lombrices de tierra al

transcurrir el tiempo de exposición al glifosato, cobre y sus mezclas sugieren el ingreso de los tóxicos a los anélidos, posiblemente su acumulación en la región anterior, la inactivación de los mecanismos de detoxificación de los mismos y el desarrollo de daños en el tejido reproductivo como el clitelo, glándula sexual secundaria que se hace notoria cuando los organismos alcanzan la madurez sexual y en la que se encuentran glándulas secretoras de moco cargado con albumina necesario para la copulación, donde se forma la cubierta de las ootecas y son depositadas estas (Fisker *et al.*, 2011; Givaudan *et al.*, 2014).

En relación al planteamiento anterior, Bindesbol *et al.* (2007) describen que factores estresantes como pesticidas y metales pesados tienen efectos negativos en la reproducción de lombrices de tierra que tienden a desaparecer completamente el clitelo o a causar lesiones en el tegumento clitelar, provocando enrollamientos anormales y reducción de las copulaciones entre las parejas al impedir el contacto sexual de los anélidos durante el apareamiento. En el mismo orden de ideas, Bansiwali y Rai (2010) señalan que daños a esta estructura en *E. foetida* por exposición a pesticidas son conducentes a alteraciones reproductivas durante la secreción de moco en el apareamiento, deposición de ootecas y en la producción de estas.

El hecho de permanecer desnudo y estar continuamente en contacto con el sustrato es lo que hace al clitelo y a otras estructuras reproductivas sensibles a los efectos de pesticidas y metales pesados (Rana *et al.*, 2013; Goswami *et al.*, 2014). La vulnerabilidad por acción de contaminantes químicos en estudios con *Lumbricus terrestris* y *E. foetida* ha sido asociada con otras afectaciones como retraso en el desarrollo sexual de las lombrices de tierra, disminución de la viabilidad espermática y descensos en la producción de ootecas (Zaltauskaite y Sodiene, 2014). Bustos-Obregon y Goicochea (2002) describieron en lombrices de tierra alteraciones morfológicas de las gónadas y receptáculos seminales como efectos deletéreos en la reproducción causados por la exposición a contaminantes y los asociaron con una reducción en la cantidad de esperma, el número de ootecas y número de crías emergidas por ooteca colocada por lombriz de tierra. Perturbaciones durante la copulación y transferencia de esperma como consecuencias de una alteración neuromuscular mediada por cambios en la actividad de

la enzima acetilcolinesterasa también han sido reportadas como efectos dañinos de la exposición a químicos sobre la reproducción de lombrices de tierra. Otros efectos neurotóxicos que pueden ser frecuentes en organismos expuestos a pesticidas y resultan en perjuicio de la reproducción pueden abarcar alteraciones en la producción de neurosecreciones por los ganglios sub y supra faringeo, bajo los cuales está el control de la oogénesis y espermatogénesis así como también el desarrollo de características sexuales secundarias en las lombrices de tierra (Correia y Moreira, 2010).

Otra hipótesis que alternativamente podría explicar los descensos en el número de ootecas depositado por *E. andrei* durante la exposición prolongada a glifosato, cobre y sus mezclas estaría relacionada posiblemente con la acción de las EROs formadas durante la exposición al glifosato y a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss. Los ácidos nucleicos constituyen uno de los blancos moleculares de las EROs (Livingstone, 2001), por lo que se puede inferir la ocurrencia de procesos oxidativos sobre el ADN de las lombrices de tierra, provocan alteración de su estructura y cambios siguientes en formación de células sexuales durante la oogénesis y espermatogénesis. Acorde a esto, un estudio realizado por Espinoza-Navarro y Bustos-Obregon (2005) demostró que la exposición al pesticida malatión provoca descensos en el número de espermatozoides e induce a la proliferación de espermatozoos anormales y daños en el tejido testicular de las lombrices de tierra. Los autores explican que la reducción de esperma podría estar relacionada con la toxicidad de metabolitos activos y EROs generados durante la biotransformación del pesticida, atribuyéndole que pueden provocar daños en el ADN e interferir con la espermatogénesis y, la presencia de anomalías en las células sexuales las asociaron con las propiedades alquilantes y oxidantes de los metabolitos activos del malatión y de las EROs, las cuales pueden actuar a nivel nuclear sobre complejos proteína-ADN.

Efectos sobre la reproducción mediados por EROs también han sido relacionados con la capacidad que tienen de oxidar proteínas y provocar cambios estructurales y funcionales. En relación a esto, Bustos-Obregon y Goicochea (2002) y Espinoza-Navarro y Bustos-Obregon (2005) describieron que la acción de EROs sobre enzimas colinesterasas altera la función locomotora de las lombrices de tierra y afecta la

búsqueda de alimento y de la pareja para el apareamiento. En este mismo contexto, Rai y Bansiwai (2009) señalan que perturbaciones en las actividades de colinesterasas por exposición a pesticidas afectan funciones neuromusculares por alteración del balance de Ca^{2+} y K^+ , lo cual parece ser el factor responsable de cambios morfológicos y perturbaciones de la actividad muscular que induce la incapacidad para la locomoción en lombrices expuestas a agroquímicos.

Durante todo el bioensayo los valores más bajos en el número de ootecas siempre se encontraron para lombrices de tierra expuestas a ambas dosis de cobre con una inhibición de la reproducción en lombrices tratadas con Cu_2 al finalizar la exposición. Posiblemente la reproducción se vio afectada cuando *E. andrei* se encontraba en suelos tratados con el metal en primera instancia debido al desvío de los recursos normalmente disponibles para la reproducción hacia las funciones de detoxificación y reparación, necesarias para aumentar las probabilidades de supervivencia de los organismos, los cuales posiblemente se debilitaron a medida que avanzó la exposición hasta provocar que la formación de EROs por la exposición al metal superara la capacidad de defensa antioxidante e interactuara con el proceso reproductivo provocando de esta manera la inhibición completa de la reproducción de los anélidos sujetos a Cu_2 (Aíra *et al.*, 2007; Duran y Henríquez, 2009).

Diversos estudios han reportado el efecto del glifosato y sus formulaciones comerciales sobre la puesta de ootecas y han asociado la toxicidad tanto a sus aditivos químicos, el surfactante POEA presente en la mezcla, así como también al ingrediente activo glifosato (Verrell y Buskirk, 2004; Contardo-Jara *et al.*, 2009; Correia y Moreira, 2010). En este contexto, Gaupp-Berhausen *et al.* (2015) describieron descensos en la producción de ootecas por *Lumbricus terrestris* y *Aporrectodea caliginosa* luego de ser expuesta a dos formulaciones comerciales de glifosato. Correia y Moreira (2010) informaron ausencia total de producción de ootecas por *E. foetida* cuando es expuesta a 10 y 100 mg de glifosato/kg de sustrato durante 56 días. Stellin *et al.* (2017), evidenciaron que la exposición a 0,59; 2,9 y 5,79 mg de glifosato/ kg de sustrato produce descensos en el número de ootecas depositadas por *L. terrestris*, *Octodrilus complanatus* y *Aporrectodea caliginosa*. El impacto negativo de glifosato en la

capacidad reproductiva también se ha reportado en *Dendrobaena veneta* en donde se observó producción de capullos deformados en condiciones de laboratorio (Jarmuż-Pietraszczyk y Jastrzebska, 2012).

Efectos tóxicos de metales pesados sobre la condición reproductiva también han sido descritos por Spurgeon *et al.* (2004) quienes reportaron descensos significativos en la producción de ootecas por *E. foetida* cuando se encuentra en suelos contaminados con metales pesados. Scott-Fordsmand y Weeks (2000) describieron una respuesta similar para la especie anterior cuando es sometida a suelos contaminados con arsénico y cobre. De igual manera, Avila *et al.* (2007) y Zhou *et al.* (2013) reportaron que la exposición a cobre *E. foetida* provoca una reducción significativa en la puesta de ootecas por las lombrices de tierra. La exposición de *E. andrei* a 2 g de plomo/kg de sustrato inhibió completamente la reproducción de los anélidos (Luo *et al.*, 2014). Ulloa *et al.* (2018) reportaron una menor producción de capullos en *E. foetida* expuestas a 0,89 g de Cu/kg de sustrato.

