



*The World's Largest Open Access Agricultural & Applied Economics Digital Library*

**This document is discoverable and free to researchers across the globe due to the work of AgEcon Search.**

**Help ensure our sustainability.**

Give to AgEcon Search

AgEcon Search

<http://ageconsearch.umn.edu>

[aesearch@umn.edu](mailto:aesearch@umn.edu)

*Papers downloaded from **AgEcon Search** may be used for non-commercial purposes and personal study only. No other use, including posting to another Internet site, is permitted without permission from the copyright owner (not AgEcon Search), or as allowed under the provisions of Fair Use, U.S. Copyright Act, Title 17 U.S.C.*

*No endorsement of AgEcon Search or its fundraising activities by the author(s) of the following work or their employer(s) is intended or implied.*

# DETERMINACIÓN DE CL50 Y CE50 DE ENDOSULFÁN LACTONA Y DIAZINÓN EN LOMBRIZ DE TIERRA (*Eisenia foetida*)

## DETERMINATION OF LC50 AND EC50 FROM ENDOSULFAN LACTONE AND DIAZINON IN EARTHWORM (*Eisenia foetida*)

Vázquez-Villegas, P.T.<sup>1</sup>; Meza-Gordillo, R.<sup>1\*</sup>; Gutiérrez-Miceli, F.A.<sup>1</sup>; Ruíz-Valdiviezo, V.M.<sup>1</sup>; Villalobos-Maldonado, J.J.<sup>1</sup>; Montes-Molina, J.A.<sup>1</sup>; Fernández-Toledo, A.A.J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. Carretera Panamericana km 1080, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

\*Autor de correspondencia: rociomezagordillo@gmail.com

### RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la toxicidad aguda como concentración letal media (CL50) y concentración efectiva media (CE50) de endosulfán lactona y diazinón en lombriz de tierra (*Eisenia foetida*), así como sus efectos fisiológicos visibles. La metodología a seguir fue la establecida por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE 207) haciendo uso de las técnicas de papel filtro (PPF) a 48 horas y de sustrato artificial (PSA) a 14 días, teniendo como resultado valores de CL50=7.1  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ; 0.60  $\text{mg kg}^{-1}$  y CE50=9.6  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ; 0.41  $\text{mg kg}^{-1}$  de endosulfán lactona para PPF y PSA, respectivamente; y CL50=14.9  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ; 139  $\text{mg kg}^{-1}$  y CE50=11.77  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ; 187  $\text{mg kg}^{-1}$  de diazinón, para PPF y PSA respectivamente, evaluado mediante análisis Probit. Los efectos fisiológicos principales en la lombriz fueron inhibición del crecimiento, adelgazamiento, seccionamiento, sangrado, hinchamiento en parte superior e inferior y la muerte. Los resultados demuestran que endosulfán lactona es más tóxico que diazinón para *Eisenia foetida*.

**Palabras clave:** Toxicidad, bioensayo, análisis Probit, *Eisenia foetida*, plaguicidas.

### ABSTRACT

This study evaluates acute toxicity as the mean lethal concentration (LC50) and the mean effective concentration (EC50) of endosulfan lactone and diazinon in *Eisenia foetida* earthworm, as well as its visible physiological effects. The methodology followed was established by the OECD (207) using the techniques of filter paper (FPT) at 48 hours and artificial substrate (AST) at 14 days, resulting in CL50=7.1  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ; 0.60  $\text{mg kg}^{-1}$  and CE50=9.6  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ; 0.41  $\text{mg kg}^{-1}$  of endosulfan lactone, in FPT and AST respectively; and CL50=14.9  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ; 139  $\text{mg kg}^{-1}$  y CE50=11.77  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ; 187  $\text{mg kg}^{-1}$  of diazinon, in FPT and AST respectively, evaluated by Probit analysis. The main physiological effects on the worm were growth inhibition, thinning, sectioning, bleeding, upper and lower swelling and death. The results show that endosulfan lactone is more toxic than diazinon for *Eisenia foetida*.

**Key words:** Toxicity, bioassay, Probit analysis, *Eisenia foetida*, pesticides.

## INTRODUCCIÓN

**Los plaguicidas** son sustancias químicas empleadas principalmente en la agricultura para combatir parásitos de ganado y de cultivos. Algunos plaguicidas tienen funciones acorde al tipo de organismo que atacan, pueden ser fungicidas, herbicidas, insecticidas, entre otros, como es el caso del diazinón y el endosulfán (Ortíz-Hernández *et al.*, 2014).

