

Desarrollo del ensayo de toxicidad estandarizado OECD n° 207 en lombriz de tierra expuesta al pesticida organofosforado Dimetoato.

Martínez-Morcillo S., Rodríguez Testón J.L., Míguez Santiyán M.P., Soler F., Pérez-López M.*

Unidad de Toxicología. Facultad de Veterinaria (UEX). Avda de la Universidad s/n. 10003 Cáceres.

Resumen: La importancia de los estudios toxicológicos sobre suelos es evidente, y el desarrollo y uso de los ensayos estandarizados para llevarlos a cabo es un campo en constante crecimiento. En el presente trabajo se ha procedido a realizar el ensayo de toxicidad aguda con lombrices de tierra *Eisenia foetida* de acuerdo con el protocolo estandarizado de la OECD n° 207. La sustancia activa de elección ha sido el insecticida organofosforado dimetoato. A partir de la concentración recomendada por el fabricante del formulado comercial DIMAFID40, y siguiendo el protocolo arriba indicado, se ha realizado una exposición a 5 concentraciones diferentes del pesticida (0,001%; 0,01%; 0,1%; 1%; 10%), estableciéndose además un grupo control. Como primer resultado merece destacar que, a mayor dosis de ensayo del producto, mayor ha sido el porcentaje de mortalidad en los animales, observándose además mayores cambios fisiopatológicos en los animales expuestos. Dichos cambios no fueron evidentes en todos los grupos de animales, si bien fueron progresivos y cada vez más claros a medida que aumentaba la concentración de pesticida. La Concentración Letal Media (CL₅₀) del ensayo coincidió con la concentración recomendada por el fabricante, estableciéndose en 0,1%. Por su parte, el Nivel sin efecto observable (NOEL), de gran relevancia ambiental, se alcanzó a una concentración diez veces inferior a la concentración recomendada por el fabricante.

Palabras clave: Toxicidad aguda, Lombriz de tierra, OECD 207, Pesticida, Dimetoato.

Abstract: *Development of the OECD standardized toxicity test no. 207 on earthworms exposed to the organophosphorus pesticide Dimethoate.*

It is evident the relevance of toxicological studies on soils, and the development and use of standardized tests to carry them out is a field in constant growth. In the present work, the acute toxicity test with *Eisenia foetida* earthworms has been performed according to the standardized protocol of the OECD n° 207. The active substance of choice has been the organophosphate insecticide Dimethoate. Starting from the concentration recommended by the manufacturer of the commercial formulation DIMAFID40, an exposure to 5 different concentrations of the pesticide (0.001%; 0.01%; 0.1%; 1%; 10%) was performed, also establishing a control group. As a first result, it is worth mentioning that, the higher the test dose of the product, the higher the percentage of mortality in the animals. Furthermore, major physical-pathological changes were observed in exposed animals. These changes were not evident in all groups of animals, although they were progressive and clearly increasing as the concentration of pesticide raised. The lethal Media Concentration (LC₅₀) of the trial coincided with the concentration recommended by the manufacturer, being set at 0.1%. Moreover, the level with no observed effect (NOEL), of great environmental relevance, was reached at a concentration ten times lower than the concentration recommended by the manufacturer.

Keywords: Acute toxicity, Earthworm, OECD 207, Pesticide, Dimethoate.

Introducción

El uso de plaguicidas en agricultura provoca cambios químicos en el suelo que pueden conducir a una pérdida de su calidad, lo que podría derivar en la contaminación del mismo (Frampton et al., 2006). Este

riesgo justifica el hecho de que se realicen numerosos ensayos de toxicidad en los suelos para conocer los efectos de la exposición a diferentes productos químicos sobre los seres vivos que ocupan esos importantes ecosistemas. Las lombrices de tierra son posiblemente los componentes más relevantes de la biota del suelo. Su presencia y participación en una amplia variedad de procesos en el suelo contribuye a la formación y mantenimiento de su fertilidad en diferentes ecosistemas (bosques y tierras de cultivo). Transportan nutrientes y minerales hasta la superficie mediante sus desechos y, gracias a los túneles que excavan, oxigenan la tierra. Representan, además, la mayor biomasa animal en la mayoría de los ecosistemas templados terrestres y allí donde son abundantes pueden procesar hasta 250 toneladas de suelo por hectárea (Domínguez et al., 2009). De hecho, y justamente por esta íntima relación con los suelos, son uno de los organismos más usados como bioindicadores de la toxicidad de estos (Blanchart y Julka, 1997).

