

2 Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con lombrices

Adriana Palafox Alejo, Ángel Héctor Hernández Romero,
Jaime López Luna, María del Carmen Cuevas Díaz

INTRODUCCIÓN

Las lombrices de tierra son un grupo fundamental de la fauna del suelo, ya que constituyen gran parte de la biomasa animal edáfica en varios ecosistemas, tanto en zonas templadas como tropicales. Asimismo, desempeñan un papel ecológico primordial por su influencia en la descomposición de la materia orgánica, el desarrollo de la estructura del suelo y el ciclo de los nutrientes (Ríos, 2005).

Las lombrices causan importantes modificaciones físicas en el suelo (galerías, madrigueras y hoyos) que mejoran el ambiente para el desarrollo de otros organismos (como los microorganismos) e incrementan la disponibilidad de hábitats y alimento para las plantas y otros animales (Lavelle, 1997; Brown *et al.*, 2000). Además, aumentan la porosidad, facilitan la formación de agregados y mejoran la estructura del suelo, promueven la oxigenación y la infiltración de agua, incrementan el transporte de nutrientes y compuestos químicos agrícolas hasta las capas profundas (Subler *et al.*, 1997; Edwards y Bohlen, 1992), contribuyen a la formación del suelo y a reducir la erosión. Sus efectos son especialmente importantes en suelos con estructura pobre (Ríos, 2005).

Durante su proceso de alimentación, succionan o chupan la tierra de las galerías que excavan y digieren de ella las partículas vegetales y animales en descomposición. De esta manera, transforman los residuos orgánicos en humus, el cual devuelven al suelo al expulsarlo por el ano junto con la tierra. Así, participan en la

fertilización del suelo al incrementar su carga microbiana y su contenido de nitrógeno (Elliot *et al.*, 1990). Además, participan de manera importante en el ciclo del carbono, ya sea incrementando su mineralización o disminuyendo su descomposición al formar agregados estables en los cuales este elemento queda protegido (Ríos, 2005).

La contaminación del suelo con compuestos orgánicos, metales pesados, plaguicidas y lluvia ácida puede afectar a las poblaciones de lombrices. Estos contaminantes se acumulan en sus tejidos y pueden constituir un problema para el gran número de animales que se alimentan de ellas, debido a su potencial biomagnificación (Edwards y Bohlen 1992).

Las lombrices se emplean con frecuencia como organismos de prueba para evaluar la toxicidad de los suelos (Cuevas-Díaz *et al.*, 2008). La especie de lombriz más utilizada en las pruebas estandarizadas es *Eisenia andrei* (Bouché, 1972). Esta especie se distribuye naturalmente en casi todo el hemisferio norte; es considerada un bioindicador de la calidad de los suelos, ya que solo es capaz de desarrollarse y reproducirse en condiciones adecuadas de humedad (85 %), temperatura (25 a 30 °C), pH del suelo (6.5 a 7.5) y alimentación (material orgánico agropecuario, industrial y doméstico). Además, *E. andrei* es un organismo de fácil manejo en el laboratorio (Kaplan *et al.*, 1980), casi no contrae enfermedades, tiene un ciclo reproductivo corto (alcanza su madurez sexual en aproximadamente 2 meses) y es extremadamente prolífica (deposita cada 7 a 10 días una cápsula o huevo con un contenido que fluctúa de 2 a 20 embriones) (Domínguez *et al.*, 2005; Santamaría y Ferrera, 2002). Cuando está sexualmente madura, desarrolla una estructura sobre la epidermis que se denomina "clitelo", donde crecen los cocones o cápsulas en los cuales uno o varios huevos son depositados. Posteriormente esta cápsula pasa hacia los segmentos anteriores de la lombriz y es colocada en el suelo. Los juveniles se desarrollan dentro de la cápsula y después emergen de ella.

CAMPO DE APLICACIÓN

Los bioensayos con lombrices se emplean para evaluar la toxicidad de suelos contaminados con hidrocarburos, porque de esta manera se puede predecir el impacto de las mezclas complejas de compuestos como el petróleo e hidrocarburos aromáticos policíclicos sobre los organismos.

Estas pruebas también son útiles para monitorear la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, tanto en laboratorio como en campo (Salanitro,

1997; Meier *et al.*, 1997), ya que la reducción de la contaminación no siempre viene acompañada de una disminución de la toxicidad del suelo debido a la transformación incompleta de los contaminantes o a la formación de metabolitos más tóxicos (Phillips *et al.*, 2000).

Los bioensayos con lombrices pueden realizarse directamente con las muestras de suelo o con sus extractos (elutriados); sin embargo, en este capítulo solo se describen las pruebas directas en suelo.

PRUEBA DE MORTALIDAD EN LOMBRICES

Fundamento del método

Este bioensayo es una prueba aguda, con exposición de 14 días, en la cual se mide la mortalidad a través de la concentración letal media (CL_{50}), la cual representa la concentración del suelo problema que ocasiona la muerte (daño máximo) en el 50 % de las lombrices que han sido expuestas.

Material y equipo

Recipientes de vidrio (diámetro de 4.5 cm y altura de 7 cm)	Balanza analítica
Guantes	Micropipeta de 100 a 1000 μ L
Papel aluminio	Potenciómetro
Papel filtro	
Pinzas	
Pipetas volumétricas (capacidad de 1-100 mL)	
Puntas para micropipeta de 100 a 1000 μ L	
Tela sintética (organza)	

Reactivos

Agua desionizada

2-cloroacetamida 99 %

Soluciones amortiguadoras comerciales para medir pH de 4, 7 y 10

Soluciones

Solución stock de 2-cloroacetamida. Se pesan 225 mg de 2-cloroacetamida y se diluyen en 10 mL de agua (o 4.5 g en 200 mL de agua). Esta solución equivale a 22.5 mg de 2-cloroacetamida por mL de agua. Se prepara únicamente la solución stock que se va utilizar en la prueba.

Organismos de prueba

Para esta pruebas se usan lombrices de la especie *E. andrei* que presenten clitelo y con un peso promedio de 0.30 g.

Estas lombrices se cultivan en contenedores o en lechos de 1.0 m de ancho por 1.5 m de largo, en un sitio con sombra, rodeado de tela mosquitero para evitar que otros animales penetren y se alimenten de las lombrices. En el laboratorio son mantenidas en contenedores plásticos. Las lombrices pueden ser alimentadas con estiércol equino o vacuno, o residuos agroindustriales, como cachaza o bagazo de caña de azúcar, así como residuos de jardinería (con pH cercano a 7 y conductividad iónica menor a 6 mS). Siempre se debe administrar el mismo tipo de alimento para evitar variaciones en el crecimiento de las lombrices (OECD, 1984; Cuevas-Díaz *et al.*, 2008). Se ha probado una mezcla 50:50 de estiércol precompostado de equino y cachaza de caña de azúcar, la cual ha funcionado bien. Para producir suficientes lombrices se deben colocar aproximadamente 20 kg de residuos por 1 kg de lombrices. El precomposteo consiste en dejar el estiércol y la cachaza en composteo durante 10 a 15 días previos a la colocación de lombrices, para que la etapa termofílica en donde la temperatura llega alcanzar hasta 65 °C no inhiba el desarrollo de la lombriz (Santamaría, 1996). Se ajustan la humedad y el pH para que posteriormente las lombrices sean depositadas.

Las lombrices se pueden conseguir del cultivo que se mantiene en la sección de lombricompostaje de la Facultad de Ingeniería en Sistemas Agropecuarios de la Universidad Veracruzana, ubicada en Acayucan, Veracruz (figura 2.1)

Suelo

Se recomienda realizar los bioensayos inmediatamente después de la toma de muestras del suelo problema; pero si esto no es posible, las muestras pueden ser preservadas a 4 °C en la oscuridad hasta 15 días en recipientes de vidrio.

