

Evaluación del riesgo ambiental terrestre de dos gasolinas ecológicas de 90 octanos en la lombriz de tierra *Eisenia fetida* (Savigny, 1826)

Evaluation of the terrestrial environmental risk of two ecological 90 octane gasolines in the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826)

Recibido: mayo 05 de 2020 | Revisado: junio 12 de 2020 | Aceptado: julio 11 de 2020

SUSANA ISABEL AVALOS-RUIZ¹

JOSÉ IANNAcone^{1,2,3}

RESUMEN

Se evaluó el riesgo ambiental terrestre de dos gasolinas ecológicas de 90 octanos sobre la lombriz de tierra *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). El parámetro de toxicidad letal evaluado fue la mortalidad, y los efectos subletales fueron seis: movilidad, oscurecimiento, adelgazamiento, estrangulación, fraccionamiento y peso corporal a los 7 y 14 días de exposición. Los organismos fueron expuestos a cinco concentraciones de gasolinas ecológicas de 90 octanos expresadas en base al xileno: 49,5 ug·kg⁻¹, 148,5 ug·kg⁻¹, 346,5 ug·kg⁻¹, 841,5 ug·kg⁻¹ y 2079 ug·kg⁻¹. Las gasolinas ecológicas de 90 octanos (Petroperú y Repsol) en el suelo no presentaron efectos de toxicidad letal (concentración letal media, CL₅₀) en *E. fetida*. Los efectos subletales fueron inmovilidad, oscurecimiento y adelgazamiento. Se consideró como criterio de comparación el Estándar de Calidad Ambiental para suelos (ECA) para el Perú expresado en xileno (11 mg·kg⁻¹). En base a este ECA, los parámetros más sensibles para la gasolina-Petroperú que ocasionaron riesgo en la lombriz de tierra fueron inmovilidad, oscurecimiento y adelgazamiento en relación a la concentración en la que no se observa efecto (NOEC). Para la gasolina – Repsol, los mismos parámetros mostraron riesgo en función al NOEC; sin embargo, el peso húmedo presentó un riesgo significativo en la lombriz al igual en base a la concentración efectiva media (CE₅₀). La gasolina-Repsol presentó una mayor toxicidad para la lombriz de tierra que la gasolina-Petroperú, y el riesgo ambiental fue mayor para las respuestas subletales.

Palabras clave: bioensayos, CE₅₀, CL₅₀, ecotoxicología, *Eisenia fetida*, gasolina, NOEC, toxicidad letal, toxicidad subletal

1 Laboratorio de Ingeniería Ambiental. Carrera de Ingeniería Ambiental. Universidad Científica del Sur (UCSUR), Lima, Perú

2 Grupo de Investigación en Sostenibilidad Ambiental (GISA), Escuela Universitaria de Posgrado (EUPG), Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA). Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCCNM). Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Lima, Perú

3 Laboratorio de Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú
Autor para correspondencia E-mail: jiannacone@unfv.edu.pe

ABSTRACT

The terrestrial environmental risk of two ecological 90 octane gasoline was evaluated on the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). The lethal toxicity parameter evaluated was mortality, and the sublethal effects were six: mobility, darkening, thinning, strangulation, fractionation, and body weight at 7 and 14 days of exposure. The organisms were exposed to five concentrations of ecological gasoline of 90 octane expressed on the basis of xylene: 49.5 ug·kg⁻¹, 148.5 ug·kg⁻¹, 346.5 ug·kg⁻¹, 841.5 ug·kg⁻¹ and 2079 ug·kg⁻¹. The ecological 90 octane gasoline (Petro Peru and Repsol) in the soil did not show lethal toxicity effects (medium lethal concentration, LC₅₀) in *E. fetida*. The sublethal effects were immobility, darkening, and thinning. The Environmental Quality Standard for soils (ECA) for Peru expressed in xylene (11 mg·kg⁻¹) was considered as a comparison criterion. Based

<https://doi.org/10.24265/campus.2020.v25n30.01>

on this ECA, the most sensitive parameters for gasoline-Petroperu that caused risk in the earthworm were immobility, darkening and thinning in relation to the Concentration in which no effect is observed (NOEC). For gasoline-Repsol, the same parameters showed risk based on NOEC; however, the wet weight presented a significant risk in the earthworm as well as based on the mean effective concentration (EC₅₀). Gasoline-Repsol presented a higher toxicity for the earthworm than gasoline-Petroperu, and the environmental risk was greater for the sublethal responses.

Key words: CE₅₀, CL₅₀, ecotoxicology, *Eisenia fetida*, gasoline, LOC, lethal toxicity, NOEC, sublethal toxicity

Introducción

La industria de hidrocarburos es una fuente indispensable en el marco productivo del Perú (Bravo, 2007). Dentro de la gama de los hidrocarburos, las gasolinas son las más comerciales debido al incremento y demanda del parque automotor y según sea el aditivo agregado generan el octanaje de la gasolina (Murrugarra, 2009). La gasolina de 90 octanos o comúnmente llamada gasolina ecológica (Repsol, 2007) está constituida por una mezcla de hidrocarburos saturados, olefinas, naftenos y aromáticos (Petroperu, 2013; Pinedo *et al.*, 2013; Abdollahinejad *et al.*, 2020).

Los derrames incontrolados de combustibles en estaciones de servicio y en plantas industriales han generado un deterioro significativo de los ecosistemas naturales tanto contaminación del suelo como de las aguas subterráneas (Flores & Bitteri, 2000). El derrame de gasolina es considerado como uno de los accidentes ambientales con mayor dificultad para su mitigación o remediación, pero a la par estos derrames se están presentando con mayor frecuencia debido al mal estado de las vías de transporte y de la disposición final (Flores *et al.*, 2004; Lemos *et al.*, 2020).

Desde hace algunos años atrás, el uso de organismos biológicos llamados bioindicadores en ensayos de ecotoxicidad está ampliamente documentado. Por este motivo, en años recientes se han usado otras respuestas biológicas “biomarcadores” (Iannacone & Alvarino, 2004, 2005; Iannacone *et al.*, 2006; Iannacone *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2018; Escobar-Chávez *et al.*, 2019; Bamgbose & Anderson, 2020; Bautista-Medina & Iannacone, 2020; Lemos *et al.*, 2020). Para tal efecto, los ensayos ecotoxicológicos pueden ser empleados en diversos niveles, desde el sub-individual (evaluación de efectos moleculares y bioquímicos) hasta el nivel poblacional, comunidad y ecosistema (Kammenga *et al.*, 2000; Iannacone & Alvarino, 2005; da Silva Júnior *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2018; Escobar-Chávez *et al.*, 2019; Bamgbose & Anderson, 2020; Bautista-Medina & Iannacone, 2020; Lemus *et al.*, 2020).

La lombriz de tierra o la lombriz roja californiana *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Annelida) es considerada a nivel mundial como una de las más representantes dentro la macrofauna del suelo y dentro de todas las lombrices de tierra en particular (OECD, 1984; da Silva Júnior *et al.*, 2018). *Eisenia fetida* es de gran importancia gracias a que cumple un rol ecológico primordial

(Sanchez-Hernandez, 2006; Lemos et al., 2020), como por ejemplo causan modificaciones físicas en el suelo así como al mismo tiempo incrementa las posibilidades de desarrollo de otros animales y plantas generando un equilibrio en el ecosistema (Brown et al., 2004; Abdollahinejad et al., 2020). Adicionalmente, las lombrices de tierra son capaces de acumular varios contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en el suelo (Morrison et al., 2000; Boyd et al., 2001; Peijnenburg, 2002; Cuevas et al., 2008; Abdollahinejad et al., 2020). La lombriz de tierra ha sido propuesta, extensivamente, en estudios ecotoxicológicos (Scott-Fordsmand & Weeks, 2000; da Silva Júnior et al., 2018; Khan et al., 2018; Bamgbose & Anderson, 2020).