El diazinón es un plaguicida organofosforado de amplio espectro, que bloquea la actividad de la enzima acetil colinesterasa que inhibe la acetilcolina ligada a la transmisión de impulsos nerviosos, causando convulsiones, parálisis y muerte en insectos y algunos mamíferos (Cáceres *et al.*, 2010; Cycon *et al.*, 2013). Este compuesto tiene una vida media en suelo de 40 días, lo que significa que es degradada de manera relativamente rápida comparada con otros plaguicidas de similar estructura como el coumafós o el isofenfos que permanecen hasta 150 días en el suelo (Cáceres *et al.*, 2010), pero que no son tan comúnmente usados.

Por otro lado, el endosulfán es un plaguicida organoclorado que se encuentra en mezcla de isómeros ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y se transforma en condiciones aeróbicas biológicas de oxidación en endosulfán sulfato, el cual es degradado en metabolitos polares tóxicos y peligrosos para el medio ambiente (Silva *et al.*, 2010) como endosulfán diol, endosulfán éter y endosulfán lactona (Tiwari y Guha, 2013), permaneciendo en suelo como residuos peligrosos y más tóxicos que el propio endosulfán (Odukkathil y Vasudevan, 2016). De ellos, el endosulfán lactona ha sido el menos estudiado y reportado.

La concentración letal media (CL50) es una medida para evaluar el efecto tóxico de sustancias peligrosas al medio ambiente, que significa la concentración de la sustancia medida a la cual el 50% de los organismos mueren en un periodo de exposición determinado. La concentración efectiva media (CE50) es la concentración a la cual el 50% de los organismos presentan algún efecto ante la exposición de un compuesto (Repetto *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 2012).

Los organismos modelo más utilizados en este tipo de ensayos toxicológicos son peces o lombrices (*Eisenia foetida* o *Eisenia andrei*), debido a la interacción de ambos con el agua y el suelo y a su gran capacidad de metabolizar compuestos halogenados y organofosforados tales como plaguicidas (Dendooven *et al.*, 2011).

Las lombrices de tierra junto con macro y microorganismos, forman la fauna más importante del suelo, ayudando a degradar la materia orgánica, formar y poner a disposición nutrientes esenciales para el crecimiento de plantas (Domínguez *et al.*, 2010; Gaete *et al.*, 2010). Son utilizadas de manera habitual en el proceso de vermicompostaje de residuos orgánicos sólidos generando abono para remediar suelos contaminados (Blouin *et al.*, 2013), para remover compuestos orgánicos persistentes (Villalobos-Maldonado *et al.*, 2015), remover algunos derivados de petróleo (Coutiño-González *et al.*, 2010) y como bioindicador de toxicidad (Ávila *et al.*, 2007).

Uno de los estudios más actuales relacionado con la determinación de CL50 y CE50 de plaguicidas en diversos organismos es el de Gupta *et al.* (2011). En él, se expuso a la lombriz *Eisenia foetida* a endosulfán y otros insecticidas, determinándose el valor de CL50 para endosulfán de 0.002 mg kg<sup>-1</sup> en 96 h, y concluyeron que los insecticidas organoclorados son más peligrosos para los organismos del suelo que los piretroides. Por lo anterior, el objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto toxicológico de un plaguicida organofosforado (diazinón) y un producto derivado de un plaguicida organoclorado (endosulfán lactona) en la lombriz *Eisenia foetida* mediante ensayos toxicológicos en papel filtro y sustrato artificial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La lombriz *Eisenia foetida* fue obtenida del rancho Luanda, localizado en el municipio de Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas, México. Los individuos fueron mantenidos en excreta de conejo y turba (1:1) durante 2 meses antes de la prueba. El endosulfán lactona (Pestanal® grado HPLC) fue adquirido de Sigma Aldrich (USA) con el 99.1% de pureza. El diazinón (Delta®), usado en la agricultura como plaguicida concentrado emulsionable a una concentración del 25%. La solución patrón de endosulfán lactona fue preparada en acetonitrilo a una concentración final de 100 mg L<sup>-1</sup> y la solución patrón de diazinón fue preparada en agua destilada a una concentración final de 56 g L<sup>-1</sup>.

