

DOI: 10.24850/j-tyca-2024-06-09

Artículos

**Evaluación de la toxicidad aguda del IHPLUS® sobre el biomodelo indicador de calidad del agua: *Poecilia reticulata***

**Evaluation of the acute toxicity of IHPLUS® on the biomodel water quality indicator: *Poecilia reticulata***

Zoe Alicia Castañedo-Hernández<sup>1</sup>, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6537-4861>

Alfredo Meneses-Marcel<sup>2</sup>, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3168-4989>

Osmany Marrero-Chang<sup>3</sup>, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1508-6014>

Keylin Sotolongo-González<sup>4</sup>, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8339-2836>

Daniel Artiles-Martínez<sup>5</sup>, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2637-7661>

Liliet González Sierra<sup>6</sup>, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6066-232X>

<sup>1</sup>Centro de Bioactivos Químicos, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, [zoec@uclv.cu](mailto:zoec@uclv.cu)



<sup>2</sup>Centro de Bioactivos Químicos, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, ameneses@uclv.edu.cu

<sup>3</sup>Centro de Bioactivos Químicos, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, omarrero@uclv.edu.cu

<sup>4</sup>Centro de Bioactivos Químicos, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, krsotolongo@uclv.cu

<sup>5</sup>Hospital "Arnaldo Milián", Santa Clara, Villa Clara, Cuba, danielart@infomed.sld

<sup>6</sup>Estación Experimental "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba, liliet.gonzalez@ihatuey.cu

Autora para correspondencia: Zoe Alicia Castañedo-Hernández, zoec@uclv.cu

## Resumen

La agricultura convencional depende de la aplicación de fertilizantes con el fin de lograr mayores rendimientos; sin embargo, es necesario encontrar un equilibrio entre sus beneficios y las alteraciones que pudieran producir a los ecosistemas. Organizaciones internacionales regulan su uso y comercialización teniendo en cuenta la eficacia y seguridad. IHPLUS<sup>®</sup>, producido por la Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey" (Cuba), ha mostrado ser efectivo en diferentes cultivos y es objeto en este estudio evaluar los efectos sobre la calidad del agua en el bioindicador *Poecilia reticulata*. Los peces fueron expuestos al producto, en régimen estático durante 96 h, a la concentración efectiva

en la agricultura (6 %) o diluido hasta  $10^6$  UFC/ml según recomienda la EPA OPPTS 885.4000. Asimismo, se incluyó un grupo tratado con el producto al 6 %, pero esterilizado y un grupo control que no recibió tratamiento alguno. Se observaron durante 30 días posinoculación y se evaluó el peso, la mortalidad y otros efectos subletales. Posteriormente, se determinó la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) y la influencia del pH sobre la mortalidad de los peces. Se pudo comprobar que al 6 % provocó eventos clínicos adversos y efecto letal en el biomodelo. Las lesiones histopatológicas se corresponden tanto para el producto activado como para el inactivado. La  $CL_{50}$  fue de 3.19 %, asociándose la toxicidad al pH ácido y no a la carga microbiana presente en el bioproducto. Se concluye que IHPLUS® es seguro para *Poecilia reticulata* a concentraciones inferiores al 3 %.

**Palabras clave:** bioproductos, ecotoxicología, microorganismos eficientes, pez guppy.

## Abstract

Conventional agriculture depends on the application of fertilizers in order to achieve higher yields; however, it is necessary to strike a balance between their benefits and the alterations they may cause to ecosystems. International organizations regulate their use and commercialization taking into account their efficacy and safety. IHPLUS®, produced by the Experimental Station of Pastures and Forages "Indio Hatuey" (Cuba), has shown to be effective in different crops and the purpose of this study is to evaluate the effects on water quality in the bioindicator *Poecilia reticulata*. The fish were exposed to the product, in a static regime for 96

h, at the concentration effective in agriculture (6 %) or diluted to  $10^6$  CFU/mL as recommended by EPA OPPTS 885.4000. A group treated with the 6 % product but sterilized and a control group that received no treatment were also included. They were observed for 30 days post-inoculation and weight, mortality and other sublethal effects were assessed. Subsequently, the mean lethal concentration ( $LC_{50}$ ) and the influence of pH on fish mortality were determined. It was found that at 6 % it caused adverse clinical events and lethal effect in the biomodel. The histopathological lesions corresponded for both the activated and inactivated products. The  $LC_{50}$  was 3.19 %, the toxicity being associated to the acid pH and not to the microbial load present in the bioproduct. It is concluded that IHPLUS® is safe for *Poecilia reticulata* at concentrations below 3 %.

**Keywords:** Bioproducts, ecotoxicology, efficient microorganisms, guppy fish.

Recibido: 23/02/2022

Aceptado: 18/08/2023

Publicado Online: 07/09/2023

## Introducción

El equilibrio adecuado de los ecosistemas acuáticos y terrestres del planeta es la clave para el desarrollo económico y social de la especie humana. Una de las necesidades vitales del ser humano es la alimentación, por lo que la producción de alimentos en cantidades suficientes se ha convertido en un desafío para el sector de la agricultura. Los fertilizantes a partir de productos químicos y biológicos se han empleado como instrumentos para lograr este fin; sin embargo, es importante tener en cuenta que una parte de ellos son absorbidos por las plantas, pero otra es retenida por el suelo y transportada a las aguas subterráneas por lixiviación, lo que podría tener repercusiones en la salud humana.

La Organización de la Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO, 2019) aboga por el desarrollo de una agricultura sostenible con un uso mínimo de productos químicos, que desequilibran el medio ambiente y causan daños a la salud; promueve el empleo de biofertilizantes, cuyos efectos superan las deficiencias asociadas con las técnicas agrícolas basadas en productos químicos (Maçik, Gryta, & Fraç, 2020). En su composición están presentes microorganismos como bacterias o rizobacterias, promotores del crecimiento vegetal; pero no todas son biofertilizantes (Riaz *et al.*, 2021) y el mal uso de éstos puede traer como consecuencias la aparición de patógenos que dañen el medio ambiente (Santillán, 2016). En su Código Internacional de Conducta para el Uso y Manejo de Fertilizantes, la FAO aborda la necesidad de evaluar la efectividad e inocuidad de éstos para los seres vivos, con el objetivo de limitar la emisión de contaminantes en el origen o interceptarlos antes de

que lleguen a los ecosistemas vulnerables (FAO, 2019). La ecotoxicología acuática es una herramienta destinada a evaluar la identidad, concentración y efectos tóxicos de productos en los ecosistemas acuáticos dulceacuícolas y marinos, mediante el empleo de bioensayos (Sudha & Baskar, 2017). *Poecilia reticulata* es una de las especies de peces de agua dulce recomendada por la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD, 2019) como organismo de prueba, representativo de consumidores secundarios en ecosistemas de agua dulce. Los efectos tóxicos observados en ellos son fáciles de comprender e interpretar, pues son organismos vertebrados representantes de otros de mayor complejidad (Ramírez & Mendoza, 2008).