Eisenia foetida o lombriz roja es la especie más utilizada en el reciclaje de residuos orgánicos mediante el proceso de vermicompostaje y es ampliamente usada en estudios de ecotoxicología, debido a que tiene una distribución cosmopolita, ciclos de vida cortos, rango amplio de tolerancia a la temperatura y a la humedad y manejo relativamente sencillo (Domínguez y Edwards, 2004).

El dimetoato [0,0-dimetil-S (N-metil-carbonilmetil) fosforoditioato], es un plaguicida que pertenece al grupo de los organofosforados y posee actividad insecticida y acaricida, siendo usado frecuentemente en cultivos y plantaciones para evitar su deterioro (Lasram et al., 2014). Sin embargo, y aunque tiene baja persistencia en el medio, el uso continuado del dimetoato en cultivos puede plantear un serio peligro para la salud en animales, personas y medio ambiente, a través de la exposición continuada desde los cultivos, el suelo, y/o el agua (Ferdinand et al., 2014). Muchos de los formulados comerciales que contienen esta sustancia activa son tóxicos para las comunidades microbianas, siendo capaces de inhibir la actividad oxidativa e hidrolítica de algunos procesos bioquímicos esenciales del suelo (Sannino y Gianfreda, 2001; Gianfreda y Rao, 2008).

Numerosos estudios han evaluado los efectos sobre las lombrices de tierra de los pesticidas organofosforados (Pelosi et al., 2014), entre los que se encuentran daño en el ADN intracelular (Cassabé et al., 2007), cambios en la actividad de biomarcadores de estrés oxidativo como las enzimas superóxido dismutasa, catalasa o glutatión S-transferasa (Booth et al., 2001; Schreck et al., 2008; Wang et al., 2012), inhibición de la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa (Booth et al., 2001; Venkateswara-Rao et al., 2003; Olvera-Velona et al., 2008; Schreck et al., 2008) y carboxilesterasa (Sánchez-Hernández y Wheelock, 2009), inestabilidad de la membrana lisosomal de las lombrices (Booth et al., 2001; Cassabé et al., 2007) y alteraciones en la morfología subcelular y alteraciones histológicas (Venkateswara-Rao et al., 2003). En este sentido, Chakra-Reddy y Venkateswara-Rao (2008), estudiaron la respuesta biológica de lombrices de la especie *Eisenia foetida* frente al organofosforado profenofos. De forma similar, Cáceres et al. (2011) estudiaron la biotransformación del insecticida fenamifós en *Eisenia foetida*.

Los ensayos de toxicidad son usados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota. Los individuos usados en estos experimentos deben estar sanos y aclimatados, y además han de poseer una alta sensibilidad a los tóxicos y contaminantes (Buikema et al., 1982). Específicamente, los bioensayos con lombrices son ampliamente reconocidos como prueba para evaluar la toxicidad de

*e-mail: marcospl@unex.es

suelos contaminados (Dorn et al. 1998; Wilson et al., 2002), tanto en estudios agudos como crónicos (Lanno et al., 2004). En este sentido, el protocolo estandarizado internacional de la OECD n° 207 evalúa la toxicidad aguda en el suelo usando lombrices de tierra (OECD, 1984). Este protocolo propone dos tipos de test o ensayos: test de toxicidad aguda en contacto con papel de filtro de 0,2 mm de espesor y test en suelo artificial (también de tipo agudo), empleando las especies de lombrices *Eisenia foetida* o *Eisenia andrei*, ambas con gran facilidad de manejo en el laboratorio (Tomlin y Miller, 1989). La prueba por contacto en papel de filtro expone las lombrices a sustancias prueba sobre un papel de filtro húmedo, teniendo una duración de 48 a 72 horas, y representando un método opcional para identificar aquellas sustancias que puedan ser tóxicas para las lombrices de tierra en contacto con el suelo (OECD, 1984).