### Análisis de toxicidad aguda (OCDE-207, 1984)

#### Prueba en papel filtro (PPF)

Para diazinón y endosulfán lactona las concentraciones utilizadas fueron 0.1, 1, 10, 100 y 1000 mg L<sup>-1</sup>.

como primer ensayo. Posteriormente se utilizaron concentraciones de 100, 400, 700, 1000, 1300 y 1600 mg L<sup>-1</sup>. El volumen adecuado de cada solución fue agregado a cajas Petri de vidrio de 8.5 cm de diámetro y área de contacto de 56.74 cm<sup>2</sup> que contenían papel filtro de poro medio; como controles se tuvieron cajas Petri con papel filtro impregnado con acetonitrilo para endosulfán lactona y con agua destilada para diazinón. El disolvente utilizado se dejó evaporar por una hora en una campana de extracción y posteriormente se rehidrató el papel filtro agregando 1 mL de agua destilada a cada caja Petri junto con una lombriz con clitelo desarrollado que previamente se lavó con agua destilada, se secó con papel absorbente y se dejó en contenedores de plástico por 3 horas para vaciar su tracto gastrointestinal. Cada tratamiento se hizo con 10 repeticiones. Todas las cajas Petri se mantuvieron en una incubadora marca Novatech a 25°C en completa oscuridad durante 48 horas. Pasado este tiempo, se evaluó la mortalidad (%) en la lombriz para determinar la CL50 y la inhibición de crecimiento (%) para CE50, además de los daños físicos observados. Las lombrices fueron consideradas muertas si presentaban poco movimiento y no respondían a un estímulo mecánico definido.

#### Prueba en sustrato artificial (PSA)

El sustrato artificial se preparó mezclando los ingredientes: 10% de turba, 20% de arcilla, 70% de arena industrial y 1 g de CaCO<sub>3</sub> para ajustar el pH a 7.0. Las concentraciones evaluadas fueron 0 (control), 0.1, 1 y 10 mg de endosulfán lactona por kg de sustrato y 10, 100, 500 y 1000 g de diazinón por kg de sustrato. Las unidades experimentales fueron frascos de vidrio color ámbar con capacidad de 1 L adicionados con 500 g de sustrato artificial y adicionado con el volumen correspondiente de la solución de cada plaguicida para alcanzar la concentración deseada, mezclando perfectamente y ajustando al 35% de humedad. Diez lombrices adultas y con clitelo desarrollado, previamente lavadas con agua destilada, secadas con papel absorbente y pesadas, se colocaron en los frascos de vidrio y se taparon con una tela de algodón para permitir el flujo de aire, ajustando la humedad a 35% cada 7 días. Todos los frascos estuvieron sometidos a periodos de luz/oscuridad de 12/12 horas a temperatura de 25-28°C. Cada concentración tuvo cuatro réplicas. Se evaluó mortalidad (%) (para CL50) e inhibición del crecimiento (%) (para CE50) a los 14 días, sin adición de alimento, como lo reporta Shi *et al.* (2015) y Li *et al.* (2015).

#### Cálculo de inhibición de crecimiento (%)

La inhibición del crecimiento es un parámetro que se calcula haciendo uso de los pesos iniciales y finales de la lombriz (Jovana *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015), considerando la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{Po - Pt}{Po} * 100 \quad (1)$$

Donde:

IC=Inhibición del crecimiento; Po=Peso inicial (g); Pt=Peso final total (g).

#### Análisis estadístico

Los resultados de ambas pruebas se evaluaron mediante el análisis Probit (Gupta *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2015; García *et al.*, 2016; Rico *et al.*, 2016) utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, teniendo como variable de respuesta la mortalidad de las lombrices para la CL50 e inhibición del crecimiento (%) para la CE50.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

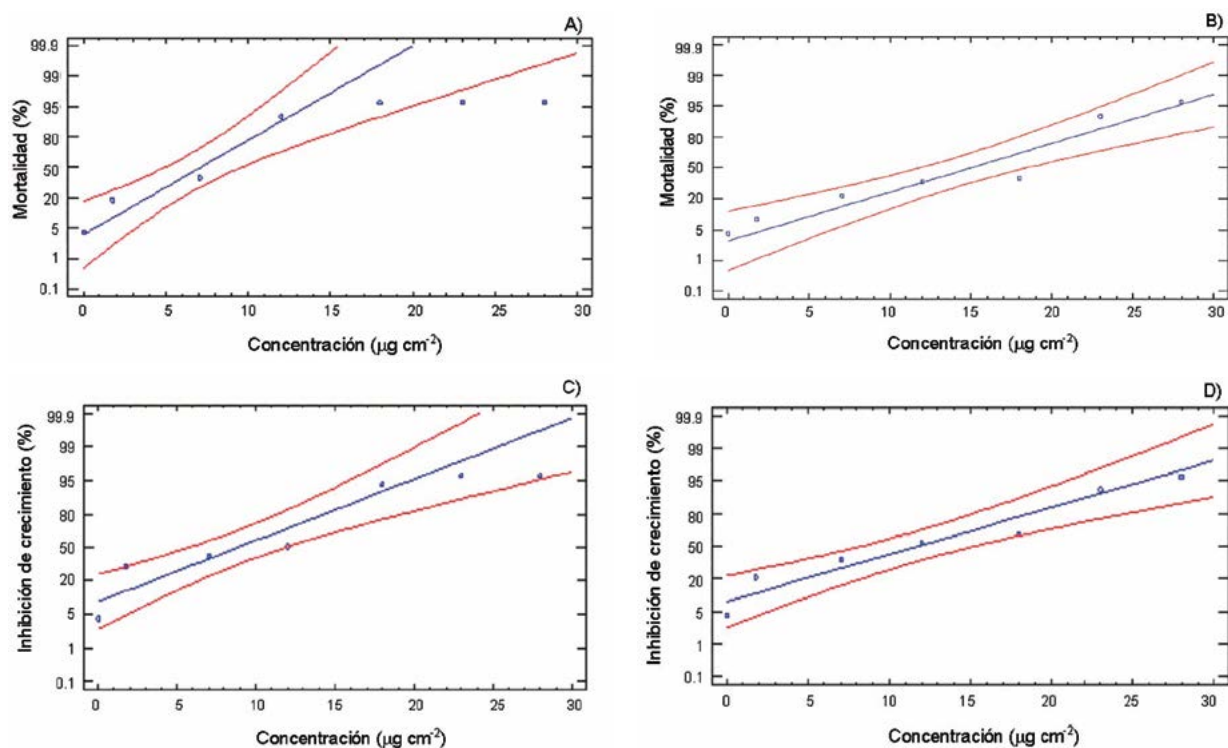
### Determinación de CL50 y CE50 por PPF

