

Informe final publicable de proyecto NUEVO ENFOQUE EN LA EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE HERBICIDAS

Código de proyecto ANII: FMV_3_2020_1_162379

01/06/2023

GARCÍA CARRIQUIRY, Isabel (Responsable Técnico - Científico)

AZZIZ DE LOS SANTOS, Julio Gastón (Investigador)

BARTABURU DEBALI, Victoria (Investigador)

FERNANDEZ CHILDS, Grisel Mariom (Investigador)

MAZZILLI VANZINI, Sebastián Ramón (Investigador)

MONTAÑEZ MASSA, Adriana (Investigador)

NIELL MENEGAZZI, María Silvina (Investigador)

TRASANTE VALERIO, Tania Valentine (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO REGIÓN LITORAL NORTE (Institución Proponente) \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE AGRONOMÍA \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS \\
FACULTAD DE AGRONOMÍA. FUNDACIÓN DR. EDUARDO ACEVEDO

Resumen del proyecto

El manejo de malezas es uno de los mayores desafíos que enfrenta la producción agrícola en la actualidad y los herbicidas, la herramienta de control más utilizada pese a la creciente preocupación sobre sus potenciales impactos sobre organismos no-blanco y los servicios ecosistémicos que estos proveen.

Los potenciales efectos de los herbicidas, en las mezclas y secuencias tal como son aplicados al presente fueron evaluados en el cultivo de soja en Uruguay, sobre parámetros y organismos directamente vinculados a diferentes funcionalidades del suelo de importancia tanto ecológica como productiva. Siendo nuestro principal objetivo estudiar nuevas formas de evaluación ecotoxicológica de herbicidas que permitan proteger eficazmente los agroecosistemas.

En general, se pudieron evaluar los efectos del uso de herbicidas bajo condiciones climáticas, edáficas y de manejo en escenarios reales de nuestro país, considerando su interacción con organismos nativos. Según indican los análisis realizados hasta el momento, algunas de las variables de respuesta que fueron afectadas por los tratamientos herbicidas fueron concentración de fósforo en planta, formación de arbusculos y vesículas por hongos micorrizicos arbusculares, actividad de la mesofauna, y el potencial supresor de patógenos. Estas diferencias no repercutieron en el rendimiento estimado de las plantas en dichos tratamientos, lo cual hace más difícil visualizar el problema a campo. Este trabajo confirma la dificultad que presenta la experimentación a campo para probar resultados con elevada variabilidad, aun cuando en condiciones controladas ciertos efectos nocivos ya fueron probados.

A nivel nacional, este proyecto permitió brindar la información generada al sector productivo mediante diversas actividades de divulgación, donde se dio a conocer esta línea de investigación, y se construyó una red de diálogo con técnicos, productores y organismo regulador acerca de los riesgos asociados al uso de fitosanitarios en nuestros agroecosistemas. También se logró divulgar la problemática en cuestión y comunicar lo que hacemos para contribuir a su solución en otras esferas de la sociedad (niños y público en general). En el futuro inmediato este proyecto pretende lograr alcance internacional a través de dos publicaciones científicas que se encuentran en preparación.

Ciencias Agrícolas / Agricultura, Silvicultura y Pesca / Agricultura / Impacto de herbicidas en suelo

Palabras clave: Herbicidas / funcionalidades del suelo / /

Introducción

Los herbicidas son un componente clave del proceso de intensificación agrícola, siendo de hecho la herramienta más importante hasta el presente, para controlar las malezas en los sistemas productivos donde se practica la siembra directa (Coleman, Stead et al. 2019). Dado el creciente número de malezas resistentes, así como la relación costo/beneficio de los herbicidas, se espera que el uso de herbicidas continúe creciendo (Maggi, Tang et al. 2019). Sin embargo, los efectos de los herbicidas sobre organismos no-blanco plantean serias preocupaciones a nivel ambiental. La ecotoxicología surge como un soporte al proceso de toma de decisiones en función de proteger el ambiente, generando y proveyendo evaluaciones de riesgo ecológico concisas (European Commission, 2003). Los primeros artículos en ecotoxicología de suelos datan de los años 60 y revelan efectos tóxicos de pesticidas en invertebrados. Posteriormente los experimentos evaluando toxicidad de diferentes contaminantes se estandarizaron, y entre los años 80 y 90 se agregaron especies y parámetros de estudio sub-letales a los protocolos. A partir del 2000 comenzaron a estudiarse los efectos de mezclas de activos e interacciones con otros factores de estrés sobre la toxicidad de las especies. Dichos experimentos de evaluación de toxicidad son utilizados tradicionalmente para realizar curvas de dosis-respuesta, se encuentran estandarizados por los organismos ISO y OECD, y son la base del análisis de riesgo ecotoxicológico utilizado por los entes que regulan la salida al mercado de los fitosanitarios (van Gestel 2012).

