VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Evaluación ecotoxicológica de un biofertilizante a base de microalgas mediante ensayo de evasión con lombrices de tierra

Ecotoxicological assessment of a microalgae-based biofertilizer using an Earthworm Avoidance Test

Juan Alberto Regalado Aguirre[1], Mario Alberto Lemus[2], Genda Edith Cea-Barcia[1,3*]

[1] Posgrado en Biociencias, [2] Licenciatura en Agronegocios, [3] Departamento de Ciencias Ambientales, Universidad de Guanajuato, México.
* glendacea@ugto.mx

Resumen

La salud del suelo presenta una pérdida de viabilidad y de fertilidad en la actualidad. Ante esto, el uso de biofertilizantes y/o biopreparados desarrollados a partir de cianobacterias emerge como una alternativa sostenible para mejorar las propiedades del suelo. No obstante, algunas cianobacterias producen toxinas que ejercen un efecto ecotoxicológico sobre otros organismos. Un método eficaz para evaluar la ecotoxicidad de un agente de interés en suelos consiste en la prueba de evasión con la lombriz *Eisenia fetida*. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la ecotoxicidad de un biopreparado formulado a partir de cianobacterias sobre *E. fetida*. Se preparó un suelo artificial adicionado con dos concentraciones de un biopreparado a base de cianobacterias, 326 mg kg^{-1} y 978 mg kg^{-1}. Se observó un porcentaje de evasión de 25.7 ± 29.9% en la dosis baja y de 25.7 ± 32.1% en la dosis alta. Asimismo, no se observó mortalidad en las lombrices. Por otro lado, en los tratamientos control, E. fetida mostró una dispersión espacial homogénea. Estos datos evidencian la factibilidad del uso de cianobacterias en el desarrollo de biopreparados, lo que resulta en una herramienta prometedora en estrategias de restauración ecológica.

Palabras clave: Ecotoxicidad, *Eisenia fetida*, cianobacterias, biofertilizante, evasión.

Introducción

El suelo desempeña un papel crucial en la sostenibilidad de la vida en la Tierra. Proporciona servicios como la regulación de los flujos de la energía solar y el almacenamiento de agua (Food and Agriculture Organization [FAO], 2015). Los suelos agrícolas en especial, son fundamentales a nivel mundial ya que en estos se producen la mayor parte de los alimentos, y actualmente se viene un reto enorme para abastecer a la población “Con la enorme presión de suplir una demanda creciente de alimentos que, acorde con proyecciones realizadas a 2050, se incrementará en un 60% para suplir a una población de 9,000 millones de personas que habitará en el planeta hasta entonces” (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural [SADER], 2024), esto representaría un degradado muy importante de en los suelos, lo que abre el camino para la utilización de biofertilizantes los cuales son formulados por microorganismos benéficos, aumentando así la disponibilidad de nutrientes en el suelo para las plantas.

Las cianobacterias son microorganismos procariotas fotoautótrofos con capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, distribuidos en una amplia variedad de ecosistemas acuáticos y terrestres (Kumar et al., 2019). Estos microorganismos pueden ser utilizados como biofertilizantes que ayudan al desarrollo de las plantas. Sin embargo, algunos producen algunos metabolitos secundarios que llegan a ser tóxicos para otros organismos presentes en el suelo, además de ser tóxicos para los humanos. Entre estos compuestos se encuentran las toxinas de cianobacterias o cianotoxinas (Melaram et al., 2022), especialmente el grupo más estudiado conocido como microcistinas (Welker y Von Döhren, 2006). Las microcistinas son una fuente de contaminación y toxicidad en cuerpos de agua y, en particular, en suelos, causando disturbios generalizados en microorganismos e invertebrados autóctonos del suelo. Además, pueden bioacumularse en invertebrados como la lombriz de tierra Eisenia fétida (Cao et al., 2017; Wen et al., 2017) y en plantas de importancia en la agricultura (World Health Organization [WHO] 2020) y causar diversas afecciones a la salud humana como daños al sistema nervioso, al sistema cardiaco y al sistema reproductivo, entre otros (Arman y Clarke, 2021 y sus referencias).