FIGURA 2.1. MÓDULO DE LOMBRICOMPOSTA DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA EN SISTEMAS AGROPECUARIOS (FISPA) DE LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA



El suelo se pasa por una malla para tener un tamaño de partícula menor o igual a 4 mm, ya que en este caso los organismos se introducen en el suelo. Para la prueba se requiere una cantidad total de 1000 g de suelo problema. De este se toman 100 g para determinar la humedad (WSDE, 1996; DOF, 2003), el pH (DOF, 2003; OECD, 1984) y el contenido de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) o hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), conforme lo indica la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (DOF, 2005). Se requieren cuatro réplicas del suelo problema, además de un control negativo (suelo no contaminado) y un control positivo (suelo con 2-cloroacetamida) para comprobar la sensibilidad de las lombrices. El control negativo debe ser un suelo no contaminado y con la misma textura que el suelo problema, al cual se le ajusta la humedad de la misma forma en que se procedió para el suelo problema. También se puede utilizar como control negativo un suelo artificial.

Humedad del suelo

Se debe calcular la humedad que requiere del suelo experimental. Para ello, se coloca una cápsula de porcelana a peso constante. Se pesan 25 g de suelo y se anota el peso de la muestra, incluyendo el peso de la cápsula. Se seca en un estufa de 103 a 104 °C durante 24 h, después se coloca en un desecador para enfriar y se pesa nuevamente. Se anota el peso total. Posteriormente se realizan los siguientes cálculos (WSDE, 1996):

$$H_s = \frac{[P_i - P_f]}{[M - (P_i - P_f)]} \times 100$$

Donde

H_s = humedad del suelo (%)

P_i = peso inicial (peso de la muestra + peso constante de la cápsula, en g)

P_f = peso final después de secar (peso de la muestra seca + peso constante de la cápsula, en g)

M = peso inicial de la muestra utilizada (25 g)

Ejemplo:

$$H_s = \frac{[41 - 36]}{[25 - (41 - 36)]} \times 100 = 25\%$$

Humedad requerida en el suelo experimental

El suelo debe presentar una humedad del 35 a 45 %. Para ajustarla se realiza el siguiente cálculo, en el cual se determina la cantidad de agua que debe suministrarse a los suelos durante las pruebas (WSDE, 1996; Cuevas-Díaz *et al.*, 2008).

$$H_f = H_r - H_s$$

Donde

H_f = humedad a adicionar o faltante en el suelo (%)

H_r = cantidad de humedad requerida para la prueba (35-45 %)

H_s = humedad inicial del suelo (%)

$$W = \frac{M \times H_f \times f}{100}$$

Donde

W = cantidad de agua para adicionar (mL)

M = peso de la muestra (g)

f = factor de conversión (1mL/g)

H_f = humedad a adicionar o faltante en el suelo (%)

Ejemplo

Cálculo del agua requerida para tener una muestra de suelo de 50 g (M) con 45 % de humedad (H_r), sabiendo que su humedad inicial es de 25 % (H_s).

$$H_f = (45 - 25)\% = 20\%$$

$$W = \frac{50 \text{ g} \times 20\% \times 1 \text{ mL/g}}{100} = 10 \text{ mL de agua}$$

Preparación del control positivo

Se utiliza una concentración de 38.5 mg/kg de suelo de 2-cloroacetamida para obtener la concentración letal, pero si se desea realizar otras concentraciones se recomiendan 19.25 y 77 mg/kg (WSDE, 1996). Para preparar, por ejemplo, la concentración de 38.5 mg/kg para 300 g de suelo (se incluyen tres réplicas), se tiene lo siguiente:

$$C_{\text{TOX}} = M \times f \times C$$

C_{TOX} = cantidad del compuesto tóxico de referencia (2-cloroacetamida) a adicionar (mg)

M = peso de la muestra (g)

f = factor de corrección (1 kg/1000 g)

C = concentración neta de 2-cloroacetamida (mg/kg)

Ya que M = 300 g y C = 38.5 mg/kg, entonces:

$$C_{\text{TOX}} = 300 \text{ g} \times \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}} \times 38.5 \frac{\text{mg}}{\text{kg}}$$

$$C_{\text{TOX}} = 11.55 \text{ mg}$$

Para determinar la cantidad de solución *stock* de 2-cloroacetamida para adicionar al suelo, se realiza el cálculo siguiente (WSDE, 1996):

$$V_s = \frac{C_{\text{TOX}}}{S}$$

$$V_s = \frac{11.25 \text{ mg}}{22.5 \text{ mg/mL}} = 0.51 \text{ mL}$$

Donde

V_s = volumen de solución *stock* a adicionar (mL)

C_{TOX} = cantidad de 2-cloroacetamida (mg)

S = concentración de la solución *stock* (mg/mL)

Ejemplo: considerando el resultado obtenido de la cantidad de 2-cloroacetamida (C_{TOX}) que es necesario agregar a una muestra de suelo de 300 g, así como la concentración de la solución *stock* igual (S), se calcula el volumen de solución *stock* a adicionar.

$$V_s = \frac{11.25 \text{ mg}}{22.5 \text{ mg/mL}} = 0.51 \text{ mL}$$

De manera que si se tiene un suelo control de 300 g con una humedad requerida de 45 %, entonces:

$$V_{\text{SD}} = 300 \text{ g} \times 0.45 = 135 \text{ g} = 135 \text{ mL}$$

Lo anterior es la cantidad de solución *stock* diluida en agua (V_{SD}) que es ne-

cesario agregar al suelo control. La cantidad de agua y *stock* que forman dicha dilución se calcula de la siguiente manera:

$$V_w = V_{SD} - V_s = (135.00 - 0.51) \text{ mL} = 134.49 \text{ mL}$$

Lo anterior significa que debemos diluir 0.51 mL de la solución *stock* en 134.49 mL de agua y agregarlos al suelo control; dicho paso debe realizarse en una campana de extracción, utilizando para el suelo un contenedor plástico o de vidrio.

Procedimiento

Preparación de los organismos

La prueba de mortalidad tiene una duración de 14 días. Antes de iniciar las pruebas, las lombrices deben vaciar sus intestinos, para lo cual se depositan en cajas de Petri sobre papel filtro humedecido con agua desionizada durante 5 h (figura 2.2). Finalmente, son lavadas, secadas y pesadas.

FIGURA 2.2. LAVADO DE LOS ORGANISMOS



Desarrollo de la prueba

En los recipientes de vidrio se depositan de 50 a 100 g de suelo problema con una humedad del 45 % y un pH entre 6 y 7. El suelo control y las réplicas deben mantenerse en las mismas condiciones de humedad y pH. Posteriormente se depositan 10 lombrices por recipiente (figura 2.3), y estos se cubren con la tela sintética (organza). La tela evita la pérdida de humedad, pero permite que exista circulación de aire dentro de los recipientes (figura 2.4).

FIGURA 2.3. COLOCACIÓN DE LOS ORGANISMOS EN LOS RECIPIENTES DE PRUEBA



Los recipientes se mantienen a una temperatura de 22 ± 2 °C con luz continua. Transcurridos los primeros 7 días, se vacía el contenido de cada recipiente en uno nuevo y se observa el comportamiento, así como los movimientos de las lombrices ante estímulos de tacto. Las lombrices son nuevamente depositadas en los contenedores originales para continuar con la prueba durante los restantes 7 días. La humedad es medida y ajustada al 45 % (WSDE, 1996; Cuevas-Díaz *et al.*, 2008). Las lombrices no deben alimentarse durante los 14 días que dura la prueba.

FIGURA 2.4. RECIPIENTES DE PRUEBA CUBIERTOS CON ORGANZA



Al término de la prueba (14 días), las lombrices son sacadas de los recipientes y depositadas en unos nuevos para determinar la mortalidad. Se cuentan los organismos vivos, el movimiento y las reacciones ante los estímulos de tacto. Las lombrices que no responden a esos estímulos se consideran muertas. También se pesan para registrar su ganancia de peso al término de la prueba. Finalmente, se mide la humedad y el pH de los suelos (problema y controles).

Cálculos

Se calcula la concentración letal media (CL_{50}) por el método de Probit o Spearman-Kärber recortado. Para ello, se incluye el control y las réplicas.

Método Spearman-Kärber

Se determinan los logaritmos naturales de las concentraciones, y los datos de mortalidad se convierten en probabilidad considerando las muertes y el número total de lombrices en la prueba; se establecen intervalos de los logaritmos de las concentraciones. Para obtener la frecuencia relativa, se calcula la diferencia de las probabilidades de muerte en el intervalo. Posteriormente se multiplica la frecuencia relativa

por la media de la concentración de los logaritmos del intervalo, y a la sumatoria se le aplica el antilogaritmo para obtener la CL_{50} con base en los datos crudos. Hasta aquí se considera el método cuando la mortalidad aumenta conforme lo hacen las concentraciones. En el anexo 1 se incluye un ejemplo de este método.