La presente investigación evidencia que la lombriz de tierra es un modelo biológico estándar para identificar impactos ecosistémicos potenciales por derrame de hidrocarburos al suelo, lo que será de mucha utilidad en el Perú (Abdollahinejad et al., 2020), debido a que actualmente no se cuenta con un registro detallado sobre el efecto ecotoxicológico que generan los derivados de hidrocarburos-gasolinas de mayor circulación, distribución y venta en el Perú (da Silva Júnior et al., 2018; Khan et al., 2018). Adicionalmente, esta investigación sirve de modelo para mejorar la normativa para un mejor cuidado del medio ambiente en el sector público, mientras que en el sector privado ayudará a implementar protocolos de monitoreo ambiental. El objetivo de la presente investigación fue determinar el riesgo ambiental terrestre de dos gasolinas ecológicas de 90 octanos en la lombriz de tierra.

Materiales y Métodos

Fundamento del protocolo

Se seleccionó el protocolo del ensayo de toxicidad letal estático (Cuevas et al., 2008) y el efecto tóxico subletal en lombriz de tierra *E. fetida* a nivel laboratorio y descrito en la guía 207 de la OECD para evaluación de sustancias (OECD, 1984).

Obtención y selección del material biológico

Se escogió a *E. fetida* por ser una especie indicadora de calidad ambiental del suelo (Cuevas et al., 2008). Se seleccionaron individuos de similar tamaño y con presencia del anillo clitelar desarrollado y visible, el cual es indicativo de su capacidad reproductiva (OECD, 1984). Las lombrices adultas se seleccionaron de un mismo cultivo (con el fin de evitar variaciones en los resultados), con un peso corporal en el rango 100 - 300 mg (promedio=192; n=280).

Preparación de sustrato artificial

La preparación del suelo artificial consistió en la mezcla de 10% de musgo de turba (materia orgánica), 20% de arcilla, y 70% de arena industrial (partículas entre 50-200 μm , previamente tamizada. Del mismo modo, se le agregó la cantidad de agua necesaria para obtener una humedad aproximada del 35%. La preparación se mezcló hasta conseguir homogeneidad (OECD, 1984). En la Tabla 1, se detallan los valores más representativos de caracterización de la muestra de suelo usados en los bioensayos con *E. fetida*.

Tabla 1

Análisis de caracterización del suelo usado en los bioensayos con Eisenia fetida. AF = Arena Franca

Materia Orgánica (%)	5,7	Método de Walkley & Black
pH (1:1)	6,7	Medida del potenciómetro de la suspensión suelo
CE (dS·m ⁻¹)	2,91	Medida en extracto acuoso relación- suelo: agua
CaCO ₃ (%)	1,1	Método Gaso-volumétrico
CIC (meq·100g ⁻¹)	9,6	Método de saturación con acetato de amonio
Clase Textual	AF	Método del hidrómetro

En la Tabla 2, se muestra que predominó la fracción arena por el método del hidrómetro; por lo tanto, la

clase textual de suelos predominante fue de Arena Franca (AF).

Tabla 2

Análisis de granulometría del suelo usado en los bioensayos con Eisenia fetida

% Arena muy gruesa (2,00 -1,00 mm)	0,46
% Arena gruesa (1,00 – 0,50 mm)	5,16
% Arena media (0,50 – 0,25 mm)	26,8
% Arena fina (0,25 – 0,10 mm)	39,92
% Arena muy fina (0,10 – 0,05 mm)	11,04
% Limo	8,98
% Arcilla	7,64

Aclimatación de lombrices

Para llevar a cabo la aclimatación de las lombrices se realizaron dos actividades: (1) previo a la aclimatación, se les dieron todas las condiciones necesarias. Su alimentación consistió de tomates “cherry” descompuestos del huerto de la Universidad Científica del Sur (UCSUR), Lima, Perú; (2) posteriormente, las lombrices seleccionadas fueron aclimatadas en suelos de similares condiciones a lo largo de una semana y no recibieron alimento durante el bioensayo (OECD, 1984).

Los ensayos de aclimatación fueron considerados validos cuando la mortalidad de *E. fetida* no sobrepasó el 10% (Iannacone & Alvarino, 2004). La cantidad de agua de riego suministrada cada dos a tres días durante ensayo fue

de 50 a 75 mL. La humedad en suelo se mantuvo en el rango óptimo establecido de 40-80%, considerando la respuesta aceptable de los bioensayos (Alonzo & Chicas, 2013).

Sustancias químicas

Se utilizó gasolinas ecológicas de 90 octanos de dos proveedores: Repsol (pH aproximado de 6 y densidad aproximada de 0,71 – 0,73) y Petroperú (pH aproximado de 5,5 y densidad aproximada de 0,75). Para ambos casos se asumió una densidad de 0,75 g·cm⁻³ y se utilizó el concentrado equivalente a un galón de gasolina a 15°C. Para identificar y seleccionar el valor de las concentraciones utilizadas en las series experimentales, se consideraron los valores registrados en la literatura científica (Iannacone & Alayo 2002; Iannacone & Alvarino 2004),

tomando en cuenta que la gasolina tiene la siguiente composición: 4-8% alcanos; 2-5% alquenos; 25-40% isoalcanos; 3-7% cicloalcanos; 1-4% cicloalquenos; y 20-50% aromáticos totales (ATSDR, 1995).

Las concentraciones de gasolina de 90 octanos se consideraron en función al compuesto predominante en los aromáticos totales que fue el xileno. Para determinar las concentraciones de las dos gasolinas de 90 octanos se tomó en cuenta el 6,6% de pureza del xileno. Se determinó este elemento debido a que es el compuesto predominante en la composición de los aromáticos totales, y estos a su vez predominan en la composición de la gasolina. Así mismo, es el elemento de mayor persistencia en suelo (ATSDR, 1995; Pinedo, 2014; NTP, 2017).

Las concentraciones en base al xileno fueron: 49,5 ug·kg⁻¹, 148,5 ug·kg⁻¹, 346,5 ug·kg⁻¹, 841,5 ug·kg⁻¹ y 2079 ug·kg⁻¹. Los tratamientos fueron: cinco concentraciones y dos controles (un control de agua y un control mezcla de alcohol y agua). Adicionalmente, se realizaron cuatro repeticiones por cada tratamiento (Iannacone & Alayo, 2002; Cuevas *et al.*, 2008).

Bioensayos

Para realizar el montaje de los bioensayos se seleccionaron contenedores de plástico. Cada contenedor contuvo 1 kg de suelo artificial con cada tratamiento y 10 lombrices en cada uno, las cuales fueron previamente climatizados. Se comprobó mediante la respuesta a estímulos de tacto y escape de la luz que las lombrices estaban saludables antes de iniciar

el experimento (Gómez, 2014; Cuevas *et al.*, 2008ab; Palafox *et al.*, 2012). El punto final considerado como respuesta letal fue la mortalidad, evaluada a través de CL₅₀, y los puntos finales de respuesta subletal fueron siete: inmovilidad, oscurecimiento, adelgazamiento, estrangulación, fragmentación, peso seco y peso húmedo evaluado a través de CE₅₀ (Concentración efectiva media), LOEC (Concentración más baja de efectos observables) y NOEC (Concentración de efectos no observables) para las gasolinas de Repsol y Petroperú a 7 y 14 días de exposición (OECD, 1984; Schaefer *et al.*, 2005).