Por su parte, el uso de suelo artificial conlleva colocar las lombrices en un suelo artificial aplicando una serie de concentraciones de la sustancia prueba. Cuando se desea evaluar la toxicidad del suelo contaminado de un sitio en estudio o de un suelo restaurado, la prueba se puede realizar directamente con este. Para la prueba de contacto la sustancia problema se expresa en mg/cm², mientras que para suelo artificial y muestras de suelo contaminado se expresa en mg/kg (base seca). Para que una prueba sea considerada como válida, la mortalidad en el control no debe exceder el 10% final del período de exposición. Así mismo, es recomendable el uso de un control positivo con un compuesto de referencia para asegurarse que las condiciones utilizadas en la prueba fueron adecuadas y no presenta ningún cambio significativo. Con estas consideraciones, el objetivo planteado en el presente estudio es estudiar la toxicidad de un preparado comercial de Dimetoato (DIMA FID40) sobre la lombriz de tierra, mediante la determinación de la Concentración Letal Media (CL₅₀), Dosis Letal 100 (DL₁₀₀) y el Nivel sin efecto observable (NOEL) y estudiar y describir los efectos fisiopatológicos observados tras su exposición al plaguicida.

Materiales y Métodos

Reactivos y muestras biológicas

Todos los reactivos empleados fueron de calidad adecuada, procedentes de la casa comercial Sigma-Aldrich. Además, se usó el producto insecticida comercial DIMA FID40 (40% pureza), compuesto por dimetoato y los solventes orgánicos xileno y ciclohexanona. La concentración recomendada por el fabricante es de 0,1 a 0,15 mg/l (concentraciones de 10 a 15%), considerando que el dimetoato se encuentra en un 40% de su peso. El fabricante también indica en la etiqueta las concentraciones de xileno y ciclohexanona que contiene el formulado (13 y 43%, respectivamente).

Los organismos del ensayo fueron lombrices de tierra de la especie *Eisenia foetida*. Se adquirieron en un vivero situado en Zorita (Cáceres), dedicado a la fabricación de humus de lombriz 100% ecológico (por tanto, las lombrices se encuentran en un hábitat libre de contaminantes químicos). Se adquirió un número suficiente de lombrices como para poder seleccionar individuos adultos, con un peso (0,24±0,06g) adecuado a tales características (OECD, 1984). Una vez seleccionadas, se transportaron a la Unidad de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, donde se almacenaron en recipientes plásticos y se aclimataron durante una semana a 150.

Ensayo de toxicidad aguda OECD n° 207

A partir de la concentración recomendada por el fabricante (CRF: 0,10%) se establecieron los cinco grupos de experimentación, con dos concentraciones superiores (10 y 100 veces mayor) y otras dos inferiores (10 y 100 veces menor) a la recomendada, siendo el grupo 1 (0,001%) el de menor concentración y el 5 (10%) el de mayor concentración. La concentración de sustancia activa se expresa en mg/cm² (Tabla 1). Se establecieron dos grupos control: uno contenía agua destilada y otro los solventes orgánicos xileno y ciclohexanona (a las concentraciones del preparado comercial). El número de

lombrices total del ensayo (N) fue de 70.

Tabla 1. Concentraciones de cada uno de los grupos experimentales (*CRF: concentración recomendada por el fabricante).

Grupo	Concentración (%)	Concentración (mg/cm ²)
1	0,001	0,615
2	0,01	6,15.10 ⁻²
3	0,1 (*CRF)	6,15.10 ⁻³
4	1	6,15.10 ⁻⁴
5	10	6,15.10 ⁻⁵