Si la mortalidad no es proporcional al aumento de concentración, se aplica el método de Spearman-Kärber recortado. Dado que hasta aquí el rango de probabilidad de muertes es muy abierto (de 0 a 1 o de 0 a 100 %), y el valor de la CL_{50} podría no ser exacto por la dispersión de datos, se hace un recorte del rango de probabilidad en un 10 %, tanto en el límite superior como en el inferior. En lugar de ir de 0 a 1, ahora irá de 0.1 a 0.9 o del 10 al 90 %, que es un rango más estrecho en donde se esperaría la mayoría de las muertes (ver anexo 1). La nueva probabilidad será de 0.1, y se deben interpolar los valores para obtener el valor correspondiente a la concentración logarítmica. Para más detalles, revisar Hamilton *et al.* (1977).

Método Probit

Los datos de supervivencia se expresan como porcentajes de mortalidad eliminando los valores extremos que, si la prueba se realizó bien, deben corresponder a 0 % y 100 %; para ello se utiliza la tabla de conversión Probit (ver anexo 2), transformando los porcentajes de mortalidad restantes mediante dicha tabla. Se construye una gráfica representando en el eje de las ordenadas los porcentajes de mortalidad transformados, y en el eje de las abscisas el logaritmo de las concentraciones. Se hace un ajuste a la recta de la gráfica mediante el método de mínimos cuadrados y se interpola el valor de la CL_{50} desde el valor Probit que corresponde al 50 % de mortalidad. A este valor se le saca su antilogaritmo o se sustituye el valor de y (0.5) en la ecuación de la recta ajustada, lo que da un valor más exacto (Serrano, 2010).

Para comprobar el ajuste se emplea la prueba de chi cuadrada, lo que permite comparar los puntos de la gráfica obtenidos experimentalmente y según lo esperado por el ajuste (Castillo, 2004).

Reporte

Para elaborar el reporte se recomienda incluir los siguientes puntos:

- El tipo de contaminante presente en el suelo problema y su concentración.
- La mortalidad (CL_{50}) registrada en el suelo control y en las réplicas del suelo problema.
- La concentración más baja del suelo problema que ocasiona el 100 % de mortalidad.
- El peso de las lombrices al inicio y al final de la prueba.
- La humedad y el pH de los suelos, registrados al inicio y al final de la prueba.

Se pueden utilizar hojas de reporte como las que se incluyen en los anexos 3 y 4.

Control de calidad

La mortalidad en el suelo control no puede exceder el 10 %. El peso de las lombrices en el suelo control no debe ser mayor del 20 %, en relación con el peso inicial. Se debe asegurar que las lombrices se encuentren saludables antes del experimento, para lo cual deben responder a los estímulos de tacto y escapar de la luz (Bembridge, 1998; Fründ *et al.*, 2010). Se debe conservar la misma temperatura durante todo el experimento. Los resultados no se consideran aceptables si en el control negativo, o sea sin compuestos tóxicos, la supervivencia es menor del 90 %.

Se debe probar la sensibilidad del organismo antes de la toma de muestra de suelo con el control positivo. Las lombrices deben provenir de una misma población para evitar variaciones en la prueba. En la tabla 2.1 se resumen las condiciones generales del bioensayo.

TABLA 2.1. RESUMEN DE LAS CONDICIONES RECOMENDADAS PARA LA PRUEBA AGUDA CON LOMBRIZ DE TIERRA

Duración del bioensayo	14 días
Temperatura	22 ± 2 °C
Humedad del suelo	45 %
pH del suelo	6.5-7
Contenedores de prueba	Recipientes de vidrio
Cantidad total de suelo requerida	200 a 400 g
Cantidad de suelo requerida por réplica	50 a 100 g

TABLA 2.1 CONTINÚA

Especie de prueba	Eisenia andrei
Edad del organismo al inicio de la prueba	Más de 2 meses (clitelada)
Número de organismos por réplica	10
Número de réplicas	4
Régimen	Sin alimento
Respuesta a medir	Supervivencia
Control negativo	Suelo no contaminado
Control positivo	2-clorocetamida

PRUEBA DE EVASIÓN O MIGRACIÓN DE LOMBRICES

Fundamento del método

Este ensayo es una prueba aguda (se desarrolla en 48 h) que se puede aplicar como una alternativa a la prueba de mortalidad. Se basa en la evaluación de efectos subletales caracterizados por el comportamiento de evasión de las lombrices, para la cual se mide el número de lombrices que se desplazan desde un suelo contaminado y que, por tanto, evaden la exposición. Dicho comportamiento se calcula a través de la concentración efectiva media (CE_{50}), que indica la concentración a la que el comportamiento de evasión es el 50 % de los organismos expuestos, comparado con el control. Esta prueba se usa para evaluar si el hábitat es funcional para la lombriz (Feisthauer, 2003; Hund *et al.*, 2003).

Material y equipo

Frascos de vidrio (diámetro de 4.5 cm y altura de 7 cm)	Contenedor de prueba
Guantes	Balanza analítica
Papel aluminio	Micropipeta de 100 a 1000 μ L
Papel filtro	Potenciómetro
Pinzas	
Pipetas volumétricas de 1 a 100 mL	
Puntas para micropipeta de 100 a 1000 μ L	
Tela sintética (organza)	

El contenedor de prueba es un recipiente redondo de acero inoxidable o PVC con un diámetro de 21 cm, altura de 5 cm y espesor de 3 mm; tiene seis cámaras unidas en forma radial con paredes (placas) de 6 cm de ancho, 5 cm de altura y un espesor de 2 mm, y una cámara central con un diámetro de 8 cm y paredes de espesor de 2 mm. Las paredes y la cámara central están intercomunicadas con cinco arcos y dos arcos, respectivamente, los cuales tienen una dimensión de 0.5 cm de altura y 1 cm de ancho (figura 2.5).

FIGURA 2.5. CONTENEDOR CON SEIS CÁMARAS: A) CONTENEDOR COMPLETO, B) DIMENSIONES EXTERNAS Y C) DIMENSIONES INTERNAS

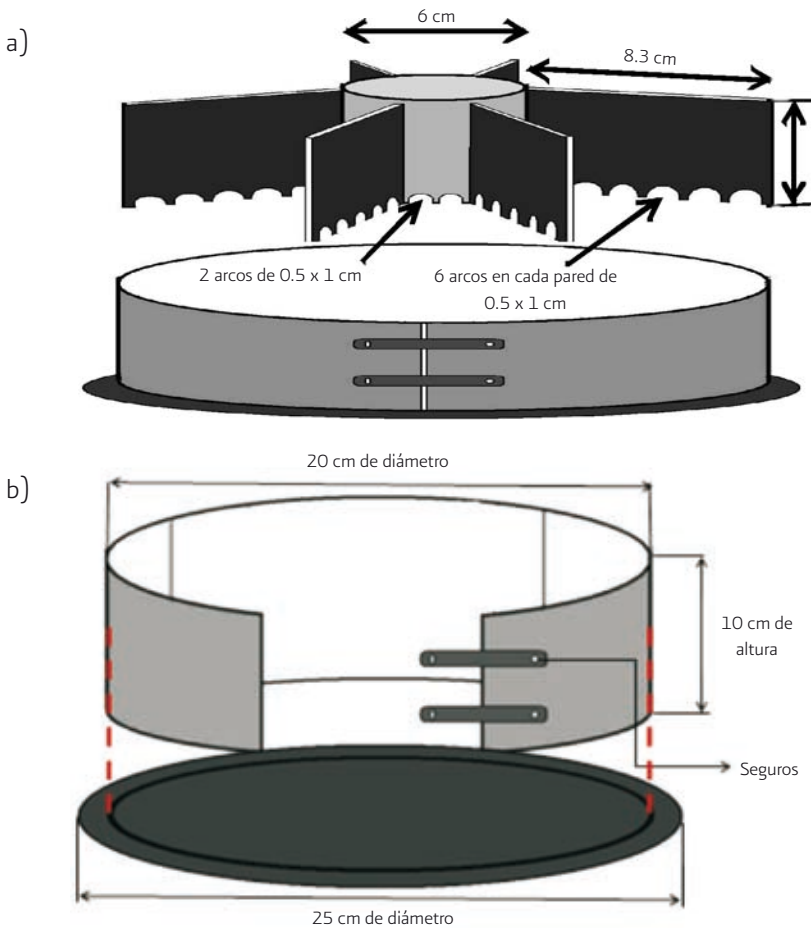
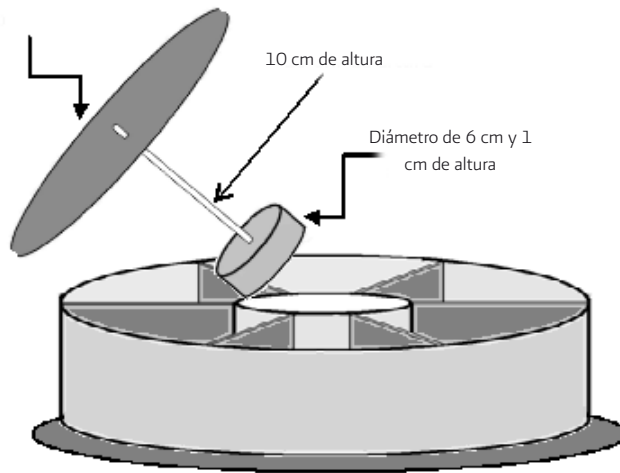