La CL50 fue evaluada por el análisis estadístico Probit, que es un tipo de regresión utilizado para analizar las variables de respuesta binomial. La medida probó la respuesta de un organismo alterado por varias concentraciones del producto químico en cuestión y comparó las concentraciones en las que se encontró una respuesta. La relación entre la respuesta y las concentraciones produce una forma sigmoide, aunque el análisis Probit permite transformar el sigmoide a una forma lineal y evaluar su regresión, obteniendo así un valor cuantitativo que representa la CL50 en un rango de confiabilidad estadística de 95% (Vincent 2010), lo cual se aprecia en la Figura 1.

Derivado de la Figura 1, se obtuvo el Cuadro 1, en donde se colocan valores máximos y mínimos de cada determinación.

Según los valores de CL50 de Roberts y Dorough (1984) obtenidos de PPF, los plaguicidas se clasifican como supertóxicos (<1.0 µg cm<sup>-2</sup>), extremadamente tóxicos (1-10 µg cm<sup>-2</sup>), muy tóxicos (10-100 µg cm<sup>-2</sup>), moderadamente tóxicos (100-1000 µg cm<sup>-2</sup>) y relativamente no tóxicos (>1000 µg cm<sup>-2</sup>). Tras esta clasificación, el diazinón se clasifica como muy tóxico (14.9 µg cm<sup>-2</sup>),





**Figura 1.** Análisis Probit de CL50 para endosulfán lactona (A) y diazinón (B) y de CE50 para endosulfán lactona (C) y diazinón (D), ambas en papel filtro a 48 h. Intervalo de confianza del 95%.

**Cuadro 1.** CL50 y CE50 de endosulfán lactona y diazinón en *Eisenia foetida* por PPF a 48 horas ( $P \leq 0.05$ ).

Compuesto	CL50 ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	CE50 ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )
Endosulfán lactona	7.10 (4.90 – 9.60)	9.60 (7.00 – 12.30)
Diazinón	14.90 (11.80 – 18.40)	11.77 (8.29 – 15.27)

mientras que el endosulfan lactona es extremadamente tóxico ( $7.1 \mu\text{g cm}^{-2}$ , equivalente a  $402.85 \text{ mg L}^{-1}$ ).

La CE50 es la concentración en donde se empieza a observar algún efecto sobre la lombriz; se puede evaluar con respecto a la inhibición del crecimiento, reproducción (De Silva *et al.*, 2010) o formación de huevecillos (Brown *et al.*, 2004; García *et al.*, 2016). Para este caso se realizó con la inhibición del crecimiento (%) y como se aprecia en los resultados para endosulfán lactona, según el límite inferior ( $7.0 \mu\text{g cm}^{-2}$ ), a esta concentración comienza a haber un efecto físico notable en *Eisenia foetida*, lo cual también se puede apreciar en la Figura 2, así como los efectos agudos ocasionados por contacto a través de la piel de *Eisenia foetida* debido a las diferentes concentraciones de los compuestos. En la Figura 2 (a y b), la lombriz está viva, con alargamiento de la parte posterior al clitelo, presenta además cortes segmentados y excesivo movimiento al menor contacto. Contracción del músculo, rigidez e hinchazón del cuerpo, se observan cuando *Eisenia foetida* es sometida a toxicidad aguda de plaguicidas (Katagi *et al.*, 2015). Daños similares encontraron Babic *et al.*, (2016) evaluando por contacto a *Eisenia foetida* expuesta durante 48 h con lodos de depuración con alta carga de compuestos orgánicos.