Existen herramientas de diagnóstico, las cuales nos ayudan a conocer la ecotoxicidad de estos microorganismos en el suelo. Una de ellas está marcada en la norma ISO 17512-1:2008, la cual establece las pautas para realizar el ensayo de evasión y determinar si existe ecotoxicidad asociada a un componente de interés particular, como pesticidas, herbicidas, fertilizantes y biofertilizantes utilizando lombrices del género Eisenia fétida. El objetivo del presente trabajo consiste en determinar si existe toxicidad asociada a la aplicación de un preparado celular compuesto por cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno sobre E. fetida. Esto con la finalidad de evaluar su inocuidad para posteriormente utilizarse como biofertilizante.

Metodología

Obtención del preparado de cianobacterias

Las cianobacterias se cultivaron en 5 fotobiorreactores de 1 L con medio de cultivo Arnon. Los cultivos se mantuvieron a una irradiancia (luz fotosintéticamente activa, PAR) de 400 µmol de fotones m^{-2} s^{-1}, en fotoperiodo de 13 h luz/11 h oscuridad, a 23 ± 3 °C, con un mezclado por aireación a 1 vvm (volumen de aire por volumen de líquido por minuto), utilizando aire filtrado a 0.45 µm. Una vez finalizada la etapa exponencial, el cultivo se concentró mediante sedimentación durante 2 h, se eliminaron 2 L de sobrenadante y se añadió un volumen similar de agua destilada para realizar un lavado. Se sedimentó durante 2 h y se eliminaron 2 L de sobrenadante. El volumen restante (3 L) presentó una concentración de 2.8 g L^{-1} de sólidos totales volátiles (STV) y 2.94 g L^{-1} de sólidos totales (ST).

Preparación del sustrato artificial

La preparación del sustrato se realizó siguiendo el protocolo descrito en la norma ISO 11268-2:2023, el cual cuenta con la siguiente composición: 69% de arena sílica fina, 20% de arcilla de caolín, 10% de turba finamente molida y 1% de carbonato de calcio para la regulación del pH entre 6.5 y 7.2. Cada material se tamizó (0.2 mm) y se secó (a 40 °C) por 24 h. Se mezclaron los componentes del sustrato y se almacenó en oscuridad a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente se tomó una muestra del sustrato para realizar el cálculo de la capacidad máxima de retención de agua ($WHC_{máx.}$), para realizar el ajuste de la humedad del sustrato al 60% del valor de la $WHC_{máx.}$

Selección de lombrices y preaclimatación en el sustrato

Las lombrices de *Eisenia fetida* fueron proporcionadas por un distribuidor local. Estas fueron seleccionadas acorde con su madurez sexual, utilizando individuos adultos con clitelo desarrollado y un tamaño de entre 5 y 7 cm. Asimismo, con la finalidad de permitir el vaciado de su contenido intestinal y verificar la existencia de alguna posible afectación en las lombrices a causa de la composición del sustrato. Se seleccionaron 210 lombrices en total, las cuales se sometieron a un periodo de preaclimatación de 24 h en una muestra del sustrato (3 kg) con una humedad del 60% del valor de la $WHC_{máx.}$

Ensayo estandarizado de evasión

Los ensayos de evasión se llevaron a cabo en recipientes de plástico rectangulares de 20 cm de largo, 14.5 cm de ancho y 7 cm de alto. Cada recipiente se dividió en dos secciones iguales utilizando una lámina extraíble de PET, según lo descrito en la norma ISO 17512-1-2008. (Figura 1). En cada sección se colocaron 0.8 kg de sustrato artificial. En una sección, el sustrato estaba libre de cianobacterias (sección control), mientras que la sección opuesta contenía sustrato mezclado con el preparado de cianobacterias. Se evaluaron dos concentraciones del preparado cianobacteriano: 326 mg de biomasa fresca por kg de sustrato (dosis baja) y 978 mg de biomasa fresca por kg de sustrato (dosis alta). Las concentraciones se calcularon con base en la masa del sustrato adicionada a cada sección y en la concentración de STV del preparado de cianobacterias.

Ahora bien, con la finalidad de mantener condiciones homogéneas de humedad (60% $WHC_{máx.}$) entre tratamientos, el volumen total adicionado a cada sección se estandarizó a 280 mL. Para la dosis baja se mezclaron 93 mL del preparado de cianobacterias con 187 mL de agua destilada hasta completar un volumen de 280 mL. Para la dosis alta se tomaron 280 mL del preparado sin una dilución adicional. En ambos casos

la sección control recibió 280 mL de agua destilada. Adicionalmente, se incluyó un tratamiento control constituido por recipientes en los cuales se colocó sustrato sin cianobacterias adicionado con 280 mL de agua destilada por sección. Se realizaron siete réplicas por tratamiento.