FIGURA 2.5 CONTINÚA

c)



Reactivos

Agua desionizada

Ácido bórico > 98 % grado analítico o 2-cloroacetamida de pureza del 99 %

Soluciones amortiguadoras comerciales para medir pH de 4, 7 y 10

Soluciones

Solución stock de 2-cloroacetamida o de ácido bórico. Se puede utilizar la solución stock de 2-cloroacetamida del bioensayo agudo de 14 días (ver sección anterior) o se puede preparar una solución stock de ácido bórico. En este último caso, para 625 g de suelo en base seca, se pesan 25 g de H_3BO_3 , se depositan en un matraz y se afora a 1 L con agua desionizada.

Organismos de prueba

Se emplean lombrices adultas cliteladas de la misma especie que en la prueba de mortalidad (*E. andrei*), con un peso de 0.250 a 0.500 g cada una. El cultivo y

la alimentación de las lombrices se realizan de la misma forma que en la prueba aguda.

Suelo

El suelo problema (4 kg) se tamiza a través de una malla de 4 mm. Se determina su pH y su capacidad de retención de agua. En función de los resultados de estas determinaciones se realiza el ajuste a un pH de 6.5 a 7.0 y un contenido de humedad del 70 %. Las concentraciones de muestra provienen del suelo contaminado y de las fases del proceso de biorremediación, por lo que se obtienen suelos o muestras con concentraciones diversas.

Para la prueba se utilizan diferentes concentraciones del suelo problema, así como un control negativo y uno positivo.

Preparación del control positivo

Una vez preparada la solución *stock* de ácido bórico (o 2-cloroacetamida), se procede a adicionarla al suelo, considerando 2000 mg de H_3BO_3 por kg de suelo. El volumen de solución *stock* a adicionar se calcula de acuerdo con la concentración de la solución *stock* y con la cantidad de suelo (EC, 2004). Así, la cantidad de H_3BO_3 (en base seca) que se agrega es la siguiente:

$$H_3BO_3 = (2 \text{ g } H_3BO_3 / 1000 \text{ g suelo seco}) \times 625 \text{ g suelo a utilizar}$$
$$H_3BO_3 = 1.25 \text{ g}$$

Como se necesita determinar el volumen de solución *stock* a adicionar, entonces:

$$H_3BO_3 = 1.25 \text{ g } H_3BO_3 / (25 \text{ g } H_3BO_3 / 1000 \text{ mL agua})$$
$$H_3BO_3 = 50 \text{ mL de solución stock}$$

También se requiere la humedad del suelo (H_i), la capacidad de campo (H_{cc}), el porcentaje de humedad requerido (H_{rq}) y la cantidad de humedad a adicionar o faltante (H_f).

$$H_f = (H_{cc} \times H_{rq}) - H_i$$
$$H_f = (56.35 \times 70 / 100) - 18.6$$
$$H_f = 20.84 \%$$

Como se debe calcular el volumen de agua a adicionar (V_{aa}) e incluir la cantidad de suelo a utilizar (P_s), entonces:

$$V_{aa} = (H_f \times P_s) / 100$$
$$V_{aa} = (20.84 \times 625) / 100$$
$$V_{aa} = 130.28 \text{ mL de agua}$$

Pero considerando que se tienen que adicionar 50 mL de solución *stock*, se saca la diferencia:

130.28 mL agua – 50 mL de solución *stock* = 80.28 mL que se deben adicionar de agua.

Se preparan concentraciones de 1000, 500, 100 y 50 mg/kg de suelo diluyendo la solución *stock*, para lo cual se procede de la manera antes descrita.

Procedimiento

Preparación de los organismos

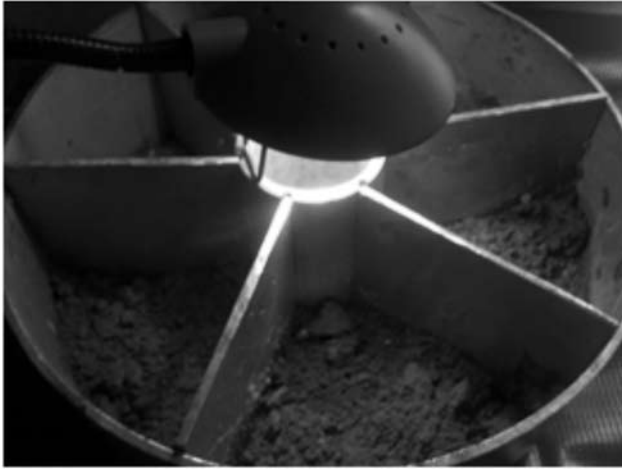
Previamente a la prueba, las lombrices se depositan en cajas de Petri con papel filtro humedecido con agua desionizada, para que vacíen sus intestinos durante 5 h. Posteriormente son lavadas, secadas y pesadas.

Desarrollo de la prueba

Se pesan 100 g del suelo problema y del suelo control, y se colocan en el contenedor de seis cámaras, alternando el suelo control y el suelo contaminado en diferentes concentraciones. Posteriormente se depositan 10 lombrices en la cámara central. La migración de la lombriz es lenta, por lo que, si después de 10 min no se observa migración, se acerca una lámpara para disminuir el tiempo de espera y acelerar el movimiento hacia los compartimentos, cuidando de no dañar a la lombriz (figura 2.6). Cada contenedor tendrá cuando menos cuatro réplicas.

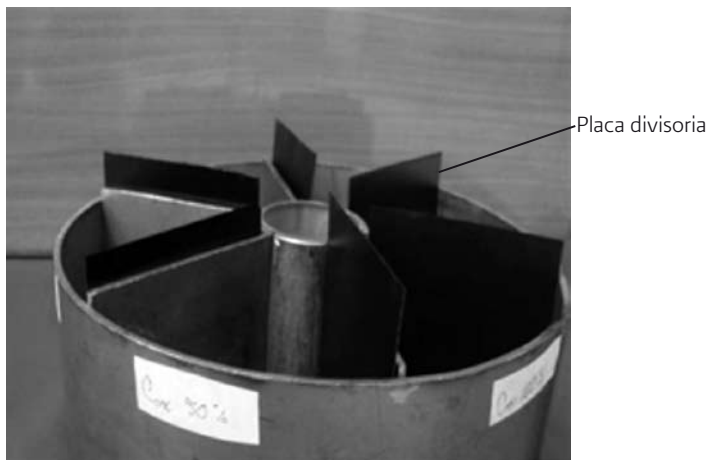
Para evitar que las lombrices escapen, los contenedores deben ser cubiertos con tela de organza y papel aluminio perforado con pequeños orificios, lo cual facilitará la circulación de oxígeno dentro del contenedor y evitará la pérdida excesiva de humedad. Los contenedores deben ser colocados en un lugar donde la luz sea mínima y la temperatura no exceda los 25 °C (Hund y Wiechering, 2001).