El abordaje actual utilizado para determinar los riesgos ecotoxicológicos sufre serios y diversos cuestionamientos, principalmente por no considerar la exposición real a nivel paisaje en escala espacial y temporal (Topping, Aldrich et al. 2020). Se ha puesto en duda la utilidad final de los resultados obtenidos y se sugiere re-pensar la forma en que se llevan a cabo los estudios de modo de asegurar la efectividad en la protección los ecosistemas (Filser, Koehler et al. 2008, Tincani and Cestari 2018). Si bien, la peligrosidad de los fitosanitarios se prueba individualmente previo a su comercialización para asegurar que no presenten riesgos inaceptables, esta evaluación se basa generalmente en pruebas de laboratorio estandarizadas en cuanto a las condiciones, las especies y los parámetros que se utilizan, siendo los experimentos de campo indicados solo en condiciones especiales. Varios de los supuestos empleados para el análisis de riesgo hasta la fecha han sido cuestionados sobre su efectividad real para proteger los sistemas de producción bajo las condiciones

actuales de uso de los fitosanitarios (Topping, Aldrich et al. 2020). Las principales limitantes relevadas en estos procesos son:

- Esquemas de aplicación: los herbicidas generalmente se aplican en mezclas de diferentes ingredientes activos para garantizar un control más eficaz de las malezas y/o para prevenir problemas de resistencia. Aunque su efecto a nivel agronómico se analiza exhaustivamente, poco se sabe de sus efectos sobre organismos no-blanco. Sumado a esto, los diferentes ingredientes activos solos o combinados se aplican con alta frecuencia (Topping, Aldrich et al. 2020). Se ha demostrado en sistemas agrícolas similares a los nacionales que la tasa de aplicación de algunos herbicidas es mayor que su disipación, lo que significa que se están acumulando en los suelos (Primost, Marino et al. 2017). El factor de aplicación múltiple es considerado en ocasiones para calcular la concentración de contaminante, sin embargo, el efecto ecotoxicológico de las aplicaciones sucesivas sobre comunidades no objetivo puede tener resultados diferentes que evaluar simplemente la dosis acumulada.

- Condiciones de prueba: los protocolos utilizados en los estudios ecotoxicológicos consideran condiciones estándar de prueba acotados a determinada temperatura, horas de luz y humedad. Sin embargo, en ecosistemas reales los fitosanitarios se combinan con diversas condiciones de estrés (exceso o déficit hídrico, altas o bajas temperaturas, contaminantes ya presentes en el suelo), que afectan la susceptibilidad biológica y las respuestas a los contaminantes, resultando probablemente en una subestimación de los riesgos (Løkke, Ragas et al. 2013). Resulta difícil e incierta la correlación de resultados obtenidos en laboratorio con respuestas en el entorno natural o de campo, lo que conduce a una muy baja reproducibilidad de los resultados (Tincani and Cestari 2018).

- Parámetros de evaluación: no solo deberían estudiarse organismos sensibles, sino que como plantean (Karpouzias, Tsiamis et al. 2016) debería incorporarse el estudio de bioindicadores relevantes de la de la salud y las funciones del suelo como oxidantes de amoníaco y micorrizas. Además, la determinación del cuando evaluar los efectos de los fitosanitarios y por cuanto tiempo contemplando la potencial persistencia de los efectos también es un factor clave en la evaluación de sus impactos.

- Resiliencia: considerar solo parcialmente este aspecto también es irreal. Esta capacidad es inherente a cada sistema y depende del bioma presente en el momento de la exposición. De hecho, el desarrollo de organismos del suelo y plantas/cultivos se verá afectado de manera diferente dependiendo de los manejos previos. Por lo que resulta vital evaluar los impactos a nivel local, así como su potencial recuperación y el punto de no-retorno.

El grupo de los principales asesores científicos, de los Procesos de autorización de productos fitosanitarios de la European Commission reconocido como uno de los más estrictos a nivel mundial, plantea en su informe de opinión (2018) la necesidad de abordar varios de estos puntos y enfatizan particularmente la necesidad contemplar los volúmenes y mezclas que se utilizan, simultánea o consecutivamente, y su modo de aplicación, para evaluar mejor los efectos acumulativos y sinérgicos.

Resulta entonces necesario y urgente un cambio en el paradigma bajo el cual se estudian los impactos, ya que esto incide en cómo se regula y autoriza el uso de fitosanitarios (Topping, Aldrich et al. 2020).

El problema que se aborda tiene relevancia a nivel mundial y específicamente para el país. Las deficiencias que se enfrentan a nivel de la evaluación ecotoxicológica de herbicidas y otros agroquímicos al presente han sido denunciadas por las más reconocidas entidades involucradas en la regulación tanto de la aprobación como del uso de estos productos. En muchos ámbitos se considera de urgencia la implementación de una estructura base para el estudio del impacto de los fitosanitarios que permita proteger, de manera confiablemente efectiva, los ecosistemas y sus servicios, sosteniendo niveles de riesgo aceptables. La preocupación es compartida por variados sectores, sociales, productivos y también políticos en la medida en que los impactos potenciales pueden afectar el ambiente globalmente. El presente proyecto pretende contribuir en el proceso de mejora de la evaluación ecotoxicológica de herbicidas aportando al diseño de la compleja matriz requerida. A tales efectos, se propone estudiar el impacto de herbicidas no sobre bioindicadores aislados sino sobre al menos 3 funcionalidades del suelo determinando los efectos sobre los organismos involucrados pero también evaluando la respuesta vegetal a través de la ejecución de una batería de ensayos, muchos de los cuales no forman parte de los protocolos habituales y considerando además esquemas reales de aplicación de herbicidas. Este cambio en el abordaje de los efectos de los herbicidas tiene en cuenta las interacciones como parte de los sistemas agrícolas, así como las condiciones estresantes o naturalmente variables (deficiencias o excesos hídricos, altas o bajas temperaturas). Este tipo de resultados es de crucial importancia para los entes regulatorios de registro de fitosanitarios, dado que esta matriz se alinea con la complementariedad buscada para los actuales protocolos de registro. Por otra parte, se espera que los resultados de esta investigación permitan dimensionar los riesgos asociados a nuestros actuales sistemas de producción agrícola, y arrojen luz sobre incógnitas que se plantean a nivel productivo concernientes a los efectos acumulados del abusivo uso de herbicidas. La generación de conocimiento y puesta en marcha de una batería de ensayos permitiría

