



Efecto ecotoxicológico de un lodo digerido de purín de cerdo sobre la lombriz de tierra (*Eisenia fetida*) y maíz (*Zea mays*)

Raez-Alcocer, B.G.¹ ; Iannacone, J.^{2*} ; Gomero, L.¹

¹Grupo de Investigación Restauración ecológica y calidad ambiental (REC), Laboratorio de Ingeniería Ambiental. Escuela de Ingeniería Ambiental. Universidad Científica del Sur, Panamericana Sur Km 19, Villa, Lima, Perú. ²Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA), Museo de Historia Natural de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Grupo de Investigación de Sostenibilidad Ambiental (GISA), Escuela Universitaria de Posgrado (EUPG), Universidad Nacional Federico Villarreal, Jr. Río Chepén 290, El Agustino, Lima, Perú. ✉ joseiannacone@gmail.com

Resumen

El Lodo Digerido de Purín de Cerdo (LDPC) es un subproducto del tratamiento de residuos orgánicos por digestión anaerobia, implementado en granjas agroindustriales porcinas que, por legislación ambiental, deben ser tratados y dispuestos sin que afecten al ambiente. Se evaluaron los efectos ecotoxicológicos del LDPC en la lombriz de tierra (*Eisenia fetida*) y en el maíz (*Zea mays*) mediante los índices de DL₅₀ (dosis letal media), DI₅₀ (Dosis de inhibición media), NOEC (Concentración de efectos no observables) y LOEC (Concentración más baja de efectos observables) que determinan el nivel de riesgo del empleo del LDPC como abono al suelo. Los valores de la DL₅₀ en lombriz de tierra y DI₅₀ en maíz fueron de 15,50% y 22,60%, respectivamente, mientras que en la prueba de evasión reveló una relación directa con la presencia del LDPC, donde a partir de la dosis de 12,5% es considerada un medio tóxico para las lombrices. El NOEC y LOEC para la lombriz (mortalidad y peso seco), y para el maíz (germinación, inhibición, radícula, número de raíces, coleóptilo, altura, número de hojas, peso húmedo y peso seco) determinaron valores de 15,625% y 18,75%, para las lombrices, y 25% y 50%, para el maíz, respectivamente. Se concluye que el LDPC puede ser empleado como abono orgánico si se emplean dosis que no superen los efectos letales y subletales de las dos especies evaluadas, y que no perjudiquen la calidad funcional y biológica del suelo.

Palabras clave: Efecto toxicológico, DL₅₀, DI₅₀, lodo, LOEC, *Zea mays*.

Ecotoxicological effect of a pig manure digested sludge on earthworm (*Eisenia fetida*) and corn (*Zea mays*)

Abstract. Pig Manure Digested Sludge (LDPC) is a byproduct of the treatment of organic waste by anaerobic digestion, implemented in agro-industrial pig farms that, by environmental legislation, must be treated and disposed of without affecting the environment. The ecotoxicological effects of LDPC on the earthworm (*Eisenia fetida*) and on corn (*Zea mays*) were evaluated using the indices of LD₅₀ (medium lethal dose), ID₅₀ (Medium inhibition dose), NOEC (No observable effects concentration) and LOEC (Lowest Observable Effect Concentration) indices to determine the level of risk of using LDPC as a soil fertilizer. The values of the LD₅₀ in earthworm and DI₅₀ in corn were 15,50% and 22,60%, respectively, while the evasion test revealed a direct relationship with the presence of LDPC, where from the dose 12,5% is considered a toxic environment for worms. The NOEC and LOEC for the earthworm (mortality and dry weight), and for corn (germination, inhibition, radicle, number of roots, coleoptile, height, number of leaves, wet weight and dry weight) determined values of 15,625% and 18,75%, for worms, and 25% and 50%, for corn, respectively. It is concluded that LDPC can be used as an organic fertilizer if doses that do not exceed the lethal and sublethal effects on the two evaluated species are employed, and if it does not harm the functional and biological quality of the soil.

Key words: Toxicological effect, ID₅₀, LD₅₀, LOEC, Sludge.

INTRODUCCIÓN

La carne de cerdo es la de mayor consumo a nivel mundial y su demanda ha experimentado un fuerte incremento en las últimas décadas. La relación del consumo de carne de cerdo es proporcional a la generación de residuos orgánicos en la crianza porcina; China, la Unión Europea y los Estados Unidos son los máximos exponentes en esta producción y consumo, representando al 75% a nivel global (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos [OCDE] 2019). En el Perú, a diferencia de otros países latinoamericanos, el consumo de carne de cerdo se ha incrementado en un 230%, respecto a su producción en la última década (Herrera-Cuenca et al. 2023), y dada la preferencia de esta carne en la alimentación, existe un impacto significativo en el ambiente y la comunidad (Ramírez-Islas et al. 2020).

Los residuos orgánicos de la crianza porcina por su magnitud tienen que ser gestionados adecuadamente, para reducir sus impactos ambientales y aprovechar sus beneficios como abono en la mejora de la fertilidad del suelo. A pesar de estas ventajas, los impactos sobre el medio ambiente y la salud humana aún no están totalmente explorados y la eficacia como abono orgánico y fertilizante es aún objeto de debate (Ramírez-Islas et al. 2020, Chojnacka et al. 2024).

Los residuos de la crianza de porcinos como los purines han mostrado elevados niveles de cobre (Cu) y zinc (Zn) debido al uso de suplementos en la alimentación animal. Sin embargo, a pesar del papel esencial de estos elementos en la nutrición de las plantas, las altas concentraciones de Cu y, en menor grado, de Zn en formas disponibles en el suelo, podría inducir fitotoxicidad en los cultivos (Yen et al. 2024).

Hay varios métodos disponibles para el tratamiento de estos residuos orgánicos biodegradables, siendo la digestión anaerobia el más prometedor al recibir atención en todo el mundo (Chojnacka et al. 2024). Esta tecnología favorece la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero (Duan et al. 2020). La digestión anaerobia produce biogás y un residuo muy húmedo llamado digerido anaerobio que es una mezcla de materia orgánica parcialmente degradada (MO), biomasa microbiana y compuestos inorgánicos. La aplicación directa de lodos a los suelos actualmente se considera un medio barato para su eliminación y para la recuperación de la fertilidad del suelo y sus componentes orgánicos y minerales para los sistemas agrícolas (Duan et al. 2020, Kızılkaya et al. 2021, Chojnacka et al. 2024). Sin embargo, para un adecuado reaprovechamiento, los límites de vertido de los lodos pueden variar según las características del cuerpo receptor de las descargas y, por ende, modificar la regulación del control del vuelco a diferentes destinos (El Peruano 2017a).