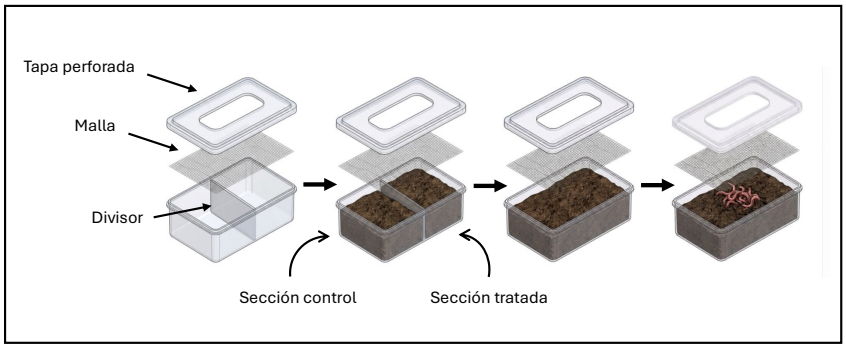


Figura 1. Esquema del ensayo de evasión acorde con la norma ISO 17512-1:2008.

Una vez colocado el sustrato en los recipientes, se retiró la lámina extraíble y se colocaron 10 lombrices de prueba por recipiente sobre la marca divisoria. En total se utilizaron 210 lombrices de prueba. Posteriormente, los recipientes se cubrieron con una malla de tela sobre la superficie para permitir el flujo de gases y evitar el escape de las lombrices. Los recipientes se dejaron en invernadero durante 48 h bajo las siguientes condiciones: fotoperiodo de 13 h luz/11 h oscuridad, temperatura de 28 ± 3 °C e irradiancia máxima de 350 µmol m^{-2} s^{-1}.

Una vez finalizado el ensayo, se colocó la lámina de PET en cada recipiente para separar nuevamente ambas secciones y cuantificar las lombrices por sección. El porcentaje de evasión se calculó con base en la ecuación (1). Además, se registró el cambio de coloración y el porcentaje de mortalidad.

$$A = \frac{(C-T)}{N}(100) \qquad \text{Ecuación (1)}$$

Donde *A* es el porcentaje de evasión, *C* es el número de lombrices en el sustrato control, *T* es el número de lombrices en el sustrato de prueba y *N* es el número total de lombrices (10) por réplica. Los porcentajes de evasión negativos (preferencia por el sustrato de prueba) se consideraron como 0% de evasión. El sustrato se consideró tóxico cuando el porcentaje de evasión era igual o mayor al 80% y la prueba se consideró inválida cuando el porcentaje de mortalidad era igual o mayor al 10%.

Análisis de datos

El análisis de datos se realizó en STATGRAPHICS Centurion Ver. 18 (Statgraphics Technologies, Inc., EU). La normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Cuando los datos cumplieron con la normalidad y homogeneidad de varianzas, se realizó un ANOVA seguido de la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Cuando no se observó normalidad, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). La variable de respuesta consistió en el porcentaje de evasión.

Técnicas analíticas

Determinación de la concentración de biomasa celular

La determinación de la concentración de biomasa se realizó siguiendo el protocolo descrito en la norma NMX-AA-034-SCFI-2001, como a continuación se describe. Se tomaron 10 mL de muestra, se centrifugaron a 14,000 RPM por 10 min, y se desechó el sobrenadante. La biomasa se resuspendió en 10 mL de agua destilada para realizar un lavado, se centrifugó (14,000 rpm, 10 min) y se retiró el sobrenadante. Se realizaron dos lavados adicionales. La biomasa resultante se resuspendió en 5 mL y se vació en un crisol seco (105 °C, 24 h) y se pesó (peso cero, P_0) previamente. El crisol se colocó en estufa a 105 °C por 24 h. Pasado el tiempo, se retiró del horno y se dejó reposar 20 min; luego, se pesó el crisol con la muestra registrando como P_2.