Aunque se ha reportado que metales pesados y herbicidas pueden inducir por separado daños en el ADN, alteraciones de las actividades enzimáticas, reducción de la supervivencia individual, descensos en la tasa de crecimiento, cambios en el comportamiento como la tasa de alimentación, disminución de la biomasa, entre otros efectos, la escasez de datos ecotoxicológicos que sustenten los efectos simultáneos de combinaciones químicas en los sistemas terrestres en la actualidad desencadena diversas controversias (Uwizeyimana *et al.*, 2017). A pesar de que se ha reportado que el patrón de respuestas biológicas a las interacciones de químicos en el ambiente puede mostrar diferencias interespecíficas, muchos estudios coinciden en plantear que distintos compuestos químicos poseen la capacidad de mezclarse en el ambiente y tener efectos potencialmente tóxicos. En este sentido, sugieren los descensos en el número de ootecas depositadas por lombrices tratadas con ambas mezclas del herbicida y el metal que durante todo el bioensayo de exposición el glifosato y el cobre ejercieron sus efectos por separado y que estos en conjunto potenciaron daños sobre la reproducción de los organismos.

Sustenta el planteamiento anterior el trabajo realizado por Yang *et al.* (2018), en el que estudiaron el efecto individual y combinado de los pesticidas fenobucarb, clorpirifos, clotianidina acetoclor con el cromo y observaron en la lombriz de tierra *E. foetida* un comportamiento de evitación a los químicos acompañado de efectos tóxicos tales como neurotoxicidad y una menor tasa reproductiva, ejercidos por la acción combinada de los pesticidas y el metal. Similarmente, Zhou *et al.* (2006) describieron que tras la exposición de la lombriz de tierra *E. foetida* a una combinación de acetoclor y metamidofos efectos tóxicos que afectan su reproducción.

Porcentaje de eclosión de las ootecas

El porcentaje de eclosión de las ootecas depositadas por *E. andrei* del grupo control y sujetas a las concentraciones subletales de glifosato, cobre y mezclas de ambos fue de un 100% durante los 7, 21 y 42 días de exposición. En relación a lo antes mencionado Givaudan *et al.* (2014) señalan que un suelo con factores abióticos controlados y gran cantidad de materia orgánica son fundamentales para mantener en buenas condiciones la estructura de las ootecas colocada por las lombrices de tierra. En este sentido los resultados encontrados permiten inferir que el suelo utilizado en la presente investigación permitió que todas las ootecas se mantuvieran en buen estado y eclosionaran según su tiempo de maduración.

Resultados similares a los obtenidos en la presente investigación durante la exposición a metales pesados fue reportado por Polo *et al.* (2011) quienes al utilizar un sustrato orgánico preparado con excretas de animales mezclado con 0,01g de cadmio/kg de sustrato reportaron un 100% de eclosión de las ootecas depositadas por *E. andrei* estos investigadores asociaron sus resultados con la existencia de respuestas bioquímicas compensatorias que le confieren mecanismos protectivos contra la toxicidad del Cd los cuales impidieron que se generara efectos deletéreos en la reproducción de *E. andrei*.

Resultados diferentes a los encontrados para el porcentaje de eclosión de las ootecas depositadas por las lombrices sujetas al glifosato fue reportado por Gaupp-Berghausen *et al.* (2015) en las ootecas colocadas por *L. terrestris* y *A. caliginosa* expuestas a 7,2 g de glifosato/L las cuales tuvieron porcentajes iniciales de 43% para *L.*

terrestris y 71% para *A. caliginosa*, el cual fue descendiendo hasta llegar a un 17% para *L. terrestres* y 32% para *A. caliginosa* a medida que transcurrió el tiempo de exposición, estos investigadores infirieron que sus resultados estuvieron asociados al debilitamiento de la corteza de las ootecas por acción del químico el cual provocó que estas no llegaran a madurarse. Sin embargo, Guayara y Bernal (2012) señalan que las ranas de género *E. pustulosus* durante la exposición al glifosato realizan un nido de espuma para recubrir sus huevos evitando de esta forma que el contacto con el herbicida dañe la eclosión de sus huevos.

Aunque no hay literatura existente que revele el efecto de mezclas de glifosato y Cu sobre el porcentaje de eclosión de las ootecas depositadas por lombrices de tierra, los resultados encontrados para este parámetro permiten inferir que al igual que la exposición de los químicos por separado la eclosión de las ootecas posiblemente estuvo relacionada con el desarrollo de estrategias para proteger a las ootecas al estrés del glifosato, Cu y mezclas de ambos y por otro lado un buen suministro de materia orgánica en el sustrato. En conjunto todo esto pudo favorecer la eclosión de las ootecas depositadas por las lombrices sujetas a los químicos.

Tiempo de eclosión de las ootecas

La prueba estadística de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas en el tiempo de eclosión de las ootecas colocadas por *E. andrei* expuesta a dosis subletales de glifosato, cobre y a las mezclas de ambos ($KW_{\text{Químico}}=54,36; p<0,05$), mientras que los diferentes periodos de exposición no influyeron en la eclosión de las ootecas depositadas por las lombrices ($KW_{\text{Tiempo}}=2,69; p>0,05$).

Las ootecas puestas por los organismos del grupo control mostraron un tiempo de eclosión de $16,45\pm 0,22$ días, sin embargo, el tiempo de eclosión de las ootecas depositadas por las lombrices expuestas a GFS2, Cu1 y Cu2 fue más prolongado, con valores promedios de $20,20\pm 1,71$; $20,67\pm 1,67$; $20,30\pm 10,09$ respectivamente (Figura 5).

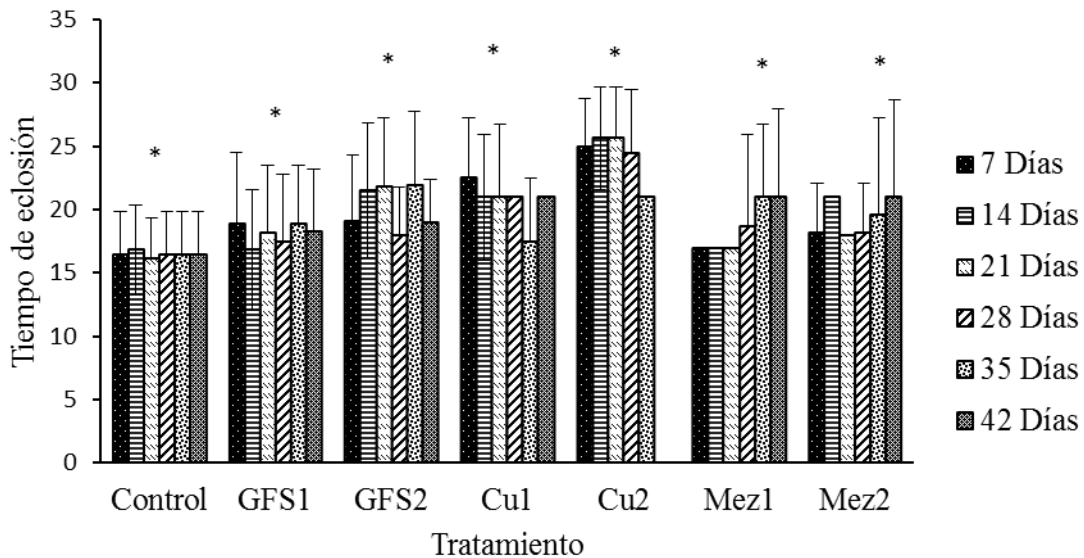


Figura 5. Tiempo de eclosión de las ootecas depositadas por *E. andrei* controles y expuestas por 42 días a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 3 g de cobre/kg de sustrato y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato). Las barras expresan las medias y la desviación estándar. *indican un $p < 0,05$.

Las ootecas depositadas por las lombrices controles tuvieron un tiempo promedio de incubación de 16 días, promedio que estuvo dentro del rango (14-21 días) reportado por Fuentes (1987). Un resultado similar al encontrado para el tiempo de eclosión de las ootecas depositadas por *E. andrei* fue reportado por Polo *et al.* (2011) al utilizar un sustrato preparado con excretas de animales observo un periodo de incubación de 15,5 días en las ootecas depositadas por *E. foetida*, sustentando que sus resultados posiblemente estuvieron asociados a un alto contenido materia orgánica así como también a un pH, humedad y temperatura óptimos que favorecieron esta variable reproductiva. Al respecto, Andrade (2018) señala que un sustrato similar al utilizado en el presente estudio, preparado con bagazo de caña de azúcar, mezcla de gallinaza, agua y el lixiviado fresco de materiales hortícolas como fuentes de alimentación favoreció el crecimiento y el desarrollo de estructuras reproductivas de *E. andrei*. Permite inferir el tiempo de eclosión de las ootecas depositadas por las lombrices sujetas al grupo control

que el sustrato utilizado en la presente investigación garantizo los nutrientes esenciales para el desarrollo de las estructuras reproductivas y la reproducción de *E. andrei*.