La empresa San Fernando S.A. en Lima, Perú, actualmente cuenta con una granja agroindustrial de crianza de porcinos cuyos desechos son tratados en una planta de tratamiento anaerobio (Sistema de Biodigestor Continuo) que produce lodos con potencial riesgo de contaminación por sus contenidos elevados de Cu (1025,50 mg kg⁻¹ de materia seca) y Zn (5394,00 mg kg⁻¹ de materia seca), razón por la cual es necesario determinar su efecto ecotoxicológico y su aporte como abono orgánico (Karimi et al. 2020).

El propósito del presente estudio fue evaluar los efectos ecotoxicológicos de un lodo digerido de purín de cerdo (LDPC) en la lombriz de tierra (*Eisenia fetida*) mediante las pruebas de evasión y mortalidad, y en la germinación de maíz (*Zea mays*) para establecer límites para su aplicación al suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. Los ensayos ecotoxicológicos se realizaron en el Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA) y en el Invernadero de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), El Agustino, Lima, Perú (12°02'28,7"S 76°59'26,1"W).

Lodo Digerido de Purín de Cerdo (LDPC). Para su manejo se empleó el reglamento de manejo de los residuos sólidos del sector agrario peruano (Decreto Supremo N° 016-2012-AG) (El Peruano 2012), y las recomendaciones técnicas para la gestión Ambiental en el Manejo de purines de la explotación Porcina (INIA 2005). Se recolectó en un recipiente una muestra de 10 kg de lodo procedente de la planta de tratamiento por digestión anaerobia de purines de la empresa San Fernando S.A. ubicada en la provincia de Huaral, departamento de Lima, Perú. Se tomó y acondicionó en una bolsa de polietileno sellada 0,6 kg de la muestra para el análisis de caracterización de metales pesados y fisicoquímica (Tabla 1). No fue realizada ninguna caracterización biológica o de contenido de antibióticos.

Tabla 1. Caracterización de Lodo Digerido de Purín de Cerdo (LDPC). LD: Límite de detección.

Parámetros	Metales Pesados (mg kg ⁻¹)	
	LD	Resultados
Aluminio (Al)	0,050	107,7
Cadmio (Cd)	0,020	<0,020
Cobre (Cu)	0,030	77,29
Cromo (Cr)	0,050	<0,050
Hierro (Fe)	1,00	541
Mercurio (Hg)	0,010	<0,010
Níquel (Ni)	0,035	1,876
Plomo (Pb)	0,020	<0,020
Zinc (Zn)	0,050	600,37
	Fisicoquímicos	
	Unidad	Resultados
pH		8,11
Conductividad Eléctrica	dS m ⁻¹	7,69
Humedad	g 100 ⁻¹	92,29
Materia Orgánica	g 100 ⁻¹	64,62

Suelo. Se recolectó una muestra de 65 kg de los primeros 30 cm de suelo (capa arable: capa superior del suelo entre 10-50 cm) de Satipo, Junín, Perú (11°13'16,6"S 74°39'06,1"W). Este suelo fue seleccionado por la escasez de nutrientes y fertilidad, lo que permitiría evidenciar los efectos de la aplicación del LDPC. Según la clasificación

de la IUSS Working Group WRB (2022) son suelos del orden Ultisol y del tipo Typic Paleudults. Se acondicionó en una bolsa de polietileno sellada con 0,8 kg de la muestra

para el análisis de metales pesados, fisicoquímica y textura (Tabla 2).

Tabla 2. Caracterización del suelo de Satipo, Junín, Perú y sus estándares de calidad ambiental de uso agrícola. LD: Límite de detección.

Parámetros	LD	Resultados	Estándares de calidad ambiental de uso agrícola	Estándares de calidad ambiental de uso agrícola
			(El Peruano 2017b)	(Chen et al. 2018)*
Metales Pesados (mg kg⁻¹)				
Aluminio (Al)	0,050	14 387		
Cadmio (Cd)	0,020	<0,020	1,4	10
Cobre (Cu)	0,030	62,27		63
Cromo (Cr)	0,050	63,45	0,4	64
Hierro (Fe)	1,00	50 663		
Mercurio (Hg)	0,010	<0,010	6,6	6,6
Níquel (Ni)	0,035	38,84		50
Plomo (Pb)	0,020	14,22	70	140
Zinc (Zn)	0,050	96,5		200
Fisicoquímicos				
pH		7,29		
Conductividad Eléctrica	dS m ⁻¹	0,038		
Humedad	g 100 ⁻¹	1,44		
Materia Orgánica	g 100 ⁻¹	3,88		
Textural				
Arena	g 100 ⁻¹	64		
Limo	g 100 ⁻¹	24		
Arcilla	g 100 ⁻¹	12		

* Norma canadiense.

Lombriz de tierra. La lombriz de tierra *E. fetida* se obtuvo del fundo agroecológico HECOSAN localizado en Centro Poblado de Macas, km. 41 de la carretera Lima – Canta, Perú (International Organization for Standardization [ISO] 2012a). Las lombrices de tierra fueron acondicionadas en cajas de madera de 74 cm x 72 cm x 79 cm, las cuales estuvieron revestidas con una doble malla de polietileno para mantener la humedad del medio, juntamente con el alimento que contenía el lecho de crianza de las lombrices. Posteriormente, se seleccionaron 320 lombrices de tierra que cumplieron los requisitos para la realización de las pruebas de mortalidad y evasión, con presencia de clítelos, con un peso de 0,3 a 0,6 g, y con un largo de 6 a 8 (± 1) cm, según protocolos estandarizados (OCDE 1984). Previo a la realización de las pruebas ecotoxicológicas, se vaciaron los intestinos de las lombrices, y finalmente, las lombrices fueron lavadas con agua destilada, secadas y pesadas.

La prueba de mortalidad o aguda, peso húmedo y peso seco con lombrices de tierra se realizó a 14 días de exposición, según los criterios estandarizados para lombrices de tierra (OCDE 1984), a través de la dosis letal media (DL₅₀) (%). El suelo previamente fue secado al aire, tamizado a 4 mm, y humedecido a 45-50% de la capacidad de retención de agua. En el ensayo se emplearon 24 recipientes plásticos rectangulares (12 x 15 x 7 cm) y se colocó la cantidad de suelo humedecido y LDPC según lo señalados en la Tabla 3. No se adicionó alimento durante la duración del bioensayo. Las dosis finales son resultado de pruebas preliminares con tratamientos con dosis de

lodo al 25%, 50% y 100%, las que ocasionaron 100% de mortalidad.

