

INFORME TÉCNICO
EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE PLAGUICIDAS SOBRE *Eisenia foetida*.

VIVIANA ELIZABETH RUBIANO RODRÍGUEZ

Plan de Trabajo Profesionalizante
para optar al título de Biólogo Ambiental.

Supervisor
Alejandra Garzón Espinosa
Bióloga Ambiental
Magíster en Ciencias Ambientales

Tutor
Luz Stella Fuentes Quintero
Directora Centro de Biosistemas UJTL
Ingeniera Agrónoma
Magíster en Biología Aplicada

UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA AMBIENTAL
BOGOTÁ
2019

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS	2
2.1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	2
2.2 OBJETIVOS	3
2.2.1 <i>Objetivo General</i>	3
2.2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	3
2.3 HIPÓTESIS	3
3. METODOLOGÍA	4
3.1 ÁREA DE ESTUDIO	4
3.2 ACTIVIDADES DESARROLLADAS	4
3.2.1 <i>Adecuación del área para el criadero de lombriz roja californiana</i>	4
3.2.2 <i>Mejoramiento del modulo para el pie de cría de lombrices</i>	4
3.2.3 <i>Adquisición del pie de cría</i>	4
3.2.4 <i>Mantenimiento del pie de cría de la lombriz roja californiana</i>	4
3.2.5 <i>Acondicionamiento del organismo de prueba</i>	4
3.2.6 <i>Prueba de retención de agua</i>	5
3.2.7 <i>Validación del protocolo para ensayos toxicológicos sobre E. foetida</i>	5
3.2.8 <i>Carta de control de sensibilidad para E. foetida</i>	5
3.2.9 <i>Análisis estadístico</i>	6
3.2.10 <i>Preparación de E. foetida para la prueba de ecotoxicidad</i>	6
3.2.11 <i>Prueba de ecotoxicidad</i>	6
3.2.12 <i>Condiciones del testigo</i>	7
3.2.13 <i>Tasa de transformación de materia orgánica a lombricompost</i>	7
3.2.14 <i>Características físico- químicas del lombricompost</i>	8
3.2.15 <i>Evaluación de la viabilidad de E. foetida expuesta a procloraz</i>	8
3.2.16 <i>Modificación del protocolo para la práctica “Bioindicadores en suelos contaminados. E. foetida (superviviencia y reproducción)” de la clase Toxicología Ambiental de la UJTL</i>	8
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9

5. CONCLUSIONES	15
6. RECOMENDACIONES	15
7. BIBLIOGRAFÍA	16
ANEXOS	20

1. INTRODUCCIÓN

Con el fin de optimizar la calidad y el rendimiento de las cosechas, los agricultores realizan actividades como la labranza y la aplicación de fertilizantes y plaguicidas (Caride *et al.*, 2011). Los plaguicidas agrícolas se disponen en forma líquida en los cultivos. Cuando estos productos de síntesis química son aplicados, cerca del 50% puede desviarse fuera del punto de control, localizándose en diferentes componentes del medio físico como suelo, aire y agua, afectando las poblaciones objetivo y no objetivo (Doménech, 2009). Los agricultores tienen poco en cuenta la macrofauna edáfica, cuando hacen aplicaciones de agroquímicos y las funciones que estos cumplen en el ecosistema. Esta condición se refleja en la disminución de la biomasa de las poblaciones o en la eliminación de especies (Klemens *et al.*, 2003). La macrofauna terrestre agrupa los invertebrados mayores de 2 mm de diámetro y se consideran importantes en la transformación de las propiedades del suelo. Entre la macrofauna se consideran las lombrices de tierra (Oligochaeta: Lumbricidae), las termitas (Isoptera: Termopsidae) y las hormigas (Hymenoptera: Formicidae), que actúan como ingenieros del ecosistema en la formación de poros, la infiltración de agua, la humificación y transformación de la materia orgánica (Cabrera *et al.*, 2011).

Las diferentes características que exhiben los macroinvertebrados son usadas principalmente, para analizar la calidad del ecosistema. La combinación de características biológicas, funcionales y ecológicas, pueden ser utilizadas como bioindicadores (Bonada, *et al.*, 2006). Dentro de los principales bioindicadores del estado del ecosistema suelo se encuentran las lombrices de tierra. Esto ha sido comprobado por diferentes autores, los cuales detectaron impactos sobre las poblaciones de lombrices en sistemas con alto grado de intervención agrícola, observando una disminución de la riqueza y la abundancia (Lavelle, 2006). Por lo descrito, el objetivo del presente estudio es evaluar el efecto ecotoxicológico del fungicida con compuesto activo Procloraz sobre la lombriz roja californiana a partir de la mortalidad, fecundidad, biomasa, transformación de materia orgánica y viabilidad del organismo, con el fin de aumentar la investigación sobre los efectos ecotoxicológicos de los plaguicidas de síntesis químico en organismos no objetivo.

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

2.1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El uso de plaguicidas ha traído consigo beneficios, aumentando la producción agrícola, la productividad del suelo y la calidad de los productos, representando principalmente un beneficio económico, pero solo el 10% de los plaguicidas aplicados llegan al organismo objetivo, mientras que un alto porcentaje es depositado en áreas y organismos no objetivo (Garzón, 2014). La aplicación de agroquímicos puede causar efectos adversos en diferentes formas de vida y ecosistemas. Como resultado de esto, se detectan de forma constante en suelo, aire, superficies acuáticas y subterráneas, sedimentos, vegetales y alimentos (Ortiz *et al.*, 2011), representando un problema principalmente para la salud humana y para el ecosistema suelo.

Numerosos estudios muestran claramente la sensibilidad de las comunidades de organismos edáficos ante las perturbaciones impuestas por el manejo de los sistemas agrícolas (De Aquino, 2008). Se sugiere que la macrofauna edáfica puede ser considerada como un indicador temprano y sensible a los efectos del manejo del suelo (Govaerts *et al.*, 2006). Además desempeñan un papel imprescindible en la productividad del suelo debido a su capacidad de alterar el ambiente superficial y edáfico en que se desarrollan las plantas (Lavelle *et al.*, 2006). Como resultado de lo anterior, determinados organismos se consideran bioindicadores de la estabilidad y la fertilidad del suelo, en especial las lombrices de tierra (Ruiz *et al.*, 2008). La utilización de las características biológicas, funcionales y ecológicas de las lombrices puede ser utilizada como bioindicadores para determinar el estado del suelo, debido a que estos organismos manifiestan cambios en una corta escala de tiempo (George, 2006). La abundancia de dichos individuos declina como función inversa a la intensidad con que son manejados los suelos o por el uso intensivo de plaguicidas (Ruiz *et al.*, 2008). Ante esto, emerge un escenario propicio para la investigación en el que se emplee el estudio de las características biológicas y funcionales de la lombriz de tierra como indicadores de la relación de la respuesta del organismo al efecto toxicológico por el uso de plaguicidas, llevando a esta investigación a buscar la respuesta para la siguiente pregunta, ¿cuáles son los efectos ecotoxicológicos del Procloraz sobre la lombriz de tierra (*Eisenia foetida*)?

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo general

Determinar el efecto ecotoxicológico del plaguicida con compuesto activo procloraz sobre la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*).

2.2.2 Objetivos específicos

1. Validar el protocolo de evaluación de los efectos de las sustancias químicas en el suelo sobre la lombriz de tierra roja californiana.
2. Evaluar la mortalidad, reproducción y biomasa de la lombriz roja californiana, bajo el efecto de cinco concentraciones del fungicida.
3. Determinar el porcentaje de nutrientes y la tasa de transformación de materia orgánica producido por *E. foetida* bajo el efecto del procloraz.

2.3 HIPÓTESIS

- Las concentraciones de Procloraz por encima de la dosis recomendada tendrá efecto ecotoxicológico sobre la biomasa, reproducción y supervivencia de *E. foetida*.
- A medida que aumenta la concentración del fungicida, la tasa de transformación de la materia orgánica se verá reducida.

3. METODOLOGÍA

3.1 ÁREA DE ESTUDIO

Se realizó en el Centro de Biosistemas de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano ubicado en el municipio de Chía (4°53'07.2"N 74°00'48.0"W), donde también se dispuso del laboratorio de entomología.

3.2 ACTIVIDADES DESARROLLADAS

3.2.1 Adecuación del área para el criadero de lombrices

Se seleccionó el lugar con las condiciones adecuadas, idealmente un sitio con sombra. Al tener esta zona identificada, se eliminó vegetación como maleza para ubicar el modulo de pie de cría (ver anexo N°1).

3.2.2 Mejoramiento del módulo para el pie de cría de lombrices

Se ajustó el módulo de cría de lombriz roja californiana existente en el C-Bios, realizando divisiones de 1 m dentro de este y ubicándose en la parte inferior del módulo, dos planchas de tablas de madera para el secado del humus sólido. (ver anexo N°2).

3.2.3 Adquisición del pie de cría

Para el inicio de la cría de la lombriz roja californiana se obtuvo con el lombricultor Lombricultura de Tenjo, ubicado en la vereda Chince del municipio de Tenjo (Cundinamarca).

3.2.4 Mantenimiento del pie de cría de la lombriz roja californiana

La cría de lombriz se mantuvo en un módulo de 1 x 3 x 0.30 m, cubierto de tela mosquitero para evitar que otros animales penetraran y se alimentaran de estas. Se alimentaron con desechos orgánicos del C-Bios cada 15 días, además que se ajustó la humedad del sustrato al 75% (ver anexo N°3).

3.2.5 Acondicionamiento del organismo de prueba

Previamente se realizó trampeo a las lombrices, con ayuda de canastillas durante 2 días. Una vez se obtuvieron las lombrices, se llevaron a una de las secciones vacías del módulo y se les dispuso de sustrato con humedad al 75% y de lechuga precompostada, la cual fue

administrada siempre, ya que el mismo tipo de alimento evita variaciones en el crecimiento de las lombrices (ver anexo N°4).

3.2.6 Prueba de retención de agua

Se pesaron 120 g de sustrato y se colocaron en un recipiente que permitiera medir el nivel de saturación de agua, luego se adicionó agua poco a poco con una probeta, midiendo el volumen gastado cuando cae la primera gota. Determinando de esta manera la cantidad de agua necesaria para saturar el sustrato, tomando el 100% de saturación el volumen gastado y calculando el 75% de retención de agua (Alonzo & Chicas, 2013) (ver anexo N°5).