Incrementos en el tiempo de eclosión de las ootecas depositadas por *E. andrei* observados durante la exposición a los químicos evidencian la sensibilidad de este parámetro en presencia del glifosato, cobre y sus mezclas. Sustentando el planteamiento anterior, Lavelle y Spain (2001) y Givaudan *et al.* (2014) señalan que tiempos prolongados en la eclosión de las ootecas depositadas por lombrices expuestas a químicos podrían estar relacionados con el desvío de los recursos energéticos para la reproducción hacia la desintoxicación de los contaminantes designados para garantizar la supervivencia de la especie en medios contaminados. Otra hipótesis válida para justificar tiempos de eclosión prolongados de ootecas depositadas por lombrices sujetas a herbicidas y metales pesados puede estar asociada con la interferencia de EROs generados por la exposición al glifosato y el Cu quien además por causa de sus electrones desapareados puede provocar alteración de la estructura del ADN y desencadenar un retraso en el desarrollo de los juveniles por ootecas y consecuentemente tiempo prolongados de eclosión (Givaudan *et al.*, 2014).

Sustentando la hipótesis planteada, Fisker *et al.* (2013) señalan que la exposición al Cu en lombrices de tierra provoca mal formación de gametos y descensos en el número de espermatozoides asociados a la acción de EROs. Tiempo de incubación de 19 días fue reportado por Mirmonsef *et al.* (2017) en las ootecas depositadas por *A. longa* expuesta a 30, 50 y 100 mg de Cu/kg de sustrato. Durante la exposición al herbicida Santos *et al.* (2010), reportaron un tiempo de eclosión de 22 días en ootecas depositadas por *Filsomia candida* expuesta a 0,33 mg de glifosato/kg de sustrato

Las ootecas depositadas por las lombrices sujetas a las mezclas de glifosato y Cu mostraron promedios similares en el tiempo de eclosión de las ootecas puestas por las lombrices durante el tratamiento con los químicos por separado, permitiendo inferir que la presencia del herbicida no atenuó la toxicidad del metal, quien resultó ser un potencial agente toxico en la reproducción de *E. andrei* a los 42 días de exposición.

Número de lombrices emergidas por ooteca

El tratamiento experimental con el glifosato, el cobre y sus mezclas tuvo un efecto significativo en el número de lombrices emergidas de las ootecas depositadas por *E. andrei* ($KW_{\text{Químicos}} = 176,4$; $p < 0,05$). No obstante, el tiempo de exposición no afectó significativamente esta variable ($KW_{\text{Tiempo}} = 9,97$; $p > 0,05$).

El grupo de organismos expuestos a un sustrato libre de químicos exhibió el mayor número de lombrices emergidas de las ootecas puestas por *E. andrei*, con un valor de $2,68 \pm 1,12$ lombrices, mientras que los anélidos expuestos a las dosis subletales de glifosato, Cu y mezclas de glifosato y Cu exhibieron un número menor de lombrices emergidas de sus ootecas depositadas, siendo mayor el descenso para aquellos organismos expuestos a Cu₂, Mez₁ y Mez₂ con valores promedios de $0,93 \pm 0,28$; $1,22 \pm 0,29$ y 1 ± 0 lombrices por ooteca respectivamente (Figura 6).

Evidencia el número de lombrices por ootecas ser un parámetro sensible a la acción de los químicos, demostrando ser esta una respuesta útil para determinar efectos tóxicos de potenciales contaminantes vertidos al sustrato.

Resultados similares a los encontrados en la presente investigación para el número de lombrices emergidas de las ootecas depositadas por las lombrices sujetas al glifosato fue reportado por Santos *et al.* (2012) en *E. foetida* expuesta a 0,38 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 0,42 mg de endosulfán/kg de sustrato, estos autores observaron números de individuos reducidos por ootecas (1 individuo) en comparación con el grupo control (de 3 a 4 individuos), sustentando que sus resultados posiblemente se debieron a la acción de las EROs sobre la formación de gametos. El efecto de otro pesticida fue reportado por Espinoza-Navarro (2003) en *E. foetida* expuesta a 0,03; 0,113; 0,116 y 0,110 g de malatión/kg de sustrato observando descensos en el número de espermatozoides a los 15 y los 30 días de exposición y una lombriz por ooteca, sustentando que sus resultados posiblemente estuvieron asociados al efecto del metabolito activo malaoxón sobre la espermatogénesis. En relación a la literatura citada se puede inferir que el número de lombrices por ootecas observado sea consecuencia de la acción de EROs por la exposición al herbicida sobre la formación de gametos y órganos importantes para la reproducción.

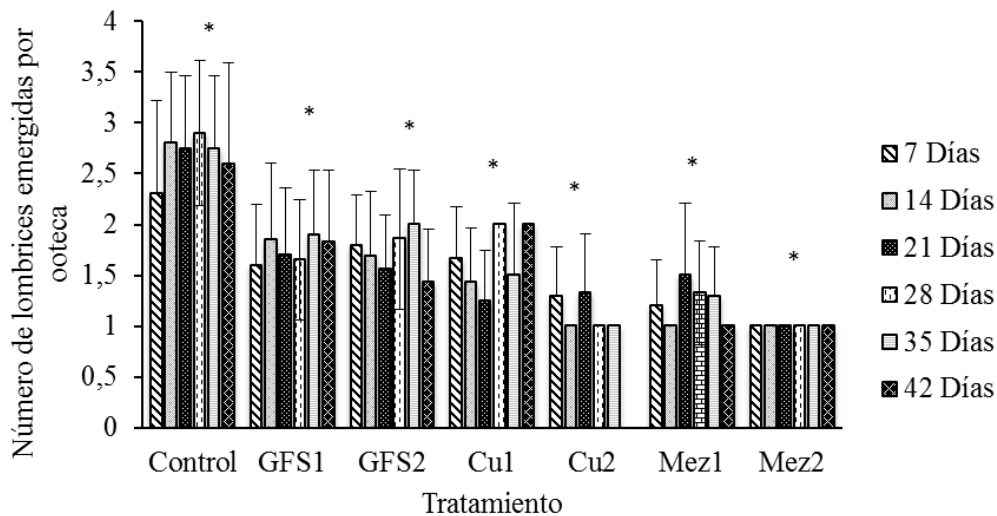


Figura 6. Número de lombrices emergidas por ooteca eclosionada por *E. andrei* controles y expuestas por 42 días a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 3 g de cobre/kg de sustrato y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato). Las barras expresan las medias y la desviación estándar. * indican un $p < 0,05$.

Los efectos deletéreos observados en la reproducción de las lombrices sujetas a las dosis de Cu posiblemente estén asociados a la acumulación del metal a medida que avanzó la exposición y consecuentemente a la interferencia de los electrones desapareados que posee el metal y las EROs con los ácidos nucleicos, proteínas y ADN, dichos metabolitos al cambiar la estructura de estas macromoléculas biológicas tienden a desencadenar alteraciones morfológicas de las gónadas y receptáculos seminales que provocan reducción en la cantidad de espermatozoides, número de ootecas y número de crías (Bustos-Obregon y Goicochea, 2002). Sustentando el planteamiento anterior Matusевич y Eitminaviciute (2005) describen que daños oxidativos sobre el ADN de las lombrices de tierra por la exposición a metales pesados conduce a cambios siguientes en formación de células sexuales durante la ovogénesis y espermatogénesis y como consecuencia de ello un menor número de lombrices por ootecas.

Descensos en el número de individuos emergidos por ooteca depositada por *E. foetida* expuestas a 56 mg de Cu/g de sustrato fue revelado por Spurgeon y Hopkin (1996) quienes señalaron que posiblemente sus resultados estuvieron asociados con el debilitamiento de los mecanismos de defensas antioxidantes y la interferencia de EROs con la formación de gametos.

El número de lombrices por ooteca observado durante las exposición a las mezclas de glifosato y Cu fueron similares al de los tratamientos por separado, por ello se puede inferir que el valor obtenido para este parámetro durante la exposición a las mezclas posiblemente estuvo dado por el efecto del Cu. Los metales pesados y herbicidas tienden a competir por la vía de entrada en las lombrices de tierra (Zhang *et al.*, 2018), por ello es probable que descensos en el número de lombrices por ootecas durante la exposición a las mezclas de glifosato y Cu están asociadas a una mayor absorción del metal.