Tabla 3. Porcentaje de para las pruebas de mortalidad con Lodo Digerido de Purín de Cerdo en *Eisenia fetida*.

Tratamientos	Porcentaje	(%)	g
Control	Suelo	100	400
	LDPC	0	0
6,25	Suelo	93,75	375
	LDPC	6,25	25
12,50	Suelo	87,50	350
	LDPC	12,50	50
15,63	Suelo	84,38	337,5
	LDPC	15,63	62,5
18,75	Suelo	81,25	325
	LDPC	18,75	75
21,88	Suelo	78,13	312,5
	LDPC	21,88	87,5

Antes de incorporar las lombrices a cada tratamiento, se pesaron grupos de 10 lombrices para cada una de las cuatro repeticiones y por tratamiento, para dar seguimiento de la ganancia o pérdida de peso a los 7 y 14 días de exposición. Los recipientes se mantuvieron a una temperatura de 20 ± 2°C con luz continua. Trascurridos los primeros 7 días, se evaluó el peso húmedo de las lombrices de tierra vivas y se retiraron las lombrices muertas. La mortalidad se

determinó cuando las lombrices de tierra no respondían a los estímulos del tacto. Pasados los 14 días, las lombrices de tierra fueron nuevamente removidas de cada recipiente para determinar el número de organismos vivos y muertos. Por último, en los individuos sobrevivientes se registró el peso húmedo y el peso seco según el procedimiento indicado por OCDE (1984).

La prueba de evasión de Lombrices de tierra se basó en el comportamiento de repelencia de *E. fetida* al suelo contaminado (Elias-Estremadoyro y Iannacone 2022). El suelo para este bioensayo estuvo bajo las mismas condiciones que la prueba de mortalidad. Para este bioensayo se emplearon ocho recipientes plásticos rectangulares de las mismas dimensiones que la prueba de mortalidad, se realizaron dos tratamientos con cuatro repeticiones. Éstos fueron divididos en dos secciones utilizando un separador plástico, seguidamente se colocó el suelo humedecido a razón de 200 g en una sección y 200 g del lodo a la dosis resultante de la prueba de mortalidad en la otra, es decir, esta prueba se realizó después de determinar la DL_{50} , debido a que a dosis más elevadas no brindarían datos relevantes para evaluar la evasión, siendo los valores a las dosis de 6,25% y 12,5%. Luego, cada separador plástico fue removido y se colocaron 10 lombrices adultas con clitelo en la línea divisor central de la superficie de los suelos, permitiendo que se incorporen al suelo. Los recipientes fueron cubiertos por la tapa del recipiente plástico perforada para favorecer la aireación y evitar la pérdida de humedad. Finalmente, se realizó lectura a los 3 días de exposición, la separación plástica fue reinsertada en el suelo y se contabilizó la cantidad de lombrices presentes en cada sección. Los organismos encontrados en la línea de la separación fueron considerados como 0,5 individuos.

La evasión se determinó aplicando la siguiente fórmula (Elias-Estremadoyro y Iannacone 2022):

$$E = \left(\frac{C - P}{L} \right) \times 100$$

Donde:

E = Evasión (%)

C = Número de lombrices en el control

P = Número de lombrices en el suelo problema

L = Número total de lombrices expuestas

Siendo un porcentaje positivo un indicador de evasión del suelo contaminado, un cero significa que no existe evasión, y un porcentaje negativo indica una atracción o afinidad por el contaminante tratado (Elias-Estremadoyro y Iannacone 2022).

Maíz. En la prueba de germinación se utilizaron las semillas certificadas del maíz híbrido Dekalb (*Z. mays*), obtenidas a razón de 1 kg y proveídas por la empresa de San Fernando S.A. Las semillas seleccionadas del mismo tamaño fueron acondicionadas y desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 15 min, y luego se lavaron con agua destilada.

La germinación del Maíz se realizó bajo los lineamientos establecidos estandarizados (ISO 2012b). Para el índice de germinación se prepararon macetas plásticas de 16 cm de alto por 18,7 cm de diámetro, con mezcla de suelo humedecido y lodo, cantidad base por maceta de 2 kg,

bajo un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA). Se realizaron 7 tratamientos con 4 repeticiones por tratamiento, empleándose en cada maceta 7 semillas, descartándose, por propósitos de evaluación, 1 semilla por repetición en cada lectura, quedando finalmente 3 semillas sobrantes, puesto que según la densidad máxima de la planta y dependiendo del tamaño de la semilla, se estima el número de semillas a emplear, siendo un aproximado de 3 a 10 semillas por 100 cm² (Tabla 4).

Tabla 4. Tratamientos para la prueba de germinación con Lodo Digerido de Purín de Cerdo en *Zea mays*.

Tratamientos	Porcentaje	(%)	g
Control	Suelo	100	2000
	Lodo	0	0
1,56	Suelo	98,44	1968,75
	Lodo	1,56	31,25
3,12	Suelo	96,88	1937,5
	Lodo	3,12	62,5
6,25	Suelo	93,75	1875
	Lodo	6,25	125
12,50	Suelo	87,50	1750
	Lodo	12,50	250
25	Suelo	75,00	1500
	Lodo	25,00	500
50	Suelo	50,00	1000
	Lodo	50,00	1000

El tiempo de evaluación fue de 21 días de exposición y se midió los siguientes ocho efectos subletales: inhibición del crecimiento, crecimiento de raíces, número de raíces, tamaño del coleóptilo, altura, número de hojas, peso húmedo y peso seco del maíz (secado a 60 °C). Por último, con los valores obtenidos, se determinó el índice de germinación utilizando la fórmula siguiente (Kominko et al. 2022):

$$GRS(\%) = \frac{\text{Número de semillas germinadas con la muestra de LDPC}}{\text{Número de semillas germinadas en el control}} \times 100$$

$$CRR(\%) = \frac{\text{Longitud promedio de la radícula con la muestra de LDPC}}{\text{Longitud promedio de la radícula en el control}} \times 100$$

$$IG(\%) = \frac{GRS \times CRR}{100}$$

Donde:

