

Evaluación de la toxicidad del Vitrofur® en agar sobre lombriz de tierra

Osmany Marrero Chang, Edisleidy Aguila Jiménez, Zoe Castañedo Hernández, Rosario Hernández Armengol, Alfredo Meneses-Marcel, Yuleiny Y Mederos Hurtado de Mendoza

Laboratorio de Toxicología, Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: omarrero@uclv.edu.cu

RESUMEN

El Vitrofur® es un aditivo utilizado para la esterilización química de los medios de cultivo en la propagación *in vitro* de plantas. Al término de su utilización se convierte en un desecho del proceso biotecnológico y es vertido a ambientes terrestres confinados. Sin embargo, se desconocen los posibles impactos ecotoxicológicos que pudiera producir. El objetivo de este trabajo fue determinar la toxicidad aguda sobre lombrices de tierra (*Eisenia foetida*) por exposición a los residuos del Vitrofur® en agar. Se evaluó el potencial tóxico de los residuos por exposición única a lombrices de tierra durante 14 días. Se expusieron lombrices por contacto e ingestión a una concentración que se corresponde con la máxima posible a obtener del lixiviado del residuo sólido del Vitrofur® en agar, después de 7 y 21 días de preparado. El número de animales muertos y la pérdida de masa corporal se cuantificaron y se describieron los signos tóxicos subletales. En los grupos experimentales no ocurrió mortalidad, solo se presentaron ligeras alteraciones morfológicas y fisiológicas no significativas con tendencia a disminuir en frecuencia en el grupo expuesto al lixiviado con 21 días de preparado. Similar respuesta fue observada en la evolución de la masa corporal. Los lixiviados del Vitrofur® en medio agarizado inducen ligeros efectos subletales en lombrices de tierra en función del tiempo de preparado y demuestran la ausencia de riesgo ecotoxicológico por exposición en dicha especie.

Palabras clave: bioensayo, *Eisenia foetida*, esterilización química, toxicidad

Toxicity evaluation of Vitrofur® residues in agar on earthworms

ABSTRACT

Vitrofur® is an additive used for the chemical sterilization of plant culture media in the *in vitro* propagation of plants. At the end of its use, it becomes a waste of the biotechnological process and is dumped into confined terrestrial environments. Nevertheless, the possible ecotoxicological impacts that could occur are unknown. The aim of this work was to determine the acute toxicity of earthworms (*Eisenia foetida*) by exposure to Vitrofur® residues on agar. The toxic potential of the waste was evaluated by single exposure to earthworms for 14 days. Worms were exposed by contact and ingestion at a concentration corresponding to the maximum possible to be obtained from lixivate of the solid residue of Vitrofur® on agar, after 7 and 21 days of preparation. The number of dead animals and the loss of body mass were quantified, and the sublethal toxic signs were described. In the experimental groups there was no mortality, only slight morphological and physiological alterations were observed with a tendency to decrease in frequency in the group exposed to the lixivates with 21 days of preparation. Similar response was observed in the evolution of body mass. The lixiviated Vitrofur® in agarized medium induce slight sublethal effects in earthworms a function of the preparation time and demonstrate the absence of ecotoxicological risk due to exposure in this specie.

Keywords: bioassay, chemical sterilization, *Eisenia foetida*, toxicity

INTRODUCCIÓN

El aumento de las producciones agrícolas y la industria constituye una necesidad a nivel mundial, sin embargo cada vez más se estimula que esto se logre de una forma más ecológica.

Para establecer criterios de riesgos en ecosistemas terrestres es indispensable tener en cuenta los organismos invertebrados. Los bioensayos con lombrices son reconocidos como prueba para evaluar la toxicidad de suelos contaminados. Cada vez existe mayor interés en el suelo como fuente de diversidad y es un hecho reconocido el papel de este organismo en la génesis y mejora del suelo. Las lombrices de tierra contribuyen a mantener la porosidad de los suelos y aumentan su fertilidad (Ramírez y Mendoza, 2008; Mancebo *et al.*, 2011; Gómez, 2014).

El género más utilizado ha sido *Eisenia* en sus especies *E. foetida* Savigny y *E. andrei* Bouché (Oligochaeta, Lumbricidae), de corto ciclo de reproducción, bien delimitadas filogenéticamente, cosmopolitas, de fácil manejo y crianza (Domínguez y Pérez-Losada, 2010).

