

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN

Toxicidad de sales de amonio sobre la lombriz de tierra (*Eisenia foetida*)

RESPONSABLE

Dr. José Alberto Iannacone Oliver

COLABORADOR

Blgo. Alfonzo Alegre Navarro
Est. Uriel Arnaldo Torres Zevallos

RESUMEN

Dentro de organismos usados como bioindicadores de contaminación ambiental encontramos a la lombriz de tierra, *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) (Annelida: Oligochaeta). A la fecha, lamentablemente no se cuenta con información comparativa en relación al efecto tóxico letal y subletal significativo de las sales de amonio como sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr); metavanadato de amonio; acetato de amonio; peroxodisulfato de amonio y amonio heptamolibnato tetrahidrato sobre este modelo biológico *E. foetida*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la toxicidad letal y subletal de las sales de amonio sobre la lombriz de tierra (*E. foetida*). El punto final considerado como respuesta letal fue la mortalidad, evaluada a través de CL_{50} , y los puntos finales de respuesta sub letal fueron tres: fragmentación, oscurecimiento, adelgazamiento, evaluados a través de CE_{50} , LOEC y NOEC. Con relación a la mortalidad (CL_{50}) en base al ion amonio de *E. foetida* a las 48 h de exposición se observó la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad: peroxodisulfato de amonio > metavanadato de amonio > amonio heptamolibdato tetrahidrato > sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr) > acetato de amonio. El adelgazamiento fue el parámetro subletal más sensible al sulfato ferroso amoniacal hexahidrato. La fragmentación fue el parámetro más sensible al metavanadato de amonio. El adelgazamiento fue el parámetro más sensible al acetato de amonio. La fragmentación fue el parámetro más sensible al peroxodisulfato de amonio. El adelgazamiento y el oscurecimiento fueron los parámetros más sensibles al amonio heptamolibdato tetrahidrato. Se concluye que *E. foetida* es un bioindicador de toxicidad para la evaluación de las sales de amonio en el Perú.

PALABRAS CLAVES: agroquímicos, *Eisenia foetida*, sales de amonio, toxicidad letal, toxicidad subletal.

ABSTRACT

Within organisms used as bioindicators of environmental pollution we find the earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) (Annelida: Oligochaeta). To date, unfortunately, comparative information is not available regarding the significant lethal and sublethal toxic effect of ammonium salts such as ferrous ammoniacal sulfate hexahydrate (mohr salt); ammonium metavanadate; ammonium acetate; ammonium peroxodisulfate and ammonium heptamolibnate tetrahydrate on this biological model *E. foetida*. The objective of the present work was to evaluate the lethal and sublethal toxicity of the ammonium salts on the earthworm (*E. foetida*). The final point considered as a lethal response was mortality, evaluated through LC_{50} , and the sub-lethal response endpoints were three: fragmentation, darkening, thinning, evaluated through EC_{50} , LOEC and NOEC. With regard to mortality (LC_{50}) based on the ammonium ion of *E. foetida* at 48 h of exposure, the following sequence of higher to lower toxicity was observed: ammonium peroxodisulfate > ammonium

metavanadate> ammonium heptamolybdate tetrahydrate> ferrous sulfate ammoniacal hexahydrate (salt of mohl)> ammonium acetate. Thinning was the sublethal parameter most sensitive to ferrous ammoniacal sulfate hexahydrate. Fragmentation was the parameter most sensitive to ammonium metavanadate. Thinning was the parameter most sensitive to ammonium acetate. Fragmentation was the parameter most sensitive to ammonium peroxodisulfate. Thinning and darkening were the parameters most sensitive to ammonium heptamolybdate tetrahydrate. It is concluded that *E. foetida* is a bioindicator of toxicity for the evaluation of ammonium salts in Peru.

KEYWORDS: agrochemicals, *Eisenia foetida*, ammonium salts, lethal toxicity, sublethal toxicity.

INTRODUCCIÓN

Dentro de organismos usados como bioindicadores de contaminación encontramos a la lombriz de tierra, *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) (Annelida: Oligochaeta). Esta especie es importante para la formación del suelo y para la descomposición de materia orgánica. Ha sido considerada indicadora apta de contaminación debido a su interacción con el suelo. Además, la lombriz de tierra se expone a diferentes tóxicos por varias vías (Lionetto *et al.*, 2012). La primera vía es a través de la piel, dado que ésta es extremadamente permeable y al estar en continuo contacto con los poros y el agua que hay en el suelo, hacen que esta sea la principal ruta de exposición a los contaminantes tóxicos. Otra de las razones, es el procesamiento del suelo que realiza la lombriz de tierra, a través de su sistema digestivo, al descomponer la materia orgánica y los agregados del suelo (Lionetto *et al.*, 2012; Avalos, 2016; Arrazola, 2016).

Importancia económica-social: Al ser *E. foetida* “lombriz de tierra” un invertebrado empleado para evaluar la calidad del suelo, la obtención de una base de datos ecotoxicológica de sustancias químicas a base de amonio nos permite seleccionar aquellas de menor riesgo al ambiente terrestre. De igual forma este proyecto permite realizar investigación formativa a semilleros de investigación en pre-grado.

Importancia ambiental: En base a los resultados obtenidos con los ensayos de toxicidad se evalúa el riesgo ecológico de las sustancias químicas a base de amonio en el suelo y se propondrán medidas para disminuir el riesgo ecotoxicológico.

Importancia científica-tecnológica: Este biosensor y bioindicador ecológico terrestre puede ser empleados como un “kit” referencial patentado en INDECOPI (Instituto Nacional de

Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual), para determinar la toxicidad de cualquier sustancia química, el cual se ofrecerá como un “servicio” en consultorías ambientales que evalúan los efectos tóxicos de sustancias químicas a base de amonio en el suelo.

Lamentablemente no se cuenta con información comparativa en relación al efecto tóxico letal y subletal significativo de las sales de amonio como sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de Mohr); metavanadato de amonio; acetato de amonio; peroxodisulfato de amonio y amonio heptamolibdato tetrahidrato sobre este modelo biológico *E. foetida*. Por ende, ¿Cuál será la toxicidad de estas cinco sales de amonio sobre la lombriz de tierra (*E. foetida*)?

MARCO TEÓRICO

Estado del arte o investigaciones antecedentes relacionadas con el tema en el País.

Iannacone (1999) buscó medir la toxicidad de plaguicidas (lindano, clorpirifos y pirofilita) sobre la sobrevivencia, maduración de *Panagrellus redivivus* (Samoiloff, 1990), la tasa de fotosíntesis de *C. vulgaris* e inhibición de las raíces *Allium cepa*. Para *P. redivivus* los valores de sobrevivencia, crecimiento y maduración a 96h de exposición no sobrepasaron el 10% a una concentración de 0,04% con todas las sustancias. En *C. vulgaris* a una concentración de 0,04% de las sustancias se observaron valores mayores al 20% en fotosíntesis neta y respiración. Con respecto a *A. cepa* se observó que el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento de raíces se produce a dosis de 0,1% lindano; seguido de clorpirifos y pirofilita por lo tanto clorpirifos presentó mayor toxicidad en ensayo con *P. redivivus* y *C. vulgaris*, mientras que en *A. cepa* el lindano presentó mayor efecto de inhibición de crecimiento de raíces.