GRS = Germinación relativa de semillas

CRR = Crecimiento relativo de la radícula

IG = Índice de germinación

Tratamiento Estadístico. Los datos obtenidos de los bioensayos con lombrices de tierra y semillas de maíz fueron procesados estadísticamente mediante la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) y de homogeneidad de las varianzas (Levene). Según los resultados, las medias entre grupos fueron comparadas por análisis de varianza de una vía (ANOVA), o por una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis). Seguidamente, se realizó la comparación múltiple entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey. Los índices ecotoxicológicos fueron DL_{50} , DI_{50} , NOEC (Concentración más alta en el bioensayo que no causa un efecto estadísticamente significativo), y LOEC

(Concentración más baja de en el bioensayo que causa un efecto estadísticamente significativo), fueron determinados mediante estos análisis en el paquete estadístico SPSS versión 25,0, y por el método Probit en una calculadora en Excel. En el experimento de evasión de lombrices, para el análisis estadístico de los resultados se usó la prueba Chi-cuadrado (χ^2) para verificar si existe una dependencia entre la evasión y la presencia del contaminante en el lodo.

RESULTADOS

Lombriz de tierra. El efecto en la mortalidad a 14 días, peso húmedo a 7 y a 14 días, y finalmente peso seco a 14 días de exposición de *E. fetida* expuestos al LDPC se observa en la Tabla 5 y Figura 1. El valor de NOEC fue de 15,625% de LDPC en la mortalidad a 14 días, en el peso húmedo a 7 y 14 días, y en el peso seco a 14 días de exposición. La DL₅₀ fue 15,50% con límites de confianza inferior y superior de 13,13% y 18,28%, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto ecotoxicológico del Lodo Digerido de Purín de Cerdo en la mortalidad y en las respuestas subletales de *Eisenia fetida* a 14 días de exposición.

Tratamientos	Mortalidad ^{a,*} (%)	Promedio + Desviación estándar de los pesos			
		-----Peso Húmedo (g)-----			Peso Seco (g)
		Día 0 ^a	Día 7 ^b	Día 14 ^a	Día 14 ^a
Control	0a	4,60 ± 0,18 ^a	4,06 ± 0,19 ^b	3,20 ± 0,26 ^{ab}	0,62 ± 0,44 ^{ab}
6,25	2,56 ^a	3,36 ± 0,02 ^b	3,49 ± 0,2 ^{1c}	3,08 ± 0,21 ^{ab}	0,58 ± 0,12 ^{ab}
12,5	15,38 ^a	3,50 ± 0,08 ^b	2,64 ± 0,44 ^c	2,49 ± 0,40 ^{ab}	0,47 ± 0,10 ^b
15,625	15,38 ^a	5,05 ± 0,16 ^a	4,92 ± 0,40 ^a	3,91 ± 0,59 ^a	0,80 ± 0,11 ^a
18,75	97,44 ^b	4,93 ± 0,15 ^a	0,61 ± 0,35 ^d	0,77 ± 0,79 ^{bc}	0,01 ± 0,01 ^c
21,875	100 ^b	4,75 ± 0,15 ^a	0 ± 0 ^d	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^c
DL ₅₀	15,50	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
DL _{50-inferior}	13,13	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
DL _{50-superior}	18,28	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
NOEC	15,625	N.A.	N.A.	N.A.	15,625
LOEC	18,75	N.A.	N.A.	N.A.	18,75
Sig. (S-W)	0,000	0,008	0,024	0,017	0,007
Sig. (Levene)	0,018	0,087	0,053	0,025	0,010

NA: No Aplica. DL₅₀: Dosis Letal al que el 50% de los individuos expuestos mueren. DL_{50-inferior}: Límite inferior de la DL₅₀. DL_{50-superior}: Límite superior de la DL₅₀. NOEC: Concentración de efectos no observables. LOEC: Concentración más baja de efectos observables. a. Pruebas de Normalidad y Homogeneidad mediante Shapiro-Wilk (S-W) y Levene, respectivamente. Significancia (Sig.) p<0,05; Kruskal-Wallis. b. Pruebas de Normalidad y Homogeneidad mediante Shapiro-Wilk (S-W) y Levene, respectivamente. Significancia (Sig.) p>0,05; ANOVA. Letras minúsculas pequeñas iguales en una misma columna señalan promedios estadísticamente iguales a un p<0,05. * Valores de mortalidad fueron corregidos con la fórmula de Schneider-Orelli.

El porcentaje de evasión a 6,25% fue presentó un valor negativo de -25%; sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas según la prueba de χ^2 en la evasión entre el suelo control y el suelo con LDPC, lo que señala ausencia de evasión según valor de E (Tabla 6). En cambio, a 12,5% de LDPC se notó diferencias significativas en el porcentaje de evasión del suelo de

+90%, el cual, al presentar un valor positivo, y significativo según el χ^2 , lo que muestra una evasión o repelencia al suelo con LDPC en un 90% (Tabla 6). No se encontraron diferencias significativas en la superposición de sus valores de desviación estándar (DE) entre el peso húmedo inicial y final de *E. fetida* para el LDPC al 6,25% y 12,5%.

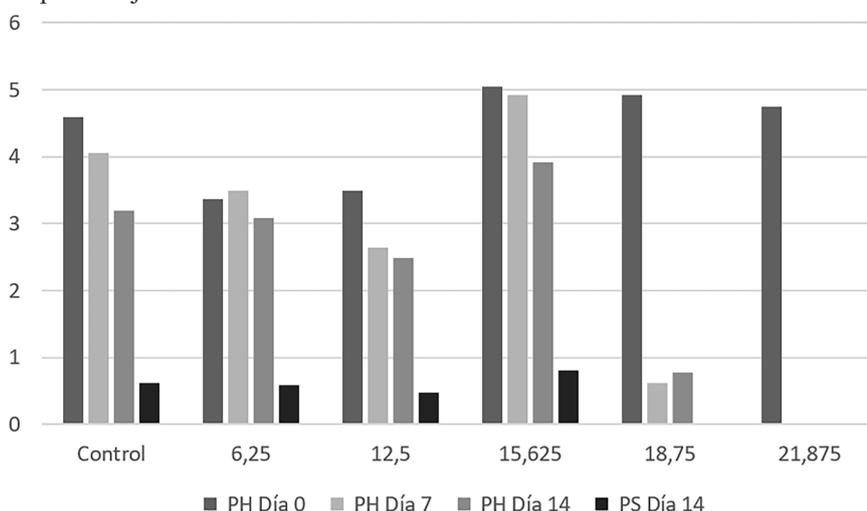


Figura 1. El efecto en el peso húmedo (PH) (g) a 0, 7 y 14 días, y peso seco (PS) (g) a 14 días de exposición de *Eisenia fetida* expuestos al Lodo Digerido de Purín de Cerdo.