Durante la aclimatación y el desarrollo del bioensayo, se controlaron la temperatura y humedad relativa, los cuales se midieron con un termohidrómetro (Coolbox®). El comportamiento de la temperatura se mantuvo poco fluctuante, esto debido a que el bioensayo se realizó en el invernadero de la UCSUR, y se encontró que la temperatura más alta fue de 24,6°C, mientras que la más baja fue de 19°C (promedio=21,29±1,54°C) y un rango de 19-24,6°C. Con respecto a la humedad relativa, presentó valores estables con un promedio de 73%±0,08; dentro de un rango de 60-88% cada semana aproximadamente.

Evaluación de Riesgo Ambiental (ERA)

Para determinar el riesgo de la gasolina de 90 octanos, se eligieron los resultados de los ensayos de toxicidad más sensibles, o sea el valor menor de NOEC y CE (L)₅₀ a partir de los datos obtenidos de los efectos letales y subletales en los bioensayos con *E. fetida*. Para establecer los valores de las concentraciones que no causan efectos sobre los organismos, se determinó el PNEC (concentración

por debajo de la cual se estima que no se producirán efectos adversos sobre los organismos) y se calculó en base a los siguientes valores por separado. Los valores de NOEC se dividieron entre un factor de seguridad de 100 y los valores de la concentración efectiva media CE (L)₅₀ se dividieron entre 1000 (IHCP, 2003).

Para tal efecto, se determinó la exposición al contaminante, tomando el valor del compuesto xileno indicado en el Estándar de Calidad Ambiental de Suelo de la norma peruana (Decreto Supremo N° 002-2013-MINAM). Finalmente, se determinó el riesgo a través de la evaluación del cociente de riesgo (CR) dividiendo la concentración de exposición (ECA suelo) entre el PNEC estimado (Delgado-Blas & Uc-Peraza, 2015). Es preciso indicar que un cociente de riesgo inferior a un 1 representa generalmente un riesgo aceptable, mientras que un cociente superior a un nivel crítico comparativo (LOC) equivalente a 1 se considera preocupante por tratarse de una exposición muy elevada que puede representar un riesgo (Planes & Fuchs, 2015).

Análisis estadístico

A través de un análisis de varianza (ANDEVA) en bloques completamente aleatorios se evaluó la eficacia de las concentraciones de las gasolinas entre las repeticiones y finalmente entre los tiempos de exposición (7 y 14 días). Como se presentaron diferencias significativas entre las réplicas, se realizó una prueba de significancia (Diferencia Verdaderamente Significativa-DVS) mediante una prueba de Tukey (Iannacone & Alayo, 2002). Por su parte, las CE (L)₅₀, se calcularon usando el

programa computarizado Probit versión 1,5 de la USEPA. Para probar diferencias entre las medias de las lecturas a los 7 y 14 días de exposición se realizó una prueba t-student para muestras relacionadas y simultáneamente se corrigieron con la fórmula de Schneider-Orelli's, la misma que permite ajustar los valores a cero cuando existe mortalidad en control pero no supera el 10%. Asimismo los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico SPSS 20,0 para establecer si existían o no diferencias significativas. Se consideró en todos los casos un valor de $p \leq 0,05$ como significativo (EPA, 1998).

Resultados

Gasolina de 90 octanos–Petroperú expresada en base al xileno ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

La Tabla 3 muestra los valores en porcentaje de los parámetros evaluados: mortalidad, inmovilidad, oscurecimiento, adelgazamiento, estrangulación, fraccionamiento y peso sobre la lombriz de tierra *E. fetida* bajo el efecto de cinco concentraciones crecientes de gasolina de 90 octanos-Petroperú y expresadas en μg de xileno en kg^{-1} de suelo.

No se observó efecto letal en *E. fetida* en relación a la gasolina de 90 octanos–Petroperú. Se determinó que el NOEC fue la concentración más alta utilizada durante el bioensayo. Se observó un incremento en el porcentaje de mortalidad a los 14 días de exposición ($t=4,50$; $p=0,004$). En el parámetro inmovilidad, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los bioensayos a los 7 y 14 días de exposición. Se determinó que el LOEC fue de $49,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Se notó una disminución en el porcentaje de inmovilidad entre ambos días de

exposición ($t=2,93$; $p=0,02$). En relación al oscurecimiento se determinó que el LOEC fue de $49,5 \text{ ug}\cdot\text{kg}^{-1}$. Ambos días de exposición no presentaron diferencias en el patrón de efecto ($t=2,20$; $p=0,07$). Los valores de CE_{50} a los 7 y 14 días para el parámetro adelgazamiento decrecieron para las concentraciones ensayadas. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los bioensayos según el tiempo de exposición ($t=2,59$; $p=0,04$).

Para el parámetro estrangulación se observó un incremento en el porcentaje del parámetro estrangulación con el tiempo de exposición ($t=3,36$; $p=0,01$). No se observaron valores de CE_{50} en los bioensayos sobre *E. fetida* en relación al fraccionamiento. Se determinó que el NOEC fue la concentración más alta utilizada durante el bioensayo. No se apreció un incremento en el porcentaje de fraccionamiento ($t=1,44$; $p=0,20$). El promedio de peso corporal empleado en el bioensayo con gasolina de 90 octanos-Petroperú no varió en relación a las concentraciones evaluadas. Se observó un incremento en el porcentaje de peso

húmedo con el tiempo de exposición ($t=7,96$; $p=0,00$). Los resultados muestran que la lombriz de tierra *E. fetida* presenta una alta sensibilidad en relación a los parámetros de movilidad, oscurecimiento y adelgazamiento. Por otro lado, no se observaron efectos sobre la lombriz de tierra en los parámetros de mortalidad, estrangulación, fraccionamiento y peso corporal.

La ERA de la gasolina de 90 octanos-Petroperú en base al NOEC mostró que todos parámetros evaluados fueron sensibles y por lo tanto ayudaron a determinar el riesgo, pues presentaron valores mayores a 1 (Tabla 4). La ERA de la gasolina de 90 octanos-Petroperú evaluada en base a la toxicidad de la concentración efectiva (CE_{50}) mostró que tres de los parámetros evaluados a los 7 y 14 días presentaron un riesgo para la lombriz de tierra *E. fetida*. Así, la secuencia relativa de mayor a menor en relación a los cocientes de riesgo de la gasolina de 90 octanos-Petroperú fue igual para ambos días de exposición: oscurecimiento > inmovilidad > adelgazamiento.

Tabla 3

Efectos letales y subletales de la gasolina de 90 octanos–Petroperú en seis parámetros porcentuales y en el peso corporal (mg) evaluados en *Eisenia fetida*.

Concentración (ug IA•Kg-1)	Mortalidad %		Inmovilidad %		Oscurecimiento %		Adelgazamiento %		Estrangulación %		Fraccionamiento %		Peso Corporal (mg)		
	7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d	Peso Húmedo 7d	Peso Húmedo 14d	Peso Seco 14d
Control Agua	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0	0a	0	168,75a	158,46a	28,21a
Control Agua + Alcohol	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0	0a	0	185,5a	161,25a	27a
49,5	2,5ab	2,56a	22,86b	8,57ab	34,29b	37,14b	25,71b	7,14a	2,5a	0	0a	0	172,31a	143,16a	29,21a
148,5	2,5ab	5,13a	42,86bc	28,57bc	48,57bcd	48,57bc	37,14bc	21,43a	5a	0	0a	0	182,82a	162,16a	27,84a
346,5	10b	12,82a	57,14cd	42,86cd	37,14 bc	51,43bc	28,57b	28,57ab	5a	0	2,5a	0	165,28a	151,76a	27,06a
841,5	5ab	5,13a	60cd	45,71cd	57,14cd	60cd	57,14cd	53,57b	2,5a	0	0a	0	177,37a	156,22a	27,57a
2079	5ab	7,69a	74,29d	57,14 d	68,57d	74,29d	62,86 d	57,14b	5a	0	5a	0	184,47a	156,94a	27,22a
NOEC (ug IA•Kg-1)	2079	2079	<49,5	<49,5	<49,5	<49,5	<49,5	<49,5	2079	-	2079	-	2079	2079	2079
LOEC (ug IA•Kg-1)	>2079	>2079	49,5	49,5	49,5	49,5	49,5	49,5	>2079	-	>2079	-	>2079	>2079	>2079
Levene	12,83	1,84	2,81	0,94	0,84	1,17	2,29	0,64	5,61	-	19,71	-	0,97	1,61	0,41
Sig	0	0,14	0,036	0,49	0,55	0,36	0,074	0,69	0,001	-	0	-	0,45	0,14	0,87
F	2,93	2	48,294	19,96	36,81	44,46	27,63	14,08	0,65	-	1,75	-	2,16	1,75	0,44
Sig	0,031	0,11	0	0	0	0	0	0	0,69	-	0,16	-	0,047	0,11	0,85
CE(L)50 (ug IA•Kg-1)	ND	ND	299,9	974,23	277,84	213,99	603,11	1110	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND. Valor No determinado. d=día. En una misma fila, valores con letras minúsculas diferentes (a, b, c, d) son significativamente diferentes en la variación de los parámetros evaluados en los tratamientos (prueba de Tukey p< 0,05). IA: Ingrediente Activo (Xileno 6,6%). Los porcentajes de los parámetros son los valores promedios para las cuatro réplicas.