Iannacone & Alvarino (2002) determinaron la toxicidad del insecticida cartap en tres organismos no destinatarios: *Porcellio laevis*, *Moina macrocopa*, y *Muscidifurax raptorellus*. *Porcellio laevis* y *M. raptorellus* no fueron altamente sensibles al cartap, en cambio en *M. macrocopa* presentó una alta toxicidad.

La evaluación del riesgo del arseniato de plomo en ocho organismos no destinatarios como la *Daphnia magna* (Cladocera: Daphniidae), *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera), *Trichogramma fuentesi* (Hymenoptera), *Heleobia cumingii*, *Chrysoperla asoralis* (Neuroptera), *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera), *Telenomus remus* (Hymenoptera) y *Orius*

insidiosus (Hemiptera: Anthocoridae) presentaron un alta toxicidad a este plaguicida (Iannacone *et al.*, 2009).

Iannacone *et al.* (2011) realizaron bioensayos usando carbofurano con organismos no destinatarios acuáticos y terrestres como *D. magna*, *T. pretiosum*, *Trichogramma pintoi* (Hymenoptera), *Chironomus calligraphus* (Diptera), *Lemna minor* (Araceae), *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae), *Tetrapygyus niger* (Arbacioida: Arbaciidae), *Paracheirodon innesi* (Characiformes: Characidae), *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes: Salmonidae), *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera) y *Coturnix japonica* (Galliformes: Phasianidae). Como resultado se obtuvo que este plaguicida afectó principalmente al ambiente acuático, presentándose una alta mortalidad en *D. magna*, una alta inhibición de formación de hojas para *L. minor* y nado extraño para *P. innesi*.

Iannacone *et al.* (2013), realizaron bioensayos en 30 especies acuáticas y terrestres, entre ellas *E. fetida*, en donde se evaluó el riesgo ecotoxicológico del bioplaguicida catahua, *Hura crepitans* (Euphorbiaceae). *Eisenia fetida* es una especie sensible y el bioplaguicida puede provocar un efecto letal en este invertebrado terrestre.

Marco teórico-conceptual

Suelo

El suelo es un sistema dinámico, constituido por tres fases, el cual se forma naturalmente por la interacción de procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren en el tiempo; es un ecosistema compuesto por elementos minerales y orgánicos en estados sólidos, líquidos y gaseosos; un recurso no renovable y cada día más reducido (Richter & Markewitz, 1995; Lewandowski & Zumwinkle, 1999; Doran & Zeiss, 2000; Gardi *et al.*, 2014; Arrazola, 2016).

La fase sólida del suelo, está formada por componentes orgánicos e inorgánicos, que dejan espacios de huecos (poros, cámaras, etc) en donde están las fases líquidas y gaseosas. Dentro de los poros se encuentra parcialmente agua, el cual es el componente principal de la fase líquida. El agua presente lleva iones y sustancias en solución o suspensión. La otra fase constituida por el aire, que también se encuentra en los poros, es la que le da la atmósfera al suelo y provee de oxígeno a las raíces de las plantas y los microorganismos del suelo (Angers & Caron, 1998; Porta *et al.*, 2003; Arrazola, 2016).

Importancia del suelo

El suelo es considerado como la unidad central de procesamiento del planeta (Richter & Markewitz, 1995). Tiene múltiples funciones las cuales pueden ser divididas en cuatro tipos de

servicios ecosistémicos: soporte, aprovisionamiento, regulación y cultural (MEA, 2016). En Primer lugar, observamos que este sistema proporciona soporte, dado que es fuente de materia prima, en este se encuentran los yacimientos de minerales o de hidrocarburos de importancia económica, como el cobre, oro, carbón, petróleo, entre otros. También, proporciona alimentos y fibra, dado que es el medio en donde se desarrollan los cultivos y crecen las especies forestales. Es clave para los procesos de regulación del clima al presentar un papel fundamental en la regulación y purificación del recurso hídrico, como también en los ciclos biogeoquímicos, como el ciclo del carbono o nitrógeno. Por último, es importante al modificar y mitigar los riesgos y efectos del cambio climático. Se ha establecido que el suelo tiene la capacidad de capturar el dióxido de carbono, un gas de efecto invernadero (Reeves, 1997; Lewandowski & Zumwinkle, 1999; Doren & Zeiss, 2000; Gardi *et al.*, 2014; Montanarella & Pangos, 2015; Arrazola, 2016).

Lombrices

Las lombrices son organismos celomados claves en los ambientes terrestres, que mantienen la estructura del suelo, ayudan en la aireación y también hacen parte de los procesos que allí se desarrollan como la degradación de la materia orgánica y en los ciclos de los nutrientes (Menzes-Oliveira *et al.*, 2011, Castellanos-Navarrete *et al.*, 2012).

La lombriz de tierra *Eisenia fetida* o conocida como lombriz roja californiana (Valera, 2000), es considerada a nivel mundial como una de las más representativas dentro la fauna del suelo y dentro de todas las lombrices de tierra en particular (OECD, 1984). *E. fetida*, ha generado gran importancia gracias a que cumple un rol ecológico primordial (Sánchez-Hernández, 2006), como por ejemplo causan modificaciones físicas en el suelo así como al mismo tiempo incrementa las posibilidades de desarrollo de otros animales y plantas generando un equilibrio en el ecosistema (Brown *et al.*, 2004).

Debido a su compleja relación con el suelo, las lombrices oligoquetas han sido consideradas como indicadores del impacto en el uso del suelo y su fertilidad, también se han dado uso en modelos de toxicidad para determinar la contaminación ambiental, siendo *E. fetida* comúnmente usada (Lionetto *et al.*, 2012; Leveque *et al.*, 2013; Araneda *et al.*, 2016).

Las lombrices son muy sensibles a la contaminación en comparación a otros invertebrados (Spurgeon & Hopkin 1996). Generalmente, han sido empleadas en investigaciones con metales, en los cuales se ha verificado su alta sensibilidad y su tendencia a acumular altas concentraciones de estos tóxicos (Spurgeon & Hopkin, 1996; Helling *et al.*, 2000; Sizmur & Hodson, 2003; Arlond *et al.*, 2003). Asimismo, han demostrado ser bioindicadores que

permiten calcular adecuadamente la toxicidad y los posibles riesgos de los contaminantes en el suelo (Spurgeon *et al.*, 1994; Spurgeon & Hopkin, 1996; Lukkari *et al.*, 2005, Leveque *et al.*, 2013; Araneda *et al.*, 2016).

Las sustancias químicas sintéticas pueden ocasionar un riesgo ecotoxicológico para los organismos no objetivos como las lombrices (Laird *et al.*, 1981; Schreck *et al.*, 2008; Pelosi *et al.*, 2014; Princz *et al.*, 2017). Dentro de los efectos que se pueden evidenciar en estos organismos se tiene: reducción de la población, enrollamiento del cuerpo, contracción longitudinal de los músculos, hinchazones, quemaduras, entre otros. Estos efectos varían dependiendo del tipo de sustancia química sintética (Dureja *et al.*, 1999; Araneda *et al.*, 2016).

Las lombrices tienen un papel muy importante dentro de la ecotoxicología terrestre, y han sido incluidas dentro del grupo de cinco bioindicadores claves para estudios ecotoxicológicos de químicos industriales determinado por la Organización para Cooperación y Desarrollo Económica (OECD) y la Comunidad Económica Europea (EEC) (Capowiez *et al.*, 2003).

Las lombrices en general representan entre el 60 y 80% del total de la biomasa del suelo, son uno de los bioindicadores más adecuados para medir la contaminación y toxicidad del suelo, llamadas también modelos (Cuevas *et al.*, 2008).