Tabla 6. Resultados de la prueba de evasión al Lodo Digerido de Purín de Cerdo (LDPC) de la lombriz de tierra (*Eisenia fetida*).

Prueba de evasión		LDPC (%)	
		6,25	12,5
Suelo control	Recuento	15	38
	% dentro de la dosis	37,5	95,0
Suelo con LDPC	Recuento	25	2
	% dentro de la dosis	62,5	5,0
	Evasión (E) (%)	-25	+90
	χ^2	3,74	20,31
	p	0,053	<0,001
	Peso húmedo inicial promedio de las lombrices \pm DE (g)	3,34 \pm 0,27	3,96 \pm 0,47
Peso húmedo final promedio de las lombrices \pm DE (g)	2,77 \pm 0,71	4,21 \pm 0,11	

χ^2 : Chi Cuadrado. p: Significancia.

Maíz. Se muestran los resultados de los Porcentajes Digerido de Purín de Cerdo (Tabla 7). Las dosis de 25% y de germinación, germinación relativa de semillas, 50% mostraron valores menores de germinación y GRS. De crecimiento relativo de la radícula, e índice de germinación igual maneras las dosis de 3,125, 25% y 50% evidenciaron del maíz a 21 días de exposición por tratamientos con Lodo efectos en la CRR y IG (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de germinación, germinación relativa de semillas, crecimiento relativo de la radícula, e índice de germinación del maíz (*Zea mays*) por tratamientos con Lodo Digerido de Purín de Cerdo.

Tratamiento	Germinación			
	(Día 21) (%)	GRS (%)	CRR (%)	IG (%)
Control	95,83			
1,5625	91,67	95,65	139,43	133,37
3,125	91,67	95,65	68,29	65,32
6,25	95,83	100	108,54	108,54
12,5	95,83	100	95,12	95,12
25	79,17	82,61	91,06	75,23
50	0	0	0	0

GRS = Germinación relativa de semillas; CRR = Crecimiento relativo de la radícula; IG = Índice de germinación.

La dosis de 50% fue estadísticamente significativa húmedo y peso seco del maíz (Tabla 8). El valor de DI_{50} con el control para las ocho variables evaluadas: inhibición fue 22,60%, con límites inferior y superior de 14,18% y del crecimiento, crecimiento de raíces, número de raíces, 36,00%, respectivamente. Finalmente, el valor de NOEC tamaño del coleóptilo, altura, número de hojas, peso fue de 25% para estas ocho variables del maíz.

Tabla 8. Efecto ecotoxicológico del LDPC en la germinación y crecimiento con Lodo Digerido de Purín de Cerdo en *Zea mays* a 21 días de exposición.

Tratamientos	Inhibición ^a (%)	Radícula ^c (cm)	Nº de raíces ^a	Coleóptilo ^c (cm)	Altura ^b (cm)	Nº de Hojas ^a	Peso húmedo ^a (g)	Peso seco ^c (g)
Control	4,17a	6,15 \pm 0,8ab	5,75 \pm 1,5a	2,43 \pm 0,4b	6,55 \pm 0,8ab	2 \pm 0bc	0,683 \pm 0,1b	0,262 \pm 0,01b
1,5625	8,33a	8,58 \pm 1,8a	6 \pm 0,8a	2,23 \pm 0,3b	7,18 \pm 0,8ab	3 \pm 0a	0,909 \pm 0,2ab	0,397 \pm 0,04a
3,125	8,33a	4,2 \pm 1,3b	5,5 \pm 1,3a	2,28 \pm 0,8b	6,3 \pm 1,5ab	2 \pm 0bc	0,854 \pm 0,1ab	0,326 \pm 0,06ab
6,25	4,17a	6,68 \pm 1,3ab	4 \pm 0a	1,78 \pm 0,3b	5,58 \pm 1,2b	2,3 \pm 0,5abc	0,895 \pm 0,2ab	0,351 \pm 0,03ab
12,5	4,17a	5,85 \pm 0,6ab	5,5 \pm 1,7a	4,03 \pm 0,6a	8,68 \pm 0,8a	2,8 \pm 0,5ab	1,261 \pm 0,2a	0,391 \pm 0,05a
25	20,83a	5,6 \pm 2,3ab	5,5 \pm 0,6a	2,53 \pm 0,6b	5,08 \pm 1,8b	1,8 \pm 0,5c	1,131 \pm 0,4a	0,391 \pm 0,07a
50	100,00b	0 \pm 0c	0 \pm 0b	0 \pm 0c	0 \pm 0c	0 \pm 0d	0 \pm 0c	0 \pm 0c
CI_{50}	22,60	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
DI_{50} -inferior	14,18	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
DI_{50} -superior	36,00	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
NOEC (%)	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00
LOEC (%)	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Sig. (S-W)	0,000	0,052	0,001	0,057	0,002	0,000	0,020	0,000
Sig. (Levene)	0,023	0,001	0,015	0,026	0,131	0,001	0,041	0,016

N.A.: No Aplica. DI_{50} : Dosis Inhibitoria al que el 50% de las semillas expuestas no germinan. DI_{50} -inferior: Límite inferior de la DI_{50} . DI_{50} -superior: Límite superior de la DI_{50} . NOEC: Concentración de efectos no observables. LOEC: Concentración más

baja de efectos observables. Procesado estadísticamente. a. Pruebas de Normalidad y Homogeneidad mediante Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Significancia (Sig.) $p < 0,05$; Kruskal-Wallis. b. Pruebas de Normalidad y Homogeneidad mediante Shapiro-Wilk (S-W) y Levene, respectivamente. Significancia (Sig.) $p > 0,05$; ANOVA, comparación entre tratamiento mediante prueba de Tukey. c. Pruebas de Normalidad y Homogeneidad mediante Shapiro-Wilk (S-W) y Levene, respectivamente. Significancia (Sig.) $p > 0,05$; ANOVA, comparación entre tratamiento mediante prueba de Dunnett.