Según Roberts y Dorough (1984), conforme pasa el tiempo de exposición, aumentan los efectos de manera significativa, de tal manera que éstos comienzan con enrollamiento y liberación del fluido celómico, siguiendo con rigidez y contractura, que aumentan conforme pasan las horas de exposición, seguido de encogimiento por segmentos, que van de 1 a 5 segmentos a lo largo del cuerpo de la lombriz, finalizando con ablandamiento, poco tono muscular y muerte.

Según Lin *et al.* (2012), las alteraciones que sufre la lombriz al contacto con cualquier contaminante o compuesto orgánico dañino es debido al estrés, sobre todo del tipo oxidativo, liberando enzimas para su protección como la catalasa o la superóxido dismutasa, como lo demostraron al evaluar los efectos bioquímicos del triclosan sobre la lombriz detectando el aumento de

la concentración de estas enzimas. Al haber un exceso de plaguicida en la prueba por contacto, el estrés que sufre la lombriz se observa además, con inflamación, sangrado y hasta la muerte. Resultados similares se observan en este trabajo en la Figura 2 (c, d y e). A baja toxicidad apenas se puede ver afectada la supervivencia de la lombriz, sin embargo una alta toxicidad puede causar efectos crónicos debido a la acumulación de estas sustancias en el organismo de la lombriz (Li et al., 2015). Para estudios posteriores se propone evaluar las respuestas bioquímicas de endosulfán lactona y diazinón en *Eisenia foetida* mediante la cuantificación de enzimas involucradas en el estrés oxidativo.

#### Determinación de CL50 y CE50 por PSA

Los compuestos tóxicos afectan a la lombriz por contacto a través de la piel (Díaz et al., 2012), incluso si este compuesto está en un sustrato. El Cuadro 3 muestra los resultados de PSA, donde existe una diferencia estadística entre las concentraciones de cada compuesto, incluso en controles de disolventes (agua y acetonitrilo). La inhibición del crecimiento sugiere que pocos nutrientes del sustrato eran suficientes para la supervivencia de las lombrices,

**Cuadro 3.** Inhibición del crecimiento (%) de *Eisenia foetida* a 14 días expuesta a endosulfán lactona y diazinón en sustrato artificial ( $P \leq 0.05$ ).

Concentración del plaguicida ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Inhibición del crecimiento (%)
Endosulfán lactona 0 (agua)	11.59 $\pm$ 0.27 b
Endosulfán lactona 0 (acetonitrilo)	15.75 $\pm$ 0.15 a
Endosulfán lactona 0.1	6.64 $\pm$ 0.14 c
Endosulfán lactona 1	98.88 $\pm$ 0.08 d
Endosulfán lactona 10	100 $\pm$ 0 e
Diazinón 10	9.35 $\pm$ 0.53 a
Diazinón 100	18.21 $\pm$ 0.36 b
Diazinón 500	100 $\pm$ 0 c
Diazinón 1000	100 $\pm$ 0 c