monitorear los efectos en las funcionalidades del suelo, impidiendo llegar a puntos de no-retorno en los sistemas agrícolas nacionales.

El objetivo general de este proyecto es determinar el impacto del uso de herbicidas, en condiciones reales de producción y tal como son utilizados en actualidad con alta frecuencia, elevadas cantidades y mezclas de activos, sobre funcionalidades claves del suelo. Específicamente, se evalúan algunas variables que afectan el crecimiento de plantas, el ciclaje de nutrientes y el potencial de supresión de patógenos. Por un lado, es información de valor para el sector agrícola nacional al posibilitar conocer el grado en el que se pueda estar afectando la salud del suelo bajo las prácticas agrícolas actuales. Al presente se ignora a nivel local qué tipo de procesos vitales pueden verse afectados por esta práctica y qué repercusión puede tener sobre el sistema productivo. Por otro, también pretende constituir información valiosa para las agencias reguladoras de fitosanitarios y los responsables políticos en general. Los resultados permitirán dimensionar el aporte de la evaluación de parámetros y bioindicadores adicionales, así como el beneficio que supone la inclusión de esquemas de aplicación reales y factores estresantes operando a campo en la mejora de los actuales protocolos de evaluación.

Las contribuciones se constituirían posteriormente en recomendaciones que se prevén dirigidas en a entidades reguladoras, que tienen a cargo de la valoración ecológica del riesgo de uso de fitosanitarios. De esta forma brindar una herramienta que permita mejorar y ampliar la valoración de los efectos sobre sistemas reales de producción. También se prevén dirigidas a agricultores y partes interesadas mediante talleres que busquen arrojar luz sobre las incógnitas que se presentan frente al uso creciente de herbicidas, permitiendo transmitir parte de la cuantificación de los efectos sobre las funcionalidades del suelo estudiadas.

Al mismo tiempo se pretende que el proyecto genere una fuerte contribución a la formación continua de profesionales y estudiantes de carreras vinculadas al agro y/o evaluación de riesgo ambiental. Así como a la comunidad científica en general, a través de artículos científicos y conferencias, para que sobre esta base pueda continuarse perfeccionando el enfoque, y caminar hacia sistemas de producción agrícolas sustentables.

Metodología/diseño del estudio

Se planteó una investigación combinada de experimentos a campo, en los que se generaron los efectos a determinar, y posteriormente fueron estimados en ensayos y determinaciones complementarias de laboratorio. Estos efectos fueron integrados mediante estimaciones del crecimiento del cultivo. La etapa experimental a campo se realizó en la Estación Experimental Mario A. Cassinonni (Paysandú), y fue repetido 2 años (ciclo 2020-2021 y ciclo 2021-2022), en sitios adjuntos, de modo de evaluar los efectos bajo condiciones climáticas diferentes. Cada experimento se extendió aproximadamente desde un mes antes de la siembra de soja hasta su cosecha. Se utilizó un diseño de 3 bloques completos al azar, y parcelas de 45 m² cada una. La secuencia de cultivos comenzó con moha (*Setaria itálica*) en enero 2020, y continuó con rotación avena-soja, bajo siembra directa. En este proyecto se analizaron las muestras de suelo tomadas en el primer ciclo (2020-2021) almacenadas en freezer hasta su análisis en conjunto con las muestras del segundo ciclo (2021-2022).

Se realizaron 9 tratamientos: tratamiento 0 es el control sin herbicidas y desmalezado a mano, el tratamiento 1 corresponde al paquete completo de herbicidas (3 aplicaciones de mezclas de herbicidas), los tratamientos 2 al 7 son combinaciones diferentes de estas aplicaciones, el tratamiento 8 es el mismo que el 1 pero considerando doble dosis para evaluar el peor escenario.

Los herbicidas seleccionados se ubican dentro de los veinte fitosanitarios más utilizados en el cultivo de soja a nivel mundial, y se prevé que aumente su uso para 2025 (Maggi, Tang et al. 2019). La aplicación secuencial de herbicidas residuales es una estrategia ampliamente extendida para controlar *Amaranthus palmeri* (Papa and Tuesca, Chahal, Ganie et al. 2018), una de las malezas más problemáticas y responsable de elevadas pérdidas económicas (Heap and Duke 2018). Se utilizaron formulaciones comerciales de los herbicidas, a dosis recomendada en etiqueta, en 3 momentos, siendo (1) glifosato + dicamba + cletodin, aplicados 30 días previo a la siembra de soja, (2) S-metoclachlor + flumioxazin + glifosato, aplicado 3 a 5 días previo a la siembra y (3) fomesafen, inmediatamente posterior a cuando el cultivo presentó la cuarta hoja desarrollada (estadio V4, escala de (Fehr and Caviness 1977).