Posteriormente se llevó el crisol a calcinación (550 °C) por 3 h. Pasado el tiempo, se dejó reposar 20 min, y luego se pesó registrando como P_3. Los ST y los STV se determinaron mediante las ecuaciones (2) y (3), respectivamente. Los análisis se realizaron en triplicado.

$$ST(g/L) = \frac{(P2-P0)}{V} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

$$STV(g/L) = \frac{(P2-P3)}{V} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Donde P_0 es la masa del crisol vacío (g), P_2 es la masa del recipiente más la muestra seca a 105 °C (g), P_3 es la masa del recipiente más la muestra calcinada a 550 °C (g) y V es el volumen de la muestra (L).

Capacidad máxima de retención de agua ($WHC_{máx.}$)

La capacidad máxima de retención de agua del sustrato se determinó conforme a lo establecido en la norma ISO 11268-2:2023 como se describe a continuación.

Se dobló un papel filtro en forma de cono y se colocó en un embudo de vidrio registrando el peso como peso del embudo más el papel filtro. Adicionalmente, se pesó un vaso de precipitado registrando como peso del vaso. Se tomaron 100 g de sustrato y se colocaron en el embudo con el filtro. Este se colocó en un matraz Erlenmeyer y se agregó agua destilada hasta que cubrió la superficie del sustrato. Una vez que inició el goteo constante, se tapó el embudo con un vidrio de reloj para minimizar la evaporación y se dejó en reposo por 3 horas. Pasado el tiempo, se retiró el embudo del matraz y se pesó registrando como peso del embudo más papel filtro más sustrato saturado. Se transfirió el sustrato saturado desde el embudo hacia el vaso previamente pesado y se introdujo en un horno a 105 °C durante 24 h. Posteriormente, el vaso con el sustrato seco se sacó de la estufa y se dejó reposar en un desecador por 30 min. Se pesó y se registró como peso del vaso más sustrato seco. A partir de estos datos se calculó el WHC con base en las ecuaciones (4) y (5). Los análisis se realizaron en triplicado.

$$WHC_{máx.} = \left(\frac{S-T-D}{D}\right)(100) \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Donde S es la masa de sustrato saturado más la masa del embudo más la masa del filtro, T es la tara (masa del filtro más masa del embudo) y D es la masa seca del sustrato (masa seca del vaso más sustrato menos la masa del vaso).

$$WHC_{(60\%)} = (WHC_{máx.})\,(0.6) \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Donde $WHC_{máx.}$ indica la capacidad máxima de retención de agua, y 0.6 el factor decimal equivalente al 60%.

Determinación de pH

El pH se determinó acorde con lo descrito en la norma mexicana NOM-021-RECNAT-2000 en una solución acuosa con agua destilada en una relación 1:2 como se describe a continuación.

Se pesaron 10 g de suelo y se colocaron en un vaso de precipitado. Se adicionaron 20 ml de agua destilada, se agitó manualmente con varilla de vidrio durante 30 min y se dejó reposar 15 min. Para realizar la medición, se agitó la muestra y se introdujo un potenciómetro portátil para registrar el pH. Los análisis se realizaron por triplicado.

Resultados

Ensayo de distribución

El desarrollo de biofertilizantes requiere una etapa clave que consiste en la evaluación de su actividad ecotoxicológica. En este contexto, se evaluó el efecto del preparado de cianobacterias sobre la distribución

espacial de las lombrices de *E. fetida* en el sustrato artificial sin tratamiento. En los recipientes control (0 mg kg^{-1}), donde ambas secciones contenían sustrato artificial no inoculado, se observó una distribución uniforme de las lombrices en ambos compartimentos (Tabla 1).

La distribución promedio de lombrices en la sección 1 fue de 48.6 ± 23.4%, mientras que en la sección 2 fue de 51.4 ± 23.4%. Esto sugiere que la composición del sustrato y las condiciones de incubación no dictaminaron ningún tipo de sesgo o preferencia por alguna de las cámaras de los recipientes. De modo similar, se observó una distribución homogénea en ambos tratamientos con cianobacterias, aunque se observó una ligera tendencia de preferencia de las lombrices por la sección control. La distribución promedio de lombrices en la sección control fue de 58.6 ± 20.4% y de 41.4 ± 20.4% en la sección tratada para la dosis baja (326 mg kg^{-1}) y la distribución promedio para las secciones control y tratada de la dosis alta (978 mg kg^{-1}) fue de 52.9 ± 26.9% y 47.1 ± 26.9%, respectivamente.