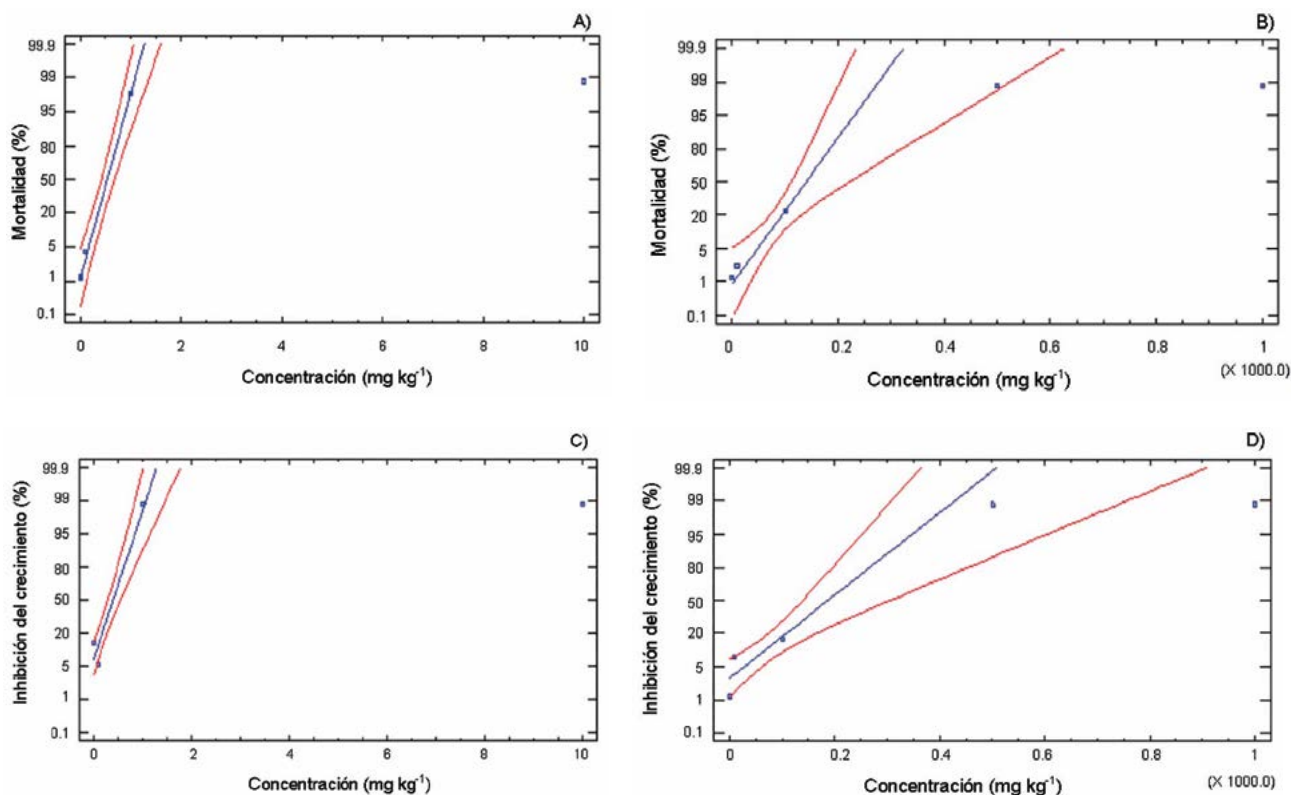
pero insuficientes para su crecimiento y desarrollo (Wu et al., 2011). Es notable que cuanto mayor sea la concentración del contaminante, mayor es la inhibición del crecimiento, lo que indica que este parámetro puede ser un buen indicador del estrés químico. El valor del 100% de inhibición ocurre en una concentración más alta de endosulfán lactona en comparación con el diazinón.

Brown et al. (2004) observaron una reducción significativa en el crecimiento del lombriz de tierra *Lumbricus rubellus*, expuesto al pireno. Por otra parte, Wu et al. (2011), reportaron características de crecimiento similares usando fenantreno en *Eisenia foetida*, y encontraron que dicho compuesto inhibe el crecimiento de la lombriz, posiblemente relacionado con su estrategia para sobrevivir de manera natural, minimizando el consumo de alimentos para prevenir los contaminantes.

La CL50 y CE50 evaluada para la prueba en sustrato artificial, se pueden apreciar en el Cuadro 4 y en la Figura 3. Las concentraciones reportadas se podrían usar como referencia para procesos de remoción en sustrato, haciendo uso de *Eisenia foetida*. Gupta et al. (2011) sometieron a *Eisenia foetida* a endosulfán por 96 horas y encontraron una CL50 de  $0.002 \text{ mg kg}^{-1}$ . Por otro lado Wang et al. (2012) sometieron a *Eisenia foetida* al plaguicida acetoclor por 14 días encontrando una CL50 de  $283 \text{ mg kg}^{-1}$ .



**Figura 2.** Efectos fisiológicos en *Eisenia foetida*. Alargamiento de la parte posterior al clitelo ( $100 \text{ mg L}^{-1}$  en diazinón) (A). Cortes segmentados en la parte posterior de la lombriz ( $400 \text{ mg L}^{-1}$  en diazinón y endosulfán lactona) (B). Formación de protuberancias después del clitelo y desangrado ( $700 \text{ mg L}^{-1}$  en endosulfán lactona). Aplanamiento total ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$  en diazinón y endosulfán lactona) (D). Degeneración de la lombriz dejando solo su piel ( $1600 \text{ mg L}^{-1}$  en diazinón y endosulfán lactona) (E).



**Figura 3.** Análisis Probit de CL50 para endosulfán lactona (A) y diazinón (B) y de CE50 para endosulfán lactona (C) y diazinón (D), ambas en sustrato artificial a 14 días. Intervalo de confianza del 95%.