La Estación Experimental de Pastos y Forrajes (EEPF) “Indio Hatuey” de la provincia de Matanzas, Cuba, ha desarrollado el bioproducto IHPLUS<sup>®</sup>, cuyo potencial biofertilizante se basa en la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar nutrientes insolubles como fosfato, descomponer residuos orgánicos, suprimir el crecimiento de patógenos del suelo, degradar tóxicos como pesticidas, reciclar e incrementar la disponibilidad de nutrientes y producir otras moléculas orgánicas simples que estimulan el crecimiento de las plantas (Díaz-Solares *et al.*, 2020). Estas cualidades han demostrado su efectividad en diferentes cultivos, sin embargo, no existen elementos sobre la seguridad medioambiental del producto y los posibles efectos que puedan tener en las fuentes de agua y sobre los organismos que viven en estas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad aguda del IHPLUS<sup>®</sup> sobre el indicador de calidad ambiental *Poecilia reticulata* (pez guppy).

## Materiales y métodos

### Ensayo de toxicidad aguda

Se realizaron las pruebas de toxicidad aguda al bioproducto IHPLUS® en los laboratorios de toxicología del Centro de Bioactivos Químicos, Cuba. Para realizar este estudio se emplearon las guías correspondientes de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) No. 203, 2019, y de la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) No. 850.1075, 2016 y No. 885.2000, 2009 (EPA, 2009a; EPA, 2009b).

### Bioproducto

El IHPLUS® (IH-19-02) fue suministrado por la Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba. Se cuantificó la presencia de microorganismos mediante el método de recuento de colonias en placa, lo que se tomó como punto de partida para preparar las concentraciones de las soluciones de estudio.

### Biomodelo

Se utilizaron como organismos de prueba juveniles de ambos sexos (aproximadamente 1.5 meses) de *Poecilia reticulata*. Se seleccionaron especímenes con buen estado de salud y se adaptaron durante siete días a las condiciones del ensayo: peceras de 5 l de capacidad de agua; sistema de luz artificial (de 900 a 1 000 lx de intensidad); ciclo de 12 h de luz-12 h de oscuridad; sistema de aireación para lograr una

concentración de oxígeno disuelto superior al 60 %, y temperatura del agua entre 23 y 25 °C. Se alimentaron diariamente con pienso para peces ornamentales, producido y certificado por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorios, Cuba.

### Grupos experimentales

Se pesaron los especímenes de *Poecilia reticulata* con una balanza analítica marca Sartorius. Aquellos que cumplieron con la condición de que el peso del mayor no duplicó el del menor se distribuyeron de forma aleatoria en cuatro grupos experimentales con diez individuos, y tres réplicas cada uno:

- **Grupo 1 (control):** peceras con agua de mantenimiento de calidad para la especie.
- **Grupo 2 (inactivado):** peceras con suspensión de IHPLUS® al 6 % inactivado por esterilización durante 1 h, en autoclave (Hirayama, Barcelona, España) durante 1 h a 121 °C.
- **Grupo 3 (6 %):** peceras con suspensión de IHPLUS® al 6 % (concentración efectiva en la agricultura).
- **Grupo 4 (10<sup>6</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>):** peceras con suspensión de IHPLUS® a una concentración de microorganismos ajustada a 10<sup>6</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> (concentración recomendada por la guía EPA 885.4000).

Para que el ensayo se considerara válido, la mortalidad en el grupo control no pudo superar el 10 % y la concentración de oxígeno disuelto debió ser superior al 60 %.

La sustancia de ensayo se administró por adición al agua de mantenimiento de los peces, que permanecieron durante 96 h en régimen estático. Posteriormente, se sustituyó el 80 % del volumen por agua fresca cada 48 h, realizándose determinaciones de las propiedades químico-físicas (conductividad, pH, oxígeno disuelto).

Los ejemplares se observaron durante las primeras cuatro horas de exposición y cada 24 h durante los siguientes 30 días. Al final del experimento, se determinó la mortalidad acumulada para cada grupo. Las variables clínicas que se midieron fueron las siguientes: pérdida de equilibrio, cambios en la actividad locomotora y natatoria, función respiratoria, pigmentación, cambios en el comportamiento alimentario, excitabilidad, letargo y mortalidad.

Se cuantificaron los pesos inicial y final de los peces. Se determinó la normalidad de la distribución de los valores (prueba de Shapiro-Wilk) al principio y al final de la prueba, así como la homogeneidad de la varianza (prueba de Levene). Finalmente, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar los pesos corporales de todos los grupos al inicio del estudio y la prueba U de Mann-Whitney para comparar el peso corporal de los peces pertenecientes a los dos grupos que llegaron al final de la prueba. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico Statistica (versión 10) y se consideraron significativos los valores de  $p$  inferiores a 0.05.

La viabilidad de las bacterias y los hongos en el agua se evaluó inmediatamente después de añadir IHPLUS<sup>®</sup> a las peceras, primero a las 96 h y 30 días después. Para ello, se utilizó el método estándar de dilución en placa.

Los peces que murieron durante las primeras cuatro horas de la prueba se recogieron para realizar estudios histopatológicos. Los supervivientes al final de la prueba fueron sacrificados mediante el método de punción cerebral con inserción de una aguja de calibre 27 en el foramen magnum hasta la base del cerebro para producir una rápida destrucción del sistema nervioso central. La toma de muestras de tejido, la fijación, la incrustación, el corte y la tinción se realizaron según lo descrito por Megías, Molist y Pombal (2018).