En general, se observó que el crecimiento de *E. andrei* expuesta a los químicos en etapa temprana de exposición resulto estimulado, posiblemente debido a un efecto hormético, el cual parece constituir una apropiada estrategia bioquímica adaptativa que le permitió a la especie controlar el estrés producido por el glifosato, Cu y mezclas de ambos, sin embargo descensos en el crecimiento de los organismos expuestos demuestran que este efecto puede ser revertido en tiempos prolongados de exposición por el gasto energético involucrado en hacerle frente a la exposición de los químicos y al debilitamiento de los mecanismos de defensas antioxidantes, incrementos en la sobreproducción de EROs posiblemente se encuentren relacionados con la inhibición de la síntesis de proteínas en el tegumento y el peso de los anélidos. Las respuestas observadas a través de la reproducción de *E. andrei* ponen en evidencia que los procesos reproductivos en las lombrices pueden ser interrumpidos por el desvío de recursos energéticos hacia la sobrevivencia de los anélidos en el sustrato asociados a la activación de defensas antioxidantes que permiten tolerar el estrés de agentes químicos y al debilitamiento de estos mecanismos a medida que avanza el tiempo exposición al glifosato, Cu y mezclas de ambos. Los resultados obtenidos a través de ambos biomarcadores de crecimiento y reproducción en las lombrices expuestas a los químicos

demonstraron que el efecto toxico de Cu no quedo inhibido ante la presencia del glifosato, debido a la no ocurrencia de interacción entre ambos.

CONCLUSIONES

Incremento en la biomasa hasta los 21 días de exposición podrían deberse a un efecto hormético en los organismos. No obstante, descensos en la biomasa de las lombrices expuestas a Cu1, Mez1 y Mez2 a los 42 días de exposición sugieren el debilitamiento de los mecanismos de control de la toxicidad del herbicida y el metal asociado a altos costos de tolerancia durante exposición prolongada.

Aumentos en las concentraciones de proteínas durante los 21 días de exposición podrían estar relacionados con la activación de mecanismos de protección por *E. andrei* para hacerle frente a la exposición de los químicos, mientras que los descensos en este parámetro podrían estar asociados con daños oxidativos producidos por acción de las EROs.

Descensos en el número de ootecas, número de lombrices emergidas de las ootecas depositadas por *E. andrei* sujetas a los tratamientos experimentales y tiempos de eclosión prolongados de las ootecas, posiblemente estén asociados a daños sobre estructuras reproductivas, al desvió de la energía para garantizar la sobrevivencia de las lombrices y la acción de EROs sobre biomoléculas como el ADN.

Los patrones de respuestas de los diferentes marcadores de crecimiento y reproducción en lombrices tratadas con las mezclas de glifosato y el cobre evidenciaron que el efecto tóxico del cobre no es inhibido en presencia del herbicida, sugiriendo que a las dosis probadas no ocurre interacción entre estos y que por el contrario cada uno ejerce su efecto tóxico por separado.

RECOMENDACIONES

Hacer un bioensayo de exposición con *E. andrei* en donde se prueben mezclas constituidas por la dosis más bajas de glifosato y cobre (0,9 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato) y por las dosis más altas del herbicida y el metal (1,8 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 3 g de cobre/kg de sustrato).

Cuantificar la concentración de glifosato y el cobre en el tegumento de las lombrices de tierra sujetas a los diferentes tratamientos.

Determinar marcadores moleculares en *E. andrei* sometiéndola a los mismos tratamientos experimentales probados en este estudio a fin de ampliar la base de datos teóricos que permitan dilucidar los mecanismos bioquímicos relacionados con el control de la toxicidad del glifosato y el cobre.

BIBLIOGRAFÍA

- Abate, L.; De Stefano, C.; Foti, C. y Sammartano, S. 1999. Binding of glyphosate by open-chain polyammonium cations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18: 2131-2137.
- Aguiar, L.; De Figueira, F.; Gottschalk, M. y Da Rosa, C. 2016. Glyphosate based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 94: 185-186.
- Ahmad, I.; Hamid, T.; Fatima, M.; Chand, H.; Jain, S.; Athar, M. y Raisuddin, S. 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica and Biophysica Acta General Subjects*, 1523(1): 37-48.
- Aíra, M.; Domínguez, J.; Monroy, F. y Velando, A. 2007. Stress promotes changes in resource allocation to growth and reproduction in a simultaneous hermaphrodite with indeterminate growth. *Biological Journal of the Linnean Society*, 91: 593-600.
- Al-Rajab, A. y Hakami, O. 2014. Behavior of the non-selective herbicide glyphosate in agricultural soil. *American Journal of Environmental Sciences*, 10: 94-101.
- Andrade, A. 2018. Morfometría y reproducción de *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) bajo alimentación suplementada con *Arthrospira maxima* (Setchell & Gardner, 1917). Trabajo de grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.
- Avigliano, L. 2018. Efecto del glifosato sobre el crecimiento y reproducción de crustáceos superiores. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Avila, G.; Gaete, H.; Morales, M. y Neaman, A. 2007. Reproducción de *Eisenia foetida* en suelos agrícolas de áreas mineras contaminadas por cobre y arsénico. *Pesqueria agropecuaria brasilera*, 42(3): 435-441.
- Bansiwal, K. y Rai, N. 2010. Assessment of malathion toxicity in certain organs of earthworm, *Eisenia foetida*. *The Bioscan*, 5(3): 473-476.
- Bertin, G y Averbek, D. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences. *Biochimie*, 88(11): 1546-1559.
- Bindesbol, A.; Bayley, M.; Damgaard, C. y Holmstrup, M. 2007. Life-history traits and population growth rate in the laboratory of the earthworm *Dendrobaena octaedra* cultured in copper-contaminated soil. *Applied Soil Ecology*, 35(1): 46-56.
- Boobis, A.; Ossendorp, A.; Banasiak, T.; Hamey, P.; Sebestyen, I. y Moretto, A. 2008. Evaluación de riesgos acumulativos de residuos de plaguicidas en alimentos.

Toxicology, 180: 137-150.

- Buch, A.; Brown, G.; Niva, C.; Sautter, K. y Sousa, J. 2013. Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontoscolex corethrurus* (Muller, 1857) and *Eisenia andrei* (Bouche, 1972). *Applied Soil Ecology*, 69: 32-38.
- Bustos-Obregon, E. y Goicochea, R. 2002. Pesticide soil contamination mainly affects earthworm male reproductive parameters. *Asian Journal of Andrology*, 4: 195-199.
- Calabrese, V.; Cornelius, C.; Cuzzocrea, S.; Iavicoli, I.; Rizzarelli, E. y Calabrese, E. 2011. Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity. *Molecular Aspects of Medicine*, 32: 279-304.
- Casabé, N.; Piola, L.; Fuchs, J.; Oneto, M.; Pamparato, L.; Basack, S.; Giménez, R.; Massaro, R.; Papa, J. y Kesten, E. 2007. Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. *Journal of Soils and Sediments*, 7(1): 232- 239.
- Cedergreen, N. 2008. Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained over time. *Environmental Pollution*, 156(3): 1099-1104.
- Cedergreen, N.; Streibig, J.; Kudsk, P.; Mathiassen, S. y Duke, S. 2007. The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose-Response*, 5: 150-162.
- Chigbo, C. y Batty, L. 2013. Effect of combined pollution of chromium and benzo (a) pyrene on seed growth of *Lolium perenne*. *Chemosphere*, 90: 164-169.
- Contardo-Jara, V.; Klingemann, E. y Wiengand, C. 2009. Bioaccumulation of glyphosate and its formation roundup ultra in *Lumbricus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution*, 157: 57-63.
- Correia, F. y Moreira, J. 2010. Effects of glyphosate and 2,4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85: 264-268.
- Cortés, C.; Marcano, L.; Marcano, E. y Zapata-Vívenes, E. 2015. Inmunotoxicidad de malatión y clorpirifos en la lombriz de tierra *Eisenia* sp. (Annelida: Oligochaeta). *Saber*, 27(4): 530-536.
- Dallinger, R.; Berger, B.; Gruber, C.; Hunziker, P. y Sturzenbaun, S. 2000. Metallothioneins in terrestrial invertebrates: Structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers. *Cellular and molecular biology*, 46(2): 331-346.
- Das, P.; Barua, S.; Sarkar, S.; Kumar, S.; Mukherjee, S.; Goswami, L.; Das, S.; Bhattacharya, S.; Karak, N. y Bhattacharya, S. 2018. Mechanism of toxicity and transformation of silver nanoparticles: Inclusive assessment in earthworm-microbe-soil-plant system. *Geoderma*, 314: 73-84.
- De la Torre, F.; Ferrari, L. y Salibian, A. 2005. Biomarkers of a native fish species