Tabla 4
Evaluación del riesgo ambiental terrestre de la gasolina ecológica de 90 octanos–Petroperú en base al xileno sobre *Eisenia fetida*.

Especie	Efecto Tóxico	Parámetros	Toxicidad NOEC	Factor	PNEC NOEC	Exposición (ECA suelo) (ug·Kg ⁻¹)	CR	LOC	RIESGO NOEC
<i>Eisenia fetida</i>	Letal	Mortalidad	2079	100	20,79	11000	529,10	1.00	SI
		Inmovilidad	49,5	100	0,50	11000	22222,22	1.00	SI
	Subletal	Oscurecimiento	49,5	100	0,50	11000	22222,22	1.00	SI
		Adelgazamiento	49,5	100	0,50	11000	22222,22	1.00	SI
		Estrangulación	2079	100	20,79	11000	529,10	1.00	SI
		Fraccionamiento	2079	100	20,79	11000	529,10	1.00	SI
		Peso húmedo 7° día	2079	100	20,79	11000	529,10	1.00	SI
		Peso húmedo 14° día	2079	100	20,79	11000	529,10	1.00	SI
		Peso seco	2079	100	20,79	11000	529,10	1.00	SI

Especie	Efecto Tóxico	Parámetros	Toxicidad CE(L)50	Factor	PNEC	Exposición (ECA suelo) (ug·Kg-1)	CR	LOC	RIESGO NOEC
<i>Eisenia fetida</i>	Subletal	Inmovilidad 7° día	299,9	1000	0,30	11000	36678,89	1.00	SI
		Oscurecimiento 7° día	277,84	1000	0,28	11000	39591,13	1.00	SI
		Adelgazamiento 7° día	603,11	1000	0,60	11000	18238,80	1.00	SI
		Inmovilidad 14° día	974,23	1000	0,97	11000	11290,97	1.00	SI
		Oscurecimiento 14° día	213,99	1000	0,21	11000	51404,27	1.00	SI
		Adelgazamiento 14° día	1110	1000	1,11	11000	9909,91	1.00	SI

Toxicidad=NOEC=Concentración más alta en la que no se observa efecto. Exposición=ECA suelo=Estándar de Calidad Ambiental de Suelo DS N° 002-2013-MINAM-Perú para el xileno. Factor de seguridad=100 para NOEC y 1000 para CE₅₀. PNEC= Concentración pronosticada sin efecto= NOEC/Factor de seguridad. CR=Cociente de Riesgo= Exposición/PNEC. LOC= Nivel crítico.

Gasolina de 90 octanos – Repsol, expresada en base al xileno (ug·kg⁻¹)

La Tabla 5 muestra los efectos de la mortalidad, inmovilidad, oscurecimiento, adelgazamiento, estrangulación, fraccionamiento y peso sobre *E. fetida* por efecto de gasolina de 90 octanos-Repsol y expresadas en ug de xileno·IA·kg⁻¹. No se observó variaciones en la mortalidad a los 7 y 14 días de exposición (t=2,20; p=0,07). Se determinó que el NOEC fue la concentración más alta utilizada durante el bioensayo. Para la inmovilidad se registraron diferencias en los valores

de CE₅₀ entre los 7 y 14 días (t=1,95; p=0,09). No se notó diferencias en el oscurecimiento según el tiempo de exposición (t=1,55; p=0,17). Los valores de CE₅₀ a los 7 y 14 días para el parámetro adelgazamiento decrecieron para las concentraciones ensayadas. Para ambos días de exposición presentaron un patrón de efecto diferente (t=6,82; p<0,05).

Para el parámetro estrangulación, no se observó cambio con el tiempo de exposición (t=2,29; p=0,06). No se vieron diferencias para la CE₅₀ de *E. fetida* en relación al fraccionamiento entre los 7 y

14 días de exposición ($t=1,33$; $p=0,23$). El peso corporal empleado en el bioensayo con gasolina de 90 octanos-Repsol varió en relación a las concentraciones. Se observó un aumento en el peso húmedo con el tiempo de exposición ($t=17,14$; $p=0,00$). Se vio sensibilidad en relación a movilidad, oscurecimiento y adelgazamiento.

Al comparar entre ambas gasolinas de 90 octanos ecológicas, se obtuvo que la mayor toxicidad de la gasolina-

Petroperú en la inmovilidad ($CE_{50}= 974,23 \text{ ug}\cdot\text{kg}^{-1}$) y en la gasolina-Repsol en el adelgazamiento ($CE_{50}= 418,41 \text{ ug}\cdot\text{kg}^{-1}$). La gasolina de Repsol en general es más tóxica que la de Petroperú. La ERA en base al NOEC, mostró que los parámetros evaluados determinaron riesgo al presentar valores superiores al LOC equivalente a 1. Hay riesgo para la gasolina de 90 octanos-Repsol en la inmovilidad, oscurecimiento, adelgazamiento y peso húmedo de *E. fetida*. (Tabla 6).

Tabla 5

Efectos letales y subletales de la gasolina de 90 octanos–Repsol en seis parámetros porcentuales y en el peso corporal (mg) evaluados en Eisenia fetida.