***Tabla 1**. Distribución espacial de Eisenia fetida en el tratamiento control*

Tratamiento	Réplica	Lombrices en sección 1 (%)	Lombrices en sección 2 (%)
Control *	1	0	100
	2	60	40
	3	50	50
	4	40	60
	5	60	40
	6	60	40
	7	70	30

* Recipientes con sustrato libre de tratamiento de cianobacterias.

Ensayo de evasión

Una vez evaluada la distribución de E. fetida en el sustrato control, se procedió a la evaluación de la actividad de evasión asociada a la adición del preparado de cianobacterias al sustrato de prueba. Los datos mostraron de manera general que el sustrato sometido al tratamiento ejerció una baja actividad de evasión. Se observaron porcentajes de evasión muy similares entre ambos tratamientos con cianobacterias. En el tratamiento de la dosis baja, la evasión promedio fue de 25.7 ± 29.9%, mientras tanto, para la dosis alta fue de 25.7 ± 32.1% (Tabla 2).

***Tabla 2**. Evasión de Eisenia fetida frente a los tratamientos de prueba.*

Tratamiento	Réplica	Lombrices en sección control (%)	Lombrices en sección tratamiento (%)	Evasión (%)
326 mg kg^{-1}	1	70	30	40
	2	70	30	40
	3	50	50	0
	4	60	40	20
	5	40	60	0
	6	30	70	0

	7	90	10	80
	1	60	40	20
	2	90	10	80
	3	20	80	0
978 mg kg^{-1}	4	30	70	0
	5	60	40	20
	6	80	20	60
	7	30	70	0

Ahora bien, el análisis estadístico no evidenció diferencias significativas entre tratamientos (Kruskal-Wallis, p = 0.94), lo que sugiere que bajo las dosis evaluadas, el aumento o disminución de la dosis del preparado de las cianobacterias no generó una respuesta distinta (Figura 2). Un efecto similar fue reportado por Castañedo Hernández *et al*., (2022), quienes observaron baja o nula evasión cuando evaluaron la supervivencia y el comportamiento de *E. fetida* en un sustrato inoculado con un biofertilizante a base de levaduras, hongos y bacterias benéficas.

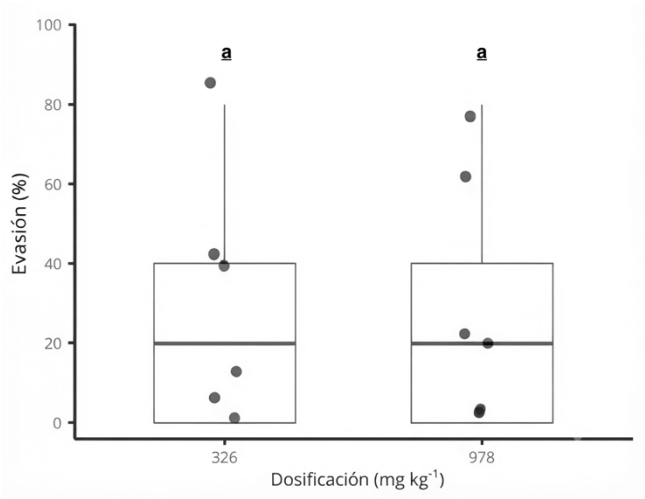


Figura 2. Porcentaje de evasión de las lombrices acorde a los tratamientos a la dosis baja (326 mg kg^{-1}) y la dosis alta (978 mg kg^{-1}) evaluados. Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, p < 0.05).

Por otro lado, la presencia de algunas réplicas con mayor preferencia de lombrices por el sustrato tratado sugiere que el preparado de cianobacterias no generó un rechazo o evitación uniforme en *E. fetida*. Una posible explicación sugiere que la biomasa microbiana pudo haber funcionado como un recurso nutrimental altamente aprovechable. Estudios previos en lombrices de tierra del género Allolobophora (Schmidt *et al*., 2016) y en nemátodos (Melody *et al*., 2016) han mostrado que la biomasa de cianobacterias y microalgas puede ser incorporada y asimilada como parte de la dieta.