- (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere*, 59(4): 577-583.
- Devine, J.; Eza, D.; Ogusuku, E. y Furlong, M. 2008. Uso de los insecticidas: Contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25(1): 74-100.
- Domínguez, A.; Brown, K.; Sautter, C.; De Oliveira, E.; Vasconcelos, C.; Niva, M. y J. Bedano. 2016. Toxicity of AMPA to the earthworm *Eisenia andrei* Bouché, 1972 in tropical artificial soil. *Scientific Reports*, 6: 197-31.
- Domy, A. 2001. *Elementos traza en ambientes terrestres: biogeoquímica, la biodisponibilidad, y los riesgos de los metales*. Segunda edición. Springer. Nueva York, Estados Unidos.
- Duran, L. y Henriquez, J. 2009. Crecimiento y reproducción de la lombriz roja (*Eisenia foetida*) en cinco sustratos orgánicos. *Agronomía Costarricense*, 33(2): 275-281.
- Dzul, R. 2016. Respuestas toxicológicas en la lombriz de tierra *Eisenia foetida*, como bioindicador sensible a plaguicidas: revisión entre estudios laboratorio-campo. *Jaina Boletín Informativo*, 27(2): 17-23.
- Dzul, R. y Rendón, J. 2017 Efectos de un herbicida formulado con glifosato sobre el peso corporal, proteínas y defensas antioxidantes en la lombriz de tierra, *Eisenia foetida*. *Jaina Boletín Informativo*, 28(2): 1-12.
- Eker, S.; Ozturk, L.; Yazici, A.; Erenoglu, B.; Romheld, V. y Cakmak, I. 2006. Foliar applied glyphosate substantially reduced uptake and transport of iron and manganese in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 10019-10025.
- Espinoza-Navarro, O. 2003. Efecto del insecticida organofosforado malatión sobre el aparato reproductor de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* como especie biocentinela. Trabajo de grado. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.
- Espinoza-Navarro, O. y Bustos-Obregon, E. 2005. Effect of Malathion on the male reproductive organs of earthworms, *Eisenia foetida*. *Asian Journal of Andrology*, 7(1): 97-101.
- Favier, A. 2002. Comment metre en evidence le stress oxidant chez ihomme sain ou malade. *Myalgies international*, 2(3): 14-19.
- Feng, L.; Zhang, L.; Zhang, Y.; Zhang, P. y Jiang, H. 2015. Inhibition and recovery of biomarkers of earthworm *Eisenia fetida* after exposure to thiacloprid. *Environmental Science and Pollution Research*, 6: 113-412.
- Fisker, K.; Holmstrup, M. y Sorensen, J. 2013. Variation in metallothionein gene expression is associated with adaptation to copper in the earthworm *Dendrobaena octaedra*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 157(2): 220-226.

- Fisker, K.; Sorensen, J. y Holmstrup, M. 2012. Costs of adaptation and expression of metallothionein in earthworm populations adapted to copper polluted soils. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 163: 56-61.
- Fisker, K.V.; Sørensen, J.G.; Damgaard, C.; Pedersen, K.L. y Holmstrup, M. 2011. Genetic adaptation of earthworms to copper pollution: is adaptation associated with fitness costs in *Dendrobaena octaedra*. *Ecotoxicology*, 20(3): 563-573.
- FONACIT (Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación). 2011. Código de ética para la vida. Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. Caracas, Venezuela.
- Fuentes, J. 1987. La crianza de la lombriz roja. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. *Ecotoxicology*, 10: 23-26.
- Furst, A. y Nguyen, Q. 1984. Cadmium-induced metallothionein in earthworms (*Lumbricus terrestris*). *Biological Trace element research*, 21: 81-85.
- Gaete, H.; Hidalgo, M.; Neaman, A. y Ávila, G. 2010. Evaluación de la toxicidad de cobre en suelos a través de biomarcadores de estrés oxidativo en *Eisenia foetida*. *Química Nova*, 33: 566-570.
- Gaupp-Berghausen, M.; Hofer, M.; Rewald, B. y Zaller, J. 2015. Los herbicidas a base de glifosato reducen la actividad y la reproducción de las lombrices de tierra y conducen a mayores concentraciones de nutrientes en el suelo. *Nature Scientific Reports*, 5: 12-886.
- Gaur, A. y Adholeya, A. 2004. Prospects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Phytoremediation of Heavy Metal Contaminated Soils. *Current Science*, 86: 528-534.
- Gavinelli, F.; Barcaro, T.; Dorigo, L.; Dreon, A.; Toniello, V.; Pamio, A.; Csuzdi, C.; Blakemore, R.; Squartini, A.; Moretto, E.; Fernandez, D.; De Sosa, I.; Nicolussi, G. y Paoletti, M. 2017. Importance of the large deep-burrowing (anecic) earthworms in forested and cultivated areas (especially vineyards) of the North-Eastern Italy. *Applied Soil Ecology*, 14: 255-284.
- Givaudan, N.; Binet, F.; Bot, L. y Wiegand, C. 2014. Earthworm tolerance to residual agricultural pesticide contamination: field and experimental assessment of detoxification capabilities. *Environmental and Pollution*, 192: 9-18.
- Goswami, L.; Sarkar, S.; Mukherjee, S.; Das, S.; Barman, S.; Raul, P.; Bhattacharyya, P.; Mandal, N.; Bhattacharya, S. y Bhattacharya, S. 2014. Vermicomposting of tea factory coal ash: metal accumulation and metallothionein response in *Eisenia fetida* (Savigny) and *Lampito mauritii* (Kinberg). *Bioresource Technology*, 166: 96-102.
- Granadillo, M. y Marcano, L. 2013. Efectos de los pesticidas malatión y metomilos sobre el crecimiento y la reproducción de *Eisenia* sp. (Annelida: Oligochaeta). *Revista Argentina de Ecotoxicología y Contaminación ambiental*, 4(1): 167-175.

- Guayara, M. y Bernal, M. 2012. Fecundity and fertility of eleven species of colombian anurans with different reproductive modes. *Caldasia*, 34(2): 483-496.
- Hernandez, J.; Zapata-Vívenez, E.; Marcano, L.; Marcano, E. y Nusetti, O. 2016. Respuestas bioquímicas en la lombriz de tierra *Eisenia andrei* expuesta a cadmio. *Saber*, 28(3): 536-545.
- Holmstrup, M.; Sorensen, J.; Overgaard, J.; Bayley, M.; Bindesbol, A.; Slotsbo, S.; Fisker, K.; Maraldo, K.; Waagner, D. y Labouriau, R. 2011. Body metal concentrations and glycogen reserves in earthworms (*Dendrobaena octaedra*) from contaminated and uncontaminated forest soil. *Environmental Pollution*, 159(1): 190-197.
- Homa, J.; Ochama, E.; Sturzbaum, A.; Morgan, J. y Plytycz, B. 2005. Early phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after thermal exposure to metal ions. *Environmental Pollution*, 135: 275-280.
- Homa, J.; Rorat, A.; Krut, J.; Cocquerelle, C.; Plytycz, B. y Bandelbulcke, F. 2015. Dermal exposure of *Eisenia andrei* earthworms: Effects of heavy metals on metallothionein and phytochelatin synthase gene expressions in coelomocytes. *Environmental Toxicology Chemistry*, 34(6): 1397-1404.
- Hussain, S.; Siddique, T.; Saleem, M.; Arshad, M. y Khalid, A. 2009. Impacto de los pesticidas en la diversidad microbiana del suelo, enzimas y reacciones bioquímicas. *Advances in agronomy*, 102: 159-200.
- Jarmuł-Pietraszczyk, J. y Jastrzębska, E. 2012. Herbicide toxicity to the California earthworms *Eisenia fetida* and *Dendrobaena veneta*. *Ecological Chemistry and Engineering*, 19(9): 1133-1137.
- Jeyanthi, V.; James, J.; Karunai, B.; Karmegam, N. 2016. Comparative study of biochemical responses in three species of earthworms exposed to pesticide and metal contaminated soil. *Environmental Processes*, 10: 1-12.
- Jinyu, F.; Ren, H. y Wang, X. 2013. Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius auratus* exposed to glyphosate and its formulation. *Toxicological y Environmental Chemistry*, 97(7): 1183-1191.
- Kouda, K. e Iki, M. 2010. Beneficial effects of mild stress (hormetic effects): dietary restriction and health. *Journal of Physiological Anthropology*, 29: 127-132.
- Lankadurai, B.; Nagato, E. y Simpson, M. 2013. Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors. *Environmental Reviews*, 21: 180-205.
- Lanno, R.; Wells, J.; Conder, J.; Bradham, K. y Basta, N. 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 39-47.
- Lavelle, P. y Spain, A. 2001. *Soil ecology*. RICHMOND, Texas, Estados Unidos.