### **Estimación de la concentración letal al 50 % (CL<sub>50</sub>)**

Se realizó un segundo experimento para estimar la CL<sub>50</sub> de IHPLUS®. Se formaron cinco grupos experimentales en un rango de concentración del 3-3.7 % (factor de dilución en serie de 1:1.053). También se incluyó un grupo control sin tratamiento. La CL<sub>50</sub> se determinó por ajuste de curva sigmoidea no lineal, según la ecuación descrita por Serrano (2003):

$$M(\%) = \frac{100 * C^n}{(C^n + LC_{50}^n)}$$

Donde:

$M(\%)$  = mortalidad acumulada observada a una determinada concentración (C)

$CL_{50}$  = concentración estimada que produce el 50 % de mortalidad

$n$  = pendiente de la región central de la curva sigmoidea

Con el valor obtenido de este parámetro se clasificó la sustancia según su peligrosidad para el medio ambiente acuático, teniendo en cuenta las categorías que el sistema de clasificación armonizado establece para este tipo de estudio (Naciones Unidas, 2015) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Categorías para la clasificación de sustancia peligrosas para el bioindicador acuático: peces.

Categorías	Rango normado
Aguda 1	$\leq 1 \text{ mg.l}^{-1}$
Aguda 2	$> 1$ , pero $\leq 10 \text{ mg.l}^{-1}$
Aguda 3	$> 10$ , pero $\leq 100 \text{ mg.l}^{-1}$

## Efecto de la acidez de IHPLUS® en la supervivencia de los peces

Se utilizó una solución de hidróxido de sodio 0.1 N (Merck) para ajustar el pH de las soluciones de agua de IHPLUS® (EPA, 2016), para lo que se conformaron los siguientes grupos:

- **Grupos 1 a 4:** como se describe anteriormente en la prueba de toxicidad aguda.
- **Grupo 5:** los peces fueron expuestos a IHPLUS® inactivado por calor al 6 % (como se describió anteriormente); pero el pH se ajustó a 7.
- **Grupo 6:** los peces fueron expuestos a IHPLUS® al 6 % disuelto en agua, pero el pH se ajustó a 7.

## Resultados y discusión

Las acciones de los seres humanos afectan ostensiblemente a un sinnúmero de ecosistemas acuáticos, modificando la evolución natural de los mismos en diferentes escalas. Uno de los instrumentos de evaluación corresponde al uso de indicadores biológicos para monitorear la salud o la integridad de los ecosistemas acuáticos. Así, la OECD (2019) recomienda utilizar al pez *Poecilia reticulata*. Al exponer este biomodelo al producto IHPLUS® se obtuvieron los siguientes resultados.

Las pruebas de toxicidad se consideraron válidas al no existir mortalidad en los grupos controles. El agua que se utilizó para los ensayos tuvo un nivel de saturación de oxígeno de  $61.8 \pm 0.59$  % a 25 °C, por lo cual cumple con los requisitos de la EPA (2016) y la OECD (2019).

### Ensayo de toxicidad aguda

El peso inicial de los peces cumplió con las exigencias de las agencias regulatorias (EPA, 2016; OECD, 2019), donde el peso del mayor no duplicó el del menor (de 0.019 a 0.037 g). También se cumplió con el requisito de no sobrepasar los 0.8 g de peso vivo por litro de agua (promedio =  $0.052 \text{ g.l}^{-1}$ ). Al aplicar la prueba de Shapiro-Wilk, no todos los grupos tuvieron distribución normal y según la prueba de Kruskal-Wallis no hubo diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) entre los cuatro grupos evaluados, lo que permitió demostrar la similitud de los pesos de los peces en los distintos grupos.

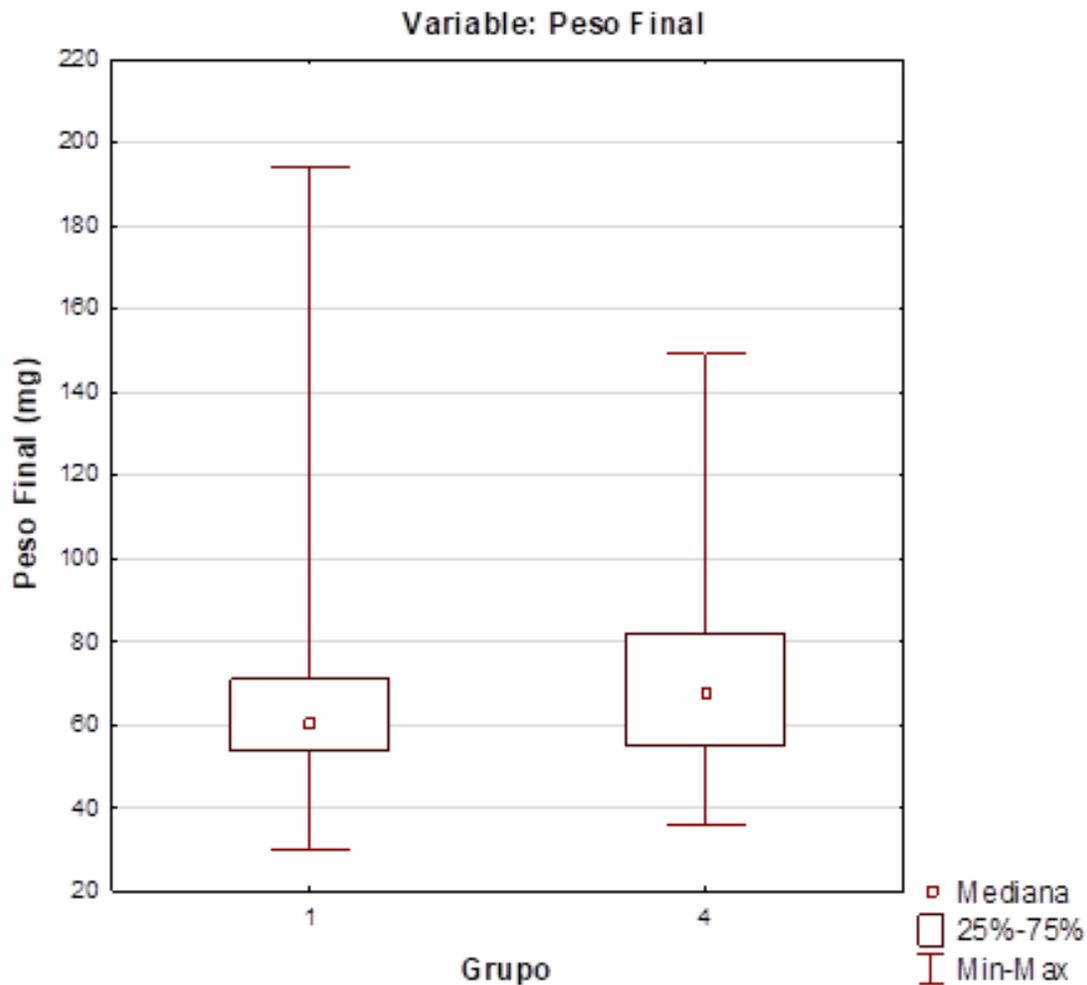
En las primeras 4 h de exposición al bioproducto a una concentración del 6 % (grupos 2 y 3), se observaron cambios conductuales (síntomas de hiperexcitación, nado errático, movimientos letárgicos con flexión lateral, parálisis de las aletas, despigmentación y descamación de la piel). Antes de las 96 h se produjo un 100 % de mortalidad de *Poecilia reticulata* en los grupos 2 y 3.