Concentración (ug IA•Kg-1)	Mortalidad		Inmovilidad		Oscurecimiento		Adelgazamiento		Estrangulación		Fraccionamiento		Peso Corporal (mg)		
	%		%		%		%		%		%		Peso	Peso	Peso
	7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d	Húmedo 7d	Húmedo 14d	Seco 14d
Control Agua	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0	203,50a	157,75a	25,5a
Control Agua + Alcohol	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0	215,75a	174,25ab	25,5a
49.5	2,5a	2,5a	42,5b	27,03b	37,14b	36,36b	26,47b	56,67b	0a	0a	0a	0	218,97a	184,87b	23,33a
148.5	2,5a	7,5a	52,5bc	32,43bc	51,43bc	45,45bc	44,12bc	63,33b	5a	0a	0a	0	219,74a	183,78ab	25,68a
346.5	7,5a	10a	60cd	45,95bc	51,43bc	48,48bc	50cd	63,33b	2,5a	0a	0a	0	225,68a	174,72ab	23,89a
841.5	0a	10a	62,5cd	48,65c	60bc	60,61c	64,71d	80b	10a	0a	2,5a	0	218,75a	184,17b	23,33a
2079	0a	12,5a	70d	51,35c	65,71c	63,64c	52,94cd	83,33b	12,5a	2,5a	7,5a	0	227,25a	185,14b	23,94a
NOEC (ug IA•Kg-1)	2079	2079	<49,5	<49,5	<49,5	<49,5	<49,5	<49,5	2079	2079	2079	-	2079	346,5	2079
LOEC (ug IA•Kg-1)	>2079	>2079	49,5	49,5	49,5	49,5	49,5	49,5	>2079	>2079	>2079	-	>2079	>841,5	>2079
Levene	8,36	8,77	2,57	0,73	1,72	0,77	2,5	1,67	31,73	9	10,64	-	3,79	1,42	0,6
Sig	0	0	0,05	0,63	0,17	0,6	0,06	0,18	0	0	0	-	0,001	0,21	0,73
F	1,53	1,39	70,49	24,23	28,38	32,5	47,5	25,69	1,78	1	1,93	-	1,65	2,69	0,63
Sig	0,22	0,27	0	0	0	0	0	0	0,15	0,45	0,12	-	0,13	0,015	0,7
CE(L)50 (ug IA•Kg-1)	ND	ND	117,59	1194	207,04	300,21	418,41	43,67	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND. Valor No determinado. d=día. En una misma fila, valores con letras minúsculas diferentes (a, b, c, d) son significativamente diferentes en la variación de los parámetros evaluados en los tratamientos (prueba de tukey $p<0,05$). IA: Ingrediente Activo (Xileno 6,6%). Los porcentajes de los parámetros son los valores promedios para las cuatro réplicas.

Tabla 6
Evaluación del riesgo ambiental terrestre de la gasolina ecológica de 90 octanos–Repsol en base al xileno sobre Eisenia fetida.

Especie	Efecto Tóxico	Parámetros	Toxicidad NOEC	Factor	PNEC NOEC	Exposición (ECA suelo) (ug·Kg ⁻¹)	CR	LOC	RIESGO NOEC
<i>Eisenia fetida</i>	Letal	Mortalidad	2079	100	20,79	11000	529,10	1.00	SI
		Inmovilidad	49,5	100	0,50	11000	22222,22	1.00	SI
		Oscurecimiento	49,5	100	0,50	11000	22222,22	1.00	SI
		Adelgazamiento	49,5	100	0,50	11000	22222,22	1.00	SI
	Subletal	Estrangulación	2079	100	20,79	11000	529,10	1.00	SI
		Fraccionamiento	2079	100	20,79	11000	529,10	1.00	SI
		Peso húmedo 7 días	2079	100	20,79	11000	529,10	1.00	SI
		Peso húmedo 14 días	346,5	100	3,47	11000	3174,60	1.00	SI
	Peso seco	2079	100	20,79	11000	529,10	1.00	SI	

Especie	Efecto Tóxico	Parámetros	Toxicidad CE(L)50	Factor	PNEC	Exposición (ECA suelo) (ug·Kg ⁻¹)	CR	LOC	RIESGO NOEC
<i>Eisenia fetida</i>	Subletal	Inmovilidad 7° día	117,59	1000	0,11759	11000	93545,37	1.00	SI
		Oscurecimiento 7° día	207,04	1000	0,20704	11000	53129,83	1.00	SI
		Adelgazamiento 7° día	418,41	1000	0,41841	11000	26290,00	1.00	SI
		Inmovilidad 14° día	1194	1000	1194,00	11000	9212,73	1.00	SI
		Oscurecimiento 14° día	300,21	1000	0,30021	11000	36641,02	1.00	SI
		Adelgazamiento 14° día	43,67	1000	0,04367	11000	251889,17	1.00	SI

Toxicidad=NOEC=Concentración más alta en la que no se observa efecto. Exposición=ECA suelo=Estándar de Calidad Ambiental de Suelo DS N° 002-2013-MINAM-Perú para el xileno. Factor de seguridad=100 o 1000 (Este valor es inversamente proporcional a la cantidad y calidad de los datos de toxicidad); (100) para NOEC y (1000) para CE₅₀. PNEC=Concentración pronosticada sin efecto=NOEC/Factor de seguridad. CR=Cociente de Riesgo= Exposición/PNEC. LOC= Nivel crítico comparativo.

Discusión

En los bioensayos realizados con la gasolina en base al xileno no se observaron efectos letales significativos en la mortalidad de *E. fetida*. Nuestros resultados son similares a Bamgbose & Anderson (2020) quienes encontraron que los biodiesel y diesel en *E. fetida* fueron menos tóxicos en ensayos de mortalidad que en las respuestas subletales. da Silva Júnior *et al.* (2018) no observaron cambios en la mortalidad en las lombrices de tierra por acción del BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno

y xileno). Abdollahinejad *et al.* (2020) observaron tasas de sobrevivencia razonables de la lombriz de tierra por acción de suelo contaminados por derivados de petróleo. En contraste no concuerda con lo presentado por Gómez (2014), quien evaluó la mortalidad de este invertebrado en suelos contaminados por pozos petroleros y de refinerías de petróleo, encontrando efecto en la toxicidad por letalidad.

Otros autores como Kobeticová *et al.* (2008) registraron mortalidad por los HAP (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos)

en *E. fetida* después de cuatro semanas de exposición. Pasková *et al.* (1988) y Droge *et al.* (2006) observaron una alta toxicidad de los HAP en la biota del suelo. Uno de las razones por los cuales no se registraron efectos letales en *E. fetida* podría deberse a las características de los BTEX presentes en la gasolina, debido a que la misma al contacto con el suelo superficial actúa por volatilización, disolución o la adsorción de componentes individuales según sus propiedades físicas/químicas (ATSDR, 1995).

La identificación de los efectos de la toxicidad subletal es de suma importancia, debido a que nos ayuda a determinar el estado de la lombriz de tierra, pues estos se ven reflejados en su crecimiento y reproducción a mediano plazo (Radamass *et al.*, 2015; da Silva Júnior *et al.*, 2018; Bamgbose & Anderson, 2020). Se observaron efectos subletales para la inmovilidad sobre *E. fetida*. Este se podría explicar por una reducción en la producción de la mucosidad que disminuye el desplazamiento de la lombriz (Weeks & Comber, 2005). Tang *et al.* (2016) encontraron que los tóxicos en el suelo ocasionan una reducción del enterramiento e inhibición en el ritmo respiratorio.

De los tres parámetros más sensibles, el oscurecimiento a los 14 días de exposición resultó ser más sensible a la gasolina-Petroperú. An & Lee (2008) registraron que la exposición corporal es más tóxica que la exposición a tóxicos por ingesta en la lombriz de tierra. Roubalová *et al.* (2015) aseveraron que cuando se acumulan los contaminantes se pueden romper células y tejidos, por la reducción progresiva de las vellosidades intestinales y del tejido cloragógeno en las lombrices

de tierra. Salanitro *et al.* (1997) indican que las respuestas bioquímicas como el estrés oxidativo y la genotoxicidad a los tóxicos en las lombrices de tierra todavía no han sido investigadas a profundidad.

El adelgazamiento en *E. fetida* está ligado a la pérdida de fluidos celómicos tal como lo afirma Radamass *et al.* (2015) quienes compararon dos tipos de aceites de motor (fresco y usado) y encontraron toxicidad en base a la inactividad, fragmentación, hinchazón y expulsión de fluido celómico antes de la muerte. Curry (1994), indica que los contaminantes más pesados conducen a efectos negativos en la lombriz, produciendo problemas como la pérdida de peso (adelgazamiento) debido a que prefieren morir de inanición en lugar de alimentarse de suelos contaminados (Radamass *et al.*, 2015). Bamgbose & Anderson (2020) observaron en *E. fetida* respuestas de morbilidad como descarga excesiva de fluidos celómicos por acción de compuestos biodiesel y diesel.

