

Evaluación de la toxicidad aguda del IHPLUS® sobre *Eisenia fetida*

Evaluation of acute toxicity of IHPLUS® bioproduct on Eisenia fetida

Avaliação da toxicidade aguda do IHPLUS® em Eisenia fetida

Castañedo Hernández, Zoe Alicia¹; Meneses-Marcel, Alfredo²; Aguila Jiménez, Edisleidy³; Seijo Wals, Mirieisy⁴; Díaz Solares, Maykelis⁵

¹ Investigadora. Máster en Desarrollo de Medicamentos de Origen Natural. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

² Doctor en Parasitología y Microbiología. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

³ Investigadora. Máster en Toxicología Experimental. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

⁴ Técnico superior en Veterinaria. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

⁵ Dra. Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey. Perico, Matanzas, Cuba.

zoec@uclv.cu

DOI: <https://doi.org/10.35305/agro39.e019>

Recibido 09/10/2021 Aceptado 12/04/2022

Resumen

Los suelos son la fuente de la mayor parte de los alimentos del ser humano, constituyendo un desafío mantener las condiciones óptimas para su uso. Son contaminados con los productos químicos que, de varias formas, llegan a ellos. Una de las herramientas de diagnóstico para evaluar esta problemática lo constituye la ecotoxicología. El Centro de Bioactivos Químicos cuenta con una batería de ensayos para evaluar el impacto de productos químicos y biológicos sobre factores bióticos representativos de diferentes ecosistemas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el impacto en el ecosistema terrestre del bioproducto IHPLUS® mediante el empleo del biomodelo *Eisenia fetida*. Según la metodología recomendada por OECD 207, se seleccionaron individuos sanos y en condiciones controladas y se expusieron a dosis única durante 28 días al biopreparado. Las dosis de exposición correspondieron a la de uso en la agricultura (6 %) y a la recomendada por la EPA OPPTS 885.4000 (10⁶ UFC/mL). Los puntos finales evaluados fueron la mortalidad y la variación del peso corporal de las lombrices. Además, se refirieron otros signos de cambios del comportamiento conductual. Al término del estudio no se observó mortalidad, y se evidenció un aumento de peso promedio de los especímenes en los grupos experimentales. Ligeros cambios no significativos del comportamiento habitual se apreciaron en algunas lombrices. El empleo del bioproducto IHPLUS® en la agricultura es seguro para esta especie del ecosistema terrestre.

Palabras clave: Ecotoxicología; *Eisenia fetida*; Bioproducto.

Summary

Soils support production of most food crops. Thus, maintaining optimal conditions for their use constitutes a major challenge. Chemicals move into soils in different ways, leading to soil contamination. One of the diagnostic tools to evaluate this problem is ecotoxicology. The Center of Chemical Bioactives has a battery of tests to evaluate the impact of chemical and biological products on biotic factors representative of different ecosystems. The objective of this work was to evaluate the impact of the IHPLUS® bioproduct on the soil ecosystem using *Eisenia foetida* as a bio-model. According to the methodology recommended by OECD 207, healthy individuals were exposed under controlled conditions to a single dose of the bioproduct for 28 days. The exposure doses matched those used in agriculture (6%) and those recommended by EPA'S OPPTS 885.4000 (10⁶ CFU / mL). The endpoints evaluated were mortality and variation in worm body weight. In addition, other signs of behavioral changes were observed. No mortality occurred, and there was an increase in the average weight of specimens in the experimental groups. Slight, non-significant changes from the usual behavior were observed in some worms. According to our results, the use of the bioproduct IHPLUS® in agriculture is safe for this earthworm species.

Key words: Ecotoxicology; *Eisenia fetida*; Bioproduct.

Resumo

Os solos são a fonte da maioria dos alimentos do ser humano, e é um desafio manter as condições ideais para o seu uso. Estão contaminados com produtos químicos que, de várias maneiras, chegam até eles. Uma das ferramentas de diagnóstico para avaliar esse problema é a ecotoxicologia. O Centro de Bioativos Químicos possui uma bateria de testes para avaliar o impacto de produtos químicos e biológicos sobre fatores bióticos representativos de diferentes ecossistemas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto no ecossistema terrestre do bioproduto IHPLUS[®] por meio do biomodelo de *Eisenia fetida*. De acordo com a metodologia recomendada pela OCDE 207, indivíduos saudáveis foram selecionados em condições controladas e expostos a uma única dose da biopreparação durante 28 dias. As doses de exposição corresponderam à dose do uso na agricultura (6%) e a dose recomendada pela EPA OPPTS 885,4000 (10⁶ UFC/mL). Os pontos finais avaliados foram mortalidade e variação do peso corporal dos vermes. Além disso, foram relatados outros sinais de mudanças comportamentais. No final do estudo, não foi observada mortalidade e houve aumento no peso médio dos espécimes nos grupos experimentais. Ligeiras alterações não significativas do comportamento habitual foram observadas em alguns vermes. O uso do bioproduto IHPLUS[®] na agricultura é seguro para esta espécie do ecossistema terrestre.