La lombriz de tierra cambia las propiedades físicas y químicas del suelo, ya que son ingenieros eficientes (Gabriel *et al.*, 2011; Blouin *et al.*, 2013), que actúan sobre las comunidades microbiológicas, actividad del suelo y pueden ser capaces de mineralizar los contaminantes presentes en éste (Monard *et al.*, 2008), las principales actividades de las lombrices con respecto a su actividad en el suelo se detalla en la Figura 1.

En ese sentido también es preciso indicar que *E. fetida* es una de las especies de lombriz compostera que presenta las mayores tasas de reproducción en cautiverio (Gomez, 2014). Sus características externas visibles son las siguientes y se pueden observar en la Tabla 1.

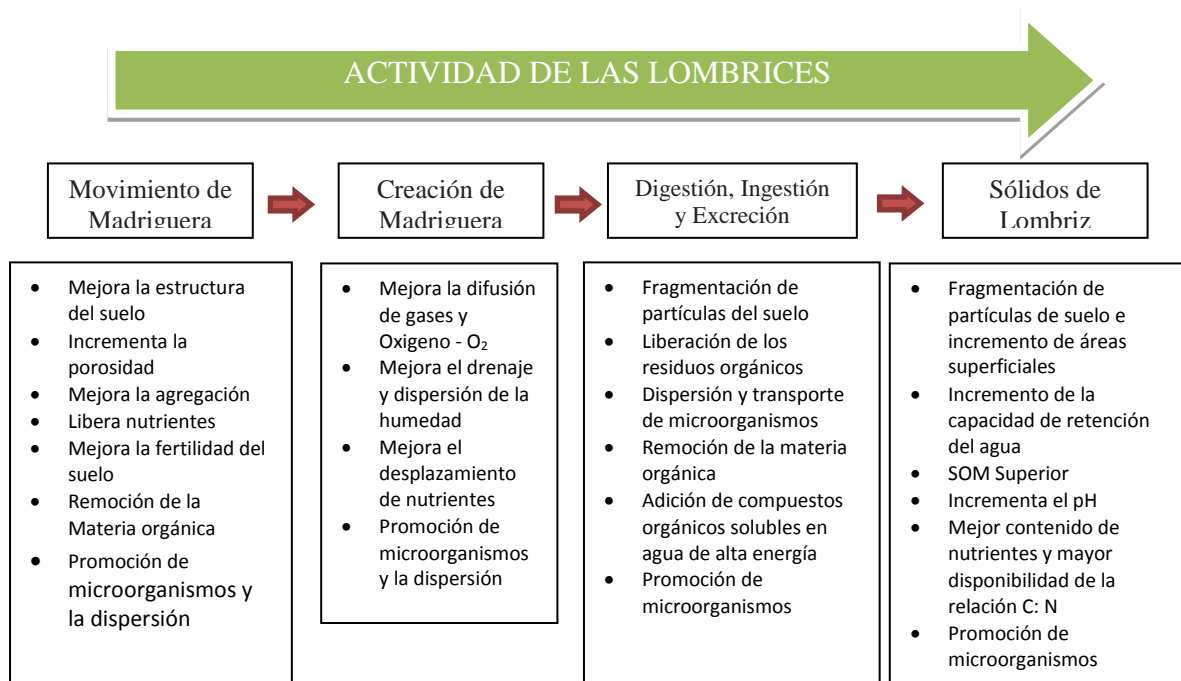


Figura 1. Efectos biológicos, químicos y físicos de las lombrices en el suelo, cuadro elaborado por (Hickman & Reid, 2008).

Tabla 1. Aspectos y unidades de la biología de la especie *E. foetida* (Gómez, 2014).

Aspectos	Unidades	<i>E. foetida</i>
Color		Roja con bandas pardas
Tamaño de las lombrices adultas	mm	6-8 mm x 50-100 mm
Peso promedio de las lombrices adultas	g	0,55 -1,4
Tiempo de madurez	Días	28-30
Numero de huevecillos por día		0,35-0,5
Tamaño promedio de los huevecillos	mm	4,85 mm x 2,82 mm
Tiempo de incubación	Días	18-26
Viabilidad de las eclosiones	%	73-80
Numero de neonatos por huevecillos		2,5-3,8
Ciclo de vida	Días	45-51
Temperatura óptima	°C	25°C (0°C-35°C)
Humedad óptima	%	80%-85% (70%-90%)

Definiciones de términos básicos

Definición de Terminología Básica (Lagarto & Vega, 1990; APHA 1995).

* **Pruebas de toxicidad o Bioensayos:** La determinación del efecto de una sustancia en un grupo de organismos seleccionados bajo condiciones definidas. Una prueba de toxicidad usualmente mide o 1) la proporción de organismos o 2) el grado de efecto mostrado (graduado o cuantitativo) después de la exposición a un rango de concentración de estresores o a una mezcla de estresores.

- * **Cociente de peligro (CP):** La proporción entre la concentración o dosis de exposición y la concentración o dosis de efecto, donde ambos son expresados en las mismas unidades. Incorrectamente referido como cociente de riesgo (CR).
- * **Concentración letal media (CL₅₀) o Dosis letal media (DL₅₀):** La concentración o dosis de una sustancia en el agua u otra matriz ambiental que es estimada a ser letal al 50% de los organismos.
- * **Ecotoxicología:** La propiedad de una sustancia de producir un efecto adverso en un ecosistema o más de uno de sus componentes.
- * **Efecto adverso:** Cambios en la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo, reproducción, ciclo de vida de un organismo, sistema, o subpoblación que resulte en deterioro de la capacidad de compensación para un estrés adicional, o un incremento en la susceptibilidad a otras influencias.
- * **Evaluación de punto final:** Una expresión explícita de valor ambiental a ser protegida. Una evaluación de punto final tiene que incluir una entidad y una propiedad específica de esa entidad.
- * **Evaluación de riesgos Ambientales (ERA):** Un proceso que evalúa la probabilidad que un efecto adverso ecológico pueda ocurrir o que esté ocurriendo como resultado de la exposición de uno o más estresores.
- * **Factor de incertidumbre (FI):** Un factor aplicado a una exposición o a una concentración de efecto u cociente de peligro que corrige las fuentes no identificadas de incertidumbre.
- * **Toxicidad aguda:** Efecto perjudicial de una sustancia que ocurre después de una exposición breve, usualmente 48 a 96 h.
- * **Toxicidad crónica:** Efecto perjudicial de una sustancia o de una mezcla de sustancias que ocurren después de una exposición extendida.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

- Evaluar la toxicidad letal y subletal de las sales de amonio sobre la lombriz de tierra (*E. foetida*).

Objetivos específicos

- Evaluar la toxicidad letal y subletal del sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (Sal de Mohr) sobre la lombriz de tierra (*E. foetida*).
- Determinar la toxicidad letal y subletal del metavanadato de amonio sobre la lombriz de tierra (*E. foetida*).
- Evaluar la toxicidad letal y subletal del acetato de amonio sobre la lombriz de tierra (*E. foetida*).

- Determinar la toxicidad letal y subletal del peroxodisulfato de amonio sobre la lombriz de tierra (*E. foetida*).
- Evaluar la toxicidad letal y subletal del amonio heptamolibnato tetrahidrato sobre la lombriz de tierra (*E. foetida*).

HIPÓTESIS

Hipótesis general

Ho: No existe efecto tóxico letal y subletal de cinco sales de amonio sobre *E. foetida*.