FIGURA 2.6. EXPOSICIÓN DE LAS LOMBRICES A LA LUZ PARA FAVORECER SU MIGRACIÓN



Al término de 48 h, las paredes de las cámaras son tapadas con una placa divisoria con dimensiones de 12 cm de altura, 8.3 cm de ancho y espesor de 0.5 mm (figura 2.7) para evitar el movimiento de la lombriz hacia las cámaras vecinas. El suelo y los organismos de cada cámara deberán ser sacados para registrar el número de lombrices en cada una de ellas, así como para evaluar su movimiento ante los estímulos de tacto y registrar su peso al final de la prueba.

FIGURA 2.7. CONTENEDOR CON PLACA INTERMEDIA



Cálculos

Si es una prueba de concentraciones múltiples, que tienen cuatro o más concentraciones y un contenedor por cada concentración (alternando suelo limpio y contaminado), la evasión se determina aplicando la siguiente fórmula a cada réplica (ISO, 2008; De Silva y Van Gesten, 2009):

$$E = \frac{C - P}{L \times 100}$$

Donde

E = evasión (%)

C = número de lombrices en el control

P = número de lombrices en el suelo problema

L = número total de lombrices expuestas

Con estos datos se puede calcular la CE_{50} , que es la concentración de suelo contaminado que genera una respuesta evasiva del 50 %. En ocasiones, como margen de seguridad ante la alta toxicidad de los suelos contaminados, se establece la CE_{20} , que es la concentración que provoca una evasión del 20 %. Ambos indicadores toxicológicos se calculan por el método Probit o Spearman-Kärber. El manejo del *software* libre, como el *Trimmed Spearman Karber Method* (USEPA, 1999b) y el *Probit Program* (USEPA, 1999a) es muy sencillo: simplemente se ingresan los datos en orden creciente de concentración con su respectiva respuesta, y el programa automáticamente hace una comparación entre el suelo control y los tratamientos. Cabe destacar que el programa *Trimmed Spearman Karber Method* solo permite calcular la CE_{50} o la CL_{50} . Los indicadores adicionales, como el CE_{20} , deben obtenerse con el programa Probit.

Si es una prueba con un solo nivel de contaminación y al menos cinco réplicas, alternando suelo contaminado con suelo control (por ejemplo para probar la toxicidad de un suelo biorremediado), se registra el número de lombrices supervivientes en el suelo control y en el problema. Se determinan los promedios y la desviación estándar de las cinco réplicas. El *software* estadístico se puede encontrar en siguiente liga de la página de USEPA: <http://www.epa.gov/eerd/stat2.htm#probit>.

Los dos grupos de datos se comparan unidireccionalmente utilizando la prueba *t* de Student de una sola cola (*one-tailed Student's t-test*) o algún otro método estadístico sensible a la comparación de pares. Debe tomarse en cuenta que en un análisis de doble cola el efecto puede ser positivo o negativo, y aun así sería estadísticamente significativo. Por lo anterior, debe hacerse una predicción de la dirección del efecto antes de realizar el análisis, es decir, establecer si se espera predilección por el suelo control (evasión del suelo contaminado) o predilección por el suelo contaminado. Una vez realizado el análisis con las consideraciones pertinentes, la prueba de doble cola se convierte en una prueba de una sola cola dividiendo entre 2 el valor de *p* que se obtiene en la salida y comparándolo con el nivel de significancia de la prueba. Si los resultados muestran dirección opuesta a la prevista, el valor de *p* en esta dirección debe obtenerse sustrayendo el valor de *p* de la prueba de una sola cola ($1-p$). Debe notarse que si el resultado presenta una dirección opuesta a la prevista, la prueba podría no ser estadísticamente significativa, aun cuando la prueba de doble cola sí lo sea. Basándose en lo anterior, los resultados de las pruebas de evasión que muestren un número promedio de lombrices significativamente menor en el suelo problema o contaminado, con respecto al suelo control, indican una respuesta evasiva al suelo problema o una respuesta preferencial por el suelo control.

Si la mortalidad no es mayor o igual al 50 % en al menos una concentración, no se puede calcular la CL_{50} , por lo que se informa como efecto del 0 % de mortalidad (EC, 2004).

Para evaluar si el suelo analizado es un hábitat adecuado para las lombrices, se evalúan los siguientes criterios: si el 50 % de los organismos se encuentran en el suelo contaminado o tratado, se considera que no muestran preferencia por ningún tipo de suelo y que dicho suelo es un hábitat adecuado. Por su parte, si el porcentaje de lombrices en el suelo contaminado es del 20 %, se considera que el suelo tiene efecto sobre los organismos y, por lo tanto, que es tóxico o de baja calidad (Hund *et al.*, 2003; Hund *et al.*, 2005; Ricardo *et al.*, 2010). Estos criterios sirven de guía; sin embargo, se recomienda tomar como una base más confiable los resultados estadísticos de la prueba.

Reporte

Para elaborar el reporte se recomienda incluir los siguientes puntos:

- El tipo de contaminante presente en el suelo problema y su concentración.
- Las características del suelo problema (pH, contenido de humedad y capacidad de campo).
- Las características de los organismos de prueba (edad al inicio de la prueba, condiciones de cultivo, fuente de alimento, número de organismos utilizados en cada equipo de prueba, etc.).
- El porcentaje de distribución del organismo al final de la prueba (número de lombrices en cada cámara) y el registro de los movimientos ante los estímulos de tacto.
- La concentración más alta de suelo problema que no causa mortalidad (NOAEC, *no observed adverse effect concentration*), que es la máxima concentración a la que no se observan efectos adversos, y la LOAEC (*low observed adverse effect concentration*), que es la mínima concentración a la que se observa un efecto (estos efectos no necesariamente implican mortalidad; pueden ser movilidad de la lombriz, producción de enzimas antioxidantes, número de huevos eclosionados, etc., dependiendo de la prueba que se esté trabajando). Los parámetros toxicológicos NOAEC y LOAEC se determinan por prueba de hipótesis, utilizando el método o la prueba de Dunnett, que permite comparar los tratamientos (suelo contaminado) con el control.
- La concentración más baja del suelo problema que ocasiona el 100 % de comportamiento de evasión.
- El peso de las lombrices al inicio y al final de la prueba.
- Los valores de humedad y pH del suelo registrados durante la prueba.

Control de calidad

Cada mes o cada vez que se efectúe el bioensayo se debe realizar una prueba con el control positivo para determinar la viabilidad de los organismos.

Para que los resultados de la prueba de evasión sean válidos, el número de lombrices muertas o perdidas debe ser menor del 10 % por tratamiento. Se debe controlar en todo momento las condiciones de temperatura durante la prueba.

TABLA 2.2. RESUMEN DE LAS CONDICIONES RECOMENDADAS PARA LA PRUEBA DE EVASIÓN O MIGRACIÓN DE LOMBRICES DE TIERRA.

Duración del bioensayo	48 h
Temperatura	22 ± 2 °C
Humedad del suelo	45-70 %
pH del suelo	6.5-7
Contenedores	Redondos de seis cámaras
Cantidad total de suelo requerida	4 kg
Cantidad de suelo requerida por réplica	100 kg
Especie de prueba	Eisenia andrei
Edad del organismo al inicio de la prueba	Más de 2 meses (clitelada)
Número de organismos por réplica	10
Número de réplicas	4
Régimen	Sin alimento
Respuesta a medir	Movimientos migratorios
Control negativo	Suelo no contaminado
Control positivo	Ácido bórico

Prueba de reproducción en lombrices

Fundamento del método

La prueba de reproducción evalúa el efecto subletal que ejerce la exposición a un suelo contaminado sobre la formación de cápsulas y el número de descendientes de las lombrices (Kapanen e Itávara, 2001). Esta es una prueba crónica con un tiempo de duración de 56 días.

Material y equipo

Frascos de vidrio (diámetro de 4.5 cm y altura de 7 cm)	Balanza analítica
Guantes	Micropipeta de 100 a 1000 µL
Papel aluminio	Potenciómetro
Papel filtro	
Pinzas	

Pipetas volumétricas de 1 a 100 mL	
Puntas para micropipeta de 100 a 1000 μ L	
Tela sintética (organza)	

Reactivos

Agua desionizada

Carbendazim con pureza mayor al 97 %

Ácido bórico (H_3BO_3) con pureza mayor al 98 %

Soluciones amortiguadoras comerciales para medir pH de 4, 7 y 10

Soluciones

Solución stock de carbendazim

Se pesan 6 mg de carbendazim y se mezclan en 10 mL de acetona, lo que proporciona una concentración de 0.6 mg de carbendazim/mL.