Palavras chave: Ecotoxicologia; *Eisenia fetida*; Bioproduto

Introducción

Con una población mundial en constante crecimiento es importante producir suficientes cultivos cada año para proporcionarles alimentos, ropas y otros productos agrícolas. El suelo es el elemento natural que brinda los nutrientes necesarios para la elaboración de los recursos primarios (maíz, trigo, algodón, madera, etc.) para la elaboración de dichas fuentes de vida. Sin embargo, los ciclos de siembra van agotando los nutrientes de este recurso natural finito, y el hombre ha tenido que reemplazarlos por otros de origen químico o biológico.

El manejo y uso adecuado de los fertilizantes se basa en mantener o mejorar la salud del suelo y reducir al mínimo cualquier posible impacto ambiental. Los componentes de estos productos que no son absorbidos por las plantas o retenidos en los suelos, pueden verse transportados a aguas superficiales por la erosión del suelo o a las aguas subterráneas por la lixiviación, que podría repercutir en la salud humana. Además pueden ser liberados de los suelos a la atmósfera a través de la volatilización de amoníaco o como emisiones de gases de efecto invernadero de óxido nitroso ([Rodríguez-Eugenio et al., 2019](#)).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en el artículo 4 del código internacional de conducta para el uso y manejo de fertilizantes plantea la necesidad de evaluar los productos nuevos y existentes que se emplean en la agricultura, con el objetivo de validar su efectividad e inocuidad ([FAO, 2019](#)).

La ecotoxicología terrestre se utiliza como una herramienta de diagnóstico para evaluar los efectos de dichos productos en los organismos que viven en el suelo mediante el monitoreo de los efectos letales, y subletales como morfológicos, conductuales, fisiológicos, citogenéticos y bioquímicos en organismos expuestos. Estas pruebas de toxicidad permiten establecer relaciones entre la concentración–efecto bajo condiciones controladas, en terreno o en el laboratorio ([Clasen y Moura, 2019](#); [van Gestel et al., 2018](#)).

Las lombrices de tierra son el componente supremo de la macrofauna del suelo y los invertebrados más importantes responsables del desarrollo y mantenimiento del valor nutritivo de este, al convertir el material biodegradable y los desechos orgánicos en humus rico en nutrientes. La Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OCDE) propuso *Eisenia fetida* como una especie de lombriz de referencia para pruebas de toxicidad, porque puede cultivarse fácilmente en el laboratorio, madurar en pocas semanas y tiene una alta tasa de reproducción ([Miglani y Singhs, 2019](#)).

El uso de biopreparados a partir de microorganismos representan una estrategia ecológica clave hacia el desarrollo integrado del manejo de nutrientes y plagas, con miras a reducir el uso de productos químicos en la agricultura, así como para mejorar el rendimiento de los cultivos ([Bhattacharyya et al., 2016](#)). Surge así una variada gama de productos como los fertilizantes orgánicos fermentados, abonos fermentados, biofermentos y lactofermentos como el IHPLUS[®], marca registrada por la Estación Experimental de Pastos y Forrajes, Indio Hatuey, Cuba. Los microorganismos nativos del IHPLUS[®] empleados como bionutrientes para enriquecer el biocarbón, y como activador de los compostajes, contribuyen a hacer de los residuos orgánicos un recurso valioso para el mejoramiento de los suelos y el incremento de la productividad a través del reciclaje, la pirólisis, y las aplicaciones estables en áreas de cultivo, así como en la producción y salud animal ([Tellez-Sorias y Orberá, 2018](#); [Díaz-Solares et al., 2020](#)); sin embargo, no se conocen sus posibles impactos al medio ambiente. Por ello, el objetivo del presente estudio es evaluar el impacto sobre la fauna del ecosistema terrestre del bioproducto IHPLUS[®] mediante el empleo del biomodelo *E. fetida*.