Tras la aclimatación de las lombrices en recipientes plásticos, se introdujeron en una cámara de cultivo (Velp Scientific) a 15°C en oscuridad durante una semana y se seleccionaron exclusivamente lombrices adultas, de un tamaño y peso homogéneo para, a continuación, proceder a vaciar su contenido intestinal. Para ello, se mantuvieron en papel de filtro húmedo durante 12 horas antes de ser colocadas en placas de Petri en cuya base se colocó el papel de filtro del mismo tamaño de la circunferencia de la misma, y cuyos bordes no poseen ni irregularidades ni estrías. Por cada concentración se usaron 10 réplicas (con una lombriz cada una), además de los dos grupos control con agua y con los solventes orgánicos del producto comercial. Tras el vaciado del contenido intestinal, se realizó el ensayo a tiempo 0 (t=0). Primeramente, se prepararon cinco tubos de ensayo y se aplicó el producto (DIMA FID40) sobre la placa a partir de una concentración del 10% (2 ml de producto en 18 ml de agua destilada) para realizar diluciones seriadas 1/10. Se prepararon también dos tubos de ensayo, uno con agua destilada y otro con la mezcla de solventes. La aplicación del producto sobre la placa se realizó de forma homogénea para que el papel de filtro se impregnase igual en toda su superficie. En los controles se añadió un 1 ml de agua destilada por placa (controles de agua) y 1 ml de la mezcla de los solventes orgánicos (control xileno y ciclohexanona). Posteriormente, se introdujeron las lombrices al azar, una en cada placa, y se incubaron a 15 °C en oscuridad.

Al inicio del ensayo se pesaron las lombrices. Estos valores de pesada se correspondieron con P_0 ó *Peso a tiempo 0*. Tras la pesada, se seleccionaron 10 lombrices procedentes de la misma población aclimatada para el ensayo. De este modo se obtuvieron muestras de animales no expuestos a *tiempo 0*. Otras 10 lombrices permanecieron 72 horas en las mismas condiciones que las del ensayo, pasado el cual se volvieron a pesar a P_{72} ó *Peso a tiempo 72*. Las lombrices no expuestas antes y después del ensayo se almacenaron a -80 °C.

Estudio estadístico

Para la realización del estudio estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el paquete GraphPad Prism 6. Dicho estudio consistió en un análisis de los principales estadísticos descriptivos (media y desviación estándar) de los valores obtenidos tras el ensayo. Se aplicó la prueba de *Kolmogorov-Smirnov*. Su objetivo reside en la comprobación de si las variables se distribuyen normalmente en este ensayo. Una vez verificada una distribución normal, se realizaron análisis paramétricos. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a partir de un valor de $p < 0,05$.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos del ensayo se expresan según lo descrito en el protocolo de la OECD n° 207.

Cambios fisiopatológicos observados

En la Tabla 2 se representa el promedio de los pesos de las lombrices por grupo al inicio (t=0h), y al final del ensayo (t=72h), además del porcentaje de peso corporal que han perdido durante el transcurso del mismo. Los valores muestran una pérdida de peso de las lombrices durante el ensayo (de t=0 horas a t=72 horas), excepto el grupo 2, que alcanza un valor positivo equivalente a una ligera ganancia de peso (0,54%).

Tabla 2. Promedio de pesos (expresados en gramos) por grupos al comienzo (t=0 horas) y al final (t=72 horas) del ensayo y sus pérdidas de peso correspondientes expresadas en porcentaje.

Grupos	Promedio t=0 h	Promedio t=72 h	Pérdida peso (%)
Control	0,258	0,227	-11,98
*Control x+c	0,234	0,217	-7,28
1 (0,001%)	0,245	0,239	-2,38
2 (0,01%)	0,287	0,289	0,54
3 (0,1%)	0,235	0,149	-36,51
4 (1%)	0,220	0,147	-33,04
5 (10%)	0,205	0,145	-29,47

Se observa, además, que el porcentaje de pérdida de peso es mayor en concentraciones más elevadas. En el grupo 3 se dio la mayor diferencia entre ambas pesadas (-36,41%), muy parecidas a las del grupo 4 (-33,03%), mientras que el grupo 5, a pesar de exponerse a la mayor concentración de sustancia, tuvo el valor menor con respecto a los dos grupos anteriores (-29,48%), pudiendo entenderse por la muerte de todas las lombrices durante el ensayo. Como se observa, se aprecian diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) en los grupos 4 y 5 y (p<0,01) en el grupo 3 (Figura 1).