3.2.7 Validación del protocolo para ensayos toxicológicos sobre *E. foetida*

La guía “Bioindicadores en suelos contaminados. *E. foetida* (superviviencia y reproducción)”, de la clase de Toxicología Ambiental durante su realización, esta presenta un porcentaje de mortalidad del testigo mayor al 10% invalidando así el ensayo, por ende, se validó la Prueba de Toxicidad elaborada por OCDE, la cual es utilizada para evaluar los efectos de las sustancias químicas en el suelo usando la lombriz de tierra roja californiana.

3.2.8 Carta de control de sensibilidad para *E. foetida*

La carta sensibilidad de *E. foetida* con Procloraz se estimó mediante una prueba de exposición aguda durante 14 días, la cual constó de cinco concentraciones alrededor de la recomendada por el fabricante, por triplicado y con un control negativo, cada unidad experimental tuvo diez lombrices adultas (cliteladas) con un peso promedio entre 0.3 y 0.6 mg. Las unidades experimentales se prepararon con 120 gramos de suelo con 15ml de agua más el plaguicida respectivamente. Se utilizaron recipientes plásticos transparentes de 16oz de capacidad con tapa rígida perforada. Luego de obtener las unidades experimentales preparadas se introdujeron en cada recipiente diez lombrices limpias, secas y pesadas, la exposición al plaguicida se prolongó por 14 días tiempo durante el cual se hicieron tres revisiones, en la que se registraron los datos de mortalidad, número de ootecas encontradas y las características de los individuos sobrevivientes (Gómez, 2014).

3.2.9 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante el programa IRMA-QCal el cual es específicamente para el cálculo de curvas de dosis-respuesta. La aplicación utiliza un modelo de regresión logística para generar valores para DL₅₀ Y DL₉₀, tomando como referencia la metodología propuesta por Lozano & Saavedra (2012). Para establecer la relación entre las concentraciones con las variables Biomasa y Número de Ootecas, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI (Versión 16.1.11).

3.2.10 Preparación de *E. foetida* para la prueba de ecotoxicidad

La preparación de las lombrices tuvo de varios pasos, primero se seleccionaron los individuos evitando la manipulación excesiva. Se procedió a disponerlos en una superficie plana y firme removiendo lentamente el sustrato hasta hallar las lombrices prestando atención en seleccionar individuos adultos verificando la presencia del clitelo y una longitud mayor o igual a 3 cm, sin alteraciones o defectos apreciables en el tejido externo. Luego de la selección, las lombrices se dejaron en reposo durante 30 minutos en un recipiente pequeño. Al cabo del reposo las lombrices se lavaron con agua para terminar de remover los rastros de sustrato adherido. Se tomó papel adsorbente humedecido poniéndolo en la base de una caja de Petri y se depositaron las lombrices en una cantidad tal que pudieran moverse fácilmente (aproximadamente 20 lombrices por caja de Petri mediana y 50 para una caja de Petri grande). La ausencia de alimento y el contacto con el papel húmedo permitió que las lombrices vaciaran el intestino y que las heces fueran fácilmente descartadas junto con el papel. Las lombrices puestas en las cajas de Petri se dejaron en reposo en un lugar oscuro, y al cabo de 12 horas se eliminó el papel húmedo, las lombrices se lavaron y secaron y se dispusieron en un trozo de papel nuevo y húmedo en la caja de Petri durante otras 12 horas. Transcurridas las 24 horas de limpieza, las lombrices se volvieron a enjuagar eliminando partículas sólidas (OCDE, 2014) (ver anexo N°6).

3.2.11 Prueba de toxicidad

Se dispusieron en recipientes de plástico de 16 oz de 120 g de suelo más 50 g de lechuga precompostada. Posteriormente se aplicó 15 ml de agua con la respectiva concentración

del fungicida (0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2 cc/L) y se situaron 10 lombrices (lavadas, secadas y pesadas) por recipiente (cinco tratamientos con cuatro repeticiones), y estos se cubrieron con tapa plástica perforada para permitir el intercambio gaseoso. Los recipientes se mantuvieron en un Biotron para mantener las mismas condiciones (temperatura 20 ± 2 , humedad relativa 80%, fotoperiodo luz-oscuridad 12/12 horas).

Se construyó un diseño completamente al azar para el plaguicida con el ingrediente activo Procloraz, con cinco tratamientos y cuatro repeticiones para cada uno de los tratamientos (cada tratamiento correspondió a un valor de concentración del agroquímico) y su respectivo control. Una vez se tuvieron los recipientes con el suelo y la materia orgánica, se dispusieron de diez lombrices limpias, secas y pesadas en estado adulto por cada repetición, dejándolas durante un mes en condiciones controladas al interior de la cabina de ensayos. Cada lombriz con un peso promedio entre 0.3 y 0.6 g; la toma de datos o revisiones se realizó el primer día registrando el peso de las lombrices, la segunda correspondiente al día siete, en que se revisaron las unidades experimentales, registrando la mortalidad, el número de ootecas encontrados y se removieron los individuos muertos. En la tercera correspondiente al día catorce se medieron los mismos ítems del día siete. En el último día de revisión (Día 30), se revisó y registró además de la mortalidad y número de ootecas, el peso final de la biomasa y las características morfológicas externas de los individuos sobrevivientes (OCDE, 2014) (ver anexo N°7).

3.2.12 Condiciones del testigo

Para la prueba de ecotoxicidad se llevó un testigo por quintuplicado a las mismas condiciones ambientales y experimentales. Diez lombrices en cada vial, con una humedad del sustrato al 75%, temperatura 20 ± 2 , humedad relativa 80%, fotoperiodo luz-oscuridad 12/12 horas, utilizando las mismas proporciones de sustrato y alimento, con la diferencia que no se le aplicó plaguicida (OCDE, 2014).

3.2.13 Tasa de transformación de materia orgánica a lombricompost

Al final del estudio se tomó el porcentaje de cenizas de cada unidad experimental. Para determinar el mismo, los sustratos se sometieron al horno para así obtener el porcentaje de materia seca y conocer la conversión a lombricompos en base seca (Rodríguez, 1996).

3.2.14 Características físico-químicas del lombricompost

Al final del trabajo se remitió al laboratorio de suelos del C-Bios para su respectivo análisis físico-químico, en bolsas plásticas rotuladas.

3.2.15 Evaluación de la viabilidad de *E. foetida* expuesta a procloraz

Después de las cuatro semanas de toxicidad crónica con el fungicida, los individuos sobrevivientes de cada uno de los tratamientos, al igual que los del testigo, se llevaron a nuevas unidades experimentales sin Procloraz (dos unidades por tratamiento), donde se dispusieron de 120 g de sustrato con pH entre 6.8 y 7, humedad al 75% y 60 g de lechuga precompostada. Se registró al final de las cuatro semanas el número de juveniles y el número de ootecas (ver anexo n°8).

3.2.16 Modificación del protocolo para la práctica “Bioindicadores en suelos contaminados. (*E. foetida* superviviencia y reproducción)” de la clase Toxicología Ambiental de la UJTL

De acuerdo a la validación del protocolo del bioensayo realizado y de los resultados de este, se modificó el protocolo de la guía para la práctica “Bioindicadores en suelos contaminados. (*E. foetida* superviviencia y reproducción)” (ver anexo N°9).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Resultados de procloraz sobre *E. foetida* para mortalidad, reproducción y tasa de cambio en biomasa.

	Concentración cc/L	Mortalidad (%)	# Ootecas	Tasa de cambio en Biomasa (%)
Testigo	0	0,00	22	16,24
Procloraz	0.4	0.00	9	8,26
	0.8	0.00	7	7,79
	1.2	1.87	4	- 13,02
	1.6	3.75	2	-30.06
	2.0	5.00	2	-39,26

Procloraz es un fungicida de acción preventivo y curativo, el cual actúa de forma translaminar (Adama, 2019). Para este estudio se utilizaron dosis alrededor de recomienda por el fabricante para cultivos de clavel y rosa (0,8 cc/L).

En la tabla 1, se observa como la población va presentando efectos ecotoxicológicos a medida que se va aumentando la concentración de Procloraz, lo cual se refuerza por los estudios de Calow, 1991 y Gibbs *et al.*, 1996, donde se dedujo que el estrés causado por la presencia de un contaminante puede desviar la energía para el crecimiento y/o la reproducción, y así asegurar la supervivencia del organismo, por lo tanto, el crecimiento como la reproducción pueden ser afectados por la exposición a un contaminante, antes de que ocurra la mortalidad en una población. Estos dos parámetros pueden ser los más representativos de los efectos en las poblaciones (Brown, 1983; Dickson, 1995; Kokta, 1992) y, por lo tanto, de mayor importancia ecológica en el monitoreo de los efectos de los pesticidas sobre oligoquetos (Edwards, 1992; Gibbs *et al.*, 1996; Kokta, 1992).

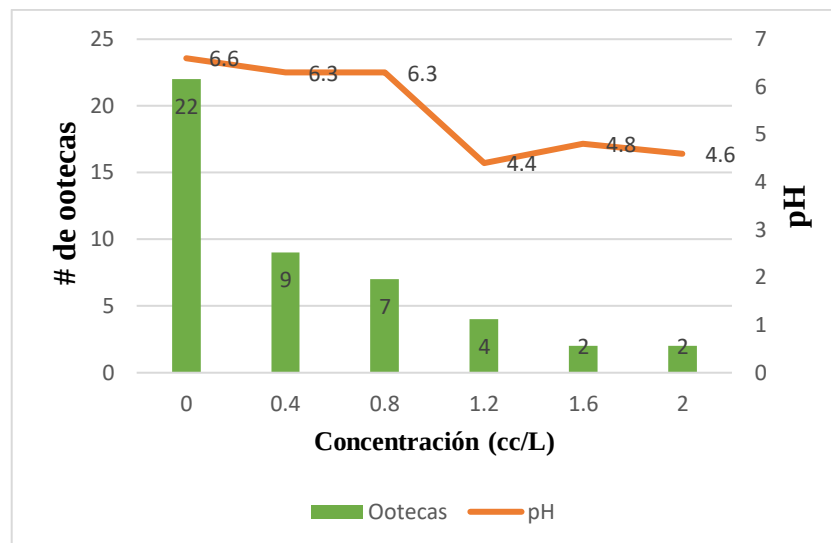


Figura 1. Producción de ootecas con respecto al pH.

Todos los individuos presentaron clítelos bien desarrollados al final del estudio, lo cual indica que son aptos para la reproducción, pero como se observa en la figura 1, a medida que se va aumentando la concentración del plaguicida, el pH disminuye causando así la poca producción de ootecas, debido que para el género *E. foetida* el rango ideal para su reproducción es de sustratos con pH 6.8 a 7.8 (Reinés *et al.*, 1998).