Materiales y Métodos

El diseño experimental se desarrolló según las normativas internacionales de la OECD No. 207, ([1984](#)) y de la EPA No. 850.3100, ([2012](#)) y No. 885.4000, ([1996](#)), en el Centro de Bioactivos Químicos de La Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV), Cuba.

Se emplearon especímenes de la especie *E. fetida* en estadio adulto (presencia de clitelo) cuyos pesos oscilaron entre 300 mg y 600 mg, previo vaciamiento de sus intestinos durante 24 horas ([EPA, 2012](#); [Ramírez y Mendoza, 2008](#)). Se inocularon aleatoriamente en frascos de polipropileno perforados (10 individuos/frasco) y de 500 mL de capacidad, que contenían 200 mg de suelo pardo con carbonatos ([Hernández-Jiménez et al., 2019](#)), caracterizado y certificado por el Centro de Investigaciones Agropecuaria de la UCLV y humedecido (40% de humedad) de forma única al inicio del ensayo con la sustancia de cada grupo experimental (4 réplicas):

Grupo 1 (Control): Agua destilada.

Grupo 2 (Inactivado): Suspensión acuosa de IHPLUS[®] 6 % inactivado por esterilización en autoclave (Hirayama) durante 1 h a 121 °C.

Grupo 3 (Tratado): Suspensión acuosa de IHPLUS[®] 6 %, equivalente a una carga total de $1,16 \times 10^{10}$ UFC/mL.

Grupo 4 (Tratado): Suspensión acuosa de IHPLUS[®] con recuento total de microorganismos de 10^6 UFC/mL.

El IHPLUS[®] fue suministrado por la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey” lote IH-19-02, comprobándose la composición de los microorganismos presentes en el biopreparado ([Tabla 1](#)) mediante el método de recuento de colonias en placa ([Muñoz et al., 2016](#)). A partir de esta determinación se prepararon suspensiones con concentraciones 6 % y 10^6 UFC/mL y se calculó el volumen de bioproducto (60,79 mL) a aplicar al suelo de la solución de cada grupo experimental para lograr una humedad del 40 %, teniendo en cuenta que el contenido de humedad del suelo seco varió entre 8,8 % a 10,25 % con un valor medio de $9,61 \pm 0,48$ %.

Tabla 1: Conteo de microorganismos presentes en el bioproducto IHPLUS®.

Tipo de microorganismos	Conteo total (UFC/ml)
Bacterias	$1,94 \times 10^{11}$
Hongos	$1,38 \times 10^7$
Levaduras	$1,65 \times 10^5$

El local de experimentación durante el tiempo de ensayo mantuvo condiciones controladas de temperatura (20 ± 2 °C) y con sistema de luz artificial que aseguró una intensidad de iluminación de 400 a 800 lux, medida en la superficie del suelo ([ASTM-E1676-12, 2021](#); [Ramírez y Mendoza, 2008](#)). Estas variables ambientales fueron determinadas con el empleo de un termómetro y luxómetro (PCE-174) respectivamente.

Para evaluar los signos de toxicidad en cada réplica por grupo experimental se contaron las lombrices que respondieron a la aplicación de un estímulo mecánico y se observó el aspecto macroscópico de cada individuo con el objetivo de detectar posibles alteraciones (daños en la región del clitelo, pérdida o reducción de movimiento, cambio de coloración y presencia de abultamientos o constricción en los anillos en diferentes áreas del cuerpo). Además se pesaron las lombrices individualmente al inicio y final del ensayo, constituyendo la diferencia un punto final de evaluación, siendo posteriormente sacrificadas mediante el empleo de una solución alcohólica (30 %) durante 3 min.

El estudio se extendió durante 28 días y las evaluaciones tanto clínica como los parámetros ambientales se realizaron los días 7, 14, 21 y 28. También se tomaron muestras del sustrato de cada grupo al inicio y final para determinar la carga total de microorganismos mediante el método de recuento de colonias en placa ([Muñoz *et al.*, 2016](#)).

La validez del ensayo se considera si la mortalidad en el grupo control no excede el 10 % al final del período de exposición y se produzca una pérdida de peso promedio del 30 % ([EPA, 2012](#)).

El porcentaje de mortalidad se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%M = TM/(T*100)$$

Donde: %M = porcentaje de mortalidad; TM = Total de muertos; T = Total de lombrices, reportándose las medidas de tendencia central y su dispersión para cada grupo.