Solución stock de ácido bórico (H_3BO_3)

Para preparar esta solución se sigue el mismo procedimiento descrito para la prueba de evasión.

Organismos de prueba

El organismo de prueba utilizado es la lombriz de tierra de la misma especie que en las pruebas anteriores (*E. andrei*). Al inicio de la prueba, los organismos deben haber alcanzado la edad adulta, y presentar clitelo y un peso promedio de 0.300 g, con un rango de 0.300 a 0.600g.

Para cultivar y alimentar a las lombrices se deben seguir los procedimientos descritos en la prueba aguda.

Suelo

Se requieren 1000 g de suelo problema, previamente cribado a través de una malla de 4 mm. Se toman 100 g de este suelo para determinar su capacidad de retención

de agua, contenido de humedad, pH (DOF, 2003; Ortiz y Ortiz, 1990; OECD, 2004) y contenido de HTP (USEPA, 1996b; DOF, 2006) o HAP (USEPA, 1986). Se necesitan cuatro réplicas del suelo problema, así como un control negativo y un control positivo. El suelo problema es el suelo contaminado o el suelo biorremediado.

Preparación del control positivo

De acuerdo con la guía actualizada OECD 222 (OCDE, 2004), se utiliza carbendazim como compuesto tóxico de referencia para esta prueba; sin embargo, la guía EC (2004) recomienda el H_3BO_3 . Si se van a realizar simultáneamente la prueba de evasión y la de reproducción, lo mejor es emplear el H_3BO_3 , ya que funciona como compuesto tóxico de referencia para ambas pruebas.

Para adicionar el carbendazim o el H_3BO_3 al suelo, se realizan los cálculos y el procedimiento descrito para las dos pruebas anteriores.

Procedimiento

Preparación de los organismos

Antes de realizar la prueba, las lombrices son colocadas durante 5 h en cajas de Petri con papel filtro humedecido con agua desionizada, con el fin de vaciar sus intestinos. Posteriormente son lavadas, secadas y pesadas.

Desarrollo de la prueba

Este bioensayo se desarrolla en un tiempo de 8 semanas (56 días), evaluando la respuesta de las lombrices cada 7 días.

Se adicionan 50 a 100 g de suelo problema en los recipientes de vidrio y se añade el 5 % de una mezcla (50:50) de estiércol equino precompostado y cachaza de caña de azúcar, como alimento. Se ajusta la humedad del suelo a entre 45 y 60 % de la capacidad de campo, y el pH a un valor entre 6.0 y 7.0. Con los controles se realizan los mismos ajustes.

Se depositan 10 lombrices en cada recipiente y se cubren con organza y papel aluminio perforado para evitar la pérdida de humedad y permitir la circulación de aire dentro de los recipientes. Se pesan los recipientes para llevar el control de

humedad por diferencia de peso; otra opción es utilizar una balanza de humedad, como el analizador marca Kern, en donde se deposita un gramo de muestra.

Se preparan los controles negativo y positivo con cuatro réplicas, al igual que el suelo problema (Kula y Larink, 1997).

Los contenedores se mantienen a una temperatura de 22 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 18 h de luz y 6 de oscuridad (ISO, 1998). Las lombrices son alimentadas cada semana, adicionando un 5 % de mezcla de estiércol equino y cachaza en proporciones de 50:50.

A los 7 días de haber iniciado la prueba, se vacía el recipiente de cada una de las réplicas sobre uno nuevo y se determina la mortalidad de las lombrices por la ausencia de movimientos o reacciones ante estímulos de tacto. Posteriormente, las lombrices supervivientes son colocadas de nuevo en los recipientes originales de prueba para proseguir con el desarrollo de la prueba. Se mide el contenido de humedad del suelo y, si es necesario, se ajusta nuevamente.

A los 28 días de prueba, las lombrices adultas son separadas para ser contadas y pesadas, y para examinar y registrar los cambios en su morfología o comportamiento ante los estímulos de tacto. Una vez contados, las lombrices jóvenes y los capullos (figura 2.8) se dejan en el contenedor durante las siguientes cuatro semanas.

Cada una de las réplicas y controles se revisa cada 7 días hasta finalizar los 56 días (8 semanas), para llevar un registro del número de lombrices muertas, los movimientos, el peso y el número de capullos producidos por las lombrices supervivientes. Al término de los 56 días, los contenedores se vacían para realizar la cuenta de las lombrices jóvenes y de los capullos. Las lombrices juveniles son observadas para determinar sus movimientos y su peso, y también se pesan las lombrices adultas. Se mide la humedad y el pH del suelo (EC, 2004; Cuevas-Díaz *et al.*, 2008).

Para facilitar la cuenta de lombrices juveniles, los contenedores se pueden colocar en un baño maría a una temperatura de 50 a 60°C; después de 20 min, las lombrices juveniles tienden a subir a la superficie, y así se pueden retirar para contarlas (ISO, 1998).

Cálculos

Para evaluar los efectos en la reproducción, se emplean los siguientes parámetros:

FIGURA 2.8. CAPULLOS DE LOMBRIZ



- Se calcula la CL_{50} a partir de los datos de mortalidad y la CE_{50} a partir de los resultados de las concentraciones, para estimar la concentración en donde se reduce un 50 % la reproducción. Para ello, se pueden emplear los métodos Probit o Spearman-Kärber recortado.
- Se calcula la NOEC (*no observed effect concentration*), que corresponde a la concentración máxima del suelo problema en la cual no se observan efectos en las lombrices.
- Se calcula la media y la desviación estándar del número de lombrices juveniles en cada réplica por cada concentración. Posteriormente se comparan estos parámetros entre las diferentes concentraciones y en relación con los controles a través de un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias (por ejemplo, la prueba de Dunnett), con un intervalo de confianza del 95 %.

Reporte

Para elaborar el reporte, al igual que en las otras pruebas, se recomienda incluir los siguientes puntos (USEPA, 1996a; ISO, 1998; OECD, 2004):

- El tipo de contaminante presente en el suelo problema y su concentración.
- Las características del suelo problema (pH, contenido de humedad y capacidad de campo) antes, durante y al término de la prueba.
- Las características de los organismos de prueba (especie, nombre, edad al inicio de la prueba, condiciones de cultivo, fuente de alimento, número de organismos utilizados en cada equipo de prueba, etc.).
- Detalles de preparación del suelo.
- Descripción de los contenedores usados y el volumen de suelo empleado.

- Condiciones de la prueba, como temperatura, intensidad de la luz, ciclos de luz y oscuridad.
- Una tabla con los resultados de mortalidad por concentración, réplica y control.
- Peso de las lombrices adultas al inicio y de las lombrices adultas supervivientes después de 4 semanas de prueba por cada recipiente.
- Número de juveniles por contenedor.
- La LC_{50} , la mayor concentración en donde no se observa efecto (NOEC) y la concentración más baja en donde se observa efecto (LOEC).
- Descripción de patologías o cambio de comportamiento (por ejemplo, disminución de la ingesta de alimento).
- Asimismo, se deberá anotar cualquier desviación del procedimiento o suceso inusual.

Control de calidad

Los capullos, lombrices juveniles y adultas deben manipularse lo menos posible para evitarles daños y estrés. Cuando la manipulación sea necesaria, como en el caso de mover los organismos del área de cultivo al contenedor, se debe realizar de forma rápida y correcta, utilizando guantes o pinzas con puntas redondas.

Se debe llevar el control de la humedad para evitar que la falta de esta afecte a las lombrices. No debe presentarse una diferencia en humedad del suelo mayor del 10 % entre el inicio y el final (ISO, 1998).

Para que los resultados de esta prueba sean válidos, la variación en reproducción entre las réplicas del control negativo debe ser menor al 30 %, o su productividad debe ser de al menos un promedio de 3 lombrices juveniles por adulto, y la mortalidad del total de lombrices debe ser menor al 10 % después de 28 días (Kula, 1997).