**Cuadro 4.** CL50 y CE50 de endosulfán lactona y diazinón en *Eisenia foetida* por PSA a 14 días ( $P \leq 0.05$ ).

Compuesto	CL50 ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	CE50 ( $\text{mg kg}^{-1}$ )
Endosulfán lactona	0.60 (0.48-0.73)	0.41 (0.30-0.56)
Diazinón	139 (111-222)	187 (138-306)

En la Figura 3, se puede apreciar el gráfico derivado del análisis Probit, que contiene una gráfica lineal para la obtención de la CL50 y CE50.

Este tipo de gráficos son útiles para conocer las relaciones concentración-respuesta de organismos expuestos a sustancias peligrosas y dan una relación cuantificable de concentración.

Como se puede observar, para endosulfán lactona la CL50 y CE50 son menores en PSA que en PPF indicando que la exposición dérmica y oral provocó mayor toxicidad aguda, observándose lo contrario para diazinón. Esto se puede explicar por los diferentes mecanismos con los que los compuestos organoclorados (endosulfán lactona) y los organofosforados (diazinón) actúan en la lombriz (Savolainen, 2001).

## CONCLUSIONES

La determinación de la CL50 da una aproximación a la concentración máxima a utilizar en los cultivos donde se hace uso de plaguicidas. Sin embargo al ser *Eisenia foetida* un organismo modelo para las cuestiones ambientales de

biorremediación y biodegradación de xenobióticos, se sugiere hacer uso de ésta para poder remover los compuestos estudiados que junto con el antecedente presentado de la CL50 se tiene una aproximación del efecto dañino que le causará así como de la concentración máxima soportable.

Por lo tanto la prueba con papel filtro y la prueba con sustrato artificial, da una aproximación de los índices tempranos de contaminación en el ambiente de muchos compuestos orgánicos y xenobióticos que estuvieron, están y persistirán en la naturaleza.

De acuerdo con los resultados, el endosulfán lactona es más tóxico que el diazinón, tanto por PPF como por PSA ya que a menores concentraciones genera toxicidad aguda en *Eisenia foetida*.

Hasta el momento, no existen reportes de determinación de CL50 y CE50 de diazinón ni de endosulfán lactona con *Eisenia foetida* en pruebas de contacto (papel filtro) ni por ingestión (sustrato), por lo que los resultados obtenidos son de relevancia para estudios posteriores.