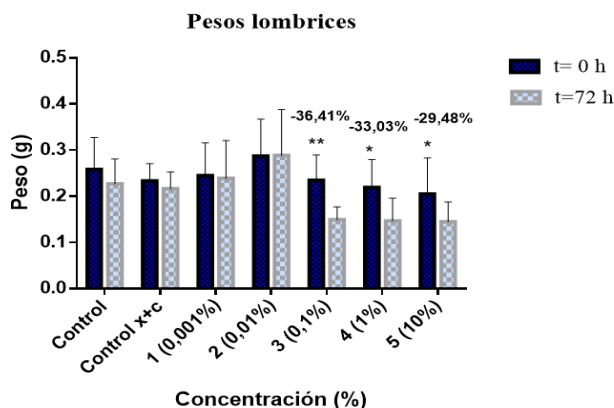


Figura 1: Evolución en los pesos de las lombrices a t=0 horas y t=72 horas y % de pérdida de peso en aquellos que mostraron diferencias estadísticamente significativas (*:p<0,05; **:p<0,01).

No son evidentes en todos los grupos de animales los cambios físicos, si bien cabe destacar que se producen cambios progresivos y cada vez

más evidentes a medida que aumenta la concentración de pesticida. Tanto los dos grupos controles como los grupos 1 (0,001%) y 2 (0,01%) presentan una actividad física normal. No se producen cambios en su comportamiento y sus movimientos son sincrónicos y constantes. En cambio, los grupos 3 (0,1%), 4 (1%) y 5 (10%) sí presentan cambios físico-patológicos evidentes. En el grupo 3, a t=72 horas, se observa una respuesta lenta a los estímulos, y los supervivientes presentaron movimientos lentos y más asincrónicos. En el grupo 4, a t=72 horas, hubo una nula respuesta a estímulos en prácticamente todas las lombrices. Muchas de ellas se observaron que habían muerto y se vislumbró a su alrededor un halo de color amarillento procedente de la cavidad celómica (Figura 2). Aquellas que todavía permanecían vivas, se encontraban enrolladas sobre sí mismas y en un estado de debilidad extrema con fallecimiento poco tiempo después. Solo una llegó a sobrevivir. Por último, en el grupo 5, a la máxima concentración, todas las lombrices murieron tras acabar el ensayo. A t=0 horas, en el momento en el que se puso en contacto a la lombriz con el producto, se observaron espasmos bruscos y violentos en cada una de ellas con una reacción exagerada y desproporcionada ante cualquier estímulo y finalmente enrollan la cola. Minutos después, se observó una retracción espontánea de su cuerpo y una ausencia de respuesta. A t=72 horas, se observó la presencia de un halo de líquido amarillento desprendido de la cavidad celómica y una segmentación corporal evidente.



Figura 2: Halo amarillento de líquido procedente de la cavidad celómica tras la muerte de la lombriz.

Mortalidad del ensayo

En la tabla 3 se muestra el número de lombrices tanto vivas como muertas al comienzo y al final del ensayo, así como el porcentaje de mortalidad que se atribuye a cada concentración. Como se observa, las muertes se producen a partir del grupo 3 (0,1%), que a su vez coincide con la concentración recomendada por el fabricante de producto. De las 10 lombrices de este grupo, mueren 5. En el grupo 4 (1%) son 9 las lombrices que mueren a t=72 horas. Por último, en el grupo 5 (10%) hay un 100% de mortalidad. No se observa mortalidad alguna en los grupos control, así como en los grupos 1 y 2.

Tabla 3. Número de lombrices vivas y muertas a t=0 horas y a t=72 horas y % de mortalidad al final del ensayo.

	t= 0 h		t= 72 h		% mortalidad
	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	
Control	10	0	10	0	0
*Control x+c	10	0	10	0	0
1 (0,001%)	10	0	10	0	0
2 (0,01%)	10	0	10	0	0
3 (0,1%) (CRF)	10	0	5	5	50
4 (1%)	10	0	1	9	90
5 (10%)	10	0	0	10	100

*: control xileno+ciclohexanona

Dosis Letal 100 (DL₁₀₀), Nivel sin efecto observable (NOEL) y Concentración Letal Media (CL₅₀)

La Dosis Letal 100 (DL₁₀₀) es la concentración de producto a la que se produce el 100% de mortalidad. En este ensayo, el DIMAFID40 causa la DL₁₀₀ a una concentración del 10%. Por su parte, el nivel sin efecto observable o NOEL es la mayor concentración o cantidad de una sustancia que no causa alteraciones en la morfología, capacidad funcional, crecimiento, desarrollo o duración de la vida de los organismos diana. El NOEL es de 0,01% (concentración 10 veces inferior a la CRF).