DISCUSIÓN

Lombriz de tierra. Se observaron diferencias significativas en comparación al control en las pruebas de mortalidad de las lombrices a las concentraciones máximas del LDPC que fueron al 50% y 100%. Estos resultados concuerdan con Kaushik y Garg (2003), quienes obtuvieron resultados similares de alta mortalidad a más del 70% de contenido del lodo empleado en sus experimentos; así como la mortalidad de las lombrices en su composición fresca del lodo. La alta mortalidad al 50% y 100% puede deberse a la naturaleza y deficiencia de oxígeno disponible, y al alto contenido de amonio del lodo. De igual forma podrían presentarse algunos en el LDPC la presencia de residuos farmacéuticos veterinarios contaminantes como antibióticos de varias familias (β -lactámicos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, sulfonamidas, macrólidos, entre otros), antiparasitarios, analgésicos y hormonas, entre otros, que podrían provocar mortalidad en la lombriz de tierra (Argüeso-Mata et al. 2021). Zaman et al. (2023) trabajaron con concentraciones relativas de vermicompostaje de lodos textiles enriquecidos con estiércol de vaca en una proporción de masa seca de 2:3 con *E. fetida*, no encontrándose mortalidad durante el proceso de compostaje, y observándose una alta tasa de producción de cocones (~4 cocones de lombriz⁻¹). Sin embargo, el hacinamiento afectó la producción de juveniles de lombrices de tierra⁻¹, lo que resultó en una disminución. También se retrasó el crecimiento de la lombriz adulta, que varió de 0,44 a 0,35 g de lombriz⁻¹ con el aumento de la densidad de población debido a la alta competencia por los alimentos. Por otro lado, al aplicar lodos digeridos en una planta de tratamiento de aguas residuales sobre la supervivencia y reproducción de la *E. fetida*, se observó un incremento de la concentración del lodo tóxico, atribuyéndolo a las altas concentraciones de Zn en el lodo digerido (Fatima y Singh 2023).

El valor de la DL₅₀ de la exposición de las lombrices al LDPC fue de 15,50%, el cual es similar a otros trabajos donde se determinó la DL₅₀ para distintos lodos, como de origen textil (Kaushik y Garg 2003), municipales (Babić et al. 2016), y otros con diferentes enfoques de estudio (Roques et al. 2023). En algunos ejemplares de *E. fetida*, donde se evidenció la mortalidad, se observaron efectos subletales (12,5%, 15,625% y 18,85%) como degeneración, protuberancias en el clitelo, cortes segmentados, hinchazón y pérdida de fluido celomático. Se han encontrado daños similares cuando expuso a *E. fetida* por 48 h de exposición en lodos de depuración (Babić et al. 2016). Estos efectos conllevan a una descomposición rápida por acción de los contaminantes. Los resultados sugieren que estos daños son el resultado del estrés ocasionado por el contacto de las lombrices al contaminante o compuesto orgánico dañino, debido a que genera un estrés del tipo oxidativo que libera enzimas como la catalasa o el superóxido dismutasa para su protección (Wu et al. 2020).

Roques et al. (2023) afirman que a medida que varía la concentración en el suelo de algún elemento potencialmente tóxico, éste afecta el metabolismo de las lombrices, como es el caso de los metales presentes en los diversos tratamientos del LDPC. A 15,625% de LDPC se evidenció una ganancia de peso húmedo a los 7 días en las lombrices de tierra en comparación con el control, esto podría deberse a que el LDPC podría ser una fuente potencial de alimentación para las lombrices. Algunas investigaciones, han evaluado el crecimiento y reproducción de *E. fetida*, afirmando que los lodos, pueden ser utilizados para enriquecer de nutrientes al suelo debido al alto contenido de materia orgánica (Roques et al. 2023).

Respecto al peso seco, no hubo diferencias significativas con los tratamientos más bajos hasta 15,625% de LDPC. Los resultados son concordantes con França et al. (2021), quienes expusieron a *E. fetida* a lodos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales en ensayos de ecotoxicología indicaron valores satisfactorios y no tóxicos de mortalidad, ganancia de masa, supervivencia, lo que revela un potencial positivo para el uso de lodos en la agricultura.

En la composición del LDPC, los elementos más elevados fueron el Cu y el Zn, los cuales son micronutrientes esenciales para el desarrollo de las lombrices, aunque ambos elementos potencialmente tóxicos no superaron los estándares de calidad ambiental de uso agrícola; sin embargo, a las concentraciones de 18,75% de LDPC en adelante evidenciaron a ser tóxicas para las lombrices; por ello la variabilidad de los efectos en cada uno de los tratamientos. El Zn cumple un rol esencial en el metabolismo, desarrollo, crecimiento y regeneración de algunos tejidos de la lombriz, y el Cu permite el transporte de sustancias entre células y tejidos (Messias et al. 2023). Dentro de este marco, se sugiere que las lombrices poseen un mecanismo de almacenamiento de estos micronutrientes para demandas fisiológicas requeridas en un momento dado (Baskar et al. 2023).

En la prueba de evasión con la lombriz de tierra, se determinó una evasión $\geq 80\%$ (+90%) en la concentración de 12,5% de LDPC, el cual es definido como el valor umbral que indica la función limitada del hábitat (Ulloa et al. 2018), esto podría deberse a que al incrementarse la concentración del LDPC, hay una mayor cantidad de elementos potencialmente tóxicos a altas concentraciones, como Cu y Zn, y, por ende, surge una disminución en el número de lombrices (Messias et al. 2023). Esto se evidencia por Kaushik y Garg (2003), quienes demuestran que en la composición de los lodos de diferentes naturalezas predominan los metales pesados, donde el Cu y Zn son los más elevados como el caso del LDPC. Se determinó, respecto al inicio y término de la prueba de evasión, una pérdida de peso húmedo en la concentración más baja de 6,25% de LDPC, y una ganancia de peso en la concentración más alta de 12,5% de LDPC, el cual demuestra el valor

nutricional del lodo. Kızılkaya et al. (2021) observaron que se produce una atracción de las lombrices a una mayor carga de materia orgánica, como es el caso de mayor concentración de LDPC, por lo que, en ausencia de efectos de evasión o repulsión hacia el contaminante, favorece el movimiento de las lombrices a los suelos contaminados. En ese mismo contexto, Vivas et al. (2022) destacaron la influencia de la materia orgánica como factor relevante en la respuesta de evasión aseverando que su alto contenido no excluye la aparición de efectos tóxicos a nivel crónico.