Figura 2. Cambios en la biomasa de *E. foetida* bajo el efecto de procloraz.

En la figura 2 se muestra los cambios en la biomasa de *E.foetida* bajo el efecto del fungicida, donde se observa una disminución gradual en su biomasa desde el segundo tratamiento (0.4 cc/L), esto se debe a que los oligoquetos son capaces de sobrevivir la exposición crónica a un plaguicida reduciendo la energía necesaria para otros procesos

vitales como la alimentación (Stromborg, 1986, citado en Espinoza-Navarro & Bustos-Obregón, 2004), provocando disminución en la biomasa (Bauer & Römbke, 1997; Muthukaruppan *et al.*, 2005; Ávila *et al.*, 2007; Yasmin & D'Souza, 2007).

Para estas variables evaluadas a *E. foetida* bajo el efecto del fungicida, se encontró una relación estadísticamente significativa entre las diferentes concentraciones de procloraz ($P=0,0342$) respecto al porcentaje de la tasa de cambio en biomasa. En cuanto a su relación con la producción de ootecas no es significativa ($P=0,6651$). En cuanto a la CL_{50} y CL_{90} , de acuerdo a los resultados obtenidos mediante el programa IRMA-Qcal es de 20,99 y 30,17 cc/L respectivamente.

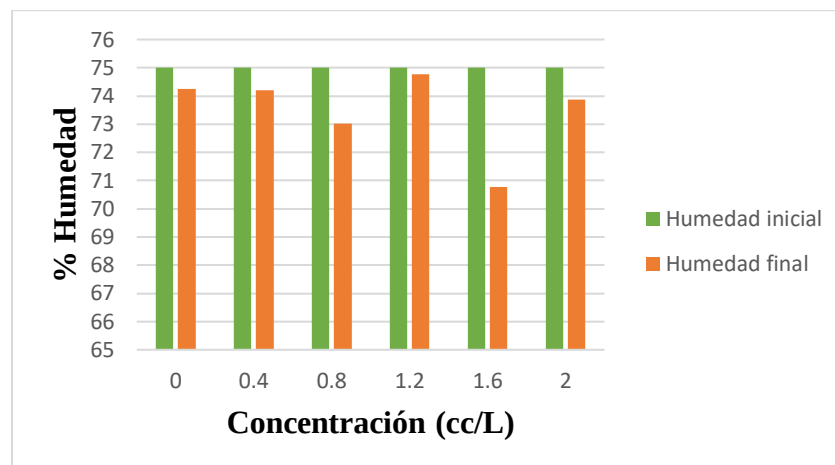


Figura 3. Humedad inicial y final del sustrato

La figura 3 ilustra que para todas las concentraciones del estudio la humedad disminuyó entre 1 y 4% (ver anexo N° 10) de su valor inicial (75%), no sobrepasando el límite de pérdida de humedad (10%), debido a que el sistema de prueba permitió el intercambio gaseoso que se produce al descomponerse la materia orgánica, dando lugar a que el agua se evapore de manera natural, dando una pérdida de humedad muy baja.

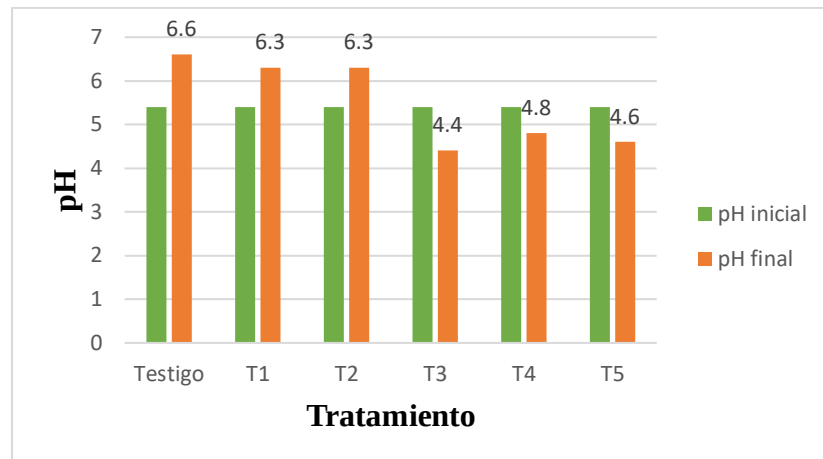


Figura 4. pH inicial y final del sustrato

La figura 4 muestra un pH inicial del sustrato de 5.4. Para el testigo, T1 y T2, se presentó un aumento del pH 6.3, 6.3 y 6.6 respectivamente, siendo esto el resultado de la producción de lombricompost y lixiviado (Bates *et al.*,1983) elaborado por las lombrices que sobrevivieron el período de cuatro semanas, los cuales permitieron modificar el pH a uno más básico.

Respecto a las concentraciones de T3, T4 y T5, se observó una disminución del pH posiblemente influenciado por la descomposición de las lombrices muertas, las cuales estas pudieron entrar al sistema y así influenciar el decrecimiento del pH. Estos tratamientos presentaron una mortalidad entre el 2 y 5% (ver anexo N°10).

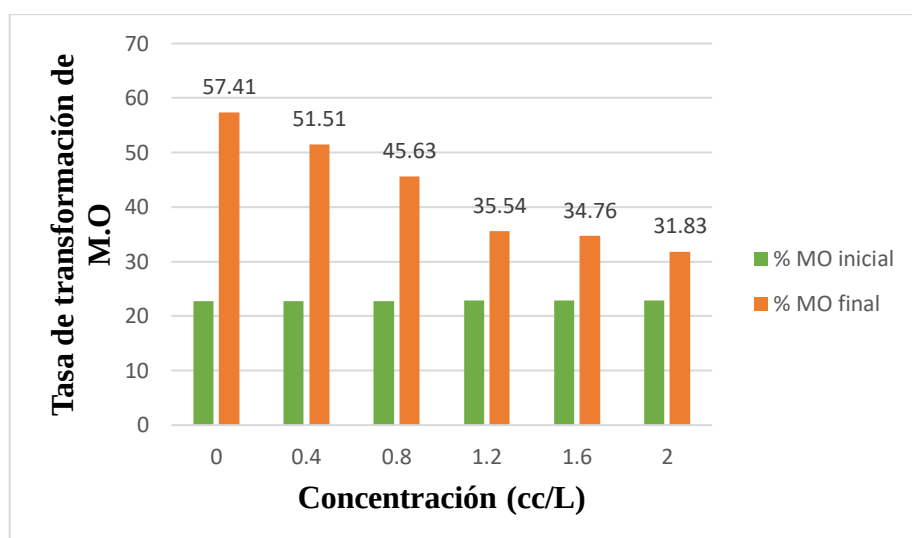


Figura 5. Tasa de transformación de Materia Orgánica.

En cuanto a la tasa de transformación de la Materia Orgánica (fig. 5), el testigo, T1 y T2 presentaron una tasa de 57, 51 y 46% respectivamente, debido a que en ellos no se produjo el 100% de mortalidad en lombrices durante las cuatro semanas de la prueba (ver anexo N° 10). Este incremento se debe a la actividad biológica que realizan lombrices al alimentarse (Bates *et al.*, 1983). Para T3, T4 y T5 la reducción de la tasa de transformación de Materia Orgánica se debió probablemente a que los oligoquetos cuando están en contacto con algún plaguicida reducen la energía necesaria para otros procesos vitales como la alimentación (Stromborg, 1986, citado en Espinoza-Navarro & Bustos-Obregón, 2004), además que la descomposición de las lombrices muertas se incorpora a la cantidad de materia orgánica presente en el sistema (Tineo, 1994).

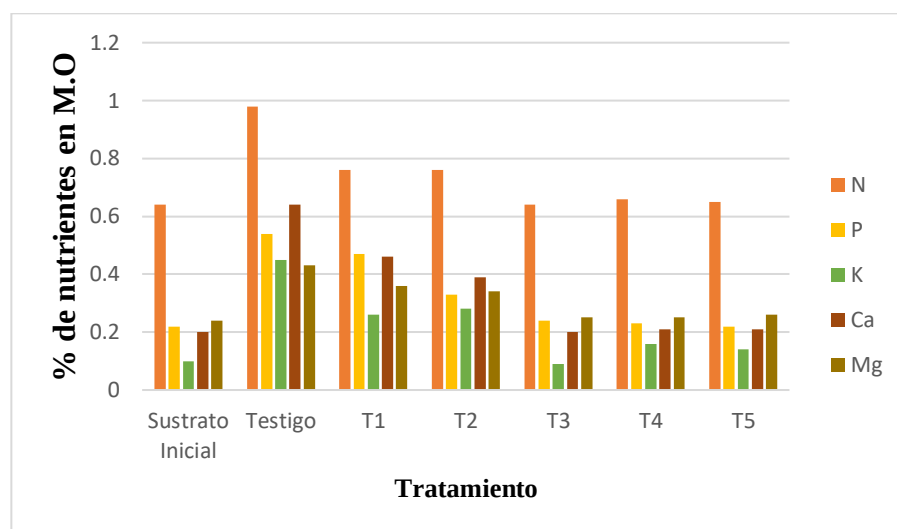


Figura 6. Porcentaje de nutrientes en la Materia Orgánica inicial y final.

Los nutrientes contenidos en el sustrato se hallan en forma orgánica por lo que no son directamente asimilables para las plantas. La mineralización de nutrientes está gobernada directamente por las actividades de las bacterias y de los hongos. Pero estas actividades están muy influenciadas por la fauna del suelo que vive junto a los microorganismos, y también por distintas interacciones de la red trófica que determinan la transferencia de nutrientes a través del sistema (Brown & Doube 2004; Aira *et al.* 2006; Aira & Domínguez 2009).

En la figura 6, se observa un aumento significativo de nutrientes en el testigo con respecto al sustrato inicial. Esto se soporta por estudios como el de Ferrera y Alarcón (2001) en

donde mencionan que el lombricompost se considera enriquecido tanto química como biológicamente por la actividad de las lombrices y su dinámica microbiana. En este sentido, las deyecciones de las lombrices de tierra juegan un papel muy importante sobre la actividad microbiana y la mineralización de nutrientes, puesto que las formas orgánicas de los nutrientes pasan a formar minerales que son los utilizados en la biomasa de la planta (Porta *et al.*, 1999).