Para los tres parámetros más sensibles también se observó que el valor de la concentración más baja de NOEC ($<49,5 \text{ ug}\cdot\text{kg}^{-1}$) generó los efectos más representativos tanto para la gasolina de 90 octanos-Petroperú como para la gasolina de 90 octanos-Repsol. Los parámetros subletales reflejan efectos que no se pueden observar con las pruebas de toxicidad letal (Dominique *et al.*, 2007; Kuppusamy *et al.*, 2020). Dawson *et al.* (2007) sugieren la incorporación de pruebas subletales para las lombrices de tierra proporcionan datos sensibles y ecológicamente relevantes (Lowe & Butt, 2007).

Los parámetros de estrangulación y fraccionamiento no influyeron de

manera significativa en la lombriz de tierra. Venkateswara *et al.* (2003), afirman que la segmentación ocurre por el agotamiento de fluido celómico. Eom *et al.* (2007) muestran por efectos subletales sensibilidad de *E. fetida* a suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos. Venkateswara *et al.* (2003) adicionan que la exposición al tetraetilo de plomo (TEL) y óxido de plomo (un aditivo de la gasolina) provoca rupturas de la cutícula y la piel, extrusión de fluido celómico y segmentación. Bamgbose & Anderson (2020) encontraron en *E. fetida* respuestas de fragmentación anterior y posterior por exposición a compuestos biodiesel y diésel.

El peso húmedo y el peso seco no ocasionaron toxicidad en el oligoqueto. Bamgbose & Anderson (2020) observaron en la lombriz de tierra disminución del peso por efecto del biodiesel y diésel. Liu *et al.* (2010) afirman que los contaminantes hidrofílicos pueden entrar en el cuerpo de lombriz a través de la piel predominantemente, mientras que las sustancias hidrofóbicas entran a través del tracto digestivo. Los resultados evidencian que las gasolinas ecológicas no afectan la ingestión y la asimilación de las lombrices lo cual se vio evidenciado en la ausencia de efecto en el peso de las lombrices. Radamass *et al.* (2015) afirman que las enzimas deshidrogenasas y nitrificadoras de los microorganismos de suelo tienden a controlar los efectos de los HTP sobre la toxicidad del suelo. Spurgeon *et al.* (2003) y Labud *et al.* (2006), corroboran que la toxicidad de los hidrocarburos depende del tipo y concentración de esta sustancia química, capacidad de intercambio catiónico, pH y contenido de materia orgánica del suelo (Wang *et al.*, 2000; Song *et*

al., 2005; Hund-Rinke & Wiechering, 2011; Palafox *et al.*, 2012; Whitfield *et al.*, 2013; Kuppusamy *et al.*, 2020), lo que puede ocasionar cambios respuestas bioquímica a nivel de las enzimas antioxidantes POD (peroxidasa), CAT (catalasa) y SOD (superóxido dismutasa) (Liu *et al.*, 2010) y en la actividad de las células similares a natural killer (NK) que forman parte del sistema de defensa en *E. fetida* (Patel *et al.*, 2007).

Las concentraciones evaluadas se determinaron considerando al xileno como el ingrediente activo. Si bien el benceno es la base estructural de los hidrocarburos aromáticos totales (HAT), el xileno causa toxicidad en suelos, debido a que es el más abundante y el más representativo en la composición de la gasolina. Pérez *et al.* (2015) afirman que el xileno presenta agregados y el componente “menos volátil” es el o-xileno, debido a que no hay pérdida de concentración en el tiempo, y por lo tanto es un contaminante que afecta al suelo. Desafortunadamente, la concentración exacta de los BTEX en gasolina que se liberan al medio ambiente por lo general no se conoce con exactitud (PES, 1999). Cline *et al.* (1991) observaron que la composición específica de la gasolina variará dependiendo del origen del petróleo, el método de producción, de la ubicación de uso final y de la estación del año.

La gasolina de 90 octanos-Petroperú utiliza un crudo proveniente de Caño-Limón (Colombia) (Petroperú, 2013), y la gasolina de 90 octanos-Repsol es elaborada en base a un crudo africano, que son considerados altamente cargados en azufre (Repsol, 2007). Podemos indicar que sus componentes químicos podrían ser diferentes y por lo tanto,

ocasionar valores de toxicidad subletal diferentes en la lombriz de tierra (Lemus *et al.*, 2020). El xileno es el compuesto de mayor persistencia en suelo (ASTDR, 1995; Pinedo, 2014). Pero al mismo tiempo no podemos adjudicar todos los efectos tóxicos únicamente al xileno, porque los cuatro componentes del BTEX pueden ocasionar impacto por efecto de mezcla generando un efecto sinérgico o antagónico (Smith, 2010). Tas *et al.* (1997) durante un ensayo de 14 días determinaron que las lombrices de tierra al contacto con el xileno presente en jabones y detergentes no generaron efectos adversos en la supervivencia y comportamiento de las lombrices.

La disminución de la concentración letal durante los bioensayos podría verse disminuida por la adición de agua, debido a que para mantener la humedad óptima durante los bioensayos se adicionó 75 mL de agua continuamente. Donaldson *et al.* (1992) indican que la volatilidad de la gasolina de suelos contaminados puede mejorar mediante la adición de agua al suelo, aunque esto va a depender de la porosidad del suelo (Bossert & Bartha, 1984). Se ha aseverado que los compuestos aromáticos contienen grupos funcionales que son resistentes a la hidrólisis (Lyman *et al.*, 1990; Khan *et al.*, 2018). La capacidad de los compuestos BTEX para disolverse en agua afectará su biodisponibilidad en medio ambiente (Luo *et al.*, 1999).

Se ha indicado que la gasolina mezclada con etanol genera una menor contaminación por derrame en suelo debido a que es mucho más volátil. Sin embargo, los datos obtenidos en el presente estudio nos muestran lo contrario, aun realizando la dilución del

contaminante (gasolina de 90 octanos) en alcohol etílico de 96°, se han observado parámetros sensibles en *E. fetida* (Repsol, 2007; AGESP, 2013). La refinería La Pampilla utiliza para la gasolina-Repsol al 7,8% de etanol en su composición; por lo tanto, se podría asumir que si bien en el control de etanol los resultados fueron iguales que el control de agua durante los bioensayos, la mezcla de etanol y gasolina de 90 octanos podría ser otro factor que exacerbe los efectos subletales en la lombriz.

La principal fuente de contaminación por hidrocarburos (gasolinas) en el Perú son las estaciones de servicio clandestinas, las mismas que no cuentan con planes de manejo y protección (planes de contingencia), y tienen a su cargo dispensadores viejos en las islas de despacho generando derrames, filtraciones y volcaduras de combustibles. Estas distribuidoras se encuentran ubicadas en zonas periféricas de Lima (OSINERGMIN, 2015). Es necesario tener una mayor supervisión y fiscalización debido a que el ingreso del crudo altera las propiedades del suelo y afecta su equilibrio biológico (Das & Chandran, 2011; Shukry *et al.*, 2013).

Conclusiones

En la presente investigación no se observó efecto tóxico letal en las dos gasolinas ecológicas de 90 octanos evaluadas sobre la lombriz de tierra *E. fetida* en base al xileno. Los tres parámetros subletales más sensibles a la gasolina de 90 octanos—Petroperú y —Repsol sobre la lombriz de tierra fueron la inmovilidad, el oscurecimiento, y el adelgazamiento. No se observaron efectos en la estrangulación, fraccionamiento y

peso corporal. Según la ERA realizada para la gasolina ecológica de 90 octanos-Petroperú en base al factor de seguridad y el cociente de riesgo considerando el ECA-peruano para suelos equivalente a $11 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, mostró que la inmovilidad, oscurecimiento y adelgazamiento fueron los más sensibles en la lombriz de tierra. Estos tres parámetros evaluados en relación al NOEC dieron un cociente de riesgo que superó el LOC equivalente a 1. Lo mismo se presentó en la evaluación

de estos tres parámetros más sensibles teniendo en consideración la CE_{50} . Por otro lado, la ERA realizada para la gasolina de 90 octanos-Repsol demostró que estos tres parámetros fueron sensibles al ser evaluados en función al NOEC, al igual que la gasolina de 90 octanos-Petroperú. Finalmente, el peso húmedo a los 14 días también presentó un riesgo significativo en la lombriz al igual que la inmovilidad, oscurecimiento y adelgazamiento evaluados en base a la CE_{50} .