Ha: Existe efecto tóxico letal y subletal de cinco sales de amonio sobre *E. foetida*.

Hipótesis específicas

Ho₁: No existe efecto tóxico letal y subletal del sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (Sal de Mohr) sobre *E. foetida*.

Ha₁: Existe efecto tóxico letal y subletal del sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (Sal de Mohr) sobre *E. foetida*.

Ho₂: No existe efecto tóxico letal y subletal del metavanadato de amonio sobre *E. foetida*.

Ha₂: Existe efecto tóxico letal y subletal del metavanadato de amonio sobre *E. foetida*.

Ho₃: No existe efecto tóxico letal y subletal del acetato de amonio sobre *E. foetida*.

Ha₃: Existe efecto tóxico letal y subletal del acetato de amonio sobre *E. foetida*.

Ho₄: No existe efecto tóxico letal y subletal del peroxodisulfato de amonio sobre *E. foetida*.

Ha₄: Existe efecto tóxico letal y subletal del peroxodisulfato de amonio sobre *E. foetida*.

Ho₅: No existe efecto tóxico letal y subletal del amonio heptamolibnato tetrahidrato sobre *E. foetida*.

Ha₅: Existe efecto tóxico letal y subletal del amonio heptamolibnato tetrahidrato sobre *E. foetida*.

VARIABLES DE ESTUDIO

Relación entre variables

Debido a que es una investigación causal se tienen variables dependientes e independientes.

VARIABLES dependientes: Mortalidad de *E. foetida* (CL₅₀), y parámetros subletales (NOEC, LOEC y CE₅₀) más sensibles en la lombriz de tierra (fraccionamiento, oscurecimiento, adelgazamiento).

Variable Independientes: Concentraciones de cinco sales de amonio (sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (Sal de Mohr); metavanadato de amonio; acetato de amonio; peroxodisulfato de amonio y amonio heptamolibnato tetrahidrato).

Matriz lógica de variables e indicadores (Caso de estudios cuantitativos) (Tabla 2).

Tabla 2. Variables, Factores e indicadores del proyecto:

VARIABLES	FACTORES DIMENSIONES	INDICADORES
DEPENDIENTE	Efectos letales	• Mortalidad
Efectos letales y subletales en el bioindicador <i>E. foetida</i>	Efectos subletales	• fraccionamiento, • oscurecimiento, • adelgazamiento,
INDEPENDIENTE		
Cinco sales de amonio:		
• sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (Sal de Mohr)		
• metavanadato de amonio;	Concentración	Amonio en mg·L ⁻¹
• acetato de amonio;		
• peroxodisulfato de amonio;		
• amonio heptamolibnato tetrahidrato		

MÉTODO

Las pruebas de toxicidad aguda sobre *E. foetida* emplearon cinco sales de amonio (sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (Sal de Mohr)); metavanadato de amonio; acetato de amonio; peroxodisulfato de amonio y amonio heptamolibnato tetrahidrato): cinco concentraciones más el control: con tres repeticiones, en un diseño Factorial en bloque completamente aleatorio (DFBCA) de 6 (concentraciones) x 5 (sustancias químicas) x 3 (repeticiones). Los criterios de selección de las concentraciones empleadas siguieron a Iannacone & Lamas (2003).

Se realizó el protocolo en el Laboratorio de Parasitología (LA79) de la Universidad Ricardo Palma (URP).

Material biológico:

Selección de lombrices

Se seleccionaron individuos adultos (clitelio visible) de *E. fetida*, por contenedor, con un peso entre 200-500 g. Las lombrices fueron aclimatadas en suelo agrícola durante 48 h. Posteriormente se lavaron con agua, se midieron y se pesaron.

Para la realización del presente estudio se seleccionó a *E. fetida* por ser una especie sensible a cambios en la calidad del suelo y por ende se le considera indicadora de calidad ambiental (Cuevas *et al.*, 2008). La identificación se realizó usando los criterios señalados por Domínguez & Pérez-Lozada (2010).

Al momento inicial de la selección de los individuos se verificó el tamaño y la presencia del anillo clitelar desarrollado y visible, la cual es indicativo de su capacidad reproductiva (Schuldt *et al.*, 2005) e indican que son individuos adultos por el clitelio visible. Las lombrices adultas se seleccionaron del mismo cultivo (con el fin de evitar variaciones en los resultados).

Aclimatación de lombrices

Para llevar a cabo la aclimatación de las lombrices se realizaron las siguientes dos actividades:

1. Previo a la aclimatación de las lombrices, se les dieron todas las condiciones necesarias, su alimentación consistió en tomates cherry descompuestos.
2. Posteriormente, las lombrices seleccionadas fueron aclimatadas en suelos a lo largo de una semana, su régimen de alimentación se mantendrá constante y no recibirán alimento durante el bioensayo (OECD, 1984).

Los ensayos de aclimatación fueron considerados validos cuando la mortalidad de *E. foetida* no sobrepasó el 10% (Iannacone & Alvariño, 2004). La cantidad de agua de riego suministrada fue de 50 a 75 mL, la humedad en suelo se mantuvo en el rango óptimo establecido de 40-80% (Alonzo & Chicas, 2013).

Material Químico:

Se evaluaron las cinco sales de amonio en mg·L⁻¹:

- sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (Sal de Mohr); 62,5; 125; 250; 500 y 1000 (en base al ion amonio).
- Metavanadato de amonio; 62,5; 125; 250; 500 y 1000 (en base al ion amonio).
- Acetato de amonio; 62,5; 125; 250; 500 y 1000 (en base al ion amonio).
- Peroxisulfato de amonio; 8,25; 16,5; 33; 66 y 132 (en base a Amonio).
- Heptamolibnato de amonio; 62,5; 125; 250; 500 y 1000 (en base al ion amonio).

Instrumentos de recolección de datos

Los resultados de los bioensayos ecotoxicológicos letales y subletales con *E. foetida* con cada una de las cinco sales de amonio fueron colocados en una base organizada de datos en Excel.

Técnicas de procesamiento de datos

Tratamiento de datos Las pruebas de toxicidad aguda para cada sal de amonio se evaluaron en cinco concentraciones, más un control o testigo con tres repeticiones, en un diseño en bloque completamente aleatorio (DBCA) de 6x3.

La eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías, previa transformación de los datos a raíz cuadrada del arcoseno, con el fin de ajustar los datos a la normalidad. En el caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos y entre las repeticiones se realizó la prueba de Tukey. Los cálculos de la mortalidad corregida se realizaron mediante la fórmula de Abbott en caso de muerte natural en el grupo testigo cuando sea menor al 20% (Macedo *et al.*, 1997). Las $CL(E)_{S_{50}}$ se calcularon usando el programa computarizado EPA-Probit versión 1.5. El modelo de regresión fue verificado usando el estadístico Chi-cuadrado. Los resultados para los estadísticos descriptivos e inferenciales se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS versión 21,0.

Aspectos éticos: los procedimientos experimentales con *E. foetida* siguieron las pautas de la “Institutional Animal Care and Use Committee” (IACUC) (APA, 2012), minimizando el número de los organismos empleados, repeticiones y empleando las tres Rs “Rs-reemplazamiento, reducción, y refinamiento (Mukerjee, 1997).