- Livingstone, D. 2001. Contaminant-Stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 656-666.
- López-Díaz, N.; González, V.; Hernández-Bautista, R.; Alarcón-Aguilar, A.; Luna-López, A. y Königsberg, M. 2013. Hormesis: lo que no mata, fortalece. *Gaceta Médica de México*, 149: 438-447.
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farra, A. y Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Lukkari, T.; Taavitsainen, M.; Soimasuo, M.; Oikari, A. y Haimi, J. 2004. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier metal exposure. *Environmental and Pollution*, 129(3): 377-386.
- Luo, W.; Verweij, R. y Van Gestel, C. 2014. Determining the bioavailability and toxicity of lead contamination to earthworms requires using a combination of physicochemical and biological methods. *Environmental Pollution*, 185: 1-9.
- Maqueda, C.; Undabeytia, T.; Villaverde, J. y Morillo, E. 2017. Behaviour of glyphosate in a reservoir and the surrounding agricultural Soils. *Science of the Total Environment*, 594: 787-795.
- Marcano, E. 2006. Efectos del cadmio sobre los niveles de glutatión reducido (GSH) y actividades de enzimas antioxidantes en relación con la peroxidación de lípidos en la lombriz de tierra *Eisenia foetida* (Annelida: Oligochaeta). Trabajo de grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Marcano, E.; Marcano, L.; Cortesía, A. y Nusetti, O. 2013. Efectos de clorpirifos y malation en la lombriz de tierra *Eisenia sp.* (Annelida: Oligochaeta). *Saber*, 4(1): 156-166.
- Marcano, L.; Hernández, J.; Zapata, E. y León, A. 2017. Effects of contaminated natural soil by Glyphosan SL on biochemical responses of the earthworm *Eisenia sp.* *Journal of Toxicology and Environmental*, 9(10): 92-97.
- Marcano, L.; Quiaro, S.; Polo, A. y Marcano, E. 2009. *Efectos del herbicida glifosato sobre el crecimiento y la reproducción de la lombriz de tierra Eisenia spp.* (Annelida: Oligochaeta). Resúmenes. VIII Congreso Peruano de Ecotoxicología Terrestre SETAC. Lima, Perú. Págs. 72-75.
- Matuseviciute, A. y Eitminaviciute, I. 2005. Effects of different cadmium concentrations on survival, reproduction and adaptation of *Eisenia fetida californica*. *Acta Zoologica Lituanica*, 15(4): 361-369.
- Mekahlia, M.; Tine, S.; Menesria, T.; Amieur, H. y Salhi, H. 2016. *In vitro* biomarker responses of earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to herbicide sekator and phosphate fertilizer. *Water Air and Soil Pollution*, 227: 1-8.
- Meyer, J.; Smith, J.; Winston, G. y Di Gilio, R. 2003. "Antioxidant defenses in killifish

- (*Fundulus heteroclitus*) exposed to contaminated sediments and model prooxidants: short-term and heritable responses". *Aquatic Toxicology*, 65: 377-395.
- Mirmonsef, H.; Hornum, H.; Jansen, J. y Holmstrup, L. 2017. Effects of and aged copper contamination on distribution of earthworms, reproduction and cocoon hatchability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 135: 267-275.
- Morgan, A.; Turner, M. y Morgan, J. 2002. Morphological plasticity in metal sequestering earthworm ciliated cells: morphometric electron microscopy provides a biomarker of exposure in field populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 610-618.
- Morillo, E.; Undabeytia, T. y Maqueda, C. 1997. Adsorption of glyphosate on the clay mineral montmorillonite: Effects of Cu (II) in solution and adsorbed on the mineral. *Environmental and Science Technology*, 31(12): 3588-3592.
- Mosleh, Y.; Paris-Palacios, S. y Biagiante-Risbourg, S. 2006. Metallothionein induction and antioxidant response in aquatic worms *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to copper. *Chemosphere*, 12: 64-121.
- Mosleh, Y.; Paris-Palacios, S.; Ahmed, M.; Mahmoud, F.; Osman, F. y Biagiante-Risbourg, S. 2007. Effects of chitosan on oxidative stress and metallothionein in aquatic worm *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae). *Chemosphere*, 67(1): 167-175.
- Mustonen, M.; Haimi, J.; Vaisanen, A. y Knott, K. 2014. Metallothionein gene expression differs in earthworm populations with different exposure history. *Ecotoxicology*, 23(9): 1-12. DOI: 10.1007/s10646-014-1338-z.
- OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development). 2004. *Guideline for testing of chemicals. No. 222, earthworm reproduction test (Eisenia fetida/andrei)*. Paris, France.
- Pernia, B.; De Sousa A.; Reyes, R. y Castrillo, M. 2008. Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *Interciencia*, 33(2): 112-119.
- Piola, L.; Fuchs, J.; Oneto, M.; Basack, S.; Kesten, E. y Casabe, N. 2013. Comparative toxicity of two glyphosate-based formulations to *Eisenia andrei* under laboratory conditions. *Chemosphere*, 95: 545-551.
- Polo, A.; Marcano, L.; Granadillo, M.; Marcano, E.; Cortesia, C. y Hernandez, J. 2011. Crecimiento y reproducción de la lombriz roja californiana (*Eisenia andrei*) en sustratos con cadmio. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 45(2): 123-134.
- Rabideau, C. 2001. Pesticide mixtures induce immunotoxicity: potentiation of apoptosis and oxidative stress. Tesis de maestría. Postgrado en Toxicología Ambiental y Medicina Veterinaria, Colegio Regional de Ciencias Veterinaria. Virginia-Maryland, Estados Unidos.

- Rai, N. y Bansiwala, K. 2009. Impact of sublethal doses of an organophosphate pesticide-malathion on growth and reproduction of earthworm *Eisenia foetida* (Savigny 1826). *The Ecoscan*, 3(1-2): 87-91.
- Rana, A.; Dutta, A.; Naaz, M.; Kumari, S. y Farooqui, S. 2013. Uptake and kinetics of bioaccumulation of heavy metals (lead and cadmium) from contaminated soil using *Eisenia foetida*. *Research y Reviews: Journal of ecology*, 2: 8-14.
- Ratcliff, A.; Busse, M. y Shestak, C. 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology*, 34: 114-124.
- Ratkevicius, N.; Correa, J. y Moenne, A. 2003. Copper accumulation, synthesis of ascorbate and activation of ascorbate peroxidase in *Enteromorpha compressa* (L.) Grev. (Chlorophyta) from heavy metal-enriched environments in northern Chile. *Plant, Cell and Environment*, 26: 1599-1608.
- Salvio, C.; Menone, M.; Rafael, S.; Iturburu, F. y Manetti, P. 2016. Survival, reproduction, avoidance behavior and oxidative stress biomarkers in the earthworm *Octolasion cyaneum* exposed to glyphosate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96(3): 314-319.
- Sánchez-Moreno, S.; Castro, J.; Alonso-Prados, E.; Alonso-prados, J.; García-Baudin, J.; Talavera, M. y Durán-Zuazo, V. 2014. Tillage and herbicide decrease soil biodiversity in olive orchards. *Agronomy Sustainable Development*, 35(2): 691-700.
- Santos, M.; Ferreira, M.; Cachada, A.; Duarte, A.; Sousa, J. 2012. Pesticide application to agricultural fields: effects on the reproduction and avoidance behaviour of *Folsomia candida* and *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology*, 21: 2113-2122.
- Santos, M.; Morgado, R.; Ferreira, N.; Soares, A. y Loureiro, S. 2011. Evaluation of the joint effect of glyphosate and dimethoate using a small-scale terrestrial ecosystem. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 1994-2001.
- Santos, M.; Soares, A. y Loureiro, S. 2010. Joint effects of three plant protection products to the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus* and the collembolan *Folsomia candida*. *Chemosphere*, 80: 1021-1030.
- Sarkar, A.; Ray, D. y Shrivastava, N. 2006. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, 3: 1-8.
- Scott-Fordsmand, J. y Weeks, J. 2000. Biomarkers in earthworms. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 165: 117-159.
- Shi, Y.; Shi, Y.; Wang, X.; Lu, Y. y Yan, S. 2007. Efectos comparativos del lindano y deltametrina sobre la mortalidad, el crecimiento y la actividad de la celulasa en lombrices (*Eisenia fetida*). *Journal of Biochemistry and Physiology*, 89: 31-38.
- Southan, C. y Erlich, J. 1943. Effects of extract of western red-cedar heartwood of certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology*, 33: 517-524.