Maíz. El porcentaje de germinación en el maíz entre los tratamientos poseen efectos a las dosis de 25% y 50%. Esto podría deberse a que las altas concentraciones de sustancias orgánicas, como la materia orgánica, y metales pesados inhiben la germinación, siendo fitotóxicas para el crecimiento de las plántulas y, a concentraciones más altas, la inhibición es más pronunciada (Hafeez et al. 2023). Asimismo, Shen et al. (2024) afirman que cuando el lodo se incorpora recientemente al suelo, se espera una intensa actividad microbiana que conduzca a tensiones de oxígeno reducidas, acondicionando la formación de inhibidores volátiles. Del mismo modo, la presencia de metales pesados puede ser beneficiosos por ser elementales, pero en altas concentraciones inhiben la germinación, como también el crecimiento y desarrollo de las plantas (Hafeez et al. 2023). Se ha destacado el beneficio de emplear lodos digeridos anaeróticamente (Kızılkaya et al. 2021). En el 50%, además de no producirse la germinación de ningún ejemplar, se observó necrosis, lo cual puede deberse a una pudrición de las semillas por el exceso de humedad presente en el LDPC. El lodo de petróleo disminuye el crecimiento de la plántula e inhibe la germinación de las semillas de *Vigna unguiculata* (Sangeetha y Thangadurai 2014).

El IG es considerado como una medida del nivel de fitotoxicidad de la germinación de semillas y es considerado fitotóxico cuando el IG resulta menos del 80%, siendo los tratamientos 3,125% y 25%, los que presentaron valores por debajo del umbral indicado, lo que supone que el LDPC estimula la germinación en su concentración mínima y tendiendo a disminuir su potencial germinativo al incrementar las concentraciones. Kominko et al. (2022) a la concentración de 7,5% de un lodo proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales domésticas, observó que el índice de germinación del berro (*Lepidium sativum*), sorgo (*Sorghum saccharatum*) y mostaza (*Sinapis alba*) estuvo en el rango de 50 a 92% dependiendo del tipo y dosis de fertilizante y de la planta analizada, lo que correspondió a una toxicidad de moderada a nula.

Los factores vegetativos subletales, en ninguno de los tratamientos hasta el 25% del LDPC se observaron diferencias significativas, exceptuando al 50%; sin embargo, este último tratamiento representa la inhibición completa de la semilla. Por otra parte, Tóth et al. (2024) señalan que algunos factores vegetativos subletales, como el número de hojas, no llegan a ser buenos índices para la medición de la productividad potencial de la planta. Pese a que en la presente investigación no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos referente al crecimiento de la radícula a excepción del 50% del LDPC; sin embargo, autores como Jiang et al. (2023) señalaron que

la inhibición del crecimiento radicular es un indicador de toxicidad sensible que puede proveer mayor información de la fitotoxicidad en las plantas.

CONCLUSIONES

Los resultados de las pruebas ecotoxicológicas con lombrices de tierra (*E. fetida*) evidencian que la concentración letal media (DL₅₀) es de 15,50% de LDPC. Asimismo, la prueba subletal de evasión corrobora que a la concentración de 12,5% se vuelve en un medio tóxico no habitable para la lombriz. Los resultados de la prueba de germinación con maíz (*Z. mays*) demostraron que la dosis inhibitoria media (DI₅₀) es de 22,60%, reafirmando que a medida que el LDPC aumenta, la inhibición de la germinación y otros factores vegetativos observables son más pronunciadas. Los efectos subletales determinados entre tratamientos con base al LOEC y al NOEC, demostraron que se observan efectos tóxicos a partir de las concentraciones de 18,75% y 50% para la lombriz y el maíz, respectivamente, por lo que se establece estos valores como el umbral estimado de la concentración máxima a la que puede ser empleado el LDPC en la agricultura, para no atentar con la actividad funcional y biológica de los organismos del suelo al usar la lombriz de tierra y el maíz. Sin embargo, queda por analizar si los efectos observados en las concentraciones más altas de LDPC pudieran deberse a los metales pesados analizados o a otros contaminantes no evaluados como residuos de naturaleza veterinaria.

ORCID

Raez-Alcocer, B.G.  <https://orcid.org/0009-0000-2582-0126>

Iannacone, J.  <https://orcid.org/0000-0003-3699-4732>

Gomero, L.  <https://orcid.org/0000-0002-4739-2094>

REFERENCIAS

- Argüeso-Mata M, Bolado S, Jiménez JJ, López-Serna R. Determination of antibiotics and other veterinary drugs in the solid phase of pig manure. *Chemosphere.* 2021; 275: 130039.
- Babić S, Barišić J, Malev O, Klobučar G, Popović N, Strunjak-Perović I., . . . Klobučar R. Sewage sludge toxicity assessment using earthworm *Eisenia fetida*: can biochemical and histopathological analysis provide fast and accurate insight? *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2016; 23: 12150-12163.
- Baskar P, Kushal S, Bal Veer S, Saikanth DRK, Harish RKM, Rakhi G, Omkar S. Earthworm castings in ecosystem health through their elemental composition. *Int. J. Plant Sci.* 2023; 35: 2076-2087.
- Chen SB, Wang M, Li SS, Zhao ZQ, E WD. Overview on current criteria for heavy metals and its hint for the revision of soil environmental quality standards in China. *J. Integr. Agric.* 2018; 17: 765-774.
- Chojnacka K, Mikula K, Skrzypczak D, Izydorczyk G, Gorazda K, Kulczycka J, Kominko H, Moustakas