Procedimientos

Montaje de bioensayos

Prueba de papel de filtro con placas de Petri (Wang *et al.*, 2012)

La sustancia de prueba (sales de amonio tóxicas) se disuelven en agua y se toma una pieza de papel de filtro guardado en una placa de Petri de 9 cm y tratado con 2 mL de la solución

tóxica a base de las sales de amonio. El papel de filtro fue humedecido con 2 mL de agua destilada y una lombriz fue colocada sobre ella. Las lombrices se colocaron en papel de filtro húmedo durante 24 h para eliminar todos los contenidos del intestino durante 24 h antes de la introducción de la prueba. La configuración se mantuvo en 20 ° C durante 48 h, y se registró la mortalidad. Las lombrices moribundas se registran como muertas si no responden a un toque mecánico suave. El punto final considerado como respuesta letal fue la mortalidad, evaluada a través de CL₅₀, y los puntos finales de respuesta sub letal fueron: fragmentación, oscurecimiento, adelgazamiento, evaluados a través de CE₅₀, LOEC y NOEC (OECD, 1984; Schaefer, 2003; Schaefer *et al.*, 2005). La vía de administración utilizada en las lombrices de tierra fue dérmica. Durante la aclimatación y el desarrollo del bioensayo, se controlaron las condiciones ambientales: Temperatura y Humedad Relativa, los cuales se midieron con un termohidrómetro (Coolbox®).

Efecto tóxico letal.

Se midió la mortalidad a través de la **concentración letal media (CL₅₀)**, la cual representa la concentración del suelo problema que ocasiona la muerte (daño máximo) en el 50 % de las lombrices que han sido expuestas.

La toxicidad letal de los cinco bioensayos con sales de amonio fue evaluada a las 48 horas contados a partir de la instalación del bioensayo.

Mortalidad: Se consideró efectiva la mortalidad cuando:

- a) No se registran en el conteo de lombrices a las 48 h, ya que tienden a desintegrarse rápidamente.
- b) Se observa una mancha delgada amarillenta, relativo a la descomposición y desintegración.
- c) No hay respuesta ante los estímulos físicos en 15 seg de observación como por ejemplo: escape a la luz, movimientos bruscos, etc.

Efectos Tóxicos subletales

Mide el comportamiento y la reacción del organismo vivo ante el tóxico y hace referencia a la fragmentación, oscurecimiento y adelgazamiento. La observación de los síntomas físicos para los cinco bioensayos con sales de amonio, se llevó a cabo a las 48 h de exposición:

Fragmentación: fueron consideradas afectadas por fragmentación aquellas lombrices que se encuentren divididas por la mitad cuando se realizó la lectura de los bioensayos a las 48 h de exposición.

Oscurecimiento: Los efectos de la presencia de las sales de amonio en el parámetro de oscurecimiento, se consideró significativo cuando se observan manchas marrones en los

laterales y frontales de la lombriz de tierra, así también como el cambio de color de rojo a guinda oscuro

Adelgazamiento: Los efectos se fueron representados por la pérdida del grosor y ancho del cuerpo. En algunos casos fueron tan delgados que solo penderán de un hilo que los une, hasta llegar a partirse en dos.

RESULTADOS

Sulfato ferroso amoniacal hexahidrato

La Tabla 1 muestra el efecto tóxico del sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr) sobre *E. foetida* a 48 h de exposición. Se observan los valores de CL₅₀ para la mortalidad, los CE₅₀ para los tres efectos subletales como la fragmentación, oscurecimiento y adelgazamiento, con sus respectivos valores de NOEC y LOEC. De igual forma se señalan los valores promedios de Longitud total (cm) y peso (mg) de las lombrices por concentración. Los pesos moleculares (PM), Cas y formula química son señalados para el sulfato ferroso amoniacal hexahidrato. El adelgazamiento fue el parámetro más sensible al tóxico.

Metavanadato de amonio

La Tabla 2 muestra el efecto tóxico del metavanadato de amonio sobre *E. foetida* a 48 h de exposición. Se observan los valores de CL₅₀ para la mortalidad, los CE₅₀ para los tres efectos subletales como la fragmentación, oscurecimiento y adelgazamiento, con sus respectivos valores de NOEC y LOEC. De igual forma se señalan los valores promedios de Longitud total (cm) y peso (mg) de las lombrices por concentración. Los pesos moleculares (PM), Cas y formula química son señalados para el metavanadato de amonio. La fragmentación fue el parámetro más sensible al tóxico.

Acetato de amonio

La Tabla 3 muestra el efecto tóxico del acetato de amonio sobre *E. foetida* a 48 h de exposición. Se observan los valores de CL₅₀ para la mortalidad, los CE₅₀ para los tres efectos subletales como la fragmentación, oscurecimiento y adelgazamiento, con sus respectivos valores de NOEC y LOEC. De igual forma se señalan los valores promedios de Longitud total (cm) y peso (mg) de las lombrices por concentración. Los pesos moleculares (PM), Cas y formula química son señalados para el acetato de amonio. El adelgazamiento fue el parámetro más sensible al tóxico.

Peroxodisulfato de amonio

La Tabla 4 muestra el efecto tóxico del peroxodisulfato de amonio sobre *E. foetida* a 48 h de exposición. Se observan los valores de CL_{50} para la mortalidad, los CE_{50} para los tres efectos subletales como la fragmentación, oscurecimiento y adelgazamiento, con sus respectivos valores de NOEC y LOEC. De igual forma se señalan los valores promedios de Longitud total (cm) y peso (mg) de las lombrices por concentración. Los pesos moleculares (PM), Cas y fórmula química son señalados para el peroxodisulfato de amonio. La fragmentación fue el parámetro más sensible al tóxico.

Amonio heptamolibdato tetrahidrato

La Tabla 5 muestra el efecto tóxico del amonio heptamolibdato tetrahidrato sobre *E. foetida* a 48 h de exposición. Se observan los valores de CL_{50} para la mortalidad, los CE_{50} para los tres efectos subletales como la fragmentación, oscurecimiento y adelgazamiento, con sus respectivos valores de NOEC y LOEC. De igual forma se señalan los valores promedios de Longitud total (cm) y peso (mg) de las lombrices por concentración. Los pesos moleculares (PM), Cas y fórmula química son señalados para el amonio heptamolibdato tetrahidrato. El adelgazamiento y el oscurecimiento fueron los parámetros más sensibles al tóxico.

Análisis comparativo

Con relación a la mortalidad (CL_{50}) en base al ion amonio de *E. foetida* a las 48 h de exposición se observó la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad: peroxodisulfato de amonio > metavanadato de amonio > amonio heptamolibdato tetrahidrato > sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr) > acetato de amonio.

Con relación a la fragmentación (CE_{50}) en base al ion amonio de *E. foetida* a las 48 h de exposición se observó la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad: peroxodisulfato de amonio > metavanadato de amonio > amonio heptamolibdato tetrahidrato > sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr) > acetato de amonio.

Con relación al adelgazamiento (CL_{50}) en base al ion amonio de *E. foetida* a las 48 h de exposición se observó la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad: peroxodisulfato de amonio > metavanadato de amonio > amonio heptamolibdato tetrahidrato > acetato de amonio > sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr).

El adelgazamiento fue el parámetro más sensible al sulfato ferroso amoniacal hexahidrato. La fragmentación fue el parámetro más sensible al metavanadato de amonio. El adelgazamiento fue el parámetro más sensible al acetato de amonio. La fragmentación fue

el parámetro más sensible al peroxodisulfato de amonio. El adelgazamiento y el oscurecimiento fueron los parámetros más sensibles al amonio heptamolibdato tetrahidrato.