La Concentración Letal Media o CL₅₀ es la concentración, en aire o en agua, de un agente o sustancia que causa una mortalidad del 50% en los organismos de una población durante la exposición, o en un plazo definido después de ésta y bajo un conjunto de condiciones definidas. El valor de la CL₅₀ se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen de aire normal (mg/l). La CL₅₀ se obtiene a partir de los resultados obtenidos al finalizar el ensayo. Se evalúa la mortalidad de las lombrices a t=72 horas en relación con la concentración de producto aplicado. De esta manera, se elabora una curva que representa la dosis-respuesta de cada grupo y se establece

cuál es la concentración a la que mueren la mitad de las lombrices. Según lo descrito en la Tabla 3, se observa que en el grupo 3 se produce la muerte del 50% de las lombrices. Este grupo representa la concentración recomendada por el fabricante de producto, es decir, la CL_{50} coincide con la concentración recomendada por el fabricante (Figura 3).

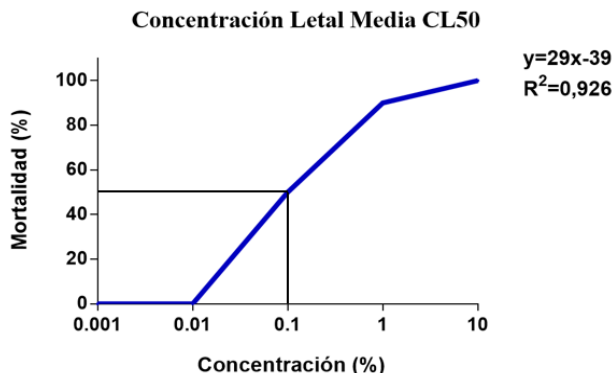


Figura 3: Representación gráfica de la CL_{50} en relación a su dosis-respuesta (mortalidad).

Discusión

Relacionando los objetivos de este ensayo con los resultados obtenidos, se observa la existencia de efectos letales a la concentración de producto recomendada por el fabricante (0,1%). De hecho, como ya se ha mencionado, la CL_{50} se alcanza a dicha concentración. Los efectos letales son mayores a medida que se aumenta la concentración, hasta alcanzar el 100% de mortalidad a la mayor concentración ensayada de producto (10%). Además, cuando la lombriz se expone a la máxima concentración del insecticida, se observa una sintomatología característica. Este hecho se asociaría a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, AChE, cuya función es desactivar la acetilcolina en el sistema nervioso, por lo que se genera un exceso de actividad colinérgica, responsable de la polineuropatía retardada que tiene lugar tras su exposición.

El estudio de la toxicidad de distintos organofosforados en lombrices de la especie *Eisenia foetida* es un campo de investigación relevante. Wang et al. (2015) estudiaron cuatro insecticidas organofosforados (clorpirifós, phoxim, piridafentión y triazofós) y calcularon la concentración a la que alcanzaban la CL_{50} . El clorpirifós alcanzaba la CL_{50} a 14,19 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, el phoxim a 54,65 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, el piridafentión a 3,84 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y el triazofós a 14,21 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Si comparamos estos resultados con los de nuestro ensayo, la CL_{50} se alcanza a una concentración de 0,1%, o 6,15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Se observa cómo, a excepción del piridafentión, el resto de organofosforados necesitaba concentraciones más altas para llegar a la CL_{50} en comparación a la formulación comercial de dimetoato usado en el presente ensayo. Por otra parte, estos resultados no dejan de ser relativos, ya que existen diferentes formulaciones de un mismo producto que pueden causar diferentes efectos tras su exposición.