En los tratamientos con las diferentes concentraciones del fungicida, hay un incremento en el porcentaje de nutrientes con respecto al sustrato inicial, pero no en la misma cantidad que el testigo, debido a que este organismo al entrar en contacto con plaguicidas, reduce la energía de procesos vitales como la alimentación (Stromborg, 1986, citado en Espinoza-Navarro & Bustos-Obregón, 2004), por lo tanto, hay una disminución en el enriquecimiento del sustrato por parte de las lombrices.

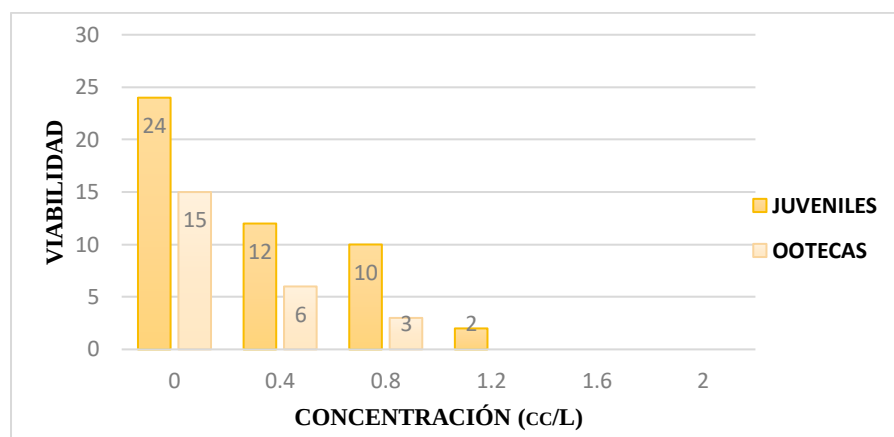


Figura 7 . Viabilidad de *E. foetida* expuesta a prochloraz

Luego de las cuatro semanas de la prueba de toxicidad, se sacaron las lombrices adultas sobrevivientes de cada tratamiento y se dejaron por cuatro semanas más en nuevos viales de prueba con sustrato a pH ajustado entre 6.8-7.8, humedad al 75% y sin el fungicida, obteniendo un promedio de 24 lombrices jóvenes y 15 ootecas para el testigo, lo cual se corrobora con lo encontrado por Yasmin & D'Souza en el año 2007, los cuales deducen que la reproducción de las lombrices es sensible a los plaguicidas, provocando esto a largo plazo una declinación en las poblaciones.

La gran mayoría de los autores coinciden en que las lombrices *E. foetida*, así como otros gusanos, hacen bien el papel de los biomarcadores sensibles y ofrecen numerosas oportunidades para estudios de contaminación del ambiente, tanto por los pesticidas y otros contaminantes (Sisinno *et al.* 2005; Loureiro *et al.* 2005).

5. CONCLUSIONES

- Los individuos de *E. foetida* bajo el efecto del fungicida, son capaces de sobrevivir a la exposición crónica del fungicida posiblemente al reducir la energía necesaria para otros procesos vitales como la alimentación, provocando disminución en la biomasa y producción de ootecas.
- La viabilidad de estos organismos después de las cuatro semanas de haber tenido contacto con Procloraz, mostró que este tiene una toxicidad directa sobre las lombrices de tierra produciendo efectos latentes sobre su reproducción.
- La actividad de las lombrices acelera la descomposición de los restos vegetales, incrementando la tasa de transformación de la materia orgánica.
- La lombricultura ofrece un mejor aprovechamiento de todos los residuos orgánicos, la cual puede ser utilizada como alimentación de las lombrices y convertirla en humus sólido y líquido, los cuales pueden ser aprovechados como abono orgánico en diferentes cultivos.

6. RECOMENDACIONES

- Durante la realización de todo el bioensayo es importante controlar los parámetros físicoquímicos del sustrato, como (temperatura, humedad), además de suministrar alimentación cuando sea necesario, con el fin de cotejar que los efectos ecotoxicológicos sobre *E. foetida* es producto del efecto de los fungicidas en estudio y no un factor ajeno a los mismos.
- Realizar pruebas ecotoxicológicas del fungicida en rangos alrededor de la CL₅₀ y CL₉₀ reportada en este documento.

- Para el mantenimiento del pie de cría de *E. foetida*, se recomienda que esta se alimente cada 18 días aproximadamente, asimismo controlar la humedad de la cama cada 8-10 días para así evitar el descenso de la población.
- Adecuar una mejor zona dentro de C-Bios para el secado del humus sólido.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ADAMA.(2029). Mirage 45EC. Información obtenida a través de <https://www.adama.com/colombia/es/crop-protection/fungicides/mirage-ec.html>
- Aira, M & Domínguez, J. (2009). Microbial and nutrient stabilization of two animal manures after the transit through the gut of the earthworm *Eisenia fetida*. Journal of Hazardous Materials 161:1234-1238.
- Aira, M., Monroy, F., Domínguez, J. (2006). *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) activates fungal growth, triggering cellulose decomposition during vermicomposting. Microbial Ecology. 52:738-746.
- Alonzo, L & Chicas, S. (2013). Determinacion de la concentracion letal 50 (CL50) de dos plaguicidas sinteticos utilizando *Eisenia foetida*. (Lombriz de tierra roja californiana) en el cultivo de *Cucumis sativus* L. (Pepino) en el distrito de riego del Valle de Zapotitan, La Libertad. Tesis de grado. Universidad de El Salvador.
- Ávila, G., Gaete, H., Morales, M & Neaman, A. (2007). Reproducción de *Eisenia foetida* en suelos agrícolas de áreas mineras contaminadas por cobre y arsénico. *Pesq. agropec. bras, Brasília*, 42(3): 435-441.
- Bauer, C & Römbke, J. (1997). Factors Influencing the Toxicity of Two Pesticides on Three Lumbricid Species in Laboratory Tests. *Soil Biol. Biochem.* 29(3,4): 705-708.
- Bates, R., Beauchamp, E., & Haq A. (1983). Análisis Físico Químico, John Wiley and Sons, Inc. New Cork.
- Bonada, N., Prat, N., Resh, V & Statzner, B. (2006). Developments in aquatic insect biomonitoring: a comparative analysis of recent approaches. *Annual Review Entomology*, 51, 495-523.

- Brown, V. (1983). The use of toxicity data in environmental toxicology. In "Environment and Quality of Life" (Sophia Antipolis-Valbourne, Ed.), pp. 214-226. CEC Press, Luxembourg.
- Brown, G. & Doube, B. (2004). Functional interactions between earthworms, microorganisms, organic matter, and plants. En: Edwards, C.A. (ed.), *Earthworm Ecology*, 2nd edn., pp. 213-224, CRC Press, Boca Raton. USA.
- Cabrera, G., Robaina, N. & Ponce de León, D. (2011). Riqueza y abundancia de la macrofauna edáfica en cuatro usos de la tierra en las provincias de Artemisa y Mayabeque, Cuba. *Pastos y Forrajes*. 34:313
- Calow, P. (1991). Physiological costs of combating chemical toxicants-Ecological implications. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100(1/2), 3-6
- Caride, C., Piñeiro, G. & Paruelo, J. (2011) ¿How does agricultural management modify ecosystem services? The effects on C dynamics. *Agric. Ecosyst. Environ.* Doi: 10.1016/j.agee.2011.05.031.
- De Aquino, A. (2008). Diversidade da macrofauna edáfica no Brasil. Em: *Biodiversidade do solo em Ecossistemas Brasileiros*. (Eds. Fátima M.S. Moreira, J.O. Siqueira y Lijbert Brussaard). Ed. UFLA. Lavras, Brasil. p. 143. 2008
- Dickson, K. (1995). Progress in toxicity testing-An academic's view point. In "Ecological Toxicity Testing-Scale, Complexity and Relevance" (J. Cairns and B. R. Niederlehner, Eds.), pp. 209-216. Lewis, London.
- Doménech, X. (2009). Química del suelo, El impacto de los contaminantes, Ed. Miraguano S.A., España, 127-153.
- Edwards, C. (1992). Testing the effects of chemicals on earthworms-The advantages and limitations of field tests. In "Ecotoxicology of Earthworms" (P. W. Greig-Smith, H. Becker, P. J. Edwards, and F. Heimbach, Eds.), pp. 75-84. Intercept, London.
- Ferrera, C. & Alarcón, A. (2001). La agricultura del suelo en la Agricultura Sostenible. *Ciencia Ergo Sum*. Universidad Autónoma del Estado de México. Vol 8, número dos. pp. 175-183. Toluca, México.
- Garzón, C. (2014). Determinación de residuos de plaguicidas en tejidos foliares y suelos de sistemas productivos de tomate bajo invernadero y libre exposición en Colombia.

- George, A. (2006). Estudio comparativo de indicadores de calidad de suelo en fincas de café orgánico y convencional en Turrialba, Costa Rica. Tesis como requisito para optar por el grado de *Magister Scientiae* en Agricultura Ecológica. Turrialba, Costa Rica. 118p.
- Gibbs, M., Wickler, L & Stewart, A. (1996). A method for assessing sublethal effects of contaminants in soils to earthworms, *Eisenia fetida*. Environ. Toxicol. Chem. 15(3), 360-368.
- Govaerts, B., Sayre, K & Deckers, J. (2006). A minimum data set for soil quality assessment of wheat and maize cropping in the highlands of Mexico. Soil & Tillage Research. 87: 163.
- Klemens, E., Stierhof, T., Dauber, J., Kreimes, K & Wolters, V. (2003). On the quality of soil biodiversity indicators: abiotic and biotic parameters as predictors of soil faunal richness at different spatial scales. Agriculture Ecosystems Environment 98(1-3): 273-283
- Kokta, C. (1992). Measuring effects of chemicals in the laboratory-Effect criteria and endpoints. In "Ecotoxicology of Earthworms" (P. W. Greig- Smith, H. Becker, P. J. Edwards, and F. Heimbach, Eds.), pp. 55-62. Intercept, London.
- Lavelle, P., Decans, T., Aubert, M., Barot, S & Blouin, M. (2006). Soil invertebrates and ecosystem services. European Journal of Soil Biology. 42:3, 2006.
- Lozano, S & Saavedra K. (2012). QCal: A software application for the calculation of dose-response curves in insecticide resistance bioassay. Journal of the American Mosquito Control Association, 28(1):59-61
- Muthukaruppan, G., Janardhanan, S & Vijayalakshmi, G. (2005). Sublethal Toxicity of the Herbicide Butachlor on the Earthworm *Perionyx sansibaricus* and its Histological Changes. JSS 5(2): 82-86
- Porta, C., López-Acevedo, R & Roquero, L. (1999). Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Ed Mundi-Prensa. México. P 183-184, 778-787.
- OCDE. (2014). Guía para la prueba de toxicidad, fertilidad y reproducción en suelos de lombrices *Eisenia foetida* prueba / *Eisenia andrei*.