DISCUSIÓN

La prueba de papel de filtro de contacto se considera un procedimiento de evaluación inicial para evaluarla toxicidad relativa de los pesticidas a las lombrices. Las pruebas de toxicidad de contacto se usan para estudiar los pesticidas que se absorben principalmente a través de la piel de las lombrices. Pero, para la gran mayoría de las pruebas no representa la situación exacta en el suelo (Christensen & Mather, 1994; Want *et al.*, 2012).

La prueba de papel de filtro no implica la ingestión del tóxico, es decir, la exposición a través del intestino no es considerado. Del mismo modo, la simulación de la adsorción de la sal de amonio en los coloides del suelo no es tomada en cuenta, y tienen un impedimento en su relevancia ecológica (Christensen & Mather 1994; Stanley & Preetha, 2016). Además, se ha informado una mala correlación entre el papel de filtro y los ensayos de contaminación del suelo (Heimbach 1988). Algunos productos químicos que son altamente tóxicos por contacto con las lombrices de tierra pueden no tener el mismo nivel de toxicidad por ingestión y viceversa. Además en las pruebas de papel de filtro, los gusanos pueden gastar mucha energía en tratar de desprenderse de la sustancia química con moco y, finalmente, morir (Christensen y Mather 1994).

Se observaron diferencias en la toxicidad letal y subletal de las cinco sales de amonio sobre *E. foetida* a las 48 h de exposición observándose una mayor toxicidad peroxodisulfato de amonio y del metavanadato de amonio en comparación al amonio heptamolibdato tetrahidrato, sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr) y acetato de amonio. No se ha encontrado información con relación a la toxicidad de estas cinco sales de amonio sobre organismos de suelo, y e especial sobre la lombriz de tierra; sin embargo, Lahive *et al.* (2014) mostraron poco efecto del nitrato cérico de amonio en la lombriz de tierra en la mortalidad a 28 días de exposición. Hughes *et al.* (2008) encontraron bajo efecto del cloruro de amonio y del sulfato de amonio en la mortalidad de *E. foetida*, atribuyendo la toxicidad a la acción sinérgica del cloruro y del amonio. En nuestro estudio, se evaluó comparativamente cinco sales de amonio en *E. foetida*, pudiendo atribuirse las diferencias encontradas a la acción tóxica de los aniones como $S_2O_8^{-2}$, VO_3^{-1} , $(SO_4)_2^{-2}$, $Mo_7O_{24}^{-6}$ y CH_3COO^{-1} (Hughes *et al.*, 2008).

El adelgazamiento y la fragmentación fueron las respuestas subletales más sensibles a las sales de amonio en *E. foetida* a las 48 h de exposición. La prueba de contacto con papel

filtro puede ser empleada como un herramienta para evaluar la respúeta de *E. foetida* al estrés de sustancias químicas a base de sales de amonio (Ouina *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

- Con relación a la mortalidad (CL₅₀) en base al ion amonio de *E. foetida* a las 48 h de exposición se observó la siguiente secuencia de mayor a menor toxicidad: peroxodisulfato de amonio > metavanadato de amonio > amonio heptamolibdato tetrahidrato > sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (sal de mohr) > acetato de amonio.
- El adelgazamiento fue el parámetro subletal más sensible al sulfato ferroso amoniacal hexahidrato. La fragmentación fue el parámetro más sensible al metavanadato de amonio. El adelgazamiento fue el parámetro más sensible al acetato de amonio. La fragmentación fue el parámetro más sensible al peroxodisulfato de amonio. El adelgazamiento y el oscurecimiento fueron los parámetros más sensibles al amonio heptamolibdato tetrahidrato.
- *Porcellio laevis* es un bioindicador de toxicidad para la evaluación de fragancias, insecticidas y productos de limpieza en el Perú.

REFERENCIAS

- Angers, A. & Caron, J. 1998. Plant-induced changes in soil structure: Processes and feedbacks. *Biogeochemistry*, 42, 55-72.
- APA (American Psychological Association). 2012. *Guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Nonhuman Animals in Research*. Washington, 14 pp.
- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION), AWWA (AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION), WPCF (WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION). 1995. *Standard methods for examination of water and wastewater*. 19th. Ed. American Health Association. Washington, D.C.
- Araneda, A.D.; Undurraga, P.; López, D.; Saez, K. & Barra, R. 2016. Use of earthworm as a pesticide exposure indicator in soil under conventional and organic management. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 76: 356-362.
- Arnold, R.E.; Hodson, M.E.; Black, S. & Davies, N.A. 2003. The influence of mineral solubility and soil solution concentration on the toxicity of copper to *Eisenia fetida* Savigny. *Pedobiologia*, 47: 622–632.
- Arrazola, E.M. 2016. *Evaluación del riesgo ambiental de la mezcla de alfa-cipermetrina e imidacloprid sobre la lombriz de tierra (Eisenia fetida)*. Tesis para optar el título profesional de ingeniero ambiental. Universidad Científica del Sur. Lima, Perú.

- Avalos, R.S.I. 2016. *Evaluación del riesgo ambiental terrestre de dos gasolinas ecológicas de 90 octanos en lombriz de tierra en el Perú*. Tesis para optar el título profesional de ingeniero ambiental. Universidad Científica del Sur. Lima, Perú.
- Blouin, M.; Hodson, M.; Delgado, E.; Baker, G.; Brussard, L. & Bult, K. 2013. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science*, 64: 161-182.
- Brown. P.J.; Long. S.M.; Spurgeon. D.J.; Svendsen. C. & Hankard. P.K. 2004. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere*, 57: 1675-1681.
- Capowiez, Y. & Bérard, A. 2006. Assessment of the effects of imidacloprid on the behavior of two earthworm species (*Aporrectodea nocturna* and *Allolobophora icterica*) using 2D terraria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 198–206.
- Capowiez, Y.; Rault, M.; Mazzia, C. & Belzunces, L. 2003. Earthworm behaviour as a biomarker- a case study in imidacloprid. *Pedobiologia*, 47: 542-547.
- Castellanos- Navarrete, A.; Rodríguez-Aragonés, C.; de Goede, R.G.M.; Kooistra, M.J.; Sayre, K.D.; Brussaard, L. & Pulleman, M.M. 2012. Earthworm activity and soil structural changes under conservation agricultura in central Mexico. *Soil & Tillage Research*, 123: 61-70.
- Christensen, O.M. & Mather, J.C. 1994. *Earthworms as Ecotoxicological Test Organisms* (Ministry of Environment, Danish Environmental Protection Agency, København), p. 100.
- Cuevas, M.; Ferrera, R.; Roldán, A. & Rodríguez, R. 2008. *Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con lombrices. Métodos Ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos*, pp. 211-223.
- Dominguez, J. & Pérez-Lozada, M. 2010. *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) y *Eisenia andrei* Bouché, 1972 son dos especies diferentes de lombrices de tierra. *Acta Zoologica Mexicana* (n.s.) Número Especial 2: 321-331.
- Doran, J.W. & Zeiss, M.R. 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, 15: 3-11.
- Dureja, P.; Dipankar, P.; Johnson, S. & Tomar, S.S. 1999. Effect of agrochemicals on earthworms. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 71: 397-404.
- Gabriel, P.; Loza-Murguía, M.; Mamani, F. & Sainz, H. 2011. Efecto de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) durante el composteo y vermicomposteo en predios de la Estación Experimental de la Unidad Académica Campesina Carmen Pampa. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 2: 24-39.
- Gardi, C.; Angelini, M.; Barceló, S.; Comerma, J.; Cruz Gaistardo, C.; Encina Rojas, A.; Jones, A.; Krasilnikov, P.; Mendoça Santos Brefin, M.L.; Montanarella, L.; Muñiz