- K, Witek-Krowiak A. Practical aspects of biowastes conversion to fertilizers. *Biomass Conv. Bioref.* 2024; 14: 1515–1533.
6. Duan N, Khoshnevisan B, Lin C, Liu Z, Liu H. Life cycle assessment of anaerobic digestion of pig manure coupled with different digestate treatment technologies. *Environ. Int.* 2020; 137: 105522.
 7. El Peruano. Aprueban Reglamento de Manejo de los Residuos Sólidos del Sector Agrario. Decreto Supremo N° 016-2012-AG. 2012. pp. 478535- 478544.
 8. El Peruano. Decreto Supremo que aprueba el Reglamento para el Reaprovechamiento de los Lodos generados en las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales. Decreto Supremo N° 015-2017-VIVIENDA. 2017a. pp. 32-40.
 9. El Peruano. Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo. Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM. 2017b. pp. 12-15.
 10. Elias-Estremadoyro D, Iannacone J. Ecotoxicological impact of three pesticides on *Eisenia fetida* (californian red worm) on *Allium cepa* (onion) crop in the district of Lurín, Lima, Peru. *Granja* 2022; 35: 112-123.
 11. Fatima N, Singh K. Accumulation of heavy metals in soil: sources, toxicity, health impacts, and remediation by earthworms. *Eur. J. Biol. Res.* 2023; 3: 129-143
 12. França M, Emmerich M, Novais de Oliveira TM, Franczack P, Oliveira Maia BG. Toxicity study of the sanitary wastewater treatment plant sludge aiming its reuse in agriculture. *Wat. Air and Soil Poll.* 2021; 232: 241.
 13. Hafeez A, Rasheed R, Ashraf MA, Qureshi FF, Hussain I, Iqbal M. Chapter 8 - Effect of heavy metals on growth, physiological and biochemical responses of plants. In: Husen A, editor. *Plants and Their Interaction to Environmental Pollution. Damage Detection, Adaptation, Tolerance, Physiological and Molecular Responses.* Elsevier; 2023. p. 139-159.
 14. Herrera-Cuenca, M., Yépez-García, MC, Cortés-Sanabria, LY, Hernández P, Sifontes Y, Ramírez G, Vásquez M, Gómez G, Liria-Domínguez MR, Rigotti A, Fisberg M, Kovaslkys I, Landaeta-Jiménez M. Contribution of proteins to the Latin American diet: results of the ELANS study. *Nutrients* 2023; 15, 669.
 15. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Recomendaciones Técnicas para la Gestión Ambiental en el Manejo de Purines de la Explotación Porcina. INIA. Santiago de Chile. 2005.
 16. International Organization for Standardization [ISO]. ISO 11268-1:2012. Soil quality — Effects of pollutants on earthworms — Part 1: Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. Int. Organ. Stand. 2012a.
 17. International Organization for Standardization [ISO]. ISO 11269-1:2012 Soil quality — Determination of the effects of pollutants on soil flora — Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth. Int. Organ. Stand. 2012b.
 18. IUSS Working Group WRB. World Reference Base for Soil Resources. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. 4th edition. International Union of Soil Sciences (IUSS), Vienna, Austria. 2022.
 19. Jiang Y, Wei C, Jiao Q, Li G, Alyemeni MN, Ahmad P, Shah T, Fahad S, JZhang J, Zhao Y, Liu F, Liu S, Liu H. Interactive effect of silicon and zinc on cadmium toxicity alleviation in wheat plants. *J. Hazard. Mater.* 2023; 458: 131933.
 20. Karimi F, Rahimi G, Kolahchi Z. Interaction effects of salinity, sewage sludge, and earthworms on the fractionations of Zn and Cu, and the metals uptake by the earthworms in a Zn- and Cu-contaminated calcareous soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020; 27: 10565–10580.
 21. Kaushik P, Garg VK. Vermicomposting of mixed solid textile mill sludge and cow dung with the epigeic earthworm *Eisenia foetida*. *Bioresour. Technol.* 2003; 90: 311-316.
 22. Kızılkaya R, Yertayeva, Z, Kaldybayev S, Murzabayev B, Zhapparova A, Nurseitov Z. Vermicomposting of anaerobically digested sewage sludge with hazelnut husk and cow manure by earthworm *Eisenia foetida*. *Eurasian J. Soil Sci.* 2021; 10: 38-50.
 23. Kominko H, Gorazda K, Wzorek Z. Effect of sewage sludge-based fertilizers on biomass growth and heavy metal accumulation in plants. *J. Environ. Manage.* 2022; 305: 114417. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114417>
 24. Messias TG, Alves PRL, Cardoso ELBN. Are the Brazilian prevention values for copper and zinc in soils suitable for protecting earthworms against metal toxicity? *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2023; 30: 40641–40653.
 25. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos [OCDE]. Test No. 207: Guideline for testing of chemicals No 207, Earthworm, acute toxicity tests, París: OCDE Publishing. 1984.
 26. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos [OCDE]. Exámenes de mercado en México: Estudio de caso del mercado de la carne de cerdo. México; 2019.
 27. Ramírez-Islas ME, Güereca LP, Sosa-Rodríguez FS, Cobos-Peralta MA. Environmental assessment of energy production from anaerobic digestion of pig manure at medium-scale using life cycle assessment. *Waste Manage.* 2020; 102: 85–96.
 28. Roques O, Bayard R, Le Maux J, Patureau D, Néliou S, Lamy I, Bedell JP. Assessing the chronic toxicity of spreading organic amendments on agricultural soil: Tests on earthworms and plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2023; 265, 115504.
 29. Sangeetha J, Thangadurai D. Effect of biologically treated petroleum sludge on seed germination and seedling growth of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2014; 57: 427-433.
 30. Shen H, Zhou C, Xu S, Huang Y, Shi J, Liu G, Wu L, Dou C. Study on the solidification performance and mechanism of heavy metals by sludge/biomass ash ceramicsites, biochar and biomass ash. *Environ. Geochem. Health* 2024; 46: 78.
 31. Tóth C, Simon L, Tóth B. Microanatomical changes in the leaves of *Arundo donax* (L.) caused by potentially toxic elements from municipal Sewage Sediment. *Plants.* 2024; 13: 740.

32. Ulloa M, Bustos V, Neaman A, Gaete H. Comportamiento de evasión y reproducción de la lombriz *Eisenia foetida* en suelos agrícolas impactados por actividades mineras. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 2018; 34: 35-43.
33. Vivas F, Balladares S, Lobos MG, Gaete H. assessment toxicity of soils from areas with mining activity through the stability of the lysosomal membrane and avoidance behavior in the earthworm *Eisenia fetida*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2022; 110: 13,
34. Wu J, Ren Z, Zhang C, Motelica-Heino M, Deng T, Wang H, Dai J. Effects of soil acid stress on the survival, growth, reproduction, antioxidant enzyme activities, and protein contents in earthworm (*Eisenia fetida*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020; 27: 33419–33428.
35. Yen KW, Chen WC, Su JJ. Recovery of copper and zinc from livestock bio-sludge with an environmentally friendly organic acid extraction. *Animals.* 2024; 14: 342.
36. Zaman AB, Atoar R, Iqbal M, Hridoy R, Sirajul H, Jashim U, Mominur R. Vermicomposting of solid textile sludge spiked with cow dung by epigeic earthworm *Eisenia fetida* in variable population density. *Environ. Prog. Sustain. Energy.* 2023; 42: e14136