El Vitrofur® es un aditivo químico obtenido por el Centro de Bioactivos Químicos (<http://www.cbq.uclv.edu.cu/es/producto/5/>) de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, que se utiliza para la esterilización de los medios de cultivo empleados en la propagación *in vitro* de plantas. Se ha comprobado en diferentes especies de plantas que este producto ofrece ventajas ya que al no tener que hacer uso de autoclaves representa beneficios en términos de ahorro energético, simplificación de operaciones, mayor estabilidad de los componentes del medio de cultivo y desarrollo de las plantas *in vitro* (Agramonte *et al.*, 1997; Quiala *et al.*, 2002; Orlikowska *et al.*, 2012).

En el proceso tecnológico de propagación *in vitro* de plantas, cuando concluyen los subcultivos, generalmente cada 21 días, los medios de cultivo se desechan. En algunos casos se depositan en excavaciones terrestres donde quedan contenidos.

Atendiendo a lo anterior se requiere evaluar el efecto ecotoxicológico que implica el vertimiento de estos desechos que contienen los residuos del aditivo químico. El objetivo de este trabajo fue determinar la toxicidad aguda sobre lombrices de tierra (*Eisenia foetida*) por exposición a los residuos del Vitrofur® en agar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios de toxicidad se realizaron en los laboratorios de Toxicología y Ecotoxicología del Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba. El presente estudio se realizó teniendo en cuenta las guías No. 207, de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD, 1984), y No. 850.3100 de la Agencia de Protección Medioambiental (EPA, 2012). Además, los ensayos fueron conducidos en concordancia con la Regulación 39/04 del MINSAP en Cuba (MINSAP, 2004).

Sustancia de ensayo

La sustancia de ensayo fue una mezcla compleja correspondiente a la fracción soluble obtenida a partir de residuos de Vitrofur® en agar, luego de 7 y 21 días de preparada y mantenida a 26 ± 2 °C y luz solar en cámara de crecimiento de plantas *in vitro*. El Vitrofur® fue suministrado por el CBQ lote: 14-4-6.

Se tomaron 100 g de Agar Bacteriológico (BioCen, lote: 450c110) y 116 mg l⁻¹ (35 mg l⁻¹ de principio activo) de Vitrofur® y se añadieron en un frasco con 2 litros de agua destilada estéril con pH 7.0. Se sometió a agitación mecánica durante 8 horas a 258 rpm a temperatura ambiente, protegido de la luz y tapado. Después de la agitación, el preparado se dejó reposar 16 horas para permitir la separación de las fases. Se utilizó el sobrenadante líquido y se filtró con papel de filtro Whatman No.3. El filtrado obtenido se utilizó como sustancia de ensayo.

Sustrato empleado en el ensayo

Se utilizó como sustrato natural un suelo Pardo con Carbonatos (Hernández *et al.*, 2015), certificado y caracterizado por el Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, con características químico-físicas adecuadas para la ejecución del ensayo.

Características de la instalación de experimentación

El ensayo se realizó en un local que garantizó una luminosidad de 400 – 800 lux en la superficie de los contenedores y 20 ± 2 °C (Gómez, 2014; ASTM E1676-12, 2012).

Sistema de ensayo

Se emplearon lombrices adultas (de más de 2 meses de edad) de la especie *E. foetida* con una masa corporal promedio entre 200 y 600 mg, purgadas previamente durante 24 horas (Gómez, 2014; Albornoz y Ortega, 2017) y procedentes del área de lombricultura del Instituto de Sanidad Vegetal. Las lombrices a incluir en el ensayo se seleccionaron aleatoriamente en función de su madurez (presencia de clitelo), masa y morfología para lograr homogeneidad en el biomodelo.

Se conformaron cuatro grupos experimentales (dos tratados y dos controles) con cuatro réplicas de 10 individuos cada una:

- Grupo tratado con el lixiviado obtenido de la sustancia de ensayo con 7 días de preparado (VA7D) y Grupo control con agua destilada estéril (C7D).
- Grupo tratado con el lixiviado obtenido de la sustancia de ensayo con 21 días de preparada (VA21D) y un grupo control con agua destilada estéril (C21D).

Para contener las lombrices se utilizaron frascos de polipropileno con tapas perforadas y capacidad de 500 ml, en los que se adicionaron 200 g de sustrato seco y triturado (4 mm). Dos días antes del inicio de los ensayos se analizó el pH y el contenido de humedad (ASTM E1676-12, 2012; Andrades *et al.*, 2015; Albornoz y Ortega, 2017). A partir de estos resultados se ajustó el contenido de humedad al 40% por masa de suelo, con la sustancia a ensayar o agua destilada, según el grupo experimental. Ambos líquidos se mezclaron manualmente con el sustrato por 15 min, y se dejaron reposar por 24 horas para lograr una humectación homogénea.