## LITERATURA CITADA

- Ávila G., Gaete H., Morales M., Neaman A. 2007. Reproducción de *Eisenia foetida* en suelos agrícolas de áreas mineras contaminadas por cobre y arsénico. *Pesquisa Agropec. Bras.* 42: 435-441. doi: 10.1590/S0100-204X2007000300018
- Babić S., Barišić J., Malev O., Klobučar G., Popović N.T., Strunjak-Perović I., Klobučar R. S. 2016. Sewage sludge toxicity assessment using earthworm *Eisenia fetida*: can biochemical and histopathological analysis provide fast and accurate insight? *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23: 12150-12163.
- Blouin M., Hodson M. E., Delgado E., Baker G., Brussaard L., Butt K. R., Tondoh J.E. 2013. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *Eur. J. Soil Sci.* 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.
- Cáceres T., Megharaj M., Venkateswarlu K., Sethunathan N., Naidu R. 2010. Fenamiphos and related organophosphorus pesticides: environmental fate and toxicology. Springer New York. pp. 117-162.
- Coutiño-González E., Hernández-Carlos B., Gutiérrez-Ortiz R., Dendooven L. 2010. The earthworm *Eisenia fetida* accelerates the removal of anthracene and 9, 10-anthraquinone, the most abundant degradation product, in soil. *Int. Biodeter Biodegrad.* 64: 525-529.
- Cycoń M., Żmijowska A., Wójcik M., Piotrowska-Seget Z. 2013. Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading *Serratia marcescens* to remove other organophosphorus pesticides from soils. *J. Environ. Manag.* 117: 7-16.
- Dendooven L., Alvarez-Bernal D., Contreras-Ramos S. M. 2011. Earthworms, a means to accelerate removal of hydrocarbons (PAHs) from soil? A mini-review. *Pedobiol.* 54: S187-S192.
- De Silva P., Mangala C.S., Pathiratne A., van Gestel C.A.M. 2010. Toxicity of chlorpyrifos, carbofuran, mancozeb and their formulations to the tropical earthworm *Perionyx excavatus*. *Appl. Soil Ecol.* 44: 56-60.
- Díaz M. D. C. C., Domínguez F. A. S., Toledo Á. M. 2012. Monitoreo De Suelos Contaminados Mediante Pruebas Ecotoxicológicas. *Tlatemoani* 11. <http://www.eumed.net/rev/tlatemoani/11/suelos-contaminados-pruebas-ecotoxicologicas.html>
- Domínguez J., Pérez-Losada M. 2010. *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) y *Eisenia andrei* Bouché, 1972 son dos especies diferentes de lombrices de tierra. *Acta Zool. Mex.* 26: 321-331.
- Gaete H., Hidalgo M. E., Neaman A., Ávila G. 2010. Evaluación de la toxicidad de cobre en suelos a través de biomarcadores de estrés oxidativo en *Eisenia foetida*. *Quim. Nova* 33: 566-570.
- García-Velasco N., Gandariasbeitia M., Irizar A., Soto M. 2016. Uptake route and resulting toxicity of silver nanoparticles in *Eisenia fetida* earthworm exposed through Standard OECD Tests. *Ecotoxicol.* 25: 1543-1555.
- Gupta R. D., Chakravorty P. P., Kaviraj A. 2011. Susceptibility of epigeic earthworm *Eisenia fetida* to agricultural application of six insecticides. *Chemosphere* 84: 724-726.
- Jovana M., Tanja M., Mirjana S. 2014. Effects of three pesticides on the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny 1826) under laboratory conditions: Assessment of mortality, biomass and growth inhibition. *Eur. J. Soil Biol.* 62: 127-131.
- Katagi T., & Ose K. 2015. Toxicity, bioaccumulation and metabolism of pesticides in the earthworm. *J. Pest. Sci.* 40: 69-81.
- Li J., Zhang W., Chen L., Liang J., Lin K. 2015. Biological effects of decabromodiphenyl ether (BDE209) and Pb on earthworm (*Eisenia fetida*) in a soil system. *Environ. Pollut.* 207: 220-225.
- Lin D., Xie X., Zhou Q., Liu Y. 2012. Biochemical and genotoxic effect of triclosan on earthworms (*Eisenia fetida*) using contact and soil tests. *Environ. Toxicol.* 27: 385-392.
- Odukkathil G., Vasudevan N. 2016. Residues of endosulfan in surface and subsurface agricultural soil and its bioremediation. *J. Environ. Manag.* 165: 72-80.
- OECD. 1984. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Earthworm, Acute Toxicity Tests. Paris, France.
- Ortiz-Hernández M.L., Rodríguez A., Sánchez-Salinas E., Castrejón-Godínez M.L. 2014. Bioremediation of Soils Contaminated with Pesticides: Experiences in Mexico. *In: Bioremediation in Latin America*. Springer New York. pp. 69-99.
- Repetto M., Sanz P., Jurado C., López-Artíguez M., Menéndez M., de la Peña E. 1995. *Glosario de términos toxicológicos*. Asociación Española de Toxicología. Madrid., España.
- Rico A., Sabater C., Castillo M. Á. 2016. Lethal and sub-lethal effects of five pesticides used in rice farming on the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 127: 222-229.
- Roberts B. L., & Dorough H. 1984. Relative toxicities of chemicals to the earthworm *Eisenia foetida*. *Environ. Toxicol. Chem.* 3: 67-78.
- Savolainen, K. 2001. Understanding the toxic actions of organophosphorus. *In: Krieger, R. (Ed.), Handbook of Pesticide Toxicology*. Agents. Academic Press, San Diego. 2. pp. 1013-1041.
- Shi Y., Zhang Q., Huang D., Zheng X., Shi Y. 2016. Survival, growth, detoxifying and antioxidative responses of earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to soils with industrial DDT contamination. *Pest. Biochem. Physiol.* 128: 22-29.
- Silva M. H., & Beauvais S. L. 2010. Human health risk assessment of endosulfan. I: Toxicology and hazard identification. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 56: 4-17.
- Tiwari M. K., Guha S. 2013. Kinetics of the biodegradation pathway of endosulfan in the aerobic and anaerobic environments. *Chemosphere* 93: 567-573.
- Villalobos-Maldonado J. J., Meza-Gordillo R., Mancilla-Margalli N.A., Ayora-Talavera T. R., Rodríguez-Mendiola M. A., Arias-Castro C., Vázquez-Villegas P.T., Ruiz-Valdiviezo V.M. 2015. Removal of Decachlorobiphenyl in Vermicomposting Process Amended with Rabbit Manure and Peat Moss. *Water Air Soil Pollut.* 226: 1-11.
- Vincent K. 2010. Probit analysis. The San Francisco State University. Department of Biology Document Repository.
- Wang Y., Wu S., Chen L., Wu C., Yu R., Wang Q., Zhao X. 2012. Toxicity assessment of 45 pesticides to the epigeic earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere* 88: 484-491.
- Wu S., Wu E., Qiu L., Zhong W., Chen J. 2011. Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions. *Chemosphere* 83: 429-434.