Al relacionar los parámetros físico-químicos (Tabla 2), se observó que el oxígeno disuelto en las suspensiones del grupo 3 se comportó por debajo de los niveles requeridos para la especie ( $5 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Abdallah, Thomas y Jonz (2015) plantean que esta variable no interfiere de manera significativa en la supervivencia de la familia *Poeciliidae*, dado que utilizan la respiración acuática en la interfaz aire-agua para satisfacer la demanda de oxígeno en el agua hipóxica. Los peces que estuvieron en contacto con las suspensiones del bioproducto al 6 % aumentaron la excitabilidad y la frecuencia de toma de aire en la superficie. En cambio, los bajos valores de pH de las suspensiones del IHPLUS® (grupos 2 y 3) pudieron influir en la subsistencia de la especie. Al respecto, Henrique, Araújo, John y Rantin (2018) plantean que una reducción en el pH puede conducir a una acidosis respiratoria que compromete la absorción de  $\text{O}_2$ , influyendo en varios procesos fisiológicos en los peces, incluido el intercambio de gases respiratorios y la excreción de desechos nitrogenados.

**Tabla 2.** Comportamiento de parámetros físico-químicos de las suspensiones del IHPLUS® frente a *P. reticulata*.

Núm.	Grupo	pH	Conductividad ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )	Oxígeno disuelto ( $\text{mg.l}^{-1}$ )
1	Control	7.75±0.04	140.27±21.56	5.03±0.03
2	Inactivado: 6 %	4.33±0.06	715.39±25.26	5.11±0.04
3	Tratado: 6 %	4.31±0.04	702.95±18.13	2.46±0.05
4	Tratado $10^6$ UFC.ml <sup>-1</sup>	7.16±0.06	205.59±5.95	5.00±0.03

Los peces del grupo control (grupo 1) y los expuestos al producto con recuento de microorganismos  $10^6$  UFC.ml<sup>-1</sup> (grupo 4) mostraron un comportamiento normal durante todo el tiempo del estudio. Al finalizar el ensayo (Figura 1) no existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.239$ , Prueba U de Mann-Whitney) entre los pesos de los peces controles (grupo 1) y de los tratados con el producto ajustado a  $10^6$  UFC.ml<sup>-1</sup> (grupo 4).



**Figura 1.** Comportamiento del peso de los peces al final del ensayo.

En los muestreos realizados para determinar la carga microbiana durante el ensayo (Tabla 3), se aislaron microorganismos en todos los grupos a las 96 h de exposición. Dichos aislamientos deben proceder del producto de prueba y de la propia flora de los peces.

**Tabla 3.** Carga microbiana (UFC.ml<sup>-1</sup>) en los diferentes grupos en el ensayo.

No.	Inicio (tiempo cero)			96 horas			30 días		
	B	H	L	B	H	L	B	H	L
1	0	0	0	1.4x10 <sup>3</sup>	0.9x10 <sup>3</sup>	0	1.02x10 <sup>3</sup>	0.7x10 <sup>3</sup>	0
2	0	0	0	2.1x10 <sup>4</sup>	0.7x10 <sup>3</sup>	0	-	-	-
3	2.1x10 <sup>9</sup>	9.8x10 <sup>6</sup>	7.5x10 <sup>4</sup>	5.2x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>7</sup>	8.2x10 <sup>4</sup>	-	-	-
5	0	0	0	1.8x10 <sup>4</sup>	4.7x10 <sup>3</sup>	0	3.1x10 <sup>5</sup>	1.03x10 <sup>3</sup>	0
6	2.7x10 <sup>10</sup>	2.85x10 <sup>6</sup>	9x10 <sup>4</sup>	2.9x10 <sup>10</sup>	3.0x10 <sup>3</sup>	1.2x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>7</sup>	2.8x10 <sup>3</sup>	2.09x10 <sup>4</sup>

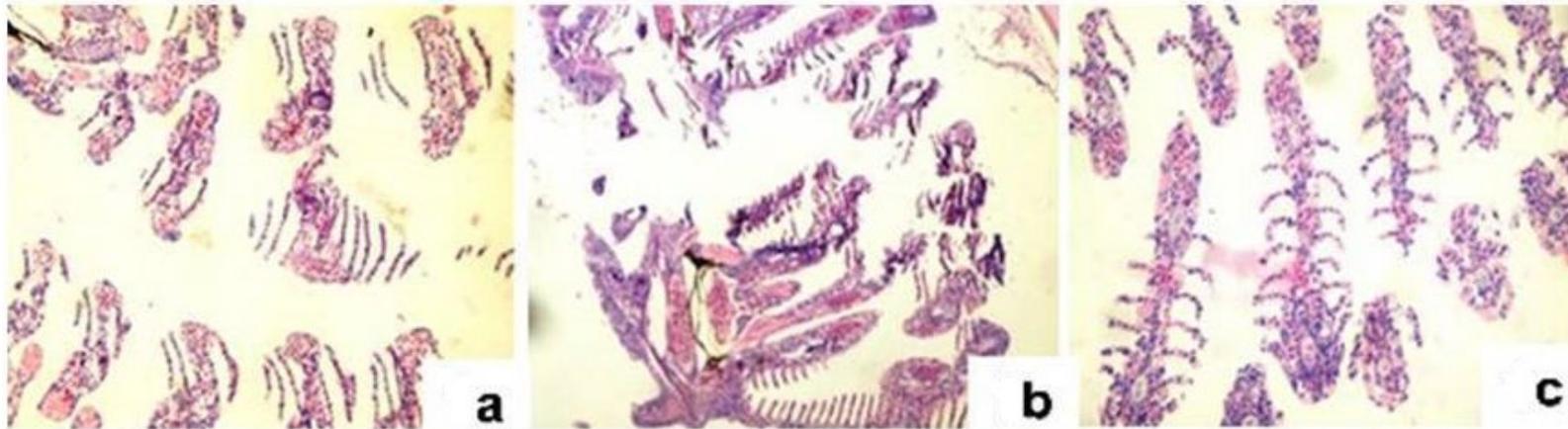
B: bacterias; H: hongos; L: levaduras; -: no realizado. Grupos con 100 % de mortalidad a las 96 horas.