Referencias

- Abdollahinejad, B., Pasalari, H., Jafari, A.J., Esrafil, A. & Farzadki, M. (2020). Bioremediation of diesel and gasoline-contaminated soil by covermicomposting amended with activated sludge: Diesel and gasoline degradation and kinetics. *Environmental Pollution*, 263, 114584.
- AGESP (Asociación de Grifos y Estaciones de Servicio del Perú) (2013). *Asociación de Grifos y Estaciones de Servicio*. Boletín Informativo, Consultado de <http://www.agesp.com>
- Alonzo, L. & Chicas, S. (2013). Determinación de la concentración letal 50 (CL_{50}) de dos plaguicidas sintéticos 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. El Salvador: Universidad del Salvador.
- An, Y. & Lee, W. (2008). Comparative and combined toxicities of toluene and methyl tert-butyl ether to an Asian earthworm *Perionyx excavatus*. *Chemosphere*, 71, 407-411.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (1995). Toxicological Profile for Gasoline. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry. US Department of Health and Human Services*, pp. 1-224.
- Bamgbose, I.A. Anderson, T.A. 2020. Ecotoxicity of three plant-based biodiesels and diesel using, *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 260, 113965.
- Bautista-Medina, Y.B. & Iannacone, J. 2020. Toxicidad del lodo de perforación minera en el bioindicador *Porcellio laevis* (Latreille, 1804) (Crustacea: Isopoda). *Paideia XXI*, 10, 95-119.
- Bossert, I. & Bartha, R. (1984). *The fate of petroleum in soil ecosystems. Atlas, RM c(Ed). Petroleum microbiology*. Macmillan, New York. pp. 435-473.
- Boyd, W.A., Stringer, V.A. & Williams, P.L. (2001). Metal LC_{50} of a soil nematode

- compared to published Earthworm Data. *Environmental Toxicology and Risk Assessment: science, policy and standardization- Implications for Environmental Decisions*. Greenberg, B.M., Hull, R.N., Roberts, M.H. Jr. Gensemer, R.W. Eds., American Society for Testing and Materials, Standard Technical Publication 1403. 10: 223-235 2001 10, pp. 223-235.
- Bravo, E. (2007). *Los impactos de la explotación petrolera en ecosistemas tropicales y la biodiversidad*. Ecuador: Acción Ecológica.
- Brown, P.J., Long, S.M., Spurgeon, D.J., Svendsen, C. & Hankard, P.K. (2004). Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere*, 57, 1675-1681.
- Cline, P., Delfino, J. & Rao, P. (1991). Partitioning of aromatic constituents into water from gasoline and other complex solvent mixtures. *Environmental Science & Technology*, 25, 914-920
- Cuevas, M., Ferrera, R., Roldán, A. & Rodríguez, R. (2008a). *Monitoreo de suelos contaminados mediante pruebas ecotoxicológicas*. Métodos Ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos, pp. 211-223. Consultado: <https://www.eumed.net/rev/tlatemoani/11/suelos-contaminados-pruebas-ecotoxicologicas.html>
- Curry, J. (1994). *Grassland Invertebrates: Ecology, Influence on soil fertility, and effects on plant growth*. Springer. New York.
- Das, N. & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, 2011, Article 941810.
- da Silva Júnior, F.M.R., Mendonça, F.S., Volcão, L.M. & Honscha, L.C. (2018). Ecotoxicological assessment of BTEX to soil organisms using a terrestrial microcosm: multispecies soil system (MS-3). *International Journal of Environmental Science and Technology*, doi.org/10.1007/s13762-018-2053-8
- Delgado-Blas, V. & Uc-Peraza, R.G. (2015). Acute toxicity and risk assessment of three commercial detergents using the polychaete *Capitella* sp. C from Chetumal Bay, Quintana Roo, Mexico. *International Aquatic Research*, 7, 251-261
- Dominique, E., Ogusuku, E., Devine, G. & Furlong, M. (2007). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina experimental y Salud Pública*, 25, 74-100
- Donaldson, S., Miller, G. & Miller, W. (1992). Remediation of gasoline-contaminated soil by passive volatilization. *Journal of Environmental Quality*, 21, 94-102.
- Droge, S., Leon, P., Bleeker, E., Kraak, M. & Gestel, C. (2006). Chronic toxicity of polycyclic aromatic compounds to the springtail *Folsomia candida* and *Enchytraeus cryp-*

- ticus*. Environmental Toxicology and Chemistry, 25, 2423-2431.
- EPA. (1998). *Guidelines for Ecological Risk Assessment*. United States: US Environmental Protection Agency. Washington, D.C. 188 p.
- Escobar-Chávez, C., Alvariño, L. & Iannacone, J. (2019). Evaluación del riesgo ambiental acuático de la mezcla de los plaguicidas imidacloprid (insecticida) y propineb (fungicida) en *Daphnia magna* Straus, 1820. *Paideia XXI*, 9, 301-322.
- Flores, J. & Bitteri, A. (2000). La Biotecnología en el impacto ambiental y su aplicación en el Perú. *Ingeniería Industrial*, 23, 105-119.
- Flores, M.A., Torras, S., & Téllez, R. (2004). Medidas de mitigación para uso de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos en infraestructura de transporte terrestre. *Publicación técnica*, 257, 24-72.
- Gomez, A. (2014). *Evaluación de la Toxicología de suelos mediante un bioensayo con la lombriz de tierra Eisenia fetida*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Hund-Rinke. K. & Wiechering. H. (2011). Earthworm avoidance test for soil assessments. *Journal of Soils and Sediments*, 1, 15-20.
- Iannacone, J. & Alayo, M. (2002). Ensayos ecotoxicológicos con petróleo crudo, Diésel 2 y Diésel 6 con dos subespecies de *Brachionus plicatilis* Muller 1786 (Rotifera: Monogononta). *Gayana*, 66, 45-58.
- Iannacone, J. & Alvariño, L. (2004). *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) como modelo ecotoxicológico para evaluar lindano y clorpirifos. *Acta Zoológica Lilloana*, 48, 5-12.
- Iannacone, J. & Alvariño, L. (2005). Selectividad del insecticida Cartap empleando bioensayos con organismos no destinatarios. *Ecología Aplicada*, 4, 1-14.
- Iannacone, J. & Alvariño, L. (2006). *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) (Annelida:Lumbricidae) como modelo ecotoxicológico para evaluar lindano y clorpirifos. *Acta Zoológica Lilloana*, 48, 5-12.
- Iannacone, J., Alvariño, L. & Paredes, C. (2009). Evaluación del riesgo ambiental del arseniato de plomo en bioensayos con ocho organismos no destinatarios. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 4, 73-82.
- IHCP. (2003). *Technical Guidance Document on Risk Assessment*. Ispra: Institute for Health and Consumer Protection. European Chemicals Bureau.
- Kammenga, J., Dallinger, R., Donker, M., Kohler, H., Simonsen, V. & Triebkorn, R. (2000). Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 164, 93-147.
- Khan, M.A.I., Biswas, B., Smith, E., Naidu, R. & Megharaj, M. (2018).

- Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil- a review. *Chemosphere*, 212, 755-767.
- Kobeticová, K., Bezchlebová, J., Lána, J., Sochová, I. & Hofman, J. (2008). Toxicity of four nitrogen-heterocyclic polyaromatic hydrocarbons (NPAHs) to soil organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 650-660.
- Kuppusamy, S., Maddela, N.R., Megharaj, M. & Venkateswarlu, K. (2020). *Ecological Impacts of Total Petroleum Hydrocarbons*. In: *Total Petroleum Hydrocarbons*. Springer, Cham.
- Labud, V., Garcia, C. & Hernandez, H. (2006). Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy a clay soil. *Chemosphere*, 66, 1863-1871.
- Lemos, G.S., Souza, M.S.S., Aleixo, N.V.S., Lima, E.N. & Cotta, J.A.O. (2020). Ecotoxicological tests with *Eisenia fetida* for the evaluation of areas allegedly contaminated with oil derivatives in municipality of João Monlevade/MG. *Research, Society and Development*, 9, e115963025.
- Liu, Y., Zhou, Q., Xie, X., Lin, D. & Dong, L. (2010). Oxidative stress and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* induced by toluene, ethylbenzene and xylene. *Ecotoxicology*, 19, 1551-1559.
- Lowe, C. & Butt, K. (2007). Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: A critical review. *European Journal of Soil Biology*, 43, 281-288.
- Luo, Y., Zang, Y., Zhong, Y. & Kong, Z. (1999). Toxicological study of two novel pesticides on earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 39, 2347-2356.
- Lyman, W., Reehl, W. & Roselblatt, D. (1990). *Handbook of chemical property estimation methods*. American Chemical Society. Washington, DC.
- MINAM (Ministerio del Ambiente). (2013). *Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo*. Decreto Supremo N° 002-2013-MINAM. El Peruano, 25 de marzo del 2013. pp. 491497-491500.
- Morrison, D., Robertson, B. & Alexander, M. (2000). Bioavailability to earthworms of aged DDT, DDE, DDD, and dieldrin in soil. *Environmental Science & Technology*, 34, 709-713.
- Murrugarra, P.F. (2009). *Obtención de gasolinas de alto octano vía rectificación de una Nafta Craqueada*. Tesis de Grado. Lima, Perú.
- NTP (Norma Técnica Peruana). (2017). *Petróleo y derivados. Gasolinas uso motor. Especificaciones*. 2^{da} Ed. Reemplaza a la NTP 321.102:2002.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). (1984). *Earthworm, Acute Toxicity Tests*. Guideline for Testing of Chemicals. pp. 1-9.

- Palafox, A., Hernandez, A., Lopez, J. & Cuevas, M. (2012). *Evaluación de la toxicidad de los suelos mediante bioensayos con lombrices*. México, DF: Métodos Ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos.
- Pasková, V., Hilscherová, K., Feldmannová, M. & Bláha, L. (1988). Toxic effects and oxidative stress in higher plants exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and their N-heterocyclic derivatives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 17-23.
- Patel, M., Francis, J., Cooper, E. & Fuller-Espie, S. (2007). Development of a flow cytometric, non-radioactive cytotoxicity assay in *Eisenia fetida*. *Soil Biology*, 43, 97-103.
- Peijnenburg, W. (2002). Bioavailability of metals to soil invertebrates. In: Allen, H.E. (ed). *Bioavailability of metals in terrestrial ecosystems: Importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes and plants*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, pp. 89-112.
- Pérez, S., Silva, I., Peñuela, G. & Cardona, S. (2015). Evaluación de biocombustibles e hidrocarburos del petróleo (Gasolina y Diesel) en un suelo: proceso de transporte y biorremediación. *Revista de la Escuela de Ingeniería de Antioquia*, 2, 23-46.
- PES (Parsons Engineering Science). (1999). *Light nonaqueous-phase liquid weathering at various fuel release sites*. Consultado: http://synectics.net/public/library/StreamResource.axd?DSN=pub&Mode=FileImage_Inline&ID=1132
- Petroperú. (2013). *Hoja de datos de Seguridad de Materiales*. Obtenido de <http://www.petroperu.com.pe/portalweb/Main.asp?Seccion=55>
- Pinedo, A. (2014). *Risk assessment applied to soils affected by petroleum hydrocarbons*. España: Universidad de Cantabria. Departamento de Ingenierías Química y Biomolecular.
- Pinedo, J., Ibañez, R., Lijzen, J. & Irabien, A. (2013). Assessment of soil pollution based on total petroleum hydrocarbons and individual oil substances. *Journal of Environmental Management*, 130, 72-79.
- Planes, E. & Fuchs, J. (2015). Cuales son los aportes de la ecotoxicología a las regulaciones ambientales. *Ciencia e Investigación*, 65, 45-62.
- Radamass, K., Megharaj, M., Venkateswarlu, K. & Naidu, R. (2015). Ecological implications of motor oil pollution: earthworm survival and soil health. *Soil Biology and Biochemistry*, 85, 72-81.
- Repsol. (2007). *Ficha de datos de seguridad (conforme al DS 026-94-EM)*. Obtenido de http://www.repsol.com/pe_es/corporacion/complejos/refineria-la-pampilla/conoce_refineria_pampilla/productos_y_servicios/productos/
- Salanitro, J., Dorn, P., Huesemann, M., Moore, K., Rhodes, I., Rice, L.,

- Vipond, T.E., Western, M.M. & Wisniewski, H.L. (1997). Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environmental Science & Technology*, 31, 1759-1776.
- Sanchez-Hernandez, J.C. (2006). Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 188, 85-126.
- Schaefer, M., Peterson, S.O. & Filser, J. (2005). Effects of *Lumbricus terrestris*, *Allolobophora chlorotica* and *Eisenia fetida* on microbial community dynamics in oil-contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 2065-2076.
- Scott-Fordsmand, J. & Weeks, J. (2000). Biomarkers in earthworms. *Review of Environmental Toxicology*, 165, 117-159.
- Shukry, W., Al-Hawas, G., Al-Moaikal, R. & El-Bendary, M. (2013). Effect of petroleum crude oil on mineral nutrient elements, soil properties and bacterial biomass of the rhizosphere of jojoba. *British Journal of Environment and Climate Change*, 3, 103-118.
- Smith, B., Greenberg, B. & Stephenson, G. (2010). Comparison of biological and chemical measures of metal bioavailability in field soils. *Chemosphere*, 81, 755-766.
- Song, Y., Zhou, Q., Gong, P. & Sun, T. (2005). Ecotoxicity of soils contaminated with industrial and domestic wastewater in western Shenyang, China. *Science in China Series C: Life Sciences*, 48, 48-56.
- Spurgeon, J., Weeks, J. & Van Gestel, C. (2003). A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. *Pedobiologia*, 47, 558-606.
- Tas, J., Balk, F., Ford, R. & van de Plassche, E. (1997). Environmental risk assessment of musk ketone and musk xylene in the Netherlands in accordance with the EU-TGD. *Chemosphere*, 35, 2973-3002.
- Venkateswara Rao, J., Kavitha, P. & Pasmanabha, R.A. (2003). Comparative toxicity of tetra ethyl lead and lead oxide. *Environmental Research*, 92, 271-276.
- Wang, W., Lyons, D., Clark, N., Gautam, M., & Norton, P. (2000). Emissions from nine heavy trucks fueled by diesel and biodiesel blend without engine modification. *Environmental Science and Technology*, 34, 933-939.
- Weeks, J., & Comber, S. (2005). Ecological risk assessment of contaminated soil. *Mineral Management*, 69, 601-6013.
- Whitfield, M., Stephenson, G.L., Simpson, A.J. & Simpson, M.J. (2013). Comparison of earthworm responses to petroleum hydrocarbon exposure in age field contaminated soil using traditional ecotoxicity endpoint and H NMR-based metabolomics. *Environmental Pollution*, 182, 264-267.