Las concentraciones de herbicidas en suelo fueron evaluadas posteriormente a cada aplicación de herbicidas y a cosecha. Se realizó un análisis multi residuo de acuerdo al alcance del método ajustado por el grupo de trabajo para determinar la concentración de herbicidas en suelo. Se incorporaron a la metodología validada aquellos compuestos del estudio que aún no se encontraban incluidos en el listado de analitos comprendidos por la misma. La metodología utilizada se basa en la propuesta por Colazzo, Pareja et al. (2018). Para el análisis de Glifosato y AMPA se utilizó el equipamiento específico. El tratamiento de muestra se ajustó siguiendo la metodología QuPPE (Anastassiades, Kolberg et al. 2015).

Se caracterizó el suelo en términos de nutrientes en general, y se analizó por parcela el contenido de materia orgánica, pH, y textura. Las determinaciones consistieron en evaluaciones de las funcionalidades de suelo relacionadas al ciclado de nutrientes, pero también producción primaria y potencial supresor de patógenos tal como se detalla:

Las variables relacionadas al ciclo del nitrógeno estudiadas: i) potencial de fijación de nitrógeno, fue estimado mediante el número de nódulos, color, y peso seco, así como biomasa de parte aérea en dos momentos del cultivo V4 y R3. Se utilizó la metodología de muestreo y análisis descrita por Hungria, Mendes et al. (2014). ii) Se analizó la abundancia de microorganismos oxidantes de amonio (Amox), Arqueas (AOA) y Bacterias (AOB), como indicadores sensibles de la ecotoxicidad microbiana del suelo (Karas, Baguelin et al. 2018). El ADN microbiano fue extraído a partir de los suelos con un kit comercial (Nucleospin, Macherey-Nagel). La concentración y la calidad del ADN genómico se comprobó mediante espectrofotometría (Nanodrop) y por electroforesis en gel de agarosa 0.8%. La abundancia de microorganismos Amox, AOA y AOB, se cuantificó mediante ensayos de qPCR dirigidos al gen *amoA* de microbios oxidantes de amonio según los métodos modificados por Azziz, Trasante et al. (2016). Para ello se utilizó el kit Luna Universal qPCR Master Mix (NEB) que utiliza la tecnología de fluorescencia con SYBR Green. Los amplicones de los genes *Arch_amoA* (AOA) y *Beta_amoA* (AOB) se verificaron en gel de agarosa 1.2% para determinar su tamaño en pares de bases.

iii) Se estimó el potencial de nitrificación del suelo utilizando el método descrito por Kandeler (1996), y modificado por Illarze, del Pino et al. (2018). Estos dos últimos análisis fueron realizados a partir de muestras de suelo tomadas posteriormente a cada aplicación.

Las variables relacionadas al ciclo del fósforo estudiadas consistieron en la cuantificación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) reconocidos por mejorar la estructura del suelo, contribuir al crecimiento vegetal y la supresión de plagas (Lendzemo, Kuyper et al. 2005), entre otras. Fueron evaluados en muestras de raíz según Füzy, Biró et al. (2015), estimando el porcentaje de colonización con el método propuesto por Trouvelot, Kough et al. (1986). Además, se midió la concentración de fósforo en parte aérea de esas plantas de soja por colorimetría utilizando el método propuesto por Murphy and Riley (1962), así verificar los niveles de absorción, por encontrarse íntimamente ligado al efecto que pudieran tener los herbicidas sobre este proceso simbiótico.

Se evaluó además la actividad de la mesofauna a través del método de láminas de cebo, contemplando así efectos sobre el ciclado de nutrientes a un nivel trófico mayor (Kratz 1998). Estandarizado por ISO 18311 (STANDARDIZATION 2016).

Por otra parte, los efectos de las primeras dos aplicaciones de herbicidas se evaluaron al momento de la siembra de la soja sobre el potencial supresor de patógenos del suelo. Para eso se estimó el índice de patogenicidad utilizando el método de Altier and Zerbino (2012), indicador de la autorregulación del suelo respecto a determinadas poblaciones de patógenos. Se tomaron muestras compuestas por parcela, y se implementaron 3 germinadores por parcela, y se registró la proporción de semillas enfermas a los días 4 y 9.

Las variables analizadas para evaluar la producción primaria como funcionalidad clave del suelo consistieron en registro del crecimiento de las plantas medido como altura de planta y biomasa seca, y el desarrollo fenológico. Se registraron durante 3 momentos del cultivo en cada año. Durante el segundo año fue posible evaluar además el potencial estado de estrés a partir del índice de clorofila utilizando un SPAD.