Los peces muertos (grupos 2 y 3) durante el ensayo de toxicidad aguda presentaron lesiones macroscópicas a nivel de la piel con descamación y pérdida de pigmentación. En los análisis microscópicos a los cortes histológicos se observaron los siguientes hallazgos.

## Branquias

Al analizar histológicamente las branquias en los peces expuestos al producto IHPLUS® (grupos 2 y 3) se observó fragmentación y destrucción de las laminillas branquiales, así como congestión de los filamentos, con presencia de necrosis y daños severos (Figura 2a, b). Por el contrario, los utilizados como control (Figura 2c) mantuvieron una estructura branquial normal. El análisis de la histología de este órgano constituye una

herramienta valiosa para evaluar la salud de los ecosistemas (Santos et al., 2019).

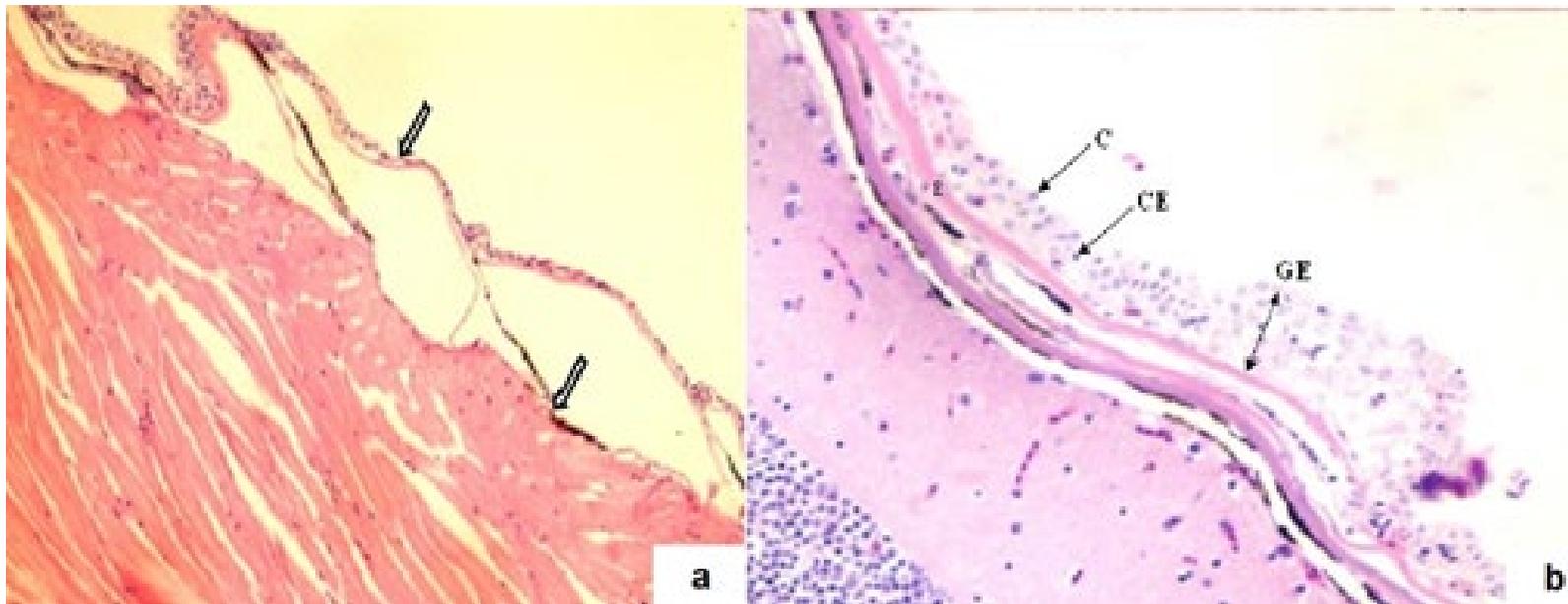


**Figura 2.** Branquias en peces expuestos a IHPLUS® 6 %. Tinción de hematoxilina-eosina 60×: 2a) daños en filamentos y lámelas branquiales de *P. reticulata* expuestos a IHPLUS® 6 %; 2b) necrosis y aumento de basofilia en laminillas primarias y secundarias en peces expuestos a IHPLUS® 6 % inactivado, presencia de congestión en los vasos sanguíneos; 2c) aspecto normal en peces utilizados como control.

## Piel

Los peces expuestos al bioproducto IHPLUS® mostraron alteraciones macroscópicas en la disposición anatómica de las escamas, y los estudios histológicos demostraron pérdida de células mucosas y epiteliales, así como desprendimiento y separación de la epidermis de la dermis (Figura 3a). Palacios, Sandoval, Bueno y Manchego (2015) aseveran que cuando