TABLA 2.3. RESUMEN DE LAS CONDICIONES RECOMENDADAS PARA LA PRUEBA DE REPRODUCCIÓN CON LOMBRICES DE TIERRA

Tiempo de prueba	56 días
Temperatura	22 ± 2 °C
Contenido de humedad del suelo	45 a 70 %
pH del suelo	6 a 7
Alimento	Estiércol de equino y vacuno, residuos de jardinería y cachaza

TABLA 2.3 CONTINÚA

Contenedores de prueba	Recipientes de vidrio de 4.5 cm de diámetro y 7 cm de altura
Cantidad total de suelo requerida para la prueba	1000 g
Cantidad de suelo requerida por contenedor	50 a 100 g
Organismo prueba	<i>Eisenia andrei</i>
Edad del organismo al inicio de la prueba	Al menos 2 meses (lombrices cliteladas)
Número de organismos por réplica	10
Número de réplicas	4
Control negativo	Suelo no contaminado
Control positivo	Carbendazim o ácido bórico

Consideraciones generales para el control de calidad en las pruebas con lombrices

Para asegurar la calidad de los bioensayos con lombrices, se debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

La preparación del suelo problema debe realizarse en un lapso no mayor de 24 h en una campana de extracción. Si esto no es posible, entonces el suelo se almacena a una temperatura de 4 °C por un lapso no mayor de 14 días, ya que puede presentarse la pérdida de algunos componentes volátiles del suelo.

Las condiciones particulares requeridas en cada prueba deben mantenerse dentro de los rangos especificados para cada una de ellas.

Las lombrices deben provenir de un cultivo puro conocido, y no deben ser usadas cuando han estado sometidas a estrés debido a condiciones extremas, como falta de comida y cambios bruscos de pH o temperatura (Presley *et al.*, 1996), ya que esto puede afectar los resultados. Todas las lombrices deben presentar su clitelo bien formado al inicio de las pruebas, para garantizar una uniformidad en su estado de madurez y, por lo tanto, en su sensibilidad a los contaminantes.

La precisión de los bioensayos debe determinarse a través de la construcción de una carta control. Dicha carta se puede iniciar realizando cuatro pruebas con un compuesto tóxico de referencia, como se indicó en cada uno de los bioensayos. Con los resultados de estas pruebas se calculan la media, la desviación estándar y coeficiente de variación (WSDE, 1996). Cada mes debe repetirse al menos una

de estas pruebas para mantener un registro continuo de la sensibilidad de nuestro cultivo de lombrices.

REFERENCIAS

- Bembridge, J.D. 1998. Recommendations from the Second International Workshop on Earthworm Ecotoxicology, Amsterdam, Netherlands. En: Sheppard, S., Bembridge, J., Holmstrup, M., Posthuma, L. (editores). *Advances in Earthworm Ecotoxicology*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, EUA.
- Brown, G.G., Barois, I., Lavelle, P. 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edafic functional domains. *European Journal of Soil Biology*. 36, 177-198.
- Castillo, G. 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México.
- Cuevas-Díaz, M.C., Roldán-Martín, A., Ferrera-Cerrato, R., Rodríguez-Vázquez, R. 2008. Ensayo de toxicidad aguda con *Eisenia andrei*. En: Ramírez Romero, P., Mendoza Cantú, A. (compiladoras). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
- De Silva, P.M.C.S., Van Gestel, C.A.M. 2009. Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionix excavatus* in earthworm avoidance test using two soil types in the tropics. *Chemosphere*. 77: 1609-1613.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2003. Norma Oficial Mexicana NOM-021-SE-MARNAT-2000. Establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Publicado el 23 de abril.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2005. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SE-MARNAT/SS-2003. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Publicado el 28 de marzo.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2006. Norma Mexicana NMX-AA-134-SCFI-2006. Suelos. Hidrocarburos. Fracción pesada por extracción y gravimetría. Método de prueba. Publicado el 12 de octubre.
- Domínguez, J., Velando, A., Ferreiro, A. 2005. Are *Eisenia fétida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouche (1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species? *Pedobiología*. 49, 81-87.

- Edwards, C.A., Bohlen, P.J. 1992. Effects of toxic chemicals on earthworm. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 125, 23-99.
- Elliot, P.W., Knight, E., Anderson, J.M. 1990. Denitrification in earthworm cast and soil from pasture under different fertilizer and drainage regimes. *Soil Biology and Biochemistry*. 22: 601-605.
- Environment Canada (EC). 2004. Biological Test Method: Tests for Toxicity of Contaminated Soil to Earthworms (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*). Environmental Protection Series. EPS 1/RM/43 2004. Method Development and Application Section. Environmental Technology Center, Ottawa, Canadá.
- Feisthauer, N. 2003. Using earthworm behaviour to assess contaminated soil. Environmental Science and Engineering. www.esemag.com/archive/0503/earthworm.html. Consultado en mayo de 2009.
- Fründ, H.C., Butt, K., Capowiez, Y., Eisenhauer, N., Emmerling, C., Ernst, G., Potthoff, M., Schädler, M., Schrader, S. 2010. Using earthworms as model organisms in the laboratory: Recommendations for experimental implementations. *Pedobiologia*. 53, 119-125.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurson, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology*. 11, 714-719.
- Hund, R.K., Wiechering, H. 2001. Earthworm avoidance test for soil assessments. *Journal of Soils and Sediments*. 1, 15-20.
- Hund, R.K., Achazi, R., Römcke, J., Warnecke, D. 2003. Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicator for the habitat function of soil. *Journal of Soils and Sediments*. 3, 7-12.
- Hund R.K, Lindemann, M. y Markus Simon, M. 2005. Experiences with Novel Approaches in Earthworm Testing Alternatives. *Journal of Soils and Sediments*. 5, 233-239.
- International Standard Organization (ISO).1998. *Soil quality-effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida)*.Parte 2. Determination of effects on reproduction. ISO-11268-2(E). Suiza.
- International Standard Organization (ISO). 2008. *Soil quality-Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour*. Parte 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*).ISO-17512-1. Suiza.
- Kapanen, A., Itávara, M. 2001. Ecotoxicity tests for compost applications. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 49, 1-16.
- Kaplan, D.L., Hartenstein, R., Neuhauser, E.F., Maleckit, M.R. 1980. Physicochemical requirements in the environment of the earthworm *Eiseniafoetida*. *Soil Biology and Biochemistry*. 12, 347-352.

- Kula, C. 1997. Endpoints in laboratory testing with earthworms experience with regard to regulatory decisions for plant protection products. En: Sheppard, S., Bembridge, J., Holmstrup, M., Posthuma, L. (editores). *Advances in earthworm ecotoxicology*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, EUA.
- Kula, H., Larink, O. 1997. Development and standarization of test methods for the prediction of sublethal effects of chemicals on earthworms. *Soil Biology and Biochemistry*. 29, 635-639.
- Lavelle, P. 1997. Faunal activities and soil processes: adaptative strategies that determine ecosystem function. *Advances in Ecological Research*. 24: 93-132.
- Meier, J.R., Chang, L.W., Jacob, S., Torsella, J. Meckes, M.C., Smith, M.K. 1997. Use of plant and earthworm bioassays to evaluate remediation of soil from a site contaminated with polychlorinated biphenyls. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16: 928-938.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 1984. *Earthworm, Acute Toxicity Test*. Guidelines for testing of chemicals. No. 207. París, Francia.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2004. *Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*. Guidelines for testing of chemicals. No 222. París, Francia.
- Ortiz, V. B y Ortiz, S.C.A. 1990. *Edafología*. Univesidad Autónoma de Chapingo, Departamento de suelos. Chapingo, México.
- Phillips, T.M., Liu, D., Seech, A.G., Lee, H., Trevors, J.T. 2000. Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 24, 132-139.
- Presley, M.L., McElroy, T.C., Diehl, W.J. 1996. Soil moisture and temperature interact to affect growth survivorship, fecundity, and fitness in the earthworm *Eisenia fetida*. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology*. 114, 319-326.
- Ricardo, T., Maitre, M.I. Rodríguez, A.R. 2010. Efectos subletales de la lambda-cialotrina sobre *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta, Lumbricidae). *Ciencia del Suelo*. 28, 39-46.
- Ríos, Y. 2005. Importancia de las Lombrices en la Agricultura. En: Nieves, D., Vivas, J., Zambrano, C. (editores). *Sistemas integrados de producción con especies no rumiantes*. VIII Encuentro de Nutrición y Producción de Animales Monogástricos. Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora, Venezuela.
- Salanitro, J.P. 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environmental Science and Technology*. 31, 1769-1776.
- Santamaría, R.S. 1996. Aspectos biotecnológicos del proceso de lombricomposteo y su