La comparación entre los tratamientos 0, 1 y 8 permitió evaluar el efecto de las mezclas a dosis recomendada, siguiendo el esquema de control de malezas planteado, y a doble dosis, respecto al control sin aplicar. En tanto que, los tratamientos del 2 al 7, plantearon situaciones de aplicación intermedia con el objetivo de evaluar si alguna de las aplicaciones fue mas responsable que las demás de los posibles efectos a encontrar en el esquema de aplicación completo. Se procesaron los datos obtenidos durante ambos años de experimentos con modelos mixtos para su análisis estadístico, utilizando el software R.

Resultados, análisis y discusión

Cabe aclarar que como se explicara en el adjunto 1, el proyecto sufrió retrasos por causas ajenas al equipo de trabajo, por lo que el análisis de los resultados no se encuentra acabado, ya que aún se continúa procesando información, que podría repercutir en los mismos. A continuación, se detalla la información generada hasta el momento en el marco de este proyecto.

- Las variables de respuesta relacionadas al potencial de fijación biológica de nitrógeno incluyeron numero de nódulos, color y peso de los mismos. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados y el control en el número de nódulos en V4 ni en R3, para ninguno de los años. De igual manera, en el peso de los nódulos no se detectaron

diferencias significativas entre el control y los demás tratamientos aplicados para ninguno de los estados de desarrollo del cultivo.

Se detectó en promedio una mayor abundancia de arqueas oxidadoras de amonio con respecto a las bacterias, detectándose mayores diferencias en las respuestas a los tratamientos al final del primer año de ensayo (enero 2021). Las tendencias en ese primer año son opuestas para arqueas y bacterias. En el segundo año de ensayo observamos una tendencia general a presentar mayor abundancia que el primer año de estudio. Sobre el final del ensayo del segundo año se pudo evidenciar una homogeneización entre los tratamientos analizados. Los resultados de estas variables de abundancia se retrasaron por diferentes motivos ya expuestos, por lo que están actualmente en proceso de análisis estadístico, mejorándose los modelos de estimación de las diferencias entre tratamientos. De todas maneras, el ensayo ha demostrado ser adecuado para detectar variaciones en una de las funciones del ciclo biogeoquímico del nitrógeno, asociada a microorganismos nitrificantes que responden en términos de abundancia a los distintos tratamientos con herbicidas.

Con los modelos utilizados para el análisis de potencial de nitrificación no se detectaron diferencias entre los tratamientos T0, T1 y T8, para ninguno de los muestreos post-aplicación.

- Para la colonización total de micorrizas se evaluaron hasta el momento solo los resultados del año 1. Con el modelo aplicado en V4, los tratamientos no registraron diferencias en la colonización total entre sí. La colonización total en R3, tampoco arrojó diferencias entre los tratamientos T0, T1 y T8. Al cuantificarse la colonización por arbusculos, los resultados indicarían una mayor colonización con arbusculos en el control que en el tratamiento T8, en V4. Y no se diferenciaría de los demás tratamientos aplicados. Sin embargo, en el análisis realizado en R3, no se encontraron diferencias entre el control y los demás tratamientos. Por último, no se observaron efectos en la formación de vesículas en V4, pero sí una tendencia a generar mayor número de vesículas en T8 respecto al control T0. En R3 pudo observarse para este año una mayor formación de vesículas en los tratamientos T8 y T1 respecto al control.

En cuanto al análisis de concentración de fósforo en planta los resultados muestran que en el estado de V4, se observó una menor concentración en T8 respecto al control T0, mientras que T1 presentó una concentración intermedia. En R3, la concentración de fósforo en planta fue similar para estos tres tratamientos.

- La actividad de la mesofauna fue evaluada posteriormente a cada aplicación para los tratamientos T0, T1 y T8, de manera de contrastar el esquema de aplicaciones típicamente realizado por un productor (T1), un peor escenario de riesgo (doble dosis T8) y el control sin aplicar (T0). La mayor desaparición del cebo en las láminas estaría asociada a una mayor actividad de la mesofauna en términos generales. Esta metodología no permite adjudicar la mayor actividad a ninguna especie en particular.

La aplicación 1 fue evaluada únicamente para el segundo año, debido a problemas de muestreo el primer año. Se observó un porcentaje de desaparición del cebo mayor en el tratamiento 1 respecto a los demás tratamientos. Para las aplicaciones 2 y 3, al modelo anterior se le agregó el efecto año. En el caso de la segunda aplicación, los tratamientos no se diferenciaron entre sí. En cuanto a la proporción de cebo desaparecido en las láminas luego de la tercera aplicación, se observa una mayor desaparición en el T8 respecto al T1, sin embargo, ninguno se diferencia del control.

- Al momento de la siembra de soja fue evaluado el porcentaje de enfermedad en los bioensayos de patogenicidad. Se observaron resultados diferentes para cada año. Únicamente en el primer año del experimento, se observó un mayor nivel de enfermedad en el tratamiento aplicado a doble dosis respecto a los demás tratamientos. Sugiriendo una posible pérdida de potencial supresor de patógenos en el tratamiento 8, dependiente de las condiciones ambientales.

- En cuanto a las variables relacionadas a la producción primaria, no se observaron diferencias en el crecimiento y desarrollo de plantas entre las parcelas. Así como tampoco se observaron diferencias significativas entre tratamientos para el rendimiento.