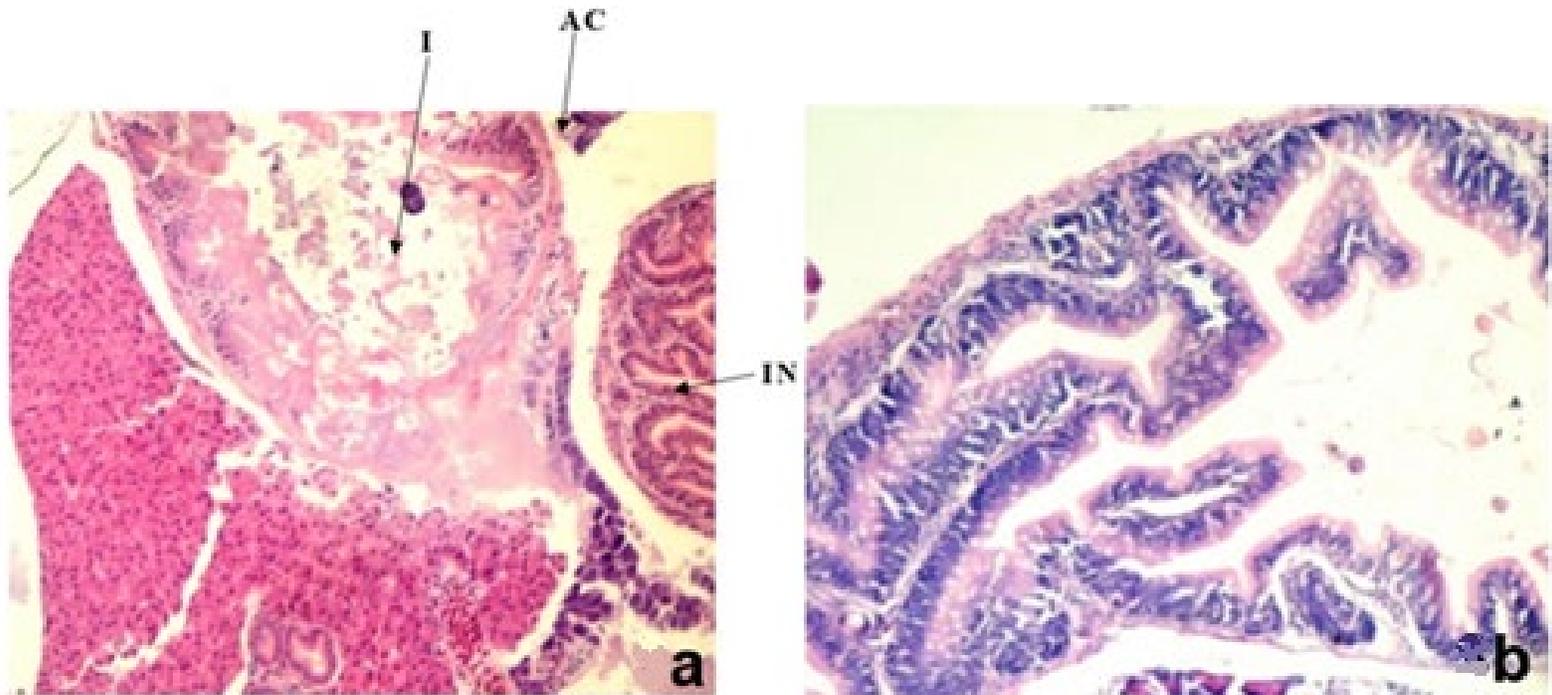
la piel es afectada por agentes externos, se producen lesiones similares a las encontradas en los peces del grupo tratado de nuestro estudio.



**Figura 3.** Piel en peces expuestos a IHPLUS® 6 %. Tinción de hematoxilina-eosina. 600×: 3a) lesiones de la piel con desprendimiento y separación de la epidermis de la dermis (flechas) 150×; 3b) aspecto normal de la piel de *P. reticulata* grupo control. C: células mucosas; CE: células epiteliales; GE: grosor de la epidermis; E: escamas.

## Intestino

Los peces muertos pertenecientes a los grupos tratados con IHPLUS® y el producto inactivado presentaron lesiones en la mucosa del intestino, por lo que es evidente el daño ocasionado por la ingestión de la sustancia. Estas lesiones descritas en la Figura 4a **no se observaron en el grupo control.**