Para evaluar la existencia de diferencias en el peso de las lombrices entre los cuatro grupos, al inicio y al final del ensayo, se empleó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y las prueba de comparaciones múltiples para distribuciones libres ([Sheskin, 2011](#)). Procedimiento similar se siguió para evaluar el comportamiento de los signos clínicos subletales. Previo a estos análisis, se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y de Levene para medir la normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza. Todos los análisis se realizaron usando el paquete estadístico *Statistica* versión 10 y se consideró un nivel de significación de 0,05.

Resultados

Se consideró válido el estudio al no existir mortalidad en el grupo control. Además, los individuos mostraron apariencia y vitalidad normal, con ganancia de 3,5 % del peso promedio.

Las lombrices de los grupos experimentales durante el tiempo del estudio mostraron comportamiento normal para la especie, apreciándose solamente ligeras manifestaciones clínicas

en aquellas pertenecientes a los grupos tratado e inactivado (Tabla 2), aunque no existió diferencia estadística entre estos.

Tabla 2: Mortalidad y manifestaciones clínicas de *Eisenia fetida* expuestas a IHPLUS®.

Grupo	Mortalidad (%)	Presencia de signos clínicos (%)	Ligera pérdida de color (%)	Coloración amarillenta (%)
Control	0,00	0,00	0,00	0,00
Inactivado	0,00	0,00	2,50	0,00
Tratado 6 %	0,00	0,00	0,00	7,50
Tratado 10 ⁶ UFC/mL	0,00	0,00	0,00	0,00

a) sin diferencia significativa entre los grupos ($p > 0.05$)
 n = 40 *E. fetida* por cada grupo

El peso corporal promedio, de las lombrices, al inicio del ensayo correspondió a 0,346 g, valor aceptado por EPA, (2012). Al comparar los valores del peso final e inicial se pudo comprobar que todos los grupos incrementaron de peso. Esta variable fue mayor en los grupos tratados e inactivados del bioproducto IHPLUS® respecto a los individuos del grupo control (Figura 1).