- Springett, J. y Gray, R. 1992. Effect of repeated low doses of biocides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa* in laboratory culture. *Soil Biology and Biochemistry*, 24: 1739-1744.
- Spurgeon, D y Hopkin, S. 1996. Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference to zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35(1): 86-95.
- Spurgeon, D.; Svendsen, C.; Kille, P.; Morgan, A. y Weeks, J. 2004. Responses of earthworms (*Lumbricus rubellus*) to copper and cadmium as determined by measurement of juvenile traits in a specifically designed test system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 54-64.
- Spurgeon, D.; Svendsen, C.; Lister, L.; Hankard, P. y Kille, P. 2005. Earthworm responses to Cd and Cu under fluctuating environmental conditions: a comparison with results from laboratory exposures. *Environmental Pollution*, 136(3): 443-452.
- Steenbergen, N.; Iaccino, F.; De Winkel, M.; Reijnders, L. y Peijnenburg, W. 2005. Development of a biotic ligand model and a regression model predicting acute copper toxicity to the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Environmental Science and Technology*, 39: 5694-5702.
- Stellin, F.; Gavinelli, F.; Stevanato, P.; Concheri, G. Squartini, A, y Paoletti, M. 2017. Effects of different concentrations of glyphosate (Roundup 360®) on earthworms (*Octodrilus complanatus*, *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa*) in vineyards in the North-East of Italy. *Applied Soil Ecology*, 11: 1-7.
- Stephan, E. 1977. Methods for calculating LC₅₀. En: *Aquatic toxicology and hazard evaluation, ASTM SPT 634*. Mayer, F. y Hamilink, J (eds). American Society for Testing Material. Philadelphia, Estados Unidos. Págs. 65-84.
- Sturzbaum, S.; Georgiev, O.; Morgen, J. y Kille, P. 2004. Cadmium in earthworms: from genes to cells. *Environmental Science and technology*, 88: 6283-6289.
- Sürzenbaum, S.; Winters, C.; Galay, M.; Morgan, A. y Kille, P. 2001. Metal ion trafficking in earthworms: identification of a cadmium-specific metallothionein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36): 34013-34018.
- Suzuki, K.; Yamamura, M. y Mori, T. 1980. Cadmium-binding proteins induced in the earthworm. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 9: 415-424.
- Tai, T.; Lin, Y. y He, J. 2008. Effect of Cu, Pb single and combined pollution on total soluble protein content and SOD activity of the *Eisenia foetida* earthworm in soils. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 27: 1985-1990.
- Tsui, M.; Wang, W. y Chu, L. 2005. Influence of glyphosate and its formulation (Roundup (R)) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Pollution*, 138: 59-68.

- Ulloa, M.; Bustos, V.; Neaman, A. y Gaete, H. 2018. Comportamiento de evasión y reproducción de la lombriz *Eisenia foetida* en suelos agrícolas impactados por actividades mineras. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 34(1): 11.
- Unrine, J.; Tsyusko, O.; Hunyadi, S.; Judy, J. y Bertsch, P. 2010. Effects of particle size on chemical speciation and bioavailability of copper to earthworms (*Eisenia foetida*) exposed to copper nanoparticles. *Journal of Environmental Quality*, 39: 2-13.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1993. *EPA Reregistration Eligibility Document Glyphosate. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances*. United States Environmental Protection Agency Washington DC, Estados Unidos.
- Uwizeyimana, H.; Wang, M.; Cheng, W. y Khan, K. 2017. Efectos ecotoxicológicos de mezclas binarias de siduron y Cd en la expresión de ARNm en la lombriz de tierra *Eisenia foetida*. *La ciencia del medio ambiente total*, 610: 657-665.
- Vereecken, H. 2005. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science*, 61: 1139-1151.
- Verrell, P. y Buskirk, V. 2004. As the worm turns: *Eisenia foetida* avoids soil contaminated by a glyphosate-based herbicide. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72: 219-224.
- Vidal, D. y Horne, A. 2003. Mercury toxicity in the aquatic oligochaete *Sparganophilus pearsei* II: autotomy as a novel form of protection. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45: 462-467.
- Wang, M.; Cheng, F. y Si, Y. 2009a. The inhibition of the combined pollution of copper and glyphosate to the seed germination and root elongation of wheat. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 4: 591-596.
- Wang, Q.; Zhou, D. y Cang, L. 2009b. Microbial and enzyme properties of apple orchard soil as affected by long-term application of copper fungicide. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 1504-1509.
- Wang, Y.; Zhou, D.; Sun, R.; Cang, L. y Hao, X. 2006. Coabsorption of zinc and glyphosate on two soils with different characteristics. *Journal of Hazardous Materials*, 137: 76-82.
- West, H.; Morgan, A.; Bowker, D. y Herbert, R. 2003. Evidence for interpopulation differences in life history parameters of adult and F1 generation *Lumbricus rubellus*. *Pedobiologia*, 47(5): 535-541.
- Wieser, W. y Krumschnabel, G. 2001. Hierarchies of ATP-consuming processes: direct compared with indirect measurements, and comparative aspects. *Biochemical Journal*, 355: 389-395.
- Yang, G.; Chen, C.; Yuchuiyu, Y.; Wen, Z.; Yanhua, W.; Leiming, W.; Yueping, C. y

- Wanga, E. 2018. Efectos combinados de cuatro pesticidas y cromo de metales pesados en la lombriz de tierra utilizando el comportamiento de evitación como punto final. *Ecotoxicología y Seguridad Ambiental*, 157(15): 191-200.
- Zaller, J.; Heigl, F.; Ruess, L. y Grabmaier, A. 2014. Glyphosate herbicide affects below ground interactions between earthworms and symbiotic mycorrhizal fungi in a model ecosystem. *Scientific Reports*, 4: 56-34.
- Zaltauskaite, L. y Sodiene, E. 2014. Effects of cadmium and lead on the life-cycle parameters of juvenile earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 103: 9-16.
- Zhang, J.; Yu, J.; Ouyang, Y. y Xu, H. 2013. Responses of earthworm to aluminum toxicity in latosol. *Environmental Science and Pollution Research*, 20: 1135-1141.
- Zhang, L.; Duan, X.; He, N.; Chen, X.; Shi, J.; Li, W.; Xu, L. y Li, H. 2017. Exposure to lethal levels of benzo[a]pyrene or cadmium trigger distinct protein expression patterns in earthworms (*Eisenia foetida*). *Science of the Total Environment*, 595: 733-742.
- Zhang, L.; He, N.; Chang, D.; Liu, X.; Zhang, X.; Xu, Y.; Zhao, C.; Sun, J.; Li, W.; Li, H.; Hu, F. y Xu, L. 2018. Does ecotype matter the influence of ecophysiology on benzo[a] pyrene and cadmium accumulation and distribution in earthworms. *Soil Biology and Biochemistry*, 121: 24-34.
- Zhang, L.; Zhou, L.; Han, L.; Zhao, C.; Norton, J.; Huixin, L.; Hu, F. y Xu, L. 2019. Benzo(a)pyrene inhibits the accumulation and toxicity of cadmium in subcellular fractions of *Eisenia foetida*. *Chemosphere*, 219: 740-747.
- Zhang, W.; Chen, L.; Liu, K.; Chen, L.; Lin, K.; Guo, J.; Liu, L.; Cui, C. y Yan, Z. 2014. Lead accumulations and toxic effects in earthworms (*Eisenia fetida*) in the presence of decabromodiphenyl ether. *Environmental Science and Pollution Research*, 21: 3484-3490.
- Zheng, K.; Liu, Z.; Li, Y.; Cui, Y. y Li, M. 2013. Toxicological responses of earthworm (*Eisenia fetida*) exposed to metal contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 20: 8382-8390.
- Zhou, C.; Wang, Y.; Li, C.; Sun, R.; Yu, Y. y Zhou, D. 2013. Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental and Pollution*, 180: 71-77.
- Zhou, C.; Wang, Y.; Yu, Y.; Sun, R.; Zhu, X.; Zhang, H. y Zhou, D. 2012. Does glyphosate impact on Cu uptake by, and toxicity to, the earthworm *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology*, 21: 2297-2305.
- Zhou, J.; Yang, L.; Wang, C.; Choi, E. y Kim, S. 2017. Enhanced performance of the methylerythritol phosphate pathway by manipulation of redox reactions relevant to IspC, IspG, and IspH. *Journal of Biotechnology*, 248: 1-8.

Zhou, X.; Zhang, Q. y Liang, J. 2006. Toxic effects of acetochlor and methamidophos on earthworm *Eisenia fetida* in phaiozem, northeast China. *Journal Environmental Science*, 18: 741-745.

APÉNDICES

Apéndice 1. Biomasa de *E. andrei* juveniles controles y expuestas por 42 días a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre /kg de sustrato) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg mezclado con 3 g de cobre/kg y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato). (Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad).

Fuente de Variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
A:Tiempo	4,0513	2	2,0257	41,39	0,0000
B:Quimico	5,2021	6	0,8670	17,72	0,0000
Interacciones					
AB	2,1254	12	0,1777	3,62	0,0002
Residuos	5,1389	105	0,0489		
Total (corregido)	16,5179	125			

Apéndice 2. Prueba de múltiple rangos para la biomasa de *E. andrei* juveniles controles y expuestas a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg mezclado con 3 g de cobre/kg y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato).(PR: Porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos).