- Al evaluar los efectos de cambios en la frecuencia, cantidad y tipo de ingredientes activos sobre todas las variables anteriores, es decir, los resultados de los tratamientos intermedios, se observaron respuestas difícilmente concluyentes en sí mismas para la mayoría de los casos por no encontrarse una respuesta biológica clara a cada una. En cuyos casos, será fundamental el análisis más al detalle que se realizará una vez se cuenten con todos los datos, y puedan realizarse los contrastes entre grupos de tratamientos.

Por el momento, algunos procesos se han visto afectados por alguna de las mezclas. Este sería el caso de la concentración de fósforo analizada en V4 donde se observaron diferencias entre los tratamientos. El T8 presentó la menor concentración, en tanto que los tratamientos T1 y T2 presentaron concentraciones intermedias, pero no diferentes de las demás; y T0 y T3 las mayores concentraciones de fósforo pero solo diferentes de T8, de acuerdo al modelo ajustado. Estos resultados podrían indicar un efecto negativo de la primera aplicación de herbicidas sobre la absorción del fósforo. En el análisis correspondiente a R3, se observa una menor concentración de fósforo en planta aun para T8, pero también en T6, respecto a T3, en tanto que los demás tratamientos mostraron un comportamiento intermedio.

En otros casos puntuales se observan algunas diferencias pero no son concluyentes por ejemplo en R3, la colonización total por hongos micorrizicos arbusculares fue menor en el tratamiento 5 respecto al T0 y al T1. Para lo cual no se encontró hasta el momento una explicación biológica.

En V4 no se observaron diferencias entre los tratamientos en la formación de vesículas. Pero en R3, pudo observarse que los tratamientos T1, T8, T2 y T6 presentaron mayor formación de vesículas que el control. No diferenciándose de los demás tratamientos con herbicidas.

En términos generales ninguna de las mezclas utilizadas parece haber generado un efecto evidentemente nocivos sobre las variables de respuesta estudiadas. Sin embargo, se sigue trabajando en los datos y evaluando la mejor forma de compendiar esta información generada. A su vez, a esta deberá agregarse los resultados de las variables que se encuentran bajo estudio. Al presente, se encuentran en preparación 2 artículos científicos a partir de los resultados obtenidos con este proyecto, y se prevee trabajar en un tercer artículo.

Además de las variables estudiadas en suelo y su interacción con el cultivo, se realizó el análisis de los residuos de los herbicidas y principales metabolitos en suelo para poder determinar con precisión la concentración que finalmente se encuentran en las parcelas y a las que se estudian las variables de respuesta analizadas anteriormente. Para ello, se desarrollaron dos metodologías para poder cubrir la variedad de propiedades fisicoquímicas que los mismos presentan. Estos resultados fueron presentados en 2 congresos de relevancia internacional y uno local, 2 estos poster pueden encontrarse en el repositorio Colibri y adjuntos 2 y 3 de este informe. Respecto al procesamiento de muestras se pudo completar los análisis multiresiduo de las mismas por LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem). Los compuestos y metabolitos analizados por este método fueron Metolachlor y sus metabolitos Metolachlor ESA y Metolachlor OA, Fomesafen, Clethodim y su metabolito Clethodim sulfone, Flumioxazin y Dicamba. Todos ellos pudieron ser detectados, excepto cletodin, cuya vida media es menor a un día. Por último, los análisis mediante IC-MS/MS (cromatografía iónica acoplada a espectrometría de masas en tándem) se encuentran con un 50% de avance debido a los retrasos que ya fueron detallados en adjunto 1.

De este proyecto surgieron además múltiples iniciativas de divulgación y difusión que permitieron también cumplir con los objetivos planteados y alcanzar el impacto esperado. En primer lugar, cabe destacar la organización de una actividad en la que se logró convocar a 71 técnicos y productores agrícolas titulada "Los herbicidas y nuestro campo" en la EEMAC, Paysandú, el 15 de diciembre de 2022. La misma contó con difusión por parte del departamento de Difusión de EEMAC y departamento de Comunicación del CENUR Litoral Norte, y fue publicada en una nota por el diario local El Telégrafo (adjunto 4). Esta fue una jornada multidisciplinaria con el fin de dar a conocer nuestro proyecto en que nos encontramos trabajando y los resultados obtenidos hasta el momento. Expusieron varios integrantes del equipo del proyecto desde su rol en el mismo, un miembro invitado de la entidad reguladora de fitosanitarios a nivel gubernamental (DGSA), y un investigador del área de la psicología social con experiencia en esta temática para complementar la discusión. Esta actividad nos permitió intercambiar y divulgar esta línea de investigación, así como crear un espacio para dialogar sobre esta problemática y las preocupaciones del sector agrícola respecto a este tema. Asimismo, nos permitió generar un punto de partida para futuras colaboraciones. El informe de esta actividad se encuentra en repositorio Colibrí.

En segunda instancia, con el objetivo de divulgar el conocimiento generado hasta esta parte, se presentó un póster titulado "Lo que sabemos del impacto de herbicidas en suelo" en el stand de la Estación Experimental M.A. Cassinonni en el "Día mundial de las abejas" el 27 de Mayo de 2023, y asimismo, en la Jornada del grupo de Protección Vegetal EEMAC, el primero de Junio de 2023, ambas actividades en Paysandú. El poster se encuentra disponible también en el repositorio Colibrí.