Rault et al. (2008) estudiaron el efecto en dos especies de lombrices (*Apodectorea caliginosa* y *Allobophora chlorotica*) de una exposición a largo plazo a etil-paratión. Se usaron dos concentraciones distintas de producto. Una de ellas fue la concentración recomendada por el fabricante (1 mg/kg) y otra concentración fue diez veces superior (10 mg/kg). El peso de las lombrices fue medido semanalmente durante 14 días y posteriormente durante 8 semanas en suelo no contaminado. Al igual que en nuestro trabajo, se midieron las pérdidas de peso respecto a los grupos control tres días después de la exposición, siendo esta pérdida de un 10% para la menor concentración y de un 15% para la mayor concentración. Después de 28 días, ambas especies de lombrices perdieron similares cantidades de peso.

Chakra-Reddy y Venkateswara-Rao (2008) estudiaron la respuesta biológica en *Eisenia foetida* al profenofós, otro insecticida organofosforado, observando a $t=24$ horas y a $t=48$ horas la CL_{50} de producto (4,56 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 3,55 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente). La CL_{50} se alcanzaba a una concentración menor de producto. Además, la CL_{50} disminuía a medida que transcurría el tiempo de ensayo. Este trabajo mostraba que el profenofós presentaba una toxicidad elevada para la especie de lombrices utilizada (*Eisenia foetida*), presentando incluso unos niveles de toxicidad superiores a los del presente trabajo.

El protocolo de la OECD n° 207 es internacionalmente reconocido y con él se realizan numerosos experimentos y/o ensayos, como el realizado por García-Velasco et al. (2016) acerca de la toxicidad resultante tras la exposición de lombrices (*E. foetida*) a nanopartículas de plata. En otro estudio reciente, se realiza el test del papel de filtro para evaluar los efectos de diversos tóxicos y toxinas, como es el caso de la aflatoxina B1 (Szabo-Fodor et al., 2017). Por ello, ya sea para el estudio de un insecticida o para el de cualquier otro contaminante, su uso está muy extendido, para evaluar el efecto de los mismos sobre organismos del suelo como son las lombrices de tierra.

Conclusiones

El producto comercial ensayado (DIMAFID40) alcanza la CL_{50} a la concentración recomendada por el fabricante (CRF) y alcanza la DL_{100} a la concentración máxima de producto y el NOEL a una concentración diez veces inferior a la concentración recomendada por el fabricante. El ensayo estandarizado con lombriz muestra su utilidad como método alternativo en los programas de monitorización de contaminantes en suelos.

Bibliografía

1. Blanchart E, Julka JM. Influence of forest disturbance on earthworm (*Oligochaeta*) communities in the Western Ghats (South India). *Soil Biol. Chem.* 1997; 29(3), 303-306.
2. Booth LH, O'Halloran K. A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 2001, 20(11), 2494-2502.
3. Buikema AL, Niederlehner BR, Cairns J. Biological monitoring part IV-Toxicity testing. *Water Res.* 1982, 16(3), 239-262.
4. Cáceres TP, Megharaj M, Naidu R. Toxicity and transformation of insecticide fenamiphos to the earthworm *Eisenia foetida*. *Ecotoxicol.* 2011, 20(1), 20-28.
5. Cassabé N, Piola L, Fuchs J, Oneto M, Pamparato L, Basack S, Kesten E. Ecotoxicological assesment of the effects of the glyphosate and chlorpyrifos in an Argentinan soya field. *J. Soil. Sediment.* 2007, 7(4), 232-239.
6. Chakra-Reddy N, Venkateswara-Rao J. Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2008, 71(2), 574-582.
7. Domínguez J, Aira M, Gómez-Brandon M. El papel de las lombrices de tierra en la descomposición de la materia orgánica y el ciclo de nutrientes. *Ecosistemas* 2009, 18(2), 20-31.
8. Domínguez J, Edwards CA. Vermicomposting organic waster: A review. En Shakir SH, Mikhaíl WZA. (Eds.), *Soil zoology for sustainable development in the 21st century*, Geocities, El Cairo, Egipto. 2004: p. 369-396.
9. Dorn PB, Vipond TE, Salanitro JP, Wisniewski HL. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soil using earthworms, microtox and plants. *Chemosphere* 1998, 37(5), 845-860.
10. Ferdinand N, Watcho P, Kenfack P, Manga JN, Defang HF,