La sustancia de ensayo se administró de forma única por contacto directo con el sustrato y además por ingestión *ad libitum*, en régimen estático y condiciones controladas. El ensayo se extendió por 14 días y las lombrices no recibieron alimentación durante el estudio. Para mantener la humedad del sustrato se utilizó agua destilada, restituida en volúmenes adecuados por diferencia de peso de los contenedores.

Observaciones clínicas y determinaciones

Se realizaron observaciones en todos los contenedores a los 7 y 14 días. Se

contabilizaron los organismos vivos y los signos clínicos subletales observados por individuo, entre ellos, pérdida o reducción de movimiento, daños apreciables en la región del clitelo y presencia de abultamientos en diferentes áreas del cuerpo. Estas evaluaciones se realizaron por vaciamiento de los contenedores sobre una superficie y se observaron tanto la reacción de las lombrices ante un estímulo mecánico, como su estado físico. El peso corporal de las lombrices se registró al inicio y al final del ensayo. Se consideró válida la prueba si la mortalidad en el tratamiento control no excedió el 10% al final del período de exposición.

Eutanasia

Al finalizar el ensayo, los animales supervivientes fueron sacrificados mediante una atmósfera de $20 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ de CO_2 durante 15 minutos.

Análisis estadísticos

Para los dos grupos (Control y Tratado) se calculó el porcentaje de mortalidad las medias y desviaciones estándar de la masa corporal inicial y final. Asimismo, se compararon las masas de los grupos experimentales en cada tiempo. Para ello se empleó la prueba t de Student para muestras independientes una vez comprobada la normalidad en cada grupo (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (prueba de Levene). Los porcentos de lombrices con cambios fisiológicos o conductuales en cada grupo fueron comparados mediante la prueba de Z para dos proporciones. Todos los análisis se realizaron usando el programa STATISTICA versión 10.0.0. Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se consideraron válidas ambas pruebas pues no se presentó mortalidad en los dos grupos controles (7 y 21 días) y la disminución de la masa corporal promedio de las lombrices en cada uno fue de 11.8% (C7D) y 14.7% (C21D), respectivamente. Estos valores se encuentran dentro de los comprendidos en las normas internacionales que establecen como parámetro de invalidez una mortalidad en los grupos controles superior al 10% y un 30% de pérdida de masa corporal promedio (OECD, 1984; EPA, 2012).

En ambos grupos de tratamiento (7 y 21 días de preparado) no ocurrió mortalidad. Las lombrices solo mostraron ligeras alteraciones fisiológicas y conductuales. Los porcentajes no difirieron significativamente del correspondiente grupo control ($p > 0.05$). Además, se apreció una tendencia a la disminución de la frecuencia de aparición de algunas alteraciones en las lombrices expuestas al lixiviado con 21 días de preparado (Tabla 1).

La ocurrencia de dichas alteraciones pudiera asociarse con el *gozzo ácido* cuya causa se relaciona con un exceso o déficit de proteína en el alimento. Al ser digeridas ciertas proteínas por las enzimas que la lombriz posee en su sistema digestivo se eleva la producción de amonio, lo que conlleva a inflamaciones en todo el cuerpo, abultamiento de la zona clitelar, constricciones, disminución de la actividad y pueden morir a las pocas horas. También se debe esta alteración proteica a los cambios que pueden originar en el sustrato la presencia de ciertas sustancias (Cervantes y Mojica, 2003; Shunico, 2011), pero la evaluación final del pH del sustrato no evidenció alteraciones del rango establecido ($\text{pH } 6.5 \pm 0.5$).

No se presentaron en los grupos experimentales otras alteraciones como: disminución de la vitalidad, necrosis del clitelo, consistencia blanduzca, pérdida de sangre, hematomas, zonas de congestión y pérdida de color.

Las masas corporales iniciales de los 160 ejemplares oscilaron en el rango que

establece la guía (OECD, 1984) (Tabla 2). Sin embargo, hubo disminución de la masa final de las lombrices en todos los grupos de manera significativa ($p \leq 0.001$) respecto al inicial, excepto en el grupo tratado con el lixiviado de 7 días de preparado (VA7D) ($p = 0.6595$). Este comportamiento resulta lógico toda vez que las lombrices no fueron alimentadas durante todo el estudio y se mantuvieron a expensas de la materia orgánica presente en el sustrato inicial.