NIVEL	PR	Media	DE	HG
Control	18	0,8349	0,0262	
MEZ1	18	0,8461	0,0262	
MEZ2	18	0,8758	0,0262	
Cu2	18	0,9310	0,0262	
Cu1	18	0,9440	0,0262	
GFS2	18	1,0846	0,0262	
GFS1	18	1,1115	0,0262	

Apéndice 3. Prueba de múltiple rangos para la biomasa para biomasa de *E. andrei* juveniles controles y expuestas por 7, 21 y 42 días a dosis subletales de glifosato, cobre y mezclas de glifosato y cobre. (PR: Porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos).

NIVEL	PR	Media	DE	GH
42 Días	42	0,8214	0,0196	
21 Días	42	0,9600	0,0196	
7 Días	42	1,0591	0,0196	

Apéndice 4. Concentración de proteínas totales en *E. andrei* juveniles controles y expuestas por 42 días a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g/kg) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg mezclado con 3 g de cobre/kg y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato). (Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad).

Fuente de Variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
A:Tiempo	120550	2	60274,8	86.56	0,0000
B:Quimico	6143,39	6	1023,9	1,47	0,1922
Interacciones					
AB	160910	12	13409,9	19,26	0,0000
Residuos	102359	147	696,322		
Total (corregido)	389962	167			

Apéndice 5. Prueba de múltiple rangos para la concentración de proteínas totales de *E. andrei* juveniles controles y expuestas por 7, 21 y 42 días a dosis subletales de glifosato, cobre y mezclas de glifosato y cobre. (PR: Porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos).

NIVEL	PR	Media	DE	GH
42 Días	56	100,826	3,52623	
7 Días	56	134,864	3,52623	
21 Días	56	166,425	3,52623	

Apéndice 6. Número de ootecas depositado por *E. andrei* controles y expuestas por 42 a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg mezclado con 3 g de cobre/kg y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato). Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de Variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
A: Tiempo	24,49522	5	4,89	2,32	0,0457
B: Tratamiento	715,5246	6	119,25	56,50	0,0000
Interacciones					
AB	49,904812	39	1,66	0,79	0,7775
Residuos	355,2105	168	2,11		
Total (corregido)	1145,12	209			

Apéndice 7. Prueba múltiple rangos para número de ootecas depositado por *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2=1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg mezclado con 3 g de cobre/kg y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato). (PR: Porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos).

NIVEL	PR	Media	DE	GH
Cu2	35	0,5667	0,265474	
MEZ2	35	0,8	0,265474	
Cu1	35	0,9	0,265474	
MEZ1	35	0,9667	0,265474	
GFS2	35	2,0	0,265474	
GFS1	35	4,1333	0,265474	
Control	35	5,7	0,265474	

Apéndice 8. Contraste múltiple de rangos para número de ootecas depositado por *E. andrei* controles y expuestas por 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días a dosis subletales de glifosato, cobre y mezclas de glifosato y cobre. (PR: Porcentaje de recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos).

NIVEL	PR	Media	DE	GH
21 DIAS	35	1,82857	0,245781	
42 DIAS	35	1,85714	0,245781	
28 DIAS	35	1,94286	0,245781	
35 DIAS	35	2,08571	0,245781	
14 DIAS	35	2,42857	0,245781	
7 DIAS	35	2,77143	0,245781	

Apéndice 9. Prueba de Kruskal-Wallis para tiempo de eclosión de las ootecas puestas por *E. andrei* controles y expuestas por 42 días a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg mezclado con 3 g de cobre/kg y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato).

	Prueba estadística	P
Tiempo	2,69676	0,746614
Tratamiento	54,3645	6,2282x10 ⁻¹⁰

Apéndice 10. Prueba de Kruskal-Wallis para número de lombrices emergidas por ootecas eclosionadas por *E. andrei* controles y expuestas por 42 días a dosis subletales de glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y a mezclas de glifosato y cobre (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg mezclado con 3 g de cobre/kg y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato).

	Prueba estadística	P
Tiempo	9,97438	0,0759644
Tratamiento	176,448	0,0

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DEL GLIFOSATO EN LA TOXICIDAD DEL COBRE SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA REPRODUCCIÓN DE LA LOMBRIZ DE TIERRA CALIFORNIANA <i>Eisenia andrei</i> (ANNELIDA: OLIGOCHAETA)
Subtítulo	

Autor (es):

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Castillejo P. Adriana J.	CVLAC	24 514 544
	e-mail	<i>adricst94@gmail.com</i>
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Crecimiento
Reproducción
<i>E. andrei</i>
Glifosato
Cobre

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Biología

Resumen (abstract):

En este estudio se evaluaron los efectos del glifosato, Cu y mezclas de ambos en la reproducción y el crecimiento de *E. andrei* expuesta a suelos con el herbicida (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato, GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato), el metal (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato, Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato) y mezclas de ambos (Mez1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 3 g de cobre/kg de sustrato y Mez2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato mezclado con 1,5 g de cobre/kg de sustrato) durante 7, 21 y 42 días. Para evaluar el efecto de estos químicos sobre la biomasa, se tomó el peso en gramos (g) de los anélidos y la concentración de proteínas totales haciendo uso del tejido corporal. El efecto del GFS, Cu y mezclas sobre la reproducción se realizó utilizando lombrices de tierra cliteladas haciendo uso de parámetros reproductivos tales como, número de ootecas depositadas, tiempo de incubación de las ootecas, porcentaje de eclosión y el número de individuos eclosionados de las ootecas depositadas por *E. andrei* sujetas a las dosis subletales de los químicos. Durante las tres primeras semanas de exposición la biomasa incrementó en las lombrices sujetas a todos los tratamientos, asociados estos resultados con un efecto de hormesis. Mientras que descensos en el peso de los organismos expuestos demuestran que en tiempos prolongados de exposición el efecto de hormesis puede ser revertido debido al gasto energético invertido en hacerle frente a la exposición de los químicos. Las concentraciones de proteínas presentes en el tegumento de las lombrices expuestas a los químicos variaron en función al tiempo y los tratamientos, encontrándose concentraciones más elevadas a los 21 días del bioensayo los cuales se asociaron probablemente con la activación de los mecanismos encargados de contrarrestar la toxicidad causada por los químicos. Descensos en la puesta de ootecas, números de lombrices por ootecas e incrementos en el tiempo de incubación se asociaron posiblemente a la acción del glifosato, Cu y mezclas de ambos sobre estructuras reproductivas como el clitelo, al efecto directo de EROs generadas por acción del glifosato y el Cu con la formación de gametos, al desvío de los recursos normalmente disponibles para la reproducción hacia las funciones de detoxificación para aumentar las probabilidades de supervivencia de los organismos y al debilitamiento del mecanismo de defensa antioxidante a medida que avanzó la exposición. Los biomarcadores de crecimiento y reproducción evaluados en *E. andrei* fueron sensibles a la exposición de los químicos y las respuestas obtenidas en las lombrices luego de la exposición al herbicida y el metal permitieron inferir que las concentraciones de glifosato utilizadas no atenuaron la toxicidad del Cu en las lombrices de tierra.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Marcano G. Elena C.	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	14 670 813
	e-mail	<i>elenamarcano_24hotmail.com</i>
	e-mail	
Marcano. Leida del V.	ROL	CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8 219 437
	e-mail	<i>Leimar5@gmail.com</i>
	e-mail	
Velásquez V. Patricia A.	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	17 446 999
	e-mail	<i>Patriciavelasquezv@gmail.com</i>
	e-mail	
Liscano C. Ahieska A	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	15 290 905
	e-mail	<i>Aye27le@hotmail.com</i>
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2020	02	12

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo (s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TG-castillejoa.doc	Word 1997-2003

Alcance:

Espacial: Nacional (Opcional)

Temporal: Temporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado en Biología

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado

Área de Estudio: Biología

Institución (es) que garantiza (n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE, NÚCLEO DE SUCRE

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *[Firma]*
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

[Firma]



JUAN A. BOLANOS CUNVELO
Secretario

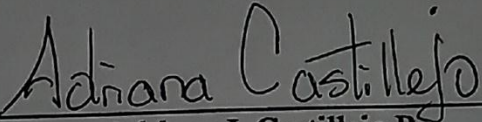
C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

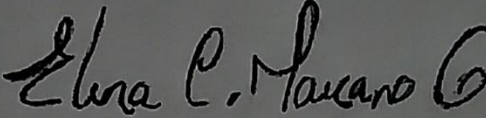
JABC/YGC/marija

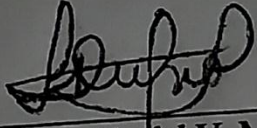
Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.


Adriana J. Castillejo P.
AUTORA


Elena C. Marcano G.
TUTORA


Leida del V. Marcano.
CO-TUTORA