- Ugarte, O.; Schad, P.; Vara Rodríguez, M.I. & Vargas, R. (eds). 2014. *Atlas de suelos de América Latina y el Caribe*. Comisión Europea – Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, L-2995. Luxembourg, 176 pp.
- Gómez, A. 2014. *Evaluación de la Toxicología de suelos mediante un bio-ensayo con la lombriz de tierra Eisenia fetida*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Helling, B.; Reinecke, S.A. & Reinecke, A.J. 2000. Effects of the fungicide Copper Oxchloride on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46: 108-116.
- Hickman, Z.A. & Reid, B.J. 2008. Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. *Environmental International*, 34: 1072-1081.
- Hughes, R.J.; Nair, J. & Ho, G. 2008. The toxicity of ammonia / ammonium to the vermifiltration wastewater treatment process. *Water Science and Technology*, 58: 1215-1220.
- Iannacone, J. & Alvarino, L. 2002. Evaluación del riesgo ambiental del insecticida Cartap en bioensayos con tres invertebrados. *Agricultura Técnica*, 62: 366-374.
- Iannacone, J. & Lamas, G. 2003. Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), en el Perú. *Entomotropica*, 18: 95-105.
- Iannacone, J. & Alvarino, L. 2004. *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) (Annelida: Lumbricidae) como modelo ecotoxicológico para evaluar lindano y clorpirifos. *Acta Zoológica Lilloana*, 48: 5-12.
- Iannacone, J. & Alvarino, L. 2005. Selectividad del insecticida Cartap empleando bioensayos con organismos no destinatario. *Ecología Aplicada*, 4: 1-13.
- Iannacone, J.; Alvarino, L. & Paredes, C. 2009. Evaluación del riesgo ambiental del arseniato de plomo en bioensayos con ocho organismos no destinatarios *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 4: 73-82.
- Iannacone, J.; Ayala, H., Alvarino, L.; Paredes E.C.; Villegas, W.; Alomia, J.; Santos, S.; Nolazco, N. & Cruces, L. 2014. Riesgo ecotoxicológico acuático y terrestre del bioplaguicida catahua, *Hura crepitans* (Euphorbiaceae). *Revista Toxicología*, 50; 50-62.
- Lagarto, A. & Vega, R. 1990. *Manual de ensayos de toxicología alternativa*. CIDEM. Cuba.
- Lahive, E.; Jurkschat, K.; Shaw, B.J.; Handy, R.D.; Spurgeon, D.J. & Svendsen, C. 2014. Toxicity of cerium oxide nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*: subtle effects. *Environmental Chemistry*, 11: 268-278.
- Laird, J.M.; Kroger, M. & Heddleson, M.R. 1981. Earthworms. *C R C Critical Reviews in Environmental Control*, 11, No. 3, pp. 189-218.

- Leveque, T.; Capowiez, Y.; Schreck, E.; Mazzia, C.; Auffan, M.; Foucault, Y.; Austruy, A. & Dumat, C. 2013. Assessing ecotoxicity and uptake of metals and metalloids in relation to two different earthworm species (*Eiseina hortensis* and *Lumbricus terrestris*). *Environmental Pollution*, 179: 232-241.
- Lewandowski, A. & Zumwinkle, M. 1999. Assessing the soil system: A review of soil quality literature. Energy and Sustainable Agriculture Program. Minnesota Department of Agriculture. URL: www.mda.state.mn.us.
- Lionetto, M.G.; Calisi, A. & Schettino, T. 2012. *Earthworm Biomarkers as tools for soil pollution assessment*. En: Hernandez-Soriano, M.C. (Ed.). *Soil Health and Land Use Management* (305-332). InTech, Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/soil-health-and-land-usemanagement/earthworm-biomarkers-as-tools-for-soil-pollution-assessment>.
- Lukkari, T.; Aatsinki, M.; Väisänen, A. & Haimi, J. 2005. Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworms tests. *Applied Soil Ecology*, 30: 133–146.
- Macedo, M.E.; Consoli, R.A.; Grande, T.S.; Dos Anjos, A.M.; De Oliveira, A.B.; Mendes, N.M.; Queiroz, R.O. & Zani, C.L. 1997. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92: 565-570.
- Menezes-Oliveira, V.B., Scott-Fordsmand, J.J.; Rocco, A.; Soares, A.M.V.M. & Amorim, M.J.B. 2011. Interaction between density and Cu toxicity for *Enchytraeus crypticus* and *Eisenia fetida* reflecting field scenarios. *Science of the Total Environment*, 409: 3370–3374.
- Monard, C.; Martin-Laurent, F.; Vecchiato, C.; Francez, A.; Vandenkoornhuyse, P. & Binet, F. 2008. Combined effect of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2253-2259.
- Montanarella, L. & Panagos, P. 2015. Policy relevance of Critical Zone Science. *Land Use Policy*, 49: 86-91.
- Mukerjee, M. 1997. Trends in Animal Research. *Scientific American*, pp. 86-93.
- OECD. 1984. *Earthworm, Acute Toxicity Tests*. Guideline for Testing of Chemicals.
- Ouina, T.S.; Panoff, J.M.; Koussémon, M. & Gonnety, T.J. 2017. Effect of pesticides and micro-organisms on earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). *African Journal of Agriculture Research*, 12: 706-712.
- Palafox, A.; Hernandez, A.; Lopez, J. & Cuevas, M. 2012. *Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con lombrices*. En: *Métodos Ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos*. México, D.F.
- Pelosi, C.; Barot, S.; Capowiez, Y.; Hedde, M. & Vandembulcke, F. 2014. Pesticides and earthworms. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34: 199–228.

- Porta, J.; López-Acevedo, M. & Roquero, C. 2003. *Edafología para la Agricultura y el Medio Ambiente* (3^{ra} ed.). Madrid: Ed. Mundi-Prensa.
- Princz, J.; Becker, L.; Scheffczyk, A.; Stephenson, G.; Scroggins, R.; Moser, T. & Rombke, J. 2017. Ecotoxicity of boric acid in standard laboratory test with plants and soil organisms. *Ecotoxicology*, 26:471-481.
- Reeves, D.W. 1997. The role of soil organic matter in maintaining soil quality in continuous cropping systems. *Soil & Tillage Research*, 43: 131-167.
- Richter, D. & Markewitz, D. 1995. How Deep is Soil?. *BioScience*, 45: 600-609.
- Sanchez-Hernandez, J.C. 2006. Earthworm Biomarkers in ecological risk assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 188: 85–126.
- Schaefer, M. 2003. Behavioural endpoints in Earthworm ecotoxicology. *The Journal of Soils and Sediments*, 3: 79–84.
- Schaefer, M.; Peterson, S.O. & Filser, J. 2005. Effects of *Lumbricus terrestris*, *Allolobophora chlorotica* and *Eisenia fetida* on microbial community dynamics in oil-contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 2065-2076.
- Schuldt, M., Rumi, A., & Gutierrez, D. 2005. *Determinación de “edades”(clases) en poblaciones de E. fetida y sus implicancias reprobilógicas*. *Revista del Museo de la Plata Zoología*, 17(170):1-10.
- Schreck, E.; Geret, F.; Gontier, L. & Treilhou, M. 2008. Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere*, 71: 1832–1839.
- Sizmur, T. & Hodson, M.E. 2009. Do earthworms impact metal mobility and availability in soil?- A review. *Environmental Pollution*, 157: 1981–1989.
- Spurgeon, D. J.; Hopkin, S. P. & Jones, D. T. 1994. Effects of Cadmium, Copper, Lead and Zinc on growth, reproduction and survival of the Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing The Environmental Impact of Point-Source Metal Contamination in Terrestrial Ecosystems. *Environmental Pollution*, 84: 123-130.
- Spurgeon, D.J. & Hopkin, S.P. 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: 86–95.
- Stanley, J. & Preetha, G. 2016. *Pesticide toxicity to non-target organisms. Exposure, Toxicity and risk assessment methodologies*. Springer.
- Valera, P. E. 2000. La Lombricultura. *Corporación Autónoma del Valle del Cauca*, Santiago de Cali.
- Wang, Y.; Cang, T.; Zhao, X.; , Yu, R.; Chen, L., Wu, Ch. & Wang, Q. (2012). Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9:122-128.