Por otra parte, generamos actividades de divulgación también hacia las infancias a través de la convocatoria de la semana de la Ciencia y la Tecnología, convocatoria 2022. Trabajamos con 3 grupos diferentes, 69 niños de la escuela N° 2 de Treinta y Tres, en formato virtual ; y 18 niños del Club de niños del INAU "Sueños de Guichón" en forma presencial. El objetivo fue que los niños comprendieran la complejidad del suelo en su estructura y composición, la importancia de su funcionamiento saludable para los seres humanos y el ecosistema. Se trabajó el concepto de plaguicidas, su rol en los sistemas productivos y los potenciales daños que pueden causar. En este sentido se apostó a motivarles a través de nuestra vocación por la ciencia, dando a conocer nuestro objeto de estudio y proyecto en el que nos encontramos trabajando. El documento con detalles de esta actividad se presenta en adjunto 5.

En otro plano, los resultados de este proyecto resultaron de gran importancia en términos educativos, y generan una fuerte contribución a la formación continua de profesionales y estudiantes de carreras vinculadas al agro, por lo que ya fueron incluidos en los cursos dictados en 2022 ("Riesgos ambientales derivados del uso de fitosanitarios", de Educación

Permanente CENUR Litoral Norte, formulado para docentes de secundaria y maestros) y 2023 ("Impactos del uso de fitosanitarios", de Unidad de Posgrados y Educación Permanente Facultad de Agronomía; y "Fitosanitarios y ambiente" curso optativo de grado Facultad de Agronomía).

Este proyecto permitió también complementar la formación de dos ingenieras agrónomas. En un caso, Saracho W., trabajó en el equipo durante el período 1/11/2021 al 30/05/2022, durante el mismo trabajó y se formó en cuestiones prácticas de trabajo de campo, manejo y aplicación de diferentes metodologías en laboratorio, manejo instrumental en laboratorio, trabajo con datos generados y su control de calidad. En el segundo caso, Medina M., becaria en investigación, durante el período 24/03/2023-a la fecha, recibió capacitación en cuantificación de micorrizas arbusculares en muestras de raíz de soja. Además, resulta fundamental destacar que este proyecto constituye parte medular del trabajo de doctorado modalidad sándwich de Isabel García, responsable del mismo, llevado a cabo en la Universidad de Wageningen, Países Bajos.

Conclusiones y recomendaciones

Este trabajo logró generar y cuantificar los diferentes niveles de exposiciones de las parcelas a los herbicidas, que son utilizados con frecuencia por productores en los agroecosistemas nacionales. Sobre los diferentes escenarios se determinaron variables de respuesta relacionados directamente a funciones del suelo de interés tanto ecológico como productivo. Según indican los análisis realizados hasta el momento, algunas de las variables de respuesta que fueron afectadas por los tratamientos herbicidas son concentración de fósforo en planta, formación de arbusculos y vesículas por hongos micorrizicos arbusculares, actividad de la mesofauna, y el potencial supresor de patógenos. Estas diferencias no repercutieron en el rendimiento estimado de las plantas en dichos tratamientos, lo cual hace más difícil visualizar el problema a campo.

La información generada es de sumo interés para el sector productivo y entes reguladores en el ámbito nacional, y fue compartida en actividades de divulgación con repercusiones muy positivas, que demuestran la aidez por este tipo de información en el sector. Este proyecto permitió sentar las bases de esta comunicación. Ciertamente, esta es una investigación incipiente en nuestro país, por lo que continuaremos de futuro intercambiando preocupaciones y buscando soluciones con quienes se encuentran directamente involucrados en la toma diaria de decisiones, tanto a nivel productivo como regulatorio.

Desde un punto de vista académico resulta interesante destacar la importancia de la realización de experimentos a campo y de evaluar el impacto del uso de herbicidas sobre diferentes variables de respuesta, y diferentes plazos o momentos luego de las aplicaciones. De esta manera se pretendió lograr una mayor comprensión del riesgo real y sus potenciales consecuencias sobre la salud de los agroecosistemas. Al mismo tiempo, importa destacar las dificultades que se enfrentan en este tipo de experimento, donde los efectos y las interacciones son múltiples, y en muchos casos quedan enmascarados por la elevada variabilidad que presenta la información generada en estas condiciones. Es por ello que se continuará realizando un análisis exhaustivo de los resultados obtenidos hasta lograr la modelación que mejor represente los efectos en las variables de respuesta. A partir de entonces, se culminarán las publicaciones científicas que se encuentran en preparación al presente, para disponibilizarlos a toda la comunidad científica interesada en el tema. Estas publicaciones están siendo trabajadas en conjunto con los integrantes del proyecto, pero también con integrantes del grupo Soil Physics and Land Management de la Universidad de Wageningen, ya que García I. además de ser responsable de este proyecto, ha basado su doctorado en esta investigación y otros estudios similares.