- Ortiz, M., Sánchez, E., Olvera, A & Folch, J. (2011). Pesticides in the Environment: Impacts and their Biodegradation as a Strategy for Residues Treatment. Cap 27. Pp 25. En: Stoytcheva, M (Ed). Baja California, Mexico.
- Reinés, M., Rodríguez, C., Sierra, A & Vázquez, M. (1998). Lombrices de tierra con valor comercial. Biología y Técnicas de Cultivo. Ducere, México, D.F., 61 pp.
- Rodríguez, A. (1996). Producción y calidad de abono orgánico por medio de la lombriz roja californiana (*Eisenia Foetida*) y su capacidad reproductiva. Centro experimental de Campamento, IHCAFE. Honduras.
- Ruiz, U., Lavelle, P. & Jiménez, J. (2008). Soil macrofauna field manual. Technical level. FAO. Rome. 101 p.
- Sisino, C., Bulus, Rizzo, M & Moreira, J. (2005). Avoidance test using earthworms as a complement for metal contaminated site evaluation: preliminary results. In: *XIII International Conference on Heavy Metals in the Environment – ICHMET*. CT2005–038–00. Rio de Janeiro.
- Stromborg, K. (1986). Reproductive toxicity of monocrotophos to bobwhite quail. Poultry Sci. 65. Citado en Espinoza-Navarro, O & Bustos-Obregón, E. (2004). Sublethal doses of malathion alter male reproductive parameters of *Eisenia foetida*. *Int. J. Morphol.* 22(4): 297-302.
- Tineo, A. (1994). Crianza y manejo de lombrices de tierra con fines agrícolas. Programa de Manejo Integral de Recursos Naturales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Publicaciones del proyecto RENARM/Manejo de Cuencas.
- Yasmin, S & D'Souza, D. (2007). Effect of Pesticides on the Reproductive Output of *Eisenia foetida*. *Bull Environ Contam Toxicol* 79: 529-532.

ANEXOS

1. Adecuación del área para el criadero de lombrices



2. Mejoramiento del módulo para el pie de cría de lombrices





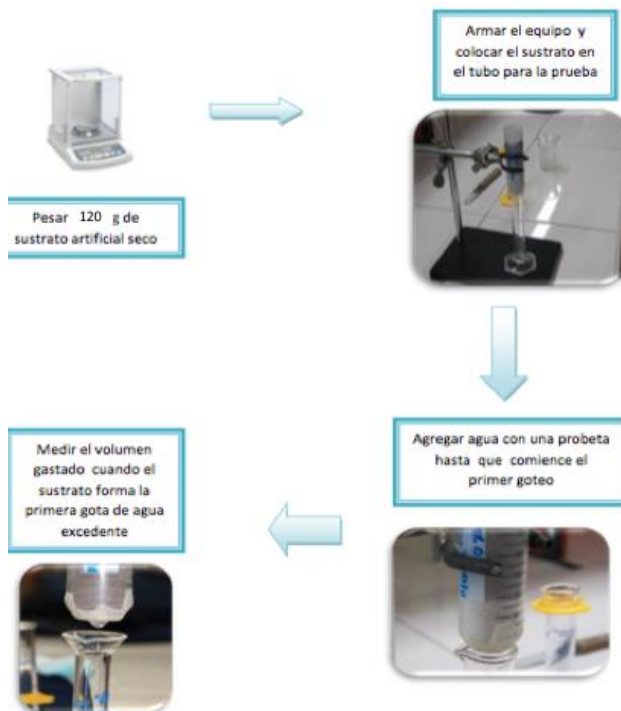
3. Mantenimiento del pie de cría de la lombriz roja californiana



4. Acondicionamiento del organismo de prueba



5. Prueba de retención de agua



20ml -> 100% Humedad
X <- 75% Humedad
X: 15ml
agua + plaguicida

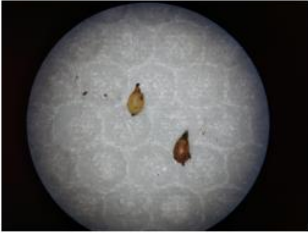
6. Preparación de *E. foetida* para la prueba de ecotoxicidad



7. Prueba de toxicidad



Tto [x μ L]	Biomasa inicial (gr)	Biomasa final (gr)	Ob 1 # muertes	Ob 2 # muertes	Ob 3 # muertes	Ob 4 # muertes	# Ootecas	Morfología
R1								
R2								
R3								
R4								


8. Evaluación de la viabilidad de *E. foetida* expuesta a procloraz

a) Derteminación de pH en sustrato

Se pesaron 3g del sustrato en un beaker de 100ml donde se adicionó 50 ml de agua destilada fría, se agitó ocasionalmente y de dejó reposar por 30 minutos. Previamente se calibró el pH-metro utilizando en orden los buffers 4, 7 y 10. Se introdujo el electrodo en la solución de la muestra.

b) Ootecas y juveniles



9. Modificación del protocolo para la práctica “Bioindicadores en suelos contaminados. *E. foetida* (supervivencia y reproducción)” de la clase Toxicología Ambiental de la UJTL



Ecotoxicidad en suelos contaminados. Lombrices (supervivencia y reproducción)

Actualmente los agricultores utilizan una gran cantidad de plaguicidas sintéticos. Su uso indiscriminado elimina agentes beneficiosos que se encuentran en el suelo. La lombriz de tierra representa aproximadamente un 80% de la biomasa del suelo y entre sus funciones se encuentra descomponer e incorporar materia orgánica, estabilizar el ciclo de nutrientes, entre otras; debido a la importancia que éstos organismos tienen para estructura y composición del suelo es necesario evaluar el daño que les provoca el uso de agroquímicos.

Plaguicidas de estudio

Se utilizará un insecticida y un fungicida con compuestos activos Metomilo y Procloraz respectivamente, los cuales son utilizados comúnmente en cultivos de flores, papa entre otros. Para los plaguicidas se tomaron las siguientes consideraciones para las concentraciones a utilizar.

Consideración	Procloraz cc/L	Metomilo g/L
Dos concentraciones menores a la recomendada por el fabricante.	0.4	0.3
	0.8	0.6
Concentración utilizada por los productores, se tomó la concentración recomendada por el fabricante siendo la misma utilizada por el productor.	1.2	0.9
Dos concentraciones mayores de la dosis recomendada por el fabricante.	1.6	1.1
	2.0	1.4

Esto se consideró de acuerdo a la cantidad rotulada de principio activo en la etiqueta del plaguicida.

Arranque de la prueba

1. Antes de iniciar la práctica, lave sus manos y use guantes de nitrilo.
2. Tomar las cajas plásticas que contienen las lombrices (previamente tratadas) y vacíe parte del contenido sobre una bandeja.

3. Tome las lombrices con ayuda de sus dedos, procurando de no lastimarlas y seleccione los individuos que tengan clitelo desarrollado y procurando que tengan el mismo tamaño y peso.
4. A medida que selecciona las lombrices, póngalas suavemente en una caja de petri
5. Enjuague las lombrices con agua esteril para remover el exceso de sustrato adherido a la lombriz.
6. Tare una base de petri vacía y pese 5 lombrices limpias y secas. Registre la biomasa de las lombrices.
7. Tare cada uno de los recipientes plásticos y pese el sustrato con el que se va a realizar la prueba (120gr de suelo y 50 gr de lechuga en pequeños trozos y estiércol vacuno).
8. Ponga las lombrices pesadas en cada recipiente con el sustrato y espere que se introduzcan en el sustrato.
9. Póngase todos los implementos de seguridad (guantes, gafas, tapabocas industrial) y ayuda de una pipeta, adicione cuidadosamente 15 ml del plaguicida de síntesis química correspondiente a cada tratamiento dentro de la cabina de extracción.
10. Tape los recipientes y póngalos en la cabina de pruebas.

Primera revisión

1. Prepare los materiales necesarios para registrar las mediciones y observaciones del caso (bandejas, tablas para datos).
2. En una superficie firme y plana, destape cuidadosamente el recipiente y vacíe el contenido en la bandeja (empiece por los tratamientos de menor concentración) OJO: lave y seque muy bien la bandeja al cambiar de plaguicida.
3. Ayudándose de unas pinzas o con los dedos, revise cuidadosamente y minuciosamente el sustrato, cuente las lombrices vivas, póngalas con mucho cuidado aparte y observe su comportamiento (lombrices que no responden al estímulo del tacto se consideran muertas).
4. Registre el número de los individuos adultos, juveniles y ootecas .
5. Remueva el material de desecho si lo hay, como individuos muertos.
6. Tare el recipiente plástico vacío y devuelva su contenido (170gr sustrato) ajustando el peso con materia orgánica (lechuga en pequeños trozos y estiércol

vacuno) y adicione las lombrices adultas sobreviviente correspondiente a cada tratamiento.

7. Póngase todos los implementos de seguridad (guantes, gafas, tapabocas industrial) y ayuda de una pipeta, adicione cuidadosamente dentro de la cabina de extracción el plaguicida de síntesis química correspondiente a cada tratamiento.
8. Tape los recipientes y póngalos nuevamente en la cabina de pruebas.

Segunda revisión

1. Repita los pasos 1 al 5, adicionalmente:
2. Tare una base de petri vacía y ponga las lombrices vivas y registre su biomasa final y si observa alguna anomalía a nivel de su morfología, reportelo.
3. Descarte el material descompuesto, los sustratos y los recipientes plásticos que estuvieron en contacto con los plaguicidas en bolsas rojas.

Tabla 1. Condiciones en la prueba

Parámetro	Und.	Descripción
Lombrices	und	5/unidad experimental
Estamento de crecimiento		Adultas (cliteladas)
Peso 5 lombrices	gr	1-2
Tiempo de exposición	días	30
Alimento		Si
Tipo de alimento	gr	20 Lechuga + estiércol vacuno
Frecuencia de alimentación	Días	15
Temperatura	°C	20 +/- 2
Humedad del sustrato	%	75
Reaplicación del plaguicida	días	15
Revisión	días	Cada 15
Observaciones		Biomasa (inicial y final) Mortalidad Ootecas Juveniles

Tabla 2. Formato para llenar durante la prueba.