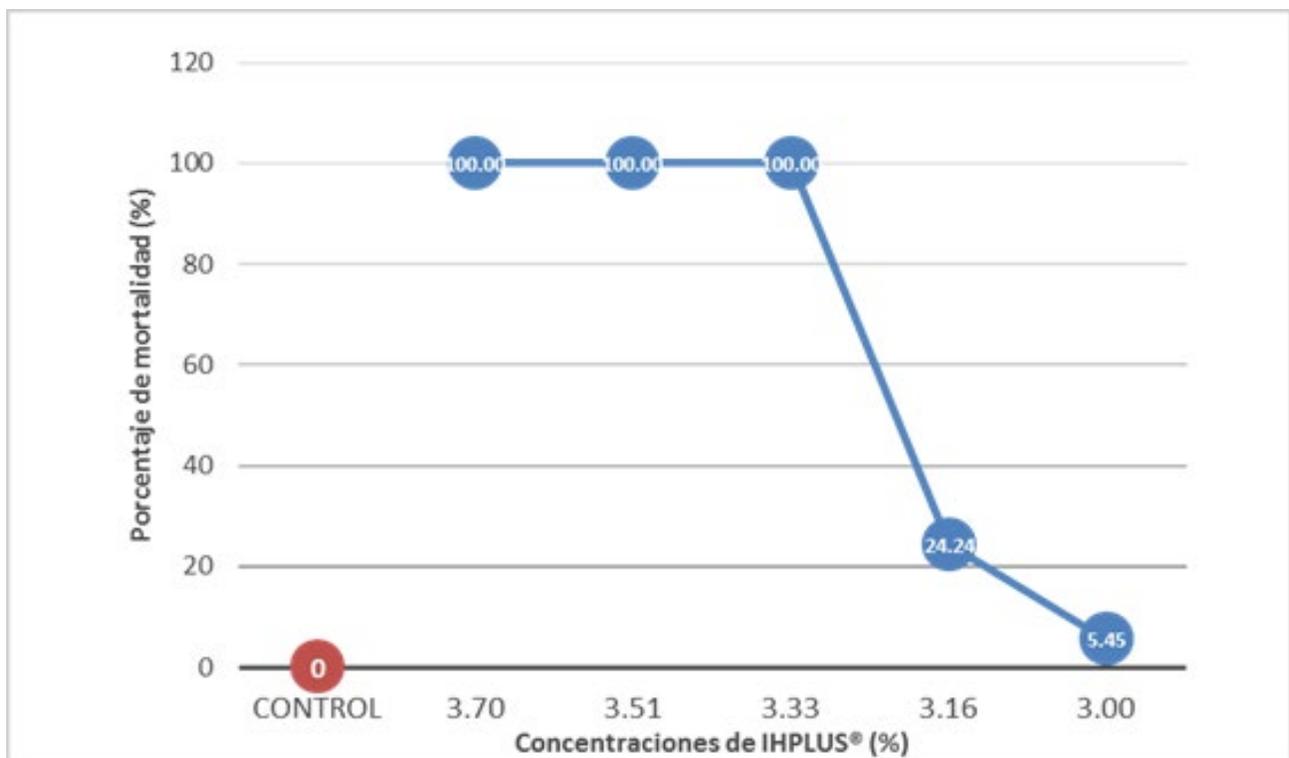


**Figura 4.** Intestino de peces expuestos a IHPLUS® 6 %. Tinción hematoxilina y eosina 600×: 4a) lesiones en intestino de *P. reticulata* tratados con IHPLUS®. I: área de intestino dañado con destrucción total de la mucosa; AC: pequeñas áreas de conservación de la mucosa en porción de intestino dañado; IN: área de intestino normal; 4b) intestino normal en *P. reticulata*. Grupo control.

La escasa información científica sobre el tema habla de la poca importancia que se le da por la comunidad científica internacional a esta parte de anatomía de los peces; sin embargo, los resultados demuestran que se pueden producir daños importantes a nivel intestinal por la acción de contaminantes acuáticos.

## Determinación de la CL<sub>50</sub>

En el ensayo de toxicidad aguda, la concentración del 6 % produjo un 100 % de mortalidad, por lo que se realizó un gradiente de concentraciones a partir del 3.7 % del bioproducto IHPLUS®. En concentraciones iguales o superiores al 3.33 % se observó un 100 % de mortalidad, comportándose con estrecho margen entre la concentración entre los límites superior e inferior en términos de concentraciones letales. Según estos resultados (Figura 5), la CL<sub>50</sub> estimada del IHPLUS® frente a *P. reticulata* a las 96 h de exposición fue de 3.19 % (31 900 mg/l).



**Figura 5.** Comportamiento de la mortalidad de los peces *P. reticulata* expuestos al IHPLUS®.

Teniendo en consideración los resultados obtenidos en el experimento y de acuerdo con el sistema de clasificación para peligros a corto plazo (agudo) para el medio ambiente acuático (Naciones Unidas, 2015), el producto IHPLUS® no puede ser clasificado dentro de las categorías propuestas debido a que el valor de la CL<sub>50</sub> resultó muy superior a los niveles de categorías de peligro, los que clasifican a la sustancia hasta 100 mg/l y en nuestro caso dicha determinación resultó 31 900 mg/l.

### **Efecto de la acidez de IHPLUS® en la supervivencia de los peces**

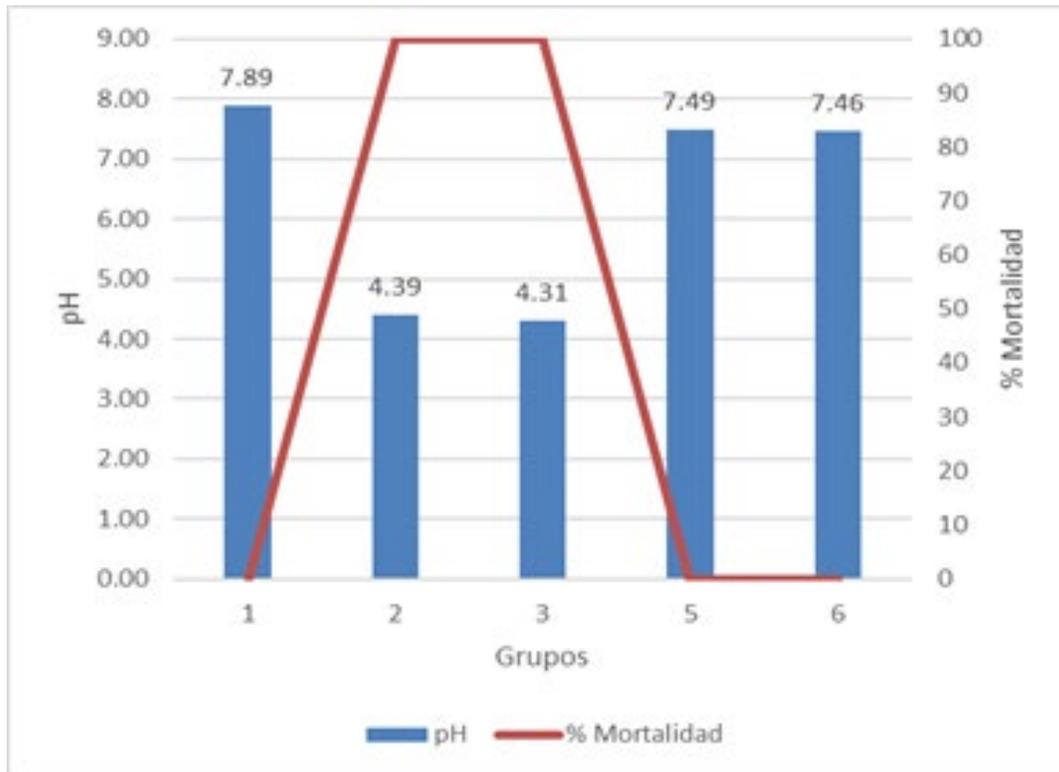
Los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad aguda demostraron que la toxicidad del producto se mantiene tanto por exposición a la microflora en evaluación (grupo 3) como a los metabolitos y desechos del proceso de fermentación que continúan ocurriendo de forma natural en el biopreparado (grupo 2). Sin embargo, el pH del agua de las peceras de estos grupos experimentales se encontraba en valores ácidos. *P. reticulata* vive satisfactoriamente en un intervalo de pH de 6 a 8. Varios autores plantean que cuando los peces se exponen a medios de mantenimiento con pH ácido se ocasionan daños a los filamentos de las branquias, produciendo una lesión aguda con disfunción respiratoria y muerte (Pardo, Suárez, & Pertuz, 2009; Urku, 2020). Teniendo en cuenta

estos hallazgos, se realizó un tercer experimento (grupos 5 y 6), donde se ajustó el pH a las suspensiones de IHPLUS 6 % (Tabla 4).