Efectos macroscópicos en las lombrices

No se registró mortalidad en ningún tratamiento. Además, aunque en general los individuos mantuvieron una apariencia normal (coloración rosa-rojiza), tres individuos presentaron una coloración amarillenta en parte de su cuerpo, de los cuales dos se encontraron en la sección control en las réplicas 4 de la dosis alta y 1 del tratamiento control, y uno más en la sección tratada de la réplica 7 de la dosis alta. Esto concuerda con lo reportado en otros trabajos donde evalúan la ecotoxicidad de formulaciones desarrolladas a partir de agentes biológicos con mínima mortalidad (Mancebo *et al*., 2008; Castañedo Hernández *et al*., 2022).

Conclusiones

El análisis de evasión constituye una aproximación ecotoxicológica preliminar que respalda la utilización del preparado de cianobacterias como potencial bioinsumo en estrategias de recuperación de la fertilidad de suelos.

Referencias bibliográficas

Arman, T., & Clarke, J. D. (2021). Microcystin Toxicokinetics, Molecular Toxicology, and Pathophysiology in Preclinical Rodent Models and Humans. Toxins, 13(8), 537. https://doi.org/10.3390/toxins13080537

Cao, Q., Steinman, A. D., Yao, L., & Xie, L. (2017). Toxicological and biochemical responses of the earthworm Eisenia fetida to cyanobacteria toxins. Scientific reports, 7(1), 15954. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16267-8

Castañedo Hernández, Z. A., Meneses-Marcel, A., Aguila Jiménez, E., Seijo Wals, M., & Díaz Solares, M. (2022). Evaluación de la toxicidad aguda del IHPLUS® sobre Eisenia fetida. Ciencias Agronómicas, 39, e019. https://doi.org/10.35305/agro39.e019

Food and Agriculture Organization [FAO]. (2015). Status of the world's soil resources: Main Report. Edit. FAO. https://www.fao.org/documents/card/en/c/c6814873-efc3-41db-b7d3-2081a10ede50/

International Organization for Standardization. (2008). Soil quality — Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour — Part 1: Test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei) (ISO Standard No. 17512-1:2008). Disponible en: https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:17512:-1:ed-1:v1:en

Kumar, J., Singh, D., Tyagi, M. B., & Kumar, A. (2019). Cyanobacteria: Applications in biotechnology. En P. Singh, D. K. Singh, & R. Prabha (Eds.), Cyanobacteria: From basic science to applications (pp. 327–346). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00016-7

Mancebo, A., Montano, R., González, C., González, Y., González, B., & Bada, A. M. (2008). Evaluación ecotoxicológica del FitoMas-H en lombriz de tierra y abejas. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, XLII(1-3), 69-75.

Melaram, R., Newton, A. R., & Chafin, J. (2022). Microcystin Contamination and Toxicity: Implications for Agriculture and Public Health. Toxins, 14(5), 350. https://doi.org/10.3390/toxins14050350

Melody, C., Griffiths, B., Dyckmans, J., & Schmidt, O. (2016). Stable isotope analysis (δ (13)C and δ (15)N) of soil nematodes from four feeding groups. PeerJ, 4, e2372. https://doi.org/10.7717/peerj.2372

Schmidt, O., Dyckmans, J., & Schrader, S. (2016). Photoautotrophic microorganisms as a carbon source for temperate soil invertebrates. Biology letters, 12(1), 20150646. https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0646

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2024, 23 de abril). Cuidemos los suelos agropecuarios. Gobierno de México. https://www.gob.mx/agricultura/articulos/cuidemos-los-suelos-agropecuarios

Welker, M., & Von Döhren, H. (2006). Cyanobacterial peptides—nature's own combinatorial biosynthesis. FEMS Microbiology Reviews, 30(4), 530-563. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00022.x

Wen, HF., Li, YW., Xiang, L. et al. (2017). Toxicological effects of microcystin-LR on earthworm (Eisenia fetida) in soil. Biol Fertil Soils 53(8), 849–860. https://doi.org/10.1007/s00374-017-1225-x

World Health Organization [WHO]. (2020). Cyanobacterial Toxins: Microcystins. In Guidelines for Drinking Water Quality and Guidelines for Safe Recreational Water Environments; World Health Organization:

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Geneva, Switzerland, 2020. Disponible en: https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/40dc2e69-26fe-4d24-aa60-444fe5206c0c/content