Tx	Biomasa inicial	Revisión 1			Revisión 2			Biomasa final
		Adultos	Juveniles	Ootecas	Adultos	Juveniles	Ootecas	
R1								
R2								
R3								
R4								
T0								

10. Tabla de resultados

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del sustrato.

Parámetro	Unidades	Sustrato	Testigo	T1	T2	T3	T4	T5
Humedad	%	74,98	73,24	74,21	73,03	74,78	70,77	73,87
Materia orgánica	%	22,78	57,41	51,51	45,63	35,54	34,76	31,83
pH	-logH ⁺	4,40	6,60	6,30	6,30	4,40	4,80	4,60
Nitrógeno total	%	0,64	0,98	0,76	0,76	0,64	0,66	0,65
Fósforo	%	0,22	0,54	0,47	0,33	0,24	0,23	0,22
Potasio	%	0,10	0,45	0,26	0,28	0,09	0,16	0,14
Calcio	%	0,20	0,64	0,46	0,39	0,20	0,21	0,21
Magnesio	%	0,24	0,43	0,36	0,34	0,25	0,25	0,26

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS**Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/ *Eisenia andrei*)****INTRODUCTION**

1. This Test Guideline is designed to be used for assessing the effects of chemicals in soil on the reproductive output (and other sub-lethal end points) of the earthworm species *Eisenia fetida* (Savigny 1826) or *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2). The test has been ring-tested (3). A guideline for the earthworm acute toxicity test has been published by OECD (4). A number of other international and national guidelines for earthworm acute and chronic tests have been published (5)(6)(7)(8).

2. *Eisenia fetida* /*Eisenia andrei* are considered to be a one of representatives of soil fauna and earthworms in particular. Background information on the ecology of earthworms and their use in ecotoxicological testing is available (7)(9)(10)(11)(12).

PRINCIPLE OF THE TEST

3. Adult worms are exposed to a range of concentrations of the test substance either mixed into the soil or, in case of pesticides, applied into or onto the soil using procedures consistent with the use pattern of the substance. The method of application is specific to the purpose of the test. The range of test concentrations is selected to encompass those likely to cause both sub-lethal and lethal effects over a

period of eight weeks. Mortality and growth effects on the adult worms are determined after 4 weeks of exposure. The adults are then removed from the soil and effects on reproduction assessed after a further 4 weeks by counting the number of offspring present in the soil. The reproductive output of the worms exposed to the test substance is compared to that of the control(s) in order to determine the (i) no observed effect concentration (NOEC) and/or (ii) EC_x (e.g. EC_{10} , EC_{50}) by using a regression model to estimate the concentration that would cause a x % reduction in reproductive output. The test concentrations should bracket the EC_x (e.g. EC_{10} , EC_{50}) so that the EC_x then comes from interpolation rather than extrapolation (see Annex 1 for definitions).

INFORMATION ON THE TEST SUBSTANCE

4. The following information relating to the test substance should be available to assist in the design of appropriate test procedures:

- water solubility;
- log K_{ow} ;
- vapour pressure;
- and information on fate and behaviour in the environment, where possible (e.g. rate of photolysis and rate of hydrolysis where relevant to application patterns).

5. This Guideline is applicable to all substances irrespective of their water solubility. The method is not applicable to volatile substances, defined here as substances for which Henry's constant or the

air/water partition coefficient is greater than one, or to substances with vapour pressures exceeding 0.0133 Pa at 25 °C.

6. No allowance is made in this Guideline for possible degradation of the test substance over the period of the test. Consequently it cannot be assumed that exposure concentrations will be maintained at initial values throughout the test. Chemical analysis of the test substance at the start and the end of the test is recommended in that case.

REFERENCE SUBSTANCE

7. The NOEC and/or the EC₅₀ of a reference substance must be determined to provide assurance that the laboratory test conditions are adequate and to verify that the response of the test organisms does not change statistically over time. It is advisable to test a reference substance at least once a year or, when testing is carried out at a lower frequency, in parallel to the determination of the toxicity of a test substance. Carbendazim or benomyl are suitable reference substances that have been shown to affect reproduction (3). Significant effects should be observed between (a) 1 and 5 mg active ingredient (a.i.) kg dry mass or (b) 250-500 g/ha or 25-50 mg/m². If a positive toxic standard is included in the test series, one concentration is used and the number of replicates should be the same as that in the controls.

VALIDITY OF THE TEST

8. The following criteria should be satisfied in the controls for a test result to be considered valid:
- each replicate (containing 10 adults) to have produced ≥ 30 juveniles by the end of the test;
 - the coefficient of variation of reproduction to be $\leq 30\%$;
 - adult mortality over the initial 4 weeks of the test to be $\leq 10\%$.

Where a test fails to meet the above validity criteria the test should be terminated unless a justification for proceeding with the test can be provided. The justification should be included in the report.

DESCRIPTION OF THE TEST

Equipment

9. Test containers made of glass or other chemically inert material of about one to two litres capacity should be used. The containers should have a cross-sectional area of approximately 200 cm² so that a moist substrate depth of about 5-6 cm is achieved when 500 to 600 g dry mass of substrate is added. The design of the container cover should permit gaseous exchange between the substrate and the atmosphere and access to light (e.g. by means of a perforated transparent cover) whilst preventing the worms from escaping. If the amount of test substrate used is substantially more than 500 to 600 g per test container the number of worms should be increased proportionately.

10. Normal laboratory equipment is required, specifically the following:
- drying cabinet;
 - stereomicroscope;
 - pH-meter and photometer;
 - suitable accurate balances;

- adequate equipment for temperature control;
- adequate equipment for humidity control (not essential if exposure vessels have lids);
- incubator or small room with air-conditioner;
- tweezers, hooks or loops;
- water bath.

Preparation of the artificial soil

11. An artificial soil is used in this test (5)(7) with the following composition (based on dry weights, dried to a constant weight at 105 °C):

- 10 per cent sphagnum peat (as close to pH 5.5 to 6.0 as possible, no visible plant remains, finely ground, dried to measured moisture content);
- 20 per cent kaolin clay (kaolinite content preferably above 30 per cent);
- 0.3 to 1.0% calcium carbonate (CaCO_3 , pulverized, analysis grade) to obtain an initial pH of 6.0 ± 0.5 ;
- 70% air-dried quartz sand (depending on the amount of CaCO_3 needed), predominantly fine sand with more than 50% of the particles between 50 and 200 microns.

Note 1: The amount of CaCO_3 required will depend on the components of the soil substrate including food, and should be determined by measurements of soil sub-samples immediately before the test. pH is measured in a mixed sample in a 1 M solution of potassium chloride (KCl) or a 0.01 M solution of calcium chloride (CaCl_2) (13).

Note 2: The organic carbon content of the artificial soil may be reduced, for example by lowering the peat content to 4.5% and increasing the sand content accordingly. By such a reduction in organic carbon content, the possibilities of adsorption of test chemical to the soil (organic carbon) may be decreased and the availability of the test chemical to the worms may increase. It has been demonstrated that *Eisenia fetida* can comply with the validity criteria on reproduction when tested in field soils with lower organic carbon content (e.g. 2.7%) (14), and there is experience that this can also be achieved in artificial soil with 5% peat. Therefore, it is not necessary before using such a soil in a definitive test to demonstrate the suitability of the artificial soil for allowing the test to comply with the validity criteria unless the peat content is lowered more than specified above.

Note 3: When using natural soil in additional (e.g. higher Tier) testing the suitability of the soil and achieving the test validity criteria should also be demonstrated.

12. The dry constituents of the soil are mixed thoroughly (e.g. in a large-scale laboratory mixer) in a well ventilated area. Before starting the test, the dry artificial soil is moistened by adding enough de-ionised water to obtain approximately half of the final water content, that being 40% to 60% of the maximum water holding capacity (corresponding to $50 \pm 10\%$ moisture dry mass). This will produce a substrate that has no standing or free water when it is compressed in the hand. The maximum water holding capacity (WHC) of the artificial soil is determined in accordance with procedures described in Annex 2 or ISO 11274 (15).

13. If the test substance is applied on the soil surface or mixed into soil without water, the final amount of water can be mixed into the artificial soil during preparation of the soil. If the test substance is mixed into the soil together with some water, the additional water can be added together with the test substance (see paragraph 19).

14. Soil moisture content is determined at the beginning and at the end of the test in accordance with ISO 11465 (16) and soil pH in accordance with Annex 3 or ISO 10390 (13). These determinations should be carried out in a sample of control soil and a sample of each test concentration soil. The soil pH should not be adjusted when acidic or basic substances are tested. The moisture content should be monitored throughout the test by weighing the containers periodically (see paragraph 26 and 30).

Selection and preparation of test animals

15. The species used in the test is *Eisenia fetida* or *Eisenia andrei* (1)(2). Adult worms between two months and one year old and with a clitellum are required to start the test. The worms should be selected from a synchronised culture with a relatively homogeneous age structure (Annex 4). Individuals in a test group should not differ in age by more than 4 weeks.

16. The selected worms should be acclimatised for at least one day with the type of artificial soil substrate to be used for the test. During this period the worms should be fed on the same food to be used in the test (see paragraphs 31 to 33).

17. Groups of 10 worms should be weighed individually randomly assigning the groups to the test containers at the start of the test. The worms are washed prior to weighing (with deionised water) and the excess water removed by placing the worms briefly on filter paper. The wet mass of individual worms should be between 250 and 600 mg.

Preparation of test concentrations

18. Two methods of application of the test substance can be used: mixing the test substance into the soil (see paragraphs 19-21) or application to the soil surface (see paragraphs 22-24). The selection of the appropriate method depends on the purpose of the test. In general, mixing of the test substance into the soil is recommended. However application procedures that are consistent with normal agricultural practice may be required (e.g. spraying of liquid formulation or use of special pesticide formulations such as granules or seed dressings). Solvents used to aid treatment of the soil with the test substance should be selected on the basis of their low toxicity to earthworm and appropriate solvent control must be included in the test design (see paragraph 27).

Mixing the test substance into the soil

Test substance soluble in water

19. A solution of the test substance in de-ionised water is prepared immediately before starting the test in a quantity sufficient for all replicates of one concentration. A co-solvent may be required to facilitate for the preparation of the test solution. It is convenient to prepare an amount of solution necessary to reach the final moisture content (40 to 60% of maximum water holding capacity). The solution is mixed thoroughly with the soil substrate before introducing it into a test container.