**Tabla 4.** Comportamiento del pH en las suspensiones de IHPLUS 6 % ajustadas.

Grupos núm.	pH	Tiempo				
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
5	7.49 ± 0.08	7.53	7.43	7.37	7.57	7.53
6	7.46 ± 0.12	7.53	7.57	7.27	7.47	7.47

Al término del tiempo de exposición se encontraban vivos el 100 % de los peces (Figura 6) y mantuvieron sus características fisiológicas normales.



**Figura 6.** Relación del efecto del pH sobre la mortalidad en *P. reticulata*.

Los efectos detectados del IHPLUS® sobre el bioindicador de calidad del agua *P. reticulata* pueden ser minimizados en su forma de uso. Este producto centra su empleo en el control de plagas en la agricultura, por lo que debe presentar un arrastre y disolución por la lluvia y/o riego, lo que hace que a las corrientes de agua no lleguen a la concentración que causa daño letal a los peces. Además, el proceso de lixiviación, a través del suelo, proporciona un aumento del pH debido a que varios minerales presentes en éste ayudan a amortiguar los cambios en el pH cuando un ácido o base es agregado (Ng *et al.*, 2022). Se pueden sugerir estudios de campo para evaluar el impacto del modo de uso.

## Conclusiones

Bajo las condiciones de ensayo, el bioproducto IHPLUS® resultó seguro para el indicador de calidad ambiental *Poecilia reticulata* a concentraciones inferiores del 3 %.

## Referencias

Abdallah, J. S., Thomas, B. S., & Jonz, G. M. (2015). Aquatic surface respiration and swimming behavior in adult and developing zebrafish exposed to hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, 218, 1777-1786.

EPA, Environmental Protection Agency. (2009a). *Microbial pesticide test guidelines: OPPTS 885.2000 background for residue analysis of microbial pest control agents (EPA 712-C-96-328)*. Recuperado de <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0159-0028>

EPA, Environmental Protection Agency. (2009b). *Microbial pesticide test guidelines: OPPTS 885.4000 background for nontarget organism testing of microbial pest control agents (EPA 712-C-96-328)*. Recuperado de <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0159-0028>

EPA, Environmental Protection Agency. (2016). *Fish acute toxicity test, freshwater and marine. United States Environmental Protection Agency. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101) (EPA OPPTTS. 850.1075)*. Recuperado de <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0154-0035>

Díaz-Solares, M., Martín-Martín, G., Taymer, F., Fonte, L., Lamela-López, L., Montejo-Sierra, I., Esquijerosa, Y., Ojeda-García, F., Medina-Salas, R., Ramírez, W., Lezcano-Fleires, J., Pentón, G., Peter-Schmith, H., Alonso-Amaro, O., Catalá-Barranco, R., & Milera-Rodríguez, M. (2020). *Obtención y utilización de microorganismos nativos: el bioproducto IHPLUS®. Proyecto Biocarbono. Cuba*. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/339916260>

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2019). *Código Internacional de Conducta para el Uso y Manejo de Fertilizantes*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Henrique, L., Araújo, V., John, D., & Rantin, T. (2018). Control of air-breathing in fishes: Central and peripheral receptors. *Acta Histochemica*, 120(7), 642-653.

Maçik, M., Gryta, A., & Fraç, M. (2020). Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Advances in Agronomy*, 16, 31-87.

- Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. (2018). *Técnicas histológicas. TINCIÓN. Atlas de Histología Vegetal y Animal*. Vigo, España: Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Universidad de Vigo.
- Naciones Unidas. (2015). *Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA) (6ª ed.)*. Nueva York, EUA, y Ginebra, Suiza: Naciones Unidas.
- Ng, J. F., Ahmed, O. H., Jalloh, M. B., Omar, L., Kwan, Y. M., Musah, A. A., 6 Poong, K. H. (2022). Soil nutrient retention and pH buffering capacity are enhanced by calciprill and sodium silicate. *Agronomy*, 12, 219. DOI: 10.3390/agronomy12010219
- OECD, Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos. (2019). *Test No. 203: Fish, acute toxicity test, OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 2*. DOI: 10.1787/9789264069961-en
- Palacios, H. S., Sandoval, C. N., Bueno, M. C., & Manchego, S. A. (2015). Estudio microbiológico e histopatológico en peces tetra neón (*Paracheirodon innesi*) de la amazonía peruana. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(3), 469-483.
- Pardo, C. S., Suárez, M. H., & Pertuz, B. V. (2009). Interacción de los suelos sulfatados ácidos con el agua y sus efectos en la sobrevivencia del bocachico (*Prochilodus magdalenae*) en cultivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 22(4), 619-631.
- Ramírez, P., & Mendoza, A. (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo*. México, DF, México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

- Riaz, U., Murtaza, G., Anum, W., Samreen, T., Sarfraz, M., & Nazir, M. Z. (2021). Chapter 11. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) as biofertilizers and biopesticides. In: Hakeem, K. R. *et al.* (eds.). *Microbiota and biofertilizers*. DOI: 10.1007/978-3-030-48771-3\_11
- Santillán, M. L. (2016). *Así funcionan los biofertilizantes*. Ciencia UNAM. Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Dirección General de Divulgación de la Ciencia (DGDC). Recuperado de [https://ciencia.unam.mx/leer/570/Asi\\_funcionan\\_los\\_biofertilizantes](https://ciencia.unam.mx/leer/570/Asi_funcionan_los_biofertilizantes)
- Santos, D., Luzio, A., Coimbra, A., Varandas, S., Fontainhas-Fernandes, A., & Monteiro, S. (2019). A gill histopathology study in two native fish species from the hydrographic Douro Basin. *Microscopy and Microanalysis*, 25(1), 1-8. DOI: 10.1017/S1431927618015490
- Serrano, R. (2003). *Introducción al análisis de datos experimentales: tratamiento de datos en bioensayos* (pp. 145-160). Castelló de la Plana, España: Universitat Jaume I.
- Sudha, V., & Baskar, K. (2017). Importance of aquatic toxicology. *Entomology, Ornithology & Herpetology: Current Research*, 6(2), e126.
- Urku, C. (2020). *Histopathology and antibiotic susceptibility of Aeromonas hydrophila isolated from diseased guppy (Poecilia reticulata)*. Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/340063729>