Con respecto al análisis comparativo de la masa corporal final de ambos grupos tratados (7 y 21 días de preparado el lixiviado) con sus respectivos controles (Tabla 2) se constató que no existieron diferencias significativas ($p = 0.9109$) en el caso del grupo de evaluación del Vitrofur® con 21 días de preparación. Este resultado contrasta con el análisis del grupo tratado con el mismo producto de 7 días de preparación ($p = 0.0416$) lo que demuestra la disminución de la discreta toxicidad del producto en estudio al término de la utilización de los medios de cultivo en las biofábricas. Además, está en correspondencia con la disminución de la incidencia de algunos efectos subletales anteriormente descritos.

El comportamiento de esta variable en el grupo tratado con el aditivo químico de 7 días de preparado (VA7D) pudo deberse a la presencia en mayor concentración de algunos productos de su degradación en el lixiviado que tienden a disminuir con el transcurrir del tiempo.

Tabla 1. Frecuencia de las observaciones clínicas y fisiológicas en lombrices de los grupos experimentales con lixivios de Vitrofur®.

Alteraciones fisiológicas y/o conductuales	7 días de preparado			21 días de preparado		
	Control (%)	Tratado (%)	p	Control (%)	Tratado (%)	p
Alteración del movimiento	12.5	2.5	0.1659	2.5	2.5	1
Inflamación del clitelo	0	2.5	0.3143	0	0	-
Ulceración del clitelo	0	5	0.3143	0	0	-
Desaparición o reducción del clitelo	25	27.5	0.7994	22.5	17.5	0.57
Constricciones y abultamientos	0	5	0.3143	0	0	-

$n = 40$, Nivel de significación para $p \leq 0.05$ mediante la prueba de Z para dos proporciones

Tabla 2. Análisis y comparación de la masa corporal inicial y final de *Eisenia foetida* expuesta a lixiviados de Vitrofur®.

Grupo	7 días de preparado				21 días de preparado			
	Masa corporal (mg)		Pérdida de masa corporal		Masa corporal (mg)		Pérdida de masa corporal	
	Inicial	Final	%	p	Inicial	Final	%	p
Control	0.328± 0.051a	0.289± 0.049b	11.8	<0.001	0.238± 0.033a	0.203± 0.029b	14.7	< 0.001
Tratado	0.325± 0.047a	0.318± 0.074a	1.9	0.6595	0.238± 0.037a	0.203± 0.033b	14.4	< 0.001
p	0.7391	0.0416			0.9953	0.9109		

n = 40, medias con letras diferentes difieren para un nivel de significación de $p < 0.05$ según la prueba *t* de Student

Los resultados de este trabajo están en correspondencia con los obtenidos por González (2014) en un ensayo de evaluación ecotoxicológica del bionemática HeberNem-S en este biomodelo durante 14 días. En dicho estudio se obtuvieron resultados similares en cuanto a la pérdida de en la masa corporal de los organismos, la cual osciló alrededor del 20% con respecto a la inicial y se le atribuyó a una respuesta adaptativa de las lombrices a un medio nuevo. Además, el cambio en el este parámetro en las lombrices de tierra adultas al inicio y término del estudio de ecotoxicidad es un comportamiento que según las guías EPA (2012) puede ocurrir en el grupo control de forma espontánea sin afectar la validez del estudio. Por tanto la pérdida de masa corporal en las lombrices no se asoció con un efecto ecotóxico del producto.

También se consideró que la ligera toxicidad del lixiviado en el biomodelo, pudo deberse a la relativa baja concentración del Vitrofur® en el medio inicial agarizado, 116 mg l⁻¹, y a la elevada dilución de dicho medio para obtener el lixiviado. Este proceso debe ocurrir en un medio natural donde se viertan los residuos tratados de medios de cultivo biotecnológicos de las biofábricas y por la ocurrencia de precipitaciones se generen elutriados.

Los resultados de este estudio contribuyen a potenciar el uso del Vitrofur®, como aditivo en los medios de cultivo para evitar la contaminación microbiana en la propagación *in vitro* de plantas. Hasta el presente solo se refiere para igual uso el PPM™ (*Plant Preservative Mixture*) registrado como

preservante y biocida de cultivos de plantas *in vitro*, pero la información relacionada no informa datos de estudios ecotoxicológicos (Plant Cell Technology, 2015).

CONCLUSIONES

Los efectos producidos por los lixiviados de Vitrofur® en agar sobre lombrices de tierra (*Eisenia foetida*) demuestran la ausencia de riesgo ecotoxicológico por exposición en dicha especie.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existió conflicto de intereses en la confección del manuscrito, con ninguna entidad financiadora o centros de investigación vinculados al estudio. El estudio fue realizado sin intereses económicos o algún tipo de presión de las instituciones vinculadas con los autores. Se declara la veracidad de los datos y resultados expuestos en el manuscrito.