Test substance insoluble in water

20. The test substance is dissolved in a small volume of a suitable organic solvent (e.g. acetone) and then sprayed onto, or mixed into, a small quantity of fine quartz sand. The solvent is then removed by evaporation in a fume hood for at least a few minutes. The treated sand is then mixed thoroughly with the pre-moistened artificial soil. De-ionised water is then added (an amount required) to achieve a final moisture content of 40 to 60 % of the maximum water holding capacity is then added and mixed in. The

soil is then ready for placing in test containers vessels. Care should be taken that some solvents may be toxic to earthworms.

Test substance insoluble in water and organic solvents

21. A mixture comprised of 10 g of finely ground industrial quartz sand with a quantity of the test substance necessary to achieve the test concentration in the soil is prepared. The mixture is then mixed thoroughly with the pre-moistened artificial soil. De-ionised water is then added to an amount required to achieve a final moisture content of 40 to 60% of the maximum water holding capacity is then added and mixed in. The soil is then ready for placing to the test containers.

Application of the test substance to the soil surface

22. The soil is treated after the worms are added. The test containers are first filled with the moistened soil substrate and the weighed worms are placed on the surface. Healthy worms normally burrow immediately into substrate and consequently any remaining on the surface after 15 minutes are defined as damaged and must be replaced. If worms are replaced, the new ones and those substituted should be weighed so that total live weight of the exposure group of worms and the total weight of the container with worms at the start is known.

23. The test substance is applied. It should not be added to the soil within half an hour of introducing the worms (or if worms are present on the soil surface) so as to avoid any direct exposure to the test substance by skin contact. When the test substance is a pesticide it may be appropriate to apply it to the soil surface by spraying. The test substance should be applied to the surface of the soil as evenly as possible using a suitable laboratory-scale spraying device to simulate spray application in the field. Before application the cover of the test container should be removed and replaced by a liner which protects the side walls of the container from spray. The liner can be made from a test container with the base removed. The application should take place at a temperature within 20 ± 2 °C of variation and for aqueous solutions, emulsions or dispersions at a water application rate of between 600 and 800 $\mu\text{l}/\text{m}^2$. The rate should be verified using an appropriate calibration technique. Special formulations like granules or seed dressings should be applied in a manner consistent with agricultural use.

24. Test containers should be left uncovered for a period of one hour to allow any volatile solvent associated with the application of the test substance to evaporate. Care should be taken that no worm will escape from the test vessels within this time.

PROCEDURE

Test groups and controls

25. A loading of 10 earthworms in 500 - 600 g dry mass of artificial soil (i.e. 50-60 g of soil per worm) is recommended. If larger quantities of soil are used, as might be the case if testing pesticides with special modes of application such as seed dressings, the loading of 50-60 g of soil per worm should be maintained by increasing the number of worms. Ten worms are prepared for each control and treatment container. The worms are washed with water and wiped and then placed on absorbent paper for a short period to allow excess water to drain.

26. To avoid systematic errors in distributing the worms to the test containers the homogeneity of the test population should be determined by individually weighing 20 worms sampled randomly from the population from which the test worms are to be taken. Having ensured homogeneity, batches of worms are

then be selected, weighed and assigned to test containers using a randomisation procedure. After the addition of the test worms, the weight of each test container should be measured to ensure that there is an initial weight that can be used as the basis for monitoring soil moisture content throughout the test as described in paragraph 30. The test containers are then covered as described in paragraph 9 and placed in the test chamber.

27. Appropriate controls are prepared for each of the methods of test substance application described in paragraphs 18 to 24. The relevant procedures described are followed for preparing the controls except that the test substance is not added. Thus, where appropriate, organic solvents, quartz sand or other vehicles are applied to the controls in concentrations/amounts consistent with those used in the treatments. Where a solvent or other vehicle is used to add the test substance an additional control without the vehicle or test substance should also be prepared and tested to ensure that the vehicle has no bearing on the result.

Test conditions

28. The test temperature is 20 ± 2 °C. The test is carried out under controlled light-dark cycles (preferably 16 hours light and 8 hours dark) with illumination of 400 to 800 lux in the area of the test containers.

29. The test containers are not aerated during the test but the design of the test vessel covers should provide opportunity for gaseous exchange whilst limiting evaporation of moisture (see paragraph 9).

30. The water content of the soil substrate in the test containers is maintained throughout the test by re-weighing the test containers (minus their covers) periodically. Losses are replenished as necessary with de-ionised water. The water content should not vary by more than 10 % from that at the start of the test.

Feeding

31. Any food of a quality shown to be suitable for at least maintaining worm weight during the test is considered acceptable. Experience has shown that oatmeal, cow or horse manure is a suitable food. Checks should be made to ensure that cows or horses from which manure is obtained are not subject to medication or treatment with substances, such as growth promoters, nematocides or similar veterinary products that could adversely affect the worms during the test. Self-collected cow manure is recommended, since experience has shown that commercially available cow manure used as garden fertiliser may have adverse effects on the worms. The manure should be air-dried, finely ground and pasteurised before use.

32. Each fresh batch of food should be fed to a non-test worm culture before use in a test to ensure that it is of suitable quality. Growth and cocoon production should not be reduced compared to worms kept in a substrate that does not contain the new batch of food (conditions as described in OECD 207(4)).

33. Food is first provided one day after adding the worms and applying the test substance to the soil. Approximately 5 g of food is spread on the soil surface of each container and moistened with de-ionised water (about 5 ml to 6 ml per container). Thereafter food is provided once a week during the 4-week test period. If food remains uneaten the ration should be reduced so as to avoid fungal growth or moulding. The adults are removed from the soil on day 28 of the test. A further 5 g of food is then administered to each test container. No further feeding takes place during the remaining 4 weeks of the test.

Selection of test concentrations

34. Prior knowledge of the toxicity of the test substance should help in selecting appropriate test concentrations, for example from an acute test (4) and/or from range-finding studies. When necessary, a

range-finding test is conducted with, for example, five test concentrations of 0.1, 1.0, 10, 100, and 1000 mg/kg (dry mass of soil). One replicate for each treatment and control is sufficient. The duration of the range-finding test is two weeks and the mortality is assessed at the end of the test.

Experimental design

35. Since a single summary statistic cannot be prescribed for the test, this Guideline makes provision for the determination of the NOEC and the EC_{50} . A NOEC is likely to be required by regulatory authorities for the foreseeable future. More widespread use of the EC_{50} , resulting from statistical and ecological considerations, may be adopted in the near future. Therefore, three designs are proposed, based on recommendations arising from a ring test of an enchytraeid reproduction test method (17):

36. In setting the range of concentrations, the following should be borne in mind:

- For determination of the NOEC, at least five/twelve concentrations in a geometric series should be tested. Four replicates for each test concentration plus eight controls are recommended. The concentrations should be spaced by a factor not exceeding 2.0.
- For determination of the EC_{50} (e.g. EC_{10} , EC_{50}), an adequate number of concentrations to cause at least four statistically significantly different mean responses at these concentrations is recommended. At least two replicates for each test concentration and six control replicates are recommended. The spacing factor may vary, i.e. less than or equal to 1.8 in the expected effect range and above 1.8 at the higher and lower concentrations.
- A combined approach allows for determination of both the NOEC and EC_{50} . Eight treatment concentrations in a geometric series should be used. Four replicates for each treatment plus eight controls are recommended. The concentrations should be spaced by a factor not exceeding 1.8.

Test duration and measurements

37. On Day 28 the living adult worms are observed and counted. Any unusual behaviour (e.g. inability to dig into the soil; lying motionless) and in morphology (e.g. open wounds) are also recorded. All adult worms are then removed from the test vessels and counted and weighed. Transfer of the soil containing the worms to a clean tray prior to the assessment may facilitate searching for the adults. The worms extracted from the soil should be washed prior to weighing (with de-ionised water) and the excess water removed by placing the worms briefly on filter paper. Any worms not found at this time are to be recorded as dead, since it is to be assumed that such worms have died and decomposed prior to the assessment.

38. If the soil has been removed from the containers it is then returned (minus the adult worms but containing any cocoons that have been produced). The soil is then incubated for four additional weeks under the same test conditions except that feeding only takes place once at the start of this phase of the test (see paragraph 33).

39. At the end of the second 4-week period, the number of juveniles hatched from the cocoons in the test soil and cocoon numbers are determined using procedures described in Annex 5. All signs of harm or damage to the worm should also be recorded throughout the test period.

Limit test

40. If no effects are observed at the highest concentration in the range-finding test (i.e. 1000 mg/kg), the reproduction test would be performed as a limit test, using a test concentration of 1000 mg/kg. A limit test will provide the opportunity to demonstrate that the NOEC for reproduction is greater than the limit concentration whilst minimising the number of worms used in the test. Eight replicates should be used for both the treated soil and the control.

DATA AND REPORTING

Treatment of results

41. Although an overview is given in Annex 6, no definitive statistical guidance for analysing test results is given in this guideline.

42. One endpoint is mortality. Changes in behaviour (e.g. inability to dig into the soil; lying motionless against the glass wall of the test vessel) and morphology (e.g. open wounds) of the adult worm should however also be recorded along with the presence of any juveniles. Probit analysis (18) or logistic regression should normally be applied to determine the LC_{50} . However, in cases where this method of analysis is unsuitable (e.g., if less than three concentrations with partial kills are available), alternative methods can be used. These methods could include moving averages (19), the trimmed Spearman-Kärbe method (20) or simple interpolation (e.g., geometrical mean of LC_5 and LC_{100} , as computed by the square root of LC_5 multiplied by LC_{100}).

43. The other endpoint is fecundity (e.g. number of juveniles produced). However, as in the range finding test, all other harmful signs should be recorded in the final report. The statistical analysis requires the arithmetic mean $\bar{X}$ and the standard deviation per treatment and per control for reproduction to be calculated.

44. If an analysis of variance has been performed, the standard deviation, s , and the degrees of freedom (df) may be replaced by the pooled variance estimate obtained from the ANOVA and by its degrees of freedom, respectively – provided variance does not depend on the concentration. In this case, use the single variances of control and treatments. Those values are usually calculated by commercial statistical software using the per-vessel results as replicates. If pooling data for the negative and solvent controls appears reasonable rather than testing against one of those, they should be tested to see that they are not significantly different (for the appropriate test, consider paragraph 47 and Annex 6).

45. Further statistical testing and inference depends on whether the replicate values are normally distributed and are homogeneous with regard to their variance.