- Pierre K, Tchouemboe J.* Effect of Dimethoate (an organophosphate insecticide) on the reproductive system and fertility of adult male rat. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* 2014, 9(1), 75-83.
11. *Frampton GK, Jänsch S, Scott-Fordsmand JJ, Römbke J, Van den Brink PJ.* Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies: A review and analysis using species sensitivity distributions. *Environ. Toxicol. Chem.* 2006, 25: 2480-2489.
 12. *García-Velasco N, Gandariasbeitia M, Irizar A, Soto M.* Uptake route and resulting toxicity of silver nanoparticles in *Eisenia foetida* earthworm exposed through Standard OECD Tests. *Ecotoxicol.* 2016, 25(8), 1543-1555.
 13. *Gianfreda L, Rao MA.* Interactions between xenobiotics and microbial and enzymatic soil activity. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 2008, 38(4), 269-310.
 14. *Lanno R, Wells J, Conder J, Bradham K, Basta N.* The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2004, 57(1), 39-47.
 15. *Lasram MM, Bini Douib I, Bouzid K, Annabi A, El Elj N, Dhouib H, El Fazaa S, Abdelmoula J, Gharbi N.* Effects of N-acetyl-l-cysteine, *in vivo*, against pathological changes induced by malathion. *Toxicol. Mech. Method.* 2014, 24(4): 294-306.
 16. *OECD.* OECD guidelines for testing of chemicals: Earthworm acute toxicity test OECD guideline NO. 207. París, Francia, 1984.
 17. *Olvera-Velona A, Capowicz Y, Masclé O, Ortiz-Hernández L, Benoit P.* Assessment of the toxicity of ethyl-parathion to earthworms *Aporrectodea caliginosa* using behavioural, physiological and biochemical markers. *Appl. Soil Ecol.* 2008, 40(3), 476-483.
 18. *Pelosi C, Barot S, Capowicz Y, Hedde M, Vandenbulcke F.* Pesticides and earthworms. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 2014, 34(1), 199-228.
 19. *Rault M, Collange B, Mazzia C, Capowicz Y.* Dynamics of acetylcholinesterase activity recovery in two earthworm species following exposure to ethyl-parathion. *Soil Biol. Biochem.* 2008, 40(12), 3086-3091.
 20. *Sánchez-Hernández JC, Wheelock CE.* Tissue distribution, isozyme abundance and sensitivity to chlorpyrifos-oxon of carboxylesterases in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Environ. Poll.* 2009, 157(1), 264-272.
 21. *Sannino F, Gianfreda L.* Pesticide influence on soil enzymatic activities. *Chemosphere* 2001, 45(4-5), 417-425.
 22. *Schreck E, Geret F, Gontier L, Treilhou M.* Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere* 2008, 71(10), 1832-1839.
 23. *Szabo-Fodor J, Bors I, Nagy G, Kovacs M.* Toxicological effects of aflatoxin B1 on the earthworm *Eisenia foetida* as determined in a contact paper test. *Mycotoxin Res.* 2017, 33(2). 109-112.
 24. *Tomlin AD, Miller JJ.* Development and fecundity of the manure worm, *Eisenia foetida*, (Annelida: Lumbricidae) under laboratory conditions. *Soil Biology as Related to Land Use Practices. Proceedings of Seventh International Soil Zoology Colloquium, New York, USA, 1987.*
 25. *Venkateswara-Rao J, Surya Pavan Y, Madhavendra SS.* Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2003, 54(3), 296-301.
 26. *Wang K, Pang S, Mu X, Qi S, Li D, Cui F, Wang C.* Biological response of earthworm, *Eisenia foetida*, to five neonicotinoid insecticides. *Chemosphere* 2015, 132, 120-126.
 27. *Wang Y, Cang T, Zhao X, Yu R, Chen L, Wu C, Wang Q.* Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia foetida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2012, 79, 122-128.
 28. *Wilson JJ, Hathcer J, Goudey JS.* Ecotoxicological endpoints for contaminated site remediation. *Ann. I. Super. Sanita* 2002, 38(2), 143-147.