Referencias bibliográficas

- Altier, N. and S. Zerbino (2012). "Indicadores biológicos para evaluar los agroecosistemas. 4. Comunidades microbianas. Índice de patogenicidad del suelo: Ejemplo para secuencias con leguminosas forrajeras." INIA; Programa Nacional Producción y Sustentabilidad Ambiental. Uso de la biodiversidad para la evaluación del impacto de la intensificación agrícola y el diseño de agroecosistemas sustentables: 73-79.
- Anastassiades, M., et al. (2015). "Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin via LC-MS/MS involving simultaneous extraction with methanol (QuPpe-method)." EU reference laboratory for pesticides requiring single residue methods (EURL-SRM). CVUA, Stuttgart, Germany.
- Azziz, G., et al. (2016). "The effect of soil type, rice cultivar and water management on ammonia-oxidizing archaea and bacteria populations." *Applied Soil Ecology* 100: 8-17.
- Chahal, P. S., et al. (2018). "Overlapping residual herbicides for control of photosystem (PS) II-and 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD)-inhibitor-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri* S. Watson) in glyphosate-resistant maize." *Frontiers in Plant science* 8: 2231.
- Colazzo, M., et al. (2018). "Multi-residue method for trace pesticide analysis in soils by LC-QQQ-MS/MS and its application to real samples." *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 98(14): 1292-1308.
- Coleman, G. R., et al. (2019). "Using energy requirements to compare the suitability of alternative methods for broadcast and site-specific weed control." *Weed Technology* 33(4): 633-650.
- Fehr, W. R. and C. E. Caviness (1977). *Stages of soybean development*, Iowa State University of Science and Technology Ames.
- Filser, J., et al. (2008). "Ecological theory meets soil ecotoxicology: challenge and chance." *Basic and applied ecology* 9(4): 346-355.
- Füzy, A., et al. (2015). "Estimation of am fungal colonization—comparability and reliability of classical methods." *Acta microbiologica et immunologica hungarica* 62(4): 435-451.
- Heap, I. and S. O. Duke (2018). "Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide." *Pest management science* 74(5): 1040-1049.
- Hungria, M., et al. (2014). "Effects of the glyphosate-resistance gene and herbicides on soybean: Field trials monitoring biological nitrogen fixation and yield." *Field Crops Research* 158: 43-54.
- Illarze, G., et al. (2018). "Emisión de óxido nitroso, nitrificación, desnitrificación y mineralización de nitrógeno durante el cultivo del arroz en 2 suelos de Uruguay." *Revista argentina de microbiología* 50(1): 97-104.
- Kandeler, K. (1996). Nitrogen Mineralization. *Methods in Soil Biology*. F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler and R. Margesin. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 135-143.
- The conversion of organic nitrogen to the more mobile, inorganic state is known as nitrogen mineralization. Microorganisms with different physiological properties take part in this process. In the first step, ammonium is formed from organic compounds (ammonification); in the second step, ammonium is oxidized to nitrate (nitrification).
- Karpouzias, D., et al. (2016). "' LOVE TO HATE' pesticides: felicity or curse for the soil microbial community? An FP7 IAPP Marie Curie project aiming to establish tools for the assessment of the mechanisms controlling the interactions of pesticides with soil microorganisms." *Environmental Science and Pollution Research* 23(18): 18947-18951.

Kratz, W. (1998). "The bait-lamina test: general aspects, applications and perspectives." *Environmental Science and Pollution Research* 5: 94-96.

Lenzemo, V., et al. (2005). "Field inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi reduces *Striga hermonthica* performance on cereal crops and has the potential to contribute to integrated *Striga* management." *Field Crops Research* 91(1): 51-61.

Løkke, H., et al. (2013). "Tools and perspectives for assessing chemical mixtures and multiple stressors." *Toxicology* 313(2-3): 73-82.

Maggi, F., et al. (2019). "PEST-CHEMGRIDS, global gridded maps of the top 20 crop-specific pesticide application rates from 2015 to 2025." *Scientific data* 6(1): 1-20.

Murphy, J. and J. P. Riley (1962). "A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters." *Analytica chimica acta* 27: 31-36.

Papa, J. and D. Tiesca "Manejo de *Amaranthus palmeri* S. Watson con herbicidas residuales selectivos para el cultivo de soja."

Primost, J. E., et al. (2017). "Glyphosate and AMPA, "pseudo-persistent" pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina." *Environmental Pollution* 229: 771-779.

STANDARDIZATION, I. O. F. (2016). ISO 18311: soil quality: method for testing effects of soil contaminants on the feeding activity of soil dwelling organisms: bait-lamina test, ISO Geneva.

Tincani, F. H. and M. M. Cestari (2018). "The end justifies the means: Rethinking ecotoxicological studies." *Integrated Environmental Assessment and Management* 14(4): 434-435.

Topping, C. J., et al. (2020). "Overhaul environmental risk assessment for pesticides." *Science* 367(6476): 360-363.

Trouvelot, A., et al. (1986). Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthode d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Physiological and genetical aspects of mycorrhizae: proceedings of the 1st european symposium on mycorrhizae, Dijon, 1-5 July 1985.

van Gestel, C. A. (2012). "Soil ecotoxicology: state of the art and future directions." *ZooKeys* 176(SPECIAL ISSUE): 275-296.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)