- aplicación agronómica. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Santamaría, R.S., Ferrera, R. 2002. Dinámica Poblacional de *Eisenia andrei* (Bouche1972) en diferentes residuos orgánicos. *Terra*. 20, 303-310.
- Serrano, G.R. 2010. *Introducción al análisis de datos experimentales. Tratamiento de datos en bioensayos*. Universitat Janume I. España.
- Subler, S., Baranski, C.M. Edwards, C.A. 1997. Earthworms additions increased short-term nitrogen availability and leaching in two grain-crop agroecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*. 29, 413-421.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1986. *Polynuclear aromatic hydrocarbons*. Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. SWE 846. (Revisión 0), EUA.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996a. *Earthworm subchronic toxicity test*. Ecological effects guidelines. OPPTS 850.6200. EPA-712-C-96-767. EUA.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996b. *Total recoverable petroleum hydrocarbons by infrared spectrophotometry*. Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. SWE 846. (Revisión 0), EUA.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1999a. *Probit Analysis Program*, Software ver. 1.5. EUA. <http://www.epa.gov/eerd/stat2.htm#tsk>. Consultado en agosto de 2010.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1999b. *Trimmed Spearman Karber Method*. Software ver. 1.5. EUA. <http://www.epa.gov/eerd/stat2.htm#tsk>. Consultado en agosto de 2010.
- Washington State Department of Ecology (WSDE). 1996. Earthworm bioassay protocol for soil toxicity screening. Publicación No. 96-327. EUA.

ANEXO 1. EJEMPLO DE LA APLICACIÓN DEL MÉTODO SPEARMAN-KARBER PARA CALCULAR LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL_{50}) (HAMILTON ET AL., 1977)

El siguiente ejemplo es una prueba con lombrices expuestas a concentraciones crecientes de pireno. Se utilizaron 5 contenedores con 10 lombrices en cada uno. Se calculó el logaritmo natural (\ln) de las concentraciones, y al final de la prueba se cuantificaron las lombrices muertas. La mortalidad se convirtió en probabilidad en función del número total de lombrices en cada contenedor. En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos.

	Contenedor				
	1	2	3	4	5
Concentración (mg/kg)	10	50	200	800	3000
Logaritmo natural de la concentración	2.303	3.912	5.298	6.685	8.006
Número de lombrices	10	10	10	10	10
Número de muertes	0	2	6	10	10
Probabilidad de muerte (p muerte)	0	0.2	0.6	1	1

Posteriormente se establecieron intervalos de los logaritmos de las concentraciones y se calculó la frecuencia relativa de las muertes por diferencia de probabilidad en dichos intervalos (p muerte en $3.912 - p$ muerte en $2.303 = 0.2 - 0 = 0.2$).

Entonces se obtuvo la sumatoria del producto de la frecuencia relativa y el promedio de los intervalos ($\mu = 4.860$) para calcular $CL_{50} = e^{4.860} = 129.024$ mg/kg. En la siguiente tabla se resumen dichos cálculos.

1	Intervalos del logaritmo natural de la concentración	(2.303-3.912)	(3.912-5.298)	(5.298-6.685)	(6.685-8.006)	Total
2	Frecuencia relativa	0.2	0.4	0.4	0	1

3	Promedio por intervalo	3.107	4.605	5.991	7.345	
	2X3	0.621	1.842	2.396	0	4.860
	$\mu=4.860$	CL50= $e4.860$	CL50= 129.024 mg/kg			

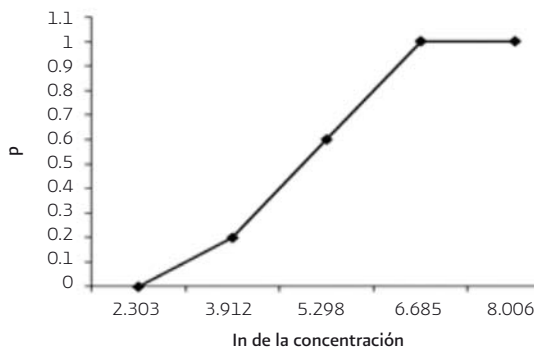
Idealmente se espera que la mortalidad se incremente con las concentraciones y que no se presenten muertes en el control, pero en toxicología esto no suele ser común. Entonces se recurre al método Spearman-Kärber recortado que, para fines ilustrativos, se explicará a continuación utilizando los mismos datos.

Ejemplo de la aplicación del método Spearman-Kärber recortado

En el ejemplo anterior, el rango de probabilidad de muerte se manejó totalmente abierto, del 0 al 100 % (0 a 1), y la CL_{50} podría no ser muy exacta si se presentara mayor dispersión de los datos. Por lo tanto, se recorta en un 10 % el rango de probabilidad en los límites superior e inferior. Ahora se tiene un rango de probabilidad más estrecho, del 10 al 90 % (0.1 a 0.9), donde se espera que caiga la mayoría de las muertes.

Entonces se debe calcular el logaritmo del intervalo de concentración cuando $p = 0.1$ y $p = 0.9$, para lo cual se utiliza una gráfica de probabilidades y los intervalos de concentración.

De esta forma, para $p = 0.1$ el logaritmo natural de la concentración es igual a 3.107, y para $p = 0.9$ es igual a 6.338.



Se genera una nueva tabla de valores con probabilidades de 0.1 a 0.9, donde se conservan los valores logarítmicos del intervalo de concentración, pero se recalculan las probabilidades considerando el recorte del 10 % que se hizo en el límite superior e inferior, quedando una p total del 80 % (0.8). Con este ajuste se normaliza la probabilidad y se obtiene un rango que va nuevamente del 0 al 100 % (0 a 1). Con estos nuevos valores se establecen los intervalos de concentración y se sigue el procedimiento explicado anteriormente para calcular la CL_{50} . La tabla siguiente resume esos cálculos.

Nuevos datos				
Logaritmo natural de las concentraciones	3.107	3.912	5.298	6.338
Nueva probabilidad $(p-0.1)/0.8$	0	0.125	0.625	1
1 Intervalos del logaritmo natural de las concentraciones	(3.107-3.912)	(3.912-5.298)	(5.298-6.338)	Total
Frecuencia relativa	0.125	0.5	0.375	1
3 Promedio por intervalo	3.509	4.605	5.818	
2X3	0.439	2.302	2.182	4.923
$\mu=4.923$	LC50= e4.923	CL50=137.414 mg/kg		

Nótese que la CL_{50} es igual a 129.024 mg/k con el método Spearman-Kärber, e igual a 137.414 mg/kg con el método Spearman-Kärber recortado. El recorte puede ser cualquier porcentaje dependiendo de la dispersión de los datos, de si se presenta mortalidad en el control y de si la mortalidad es o no proporcional al incremento de las concentraciones.

El *software* para este último método (USEPA, 1999b) puede ajustar automáticamente el recorte de acuerdo con los datos alimentados en el programa, y permite calcular la CL_{50} de manera muy sencilla y rápida.

ANEXO 2. TABLA DE CONVERSIÓN DE VALORES PROBIT

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
%	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99a	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	9.09

^a Valores entre 99.0 y 99.9

ANEXO 3. FORMATO DE REPORTE DE RESULTADOS DE LA PRUEBA DE MORTALIDAD EN LOMBRICES

Tipo de lombriz											
Peso de la lombriz (g)											
Datos iniciales			Datos día 14			Efectos subletales (día 14)					
Fecha: ___/___/___			Fecha: ___/___/___								
Humedad (%)	pH	Temperatura (°C)	Lombrices vivas	Humedad (%)	pH	Temperatura (°C)	Lombrices vivas	Lombrices vivas	Tipo	Porcentaje	
Observaciones y comentarios						Día 7					
Responsable técnico						Día 14					

ANEXO 4. FORMATO DE DATOS DE LA PRUEBA AGUDA

Datos generales

Duración de la prueba	
Fecha de inicio	
Tipo de lombriz	
Tipo de contaminante	

Datos específicos

pH de la muestra de suelo	
Número de lombrices	
Número de réplicas	
Total de lombrices en el control negativo	
Lombrices vivas en el control negativo	
Observaciones y comentarios	
Responsable técnico	