NOEC Estimation

46. The application of powerful tests should be preferred. One should use information for example from previous experience with ring-testing or other historic data on whether data are approximately normally distributed. Variance homogeneity (homoscedasticity) is more critical. Experience tells that the variance often increases with increasing mean. In these cases, a data transformation could lead to homoscedasticity. However, such a transform should be based on experience with historic data rather than on data under investigation. With homogeneous data, multiple t-tests such as Williams' test ($\alpha = 0.05$, one-sided) (21)(22) or certain cases Dunnett's test (23)(24) should be performed. It should be noted that, in the case of unequal replication, the table t-values must be corrected as suggested by Dunnett and

Williams. Sometimes, because of large variation, the responses do not increase/decrease regularly. In this case of strong deviation from monotonicity the Dunnett's test is more appropriate. If there are deviations from homoscedasticity, it may be reasonable to investigate possible effects on variances more closely to decide whether the t-tests can be applied without losing much power (25). Alternatively, a multiple U-test, for example the Bonferroni-U-test according to Holm (26), or when these data exhibit heteroscedasticity but are otherwise consistent with a underlying monotone dose-response, an other non-parametric test (e.g. Jonckheere-Terpstra (27)(28) or Shirley (29) (30)) can be applied and would generally be preferred to unequal-variance t-tests. (see also the scheme in Annex 6).

47. If a limit test has been performed and the prerequisites of parametric test procedures (normality, homogeneity) are fulfilled, the pair-wise Student-t-test can be used or otherwise the Mann-Whitney-U-test procedure (31).

EC_x Estimation

48. To compute any EC_x value, the per-treatment means are used for regression analysis (linear or non-linear), after an appropriate dose-response function has been obtained. For the growth of worms as a continuous response, EC_x-values can be estimated by using suitable regression analysis (32). Among suitable functions for quantal data (mortality/survival and number of offspring produced) are the normal sigmoid, logistic or Weibull functions, containing two to four parameters, some of which can also model hormetic responses. If a dose-response function was fitted by linear regression analysis a significant r² (coefficient of determination) and/or slope should be found with the regression analysis before estimating the EC_x by inserting a value corresponding to x% of the control mean into the equation found by regression analysis. 95%-confidence limits are calculated according to Fieller (cited in Finney (18)) or other modern appropriate methods.

49. Alternatively, the response is modelled as a percent or proportion of model parameter which is interpreted as the control mean response. In these cases, the normal (logistic, Weibull) sigmoid curve can often be easily fitted to the results using the probit regression procedure (18). In these cases the weighting function has to be adjusted for metric responses as given by Christensen (33). However, if hormesis has been observed, probit analysis should be replaced by a four-parameter logistic or Weibull function, fitted by a non-linear regression procedure (34). If a suitable dose-response function cannot be fitted to the data, one may use alternative methods to estimate the EC_x and its confidence limits, such as Moving Averages after Thompson (19) and the Trimmed Spearman-Kärber procedure (20).

Test report

50. The test report must include the following information:

Test substance:

- a definitive description of the test substance, batch, lot and CAS-number, purity;
- properties of the test substance (e.g. log K_{ow}, water solubility, vapour pressure, Henry's constant (H) and information on fate and behaviour).

Test organisms:

- test animals used: species, scientific name, source of organisms and breeding conditions;
- age, size (mass) range of test organisms.

Test conditions

- preparation details for the test soil;
- the maximum water holding capacity of the soil;
- a description of the technique used to apply the test substance to the soil;
- details of auxiliary substances used for administering the test substance;
- calibration details for spraying equipment if appropriate;
- description of the experimental design and procedure;
- size of test containers and volume of test soil;
- test conditions: light intensity, duration of light-dark cycles, temperature;
- a description of the feeding regime, the type and amount of food used in the test, feeding dates;
- pH and water content of the soil at the start and end of the test.

Test results:

- adult mortality (%) in each test container at the end of the first 4 weeks of the test;
- the total mass of adults at the beginning of the test in each test container;
- changes in body weight of live adults (% of initial weight) in each test container after the first four weeks of the test;
- the number of juveniles produced in each test container at the end of the test;
- a description of obvious or pathological symptoms or distinct changes in behaviour;
- the results obtained with the reference test substance;
- the LC₅₀, the NOEC and/or EC_x (e.g. EC₅₀, EC₁₀) for reproduction if some of them are applicable with confidence intervals, and a graph of the fitted model used for its calculation all information and observations helpful for the interpretation of the results;
- a plot of the dose-response-relationship;
- the results applicable to each test container;

Deviations from procedures described in this guideline and any unusual occurrences during the test.

Deviations from procedures described in this guideline and any unusual occurrences during the test.

LITERATURE

- (1) Jaenicke, J. (1982). '*Eisenia foetida*' is two biological species. *Megadrilogica* 4, 6-8.
- (2) Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm - III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. *Comp. Biochem. Physiol.* 78c (2), 277 - 282.
- (3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* - comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesanst. f. Land- Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.
- (4) OECD Guideline for testing chemicals 207. Earthworm acute toxicity test. Adopted: 4 April 1984.
- (5) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneva.

- (6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneva.
- (7) SETAC (1995). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Benbridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthumus, (eds). SETAC Press, 456 pp.
- (8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (\$50.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.
- (9) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France. Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.
- (10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.
- (11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.
- (12) Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.
- (13) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality - Determination of pH. No. 10390. ISO, Geneva.
- (14) Hund-Rinke, K., Römcke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisenreger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (15) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality –Determination of water retention characteristics –Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneva.
- (16) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneva.
- (17) Römcke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.
- (18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (19) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. - Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

- 21) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, 103-117.
- 22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, 519-531.
- 23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- 24) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20, 482-491.
- 25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? *Ecotoxicology* 7: 355-361
- 26) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- 27) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, *Biometrika* 41, 133-145.
- 28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, *Indagationes Math.* 14, 327-333.
- 29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, *Applied Statistics* 28, 144-151.
- 30) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, *Biometrics* 42, 183-186.
- 1) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). *Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research.* 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- 2) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494.
- 3) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18, 213-221.
- 4) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. *Ecotox. Environ. Safety.* 25, 25-32.

ANNEX 5

TECHNIQUES FOR COUNTING JUVENILE WORMS HATCHED FROM COCOONS

Hand sorting of worms from the soil substrate is very time-consuming. Two alternative methods are therefore recommended:

(a) The test containers are placed in a water bath initially at a temperature of 40°C but rising to 60°C. After a period of about 20 minutes the juvenile worms should appear at the soil surface from which they can be easily removed and counted.

(b) The test soil may be washed through a sieve using the method developed by van Gestel et al. (1) providing the peat and the manure or oatmeal added to the soil were ground to a fine powder. Two 0.5 mm mesh size sieves (diameter 30 cm) are placed on top of each other. The contents of a test container are washed through the sieves with a powerful stream of tap water, leaving the young worms and cocoons mainly on the upper sieve. It is important to note that the whole surface of the upper sieve should be kept wet during this operation so that the juvenile worms float on a film of water, thereby preventing them from creeping through the sieve pores. Best results are obtained when a showerhead is used.

Once all the soil substrate has been washed through the sieve, juveniles and cocoons can be rinsed from the upper sieve into a bowl. The contents of the bowl are then left to stand allowing empty cocoons to float on the water surface and full cocoons and young worms to sink to the bottom. The standing water can then be poured off and the young worms and cocoons transferred to a petri dish containing a little water. The worms can be removed for counting using a needle or a pair of tweezers.

Experience has shown that method (a) is better suited to extraction of juvenile worms that might be washed through even a 0.5 mm sieve.

The efficiency of the method used to remove the worms (and cocoons if appropriate) from the soil substrate should always be determined. If juveniles are collected using the hand sorting technique it is advisable to carry out the operation twice on all samples.

References:

- (1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32: 367-371.

ANNEX 2

DETERMINATION OF THE MAXIMUM WATER HOLDING CAPACITY OF THE SOIL

The following method for determining the maximum water holding capacity of the soil has been found to be appropriate. It is described in Annex C of the ISO DIS 11268-2 (1).

Collect a defined quantity (e.g. 5 g) of the test soil substrate using a suitable sampling device (auger tube etc.). Cover the bottom of the tube with a piece of filter paper fill with water and then place it on a rack in a water bath. The tube should be gradually submerged until the water level is above to the top of the soil. It should then be left in the water for about three hours. Since not all water absorbed by the soil capillaries can be retained, the soil sample should be allowed to drain for a period of two hours by placing the tube onto a bed of very wet finely ground quartz sand contained within a covered vessel (to prevent drying). The sample should then be weighed, dried to constant mass at 105 °C. The water holding capacity (WHC) can then be calculated as follows:

$$\text{WHC (in \% of dry mass)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Where:

S = water-saturated substrate + mass of tube + mass of filter paper

T = tare (mass of tube + mass of filter paper)

D = dry mass of substrate

References:

- (1) ISO (International Organization for Standardisation) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneva.

ANNEX 1DEFINITIONS

The following definitions are applicable to this Guideline:

EC_x (Effect concentration for x% effect) is the concentration that causes an x% of an effect on test organisms within a given exposure period when compared with a control. For example, an EC₅₀ is a concentration estimated to cause an effect on a test end point in 50% of an exposed population over a defined exposure period. In this test the effect concentrations are expressed as a mass of test substance per dry mass of the test soil or as a mass of the test substance per unit area of the soil.

LC₀ (No lethal concentration) is the concentration of a test substance that does not kill any of exposed test organisms within a given time period. In this test the LC₀ is expressed as a mass of test substance per dry mass of the test soil.

LC₅₀ (Median lethal concentration) is the concentration of a test substance that kills 50% of exposed test organisms within a given time period. In this test the LC₅₀ is expressed as a mass of test substance per dry mass of the test soil or as a mass of test substance per unit area of soil.

LC₁₀₀ (Totally lethal concentration) is the concentration of a test substance kills 100% of exposed test organisms within a given time period. In this test the LC₁₀₀ is expressed as a mass of test substance per dry mass of the test soil.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) is the lowest test substance concentration that has a statistically significant effect ($p < 0.05$). In this test the LOEC is expressed as a mass of test substance per dry mass of the test soil or as a mass of test substance per unit area of soil. All test concentrations above the LOEC should normally show an effect that is statistically different from the control. Any deviations from the above must be justified in the test report.

NOEC (No Observed Effect Concentration) is the highest test substance concentration immediately below the LOEC at which no effect is observed. In this test, the concentration corresponding to the NOEC, has no statistically significant effect ($p < 0.05$) within a given exposure period when compared with the control.

Reproduction rate: Mean number of juvenile worms produced per a number of adults over the test period.