Firma del profesor Responsable
Dr. José Alberto Iannacone Oliver

Tabla 1. Efecto del sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (Sal de Mohr) sobre *Eisenia foetida* a 48 h de exposición.

Concentración de la sal	Concentración ión amonio	Mortalidad	Fragmentación	Oscurecimiento	Adelgazamiento	Long(cm)	peso (mg)
0	0	0a	0a	0a	0a	8,56	0,46
694,44	62,5	13,33a	13,33a	13,33a	13,33a	7,85	0,41
1388,88	125	16,7a	16,7a	16,7a	20b	8,90	0,44
2777,77	250	36,7b	43,33a	50b	50c	7,90	0,35
5555,55	500	90c	90a	100c	93,33d	8,65	0,31
11111,11	1000	100c	100a	100c	100d	8,80	0,29
	CL(E) ₅₀	228,37	217,29	294,15	193,15		
	CL(E) _{50 inferior}	156,88	150,02	181,43	135,79		
	CL(E) _{50 superior}	332,45	314,72	353,22	274,75		
	NOEC	<62,5	<62,5	<62,5	<62,5		
	LOEC	62,5	62,5	62,5	62,5		

PM del sulfato ferroso amoniacal hexahidrato (Sal de Mohr) = 392,14 g.mol⁻¹

CAS = 7783-85-9.

Fórmula Química Fe(NH₄)₂(SO₄)₂*6H₂O

Tabla 2. Efecto del Metavanadato de amonio sobre *Eisenia foetida* a 48 h de exposición.

Concentración de la sal	Concentración ión amonio	Mortalidad	Ruptura	Oscurecimiento	Adelgazamiento	Long(cm)	peso (mg)
0	0	0a	0a	0a	0a	7,87	0,32
416,66	62,5	83,33b	90b	83,33b	83,33b	7,19	0,34
833,33	125	86,7b	93,33b	90c	86,67b	8,14	0,27
1666,66	250	90bc	100b	93,33c	96,7bc	7,12	0,31
3333,33	500	93,3bc	96,7b	100d	100c	8,14	0,30
6666,66	1000	96,7c	96,7b	100d	100c	8,19	0,36
	CL(E) ₅₀	3,15	0,10	4,86	15,82		
	CL(E) _{50 inferior}	0,64	0,01	1,22	6,29		
	CL(E) _{50 superior}	15,34	1,62	19,28	39,77		
	NOEC	<62,5	<62,5	<62,5	<62,5		
	LOEC	62,5	62,5	62,5	62,5		

PM del Metavanadato de amonio = 116,98 g.mol⁻¹

CAS = 7803-55-6.

Fórmula Química NH₄VO₃

Tabla 3. Efecto del acetato de amonio sobre *Eisenia foetida* a 48 h de exposición.

Concentración de la sal	Concentración ión amonio	Mortalidad	Fragmentación	Oscurecimiento	Adelgazamiento	Long(cm)	peso (mg)
0	0	0a	0a	0a	0a	9,90	0,46
271,74	62,5	6,7a	10a	26,7b	43,33b	9,44	0,45
543,47	125	10a	16,7ab	33,33b	53,33b	6,55	0,41
1086,95	250	13,33a	20b	56,7b	56,7b	9,50	0,43
2173,91	500	77,7b	87,7c	100c	100c	7,70	0,30
4347,82	1000	100c	100c	100c	100c	6,67	0,30
	CL(E) ₅₀	381,69	279,67	209,26	111,34		
	CL(E) _{50 inferior}	252,49	189,83	109,82	25,99		
	CL(E) _{50 superior}	576,99	412,05	398,73	476,99		
	NOEC	250	125	<6,25	<6,25		
	LOEC	500	250	5,26	6,25		

PM del acetato de amonio = 77,08 g.mol⁻¹

CAS = 631-61-8.

Fórmula Química CH₃COONH₄

Tabla 4. Efecto del peroxodisulfato de amonio sobre *Eisenia foetida* a 48 h de exposición.

Concentración de la sal	Concentración ión amonio	Mortalidad	Fragmentación	Oscurecimiento	Adelgazamiento	Long(cm)	peso (mg)
0	0	0a	0a	0a	0a	7,60	0,39
55	8,25	60b	70b	73,33b	76,66b	4,50	0,27
110	16,5	66,66b	73,33b	90c	83,33b	5,20	0,22
220	33	100c	100c	100c	100c	5,50	0,30
440	60	100c	100c	100c	100c	7,60	0,30
880	132	100c	100c	100c	100c	7,88	0,28
	CL(E) ₅₀	3,06	0,20	4,28	0,97		
	CL(E) _{50 inferior}	0,70	0,01	2,79	0,25		
	CL(E) _{50 superior}	13,28	3,05	8,01	3,17		
	NOEC	<7,5	<7,5	<7,5	<7,5		
	LOEC	7,5	7,5	7,5	7,5		

PM del Peroxodisulfato de amonio = 228,18 g.mol⁻¹

CAS = 7727-54-0.

Fórmula Química (NH₄)₂S₂O₈

Tabla 5. Efecto del amonio heptamolibdato tetrahidrato sobre *Eisenia foetida* a 48 h de exposición.

Concentración de la sal	Concentración ión amonio	Mortalidad	Fragmentación	Oscurecimiento	Adelgazamiento	Long(cm)	peso (mg)
0	0	0a	0a	0a	0a	8,20	0,29
781,25	62,5	66,7b	66,7b	70b	70b	8,15	0,27
1562,5	125	96,7c	96,7b	96,7c	96,7c	8,25	0,37
3125	250	100c	100b	100c	100c	8,15	0,26
6250	500	100c	100b	100c	100c	8,20	0,36
12500	1000	100c	100b	100c	100c	8,10	0,27
	CL(E) ₅₀	50,52	50,52	47,39	47,39		
	CL(E) _{50 inferior}	35,69	35,69	32,53	32,53		
	CL(E) _{50 superior}	71,53	71,53	69,04	69,04		
	NOEC	<62,5	<62,5	<62,5	<62,5		
	LOEC	62,5	62,5	62,5	62,5		

PM del amonio heptamolibdato tetrahidrato = 1235,86 g.mol⁻¹

CAS = 12054-85-2.

Fórmula Química (NH₄)₆Mo₇O₂₄*4H₂O