REFERENCIAS

Albornoz AM, Ortega EM (2017) Evaluación de la eficiencia de la lombriz Roja Californiana *E. foetida* para estabilización de lodos residuales de la PTAR salitre. Tesis de grado en Ingeniería Ambiental, Universidad Santo Tomas de Aquino, Bogotá, Colombia

Agramonte D, Jiménez FA, Pérez M, Gutiérrez O, Ramírez D, Pérez J, Alvarado Y, Castañedo N, Díaz G, Martín E L, Salazar E, Machado R (1997) Empleo de sustancias de acción antimicrobiana en la esterilización de los medios de cultivo en la micropropagación de

- la papa (*Solanum tuberosum* L.). En: Centro de Bioplantas (ed) Técnicas de Avanzada Aplicadas a la Propagación Masiva de Plantas BIOVEG '97, Ciego de Ávila, 02-05/04/1997, pp. 121-122. Centro de Bioplantas, Ciego de Ávila
- Andrades M, Aramendía A, Masaguer A (2015) Prácticas de Edafología: métodos didácticos para el análisis de suelos. Editorial Universidad La Rioja, Logroño; ISBN: 978-84-608-5117-2
- ASTM E1676-12 (2012) Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the lumbricid earthworm *Eisenia foetida* and the enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ADTM International, West Conshohocken PA
- Cervantes CA, Mojica F (2003) Manual de Laboratorio de Edafología, Tercera Edición. Imprenta Nacional Heredia EUNA, Costa Rica; ISBN: 9977-65-083-7
- Domínguez J, Pérez-Losada M (2010) *Eisenia foetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché, 1972 are two different earthworm species. Acta Zoológica Mexicana 2: 321-331
- EPA (2012) Ecological Effects Test Guidelines OCSP 850 3100: Earthworm Subchronic Toxicity Test, EPA 712-C-016, USEPA Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. United States Environmental Protection Agency, Washington DC
- Gómez AP (2014) Evaluación de la toxicidad de suelos mediante un bioensayo con la lombriz de tierra *Eisenia foetida*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
- González Y (2014) Evaluación ecotoxicológica del bionemático HeberNem-S en lombriz de tierra. Tesis Máster en Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingeniería Química CUJAE, La Habana, Cuba
- Hernández A, Pérez J M, Bosch D, Castro N (2015) Clasificación de los suelos de Cuba 2015. Ediciones INCA, Cuba; ISBN: 978-959-7023-77-7
- Mancebo A, Estrada Ortiz J, González Triana C, González Torres Y, González Navarro B, Bada Barro AM (2011) Evaluación ecotoxicológica de dos derivados del Nim en lombriz de tierra y abejas. Revista de Toxicología 28 (2): 147-151
- MINSAP (2004) Buró Regulatorio para la Protección de la Salud Pública, Regulación 39/04, Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medioambiental, La Habana, Cuba
- OECD (1984) Organization for Economic Cooperation and Development Earthworm Acute Toxicity Tests, OECD Guideline for testing of Chemicals, Test no 207. OECD, Paris
- Orlikowska T, Zawadzka M, Azenkteler E, Sobiczewski P (2012) Influence of the biocides PPM™ and Vitrofur on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 87 (3): 223-230; doi: 10.1080/14620316.2012.11512856
- Quiala E, Jiménez E, de Feria M, Alvarado-Capó Y, Chávez M, Agramonte D, Ramírez D, Acosta-Suárez M, Pérez N, Capote A (2002) Empleo del Vitrofur en la esterilización química del endospermo artificial de los embriones somáticos encapsulados de *Saccharum* spp. híbrido var Cuba 87- 51. Biotecnología vegetal 2(4): 221-226
- Plant Cell Technology (2015) Plant Preservative Mixture (PPM) 100 Milliliters - Plant Cell Technology. Disponible en: <http://www.plantcelltechnology.com/ppm-msds>. Consultado 13/10/2016
- Ramírez P, Mendoza A (2008) Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo la experiencia en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología, México; ISBN: 978-968-817-882-9
- Shunico HM (2011) Evaluación de cuatro diferentes sustratos en la producción de vermiabono utilizando *Eisenia foetida* (lombriz roja californiana) en Cantón Cruz Grande, Izalco, Sonsonate. Tesis de grado en Licenciatura en Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, El Salvador, El Salvador

Recibido: 27-11-2017

Aceptado: 31-01-2018