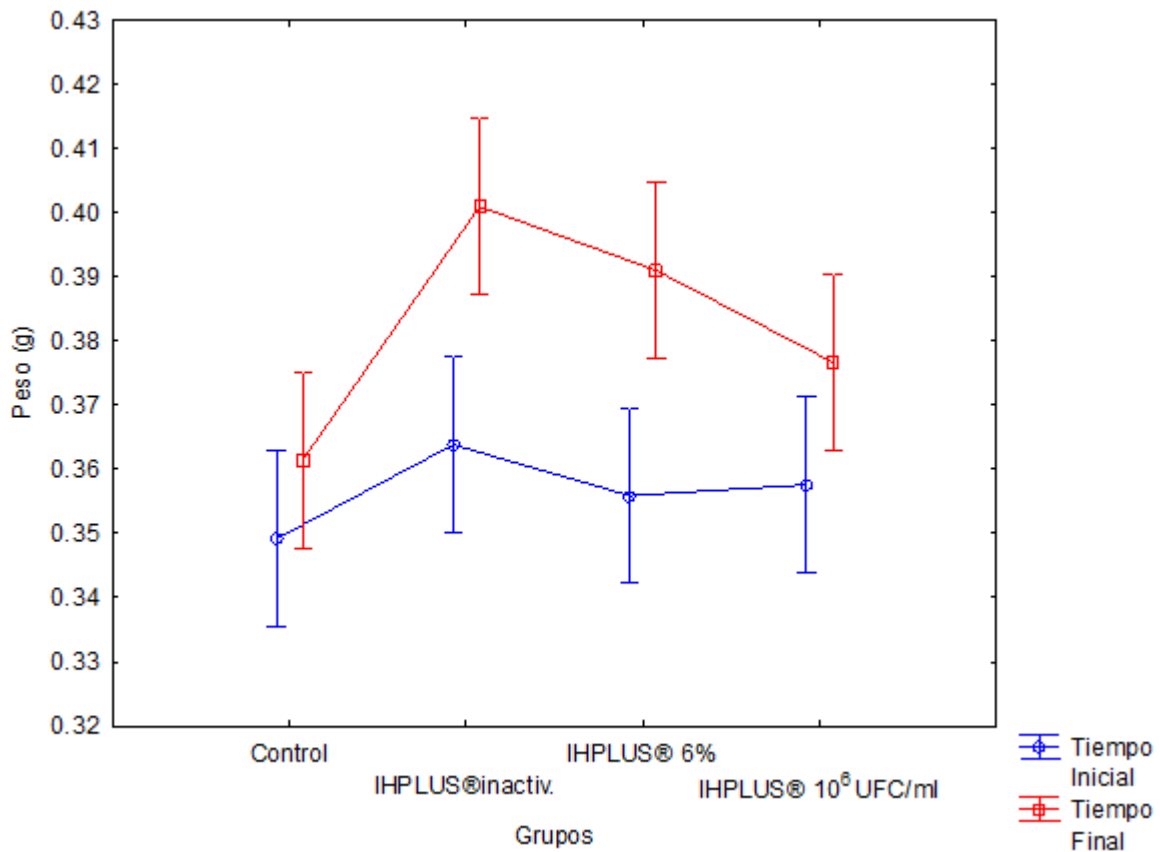


Figura 1. Peso de las lombrices durante el estudio con el bioproducto IHPLUS®.

El comportamiento de las variables ambientales cumplió con las especificaciones de la guía internacional EPA, (2012). La temperatura ambiental del local fluctuó de 19,7 a 21,9 °C, con un valor medio de $20,7 \pm 0,43$ °C y la intensidad luminosa de 454 a 793 lux con un valor promedio de $636,25 \pm 84,76$ lux.

El pH inicial del suelo de cada réplica se comportó de 6,8 a 7,2 con un valor medio de $7,03 \pm 0,11$. Esta variable al final del ensayo varió de 6,6 a 7,0 con un valor promedio de $6,8 \pm 0,1$. El desglose por grupo se relaciona en el [Tabla 3](#).

Tabla 3: Comportamiento del pH en el suelo durante el estudio.

Grupo	Inicio			28 días		
	Rango	Valor promedio \pm s	CV	Rango	Valor promedio \pm s	CV
Control	6,8-7,0	$6,9 \pm 0,1$	1,45	6,7-6,9	$6,85 \pm 0,07$	1,03
Inactivado	7,0-7,1	$7,07 \pm 0,06$	0,82	6,8-6,9	$6,88 \pm 0,05$	0,73
Tratado 6 %	7,0-7,1	$7,07 \pm 0,06$	0,82	6,6-6,8	$6,7 \pm 0,1$	1,42
Tratado 10^6 UFC/mL	7,0-7,2	$7,1 \pm 0,1$	1,41	6,8-7,0	$6,9 \pm 0,1$	1,39

El contenido de humedad final se comportó desde 38,21 % hasta 44,46 % con un valor medio de $40,92 \pm 1,76$ %. El contenido de humedad a los 28 días, de los diferentes grupos, se relaciona en el [Tabla 4](#).

Tabla 4: Valores de la humedad del suelo al término del estudio.

Grupo	Rango (%)	Valor promedio (%) \pm s	CV
Control	38,43-46,05	$41,75 \pm 2,11$	5,07
Inactivado	36,87-44,67	$40,87 \pm 1,94$	4,75
Tratado 6 %	37,33-44,65	$40,58 \pm 2,30$	5,67
Tratado 10^6 UFC/mL	37,03-44,54	$40,46 \pm 2,18$	5,39

El conteo de microorganismos en el suelo al finalizar el estudio en cada grupo experimental ([Tabla 5](#)) demostró que las lombrices estuvieron expuestas al bioproducto durante todo el tiempo del estudio. La presencia de bacterias, hongos y levaduras se incrementó de manera significativa ($p < 0,05$) al final del ensayo.

Tabla 5: Recuento de microorganismos en el sustrato al término del estudio.

Grupos	Inicio			28 días		
	HT* (UFC/g)	BT* (UFC/g)	Levaduras* (UFC/g)	HT** (UFC/g)	BT** (UFC/g)	Levaduras** (UFC/g)
Control	$1,61 \times 10^6$	$2,13 \times 10^{11}$	0	$1,31 \times 10^7$	$1,9 \times 10^{13}$	0
Inactivado	$9,85 \times 10^6$	$2,93 \times 10^{11}$	0	$1,33 \times 10^7$	$1,84 \times 10^{11}$	0
IHPLUS 6 %	$1,0 \times 10^6$	$1,58 \times 10^{12}$	$1,65 \times 10^5$	$2,83 \times 10^7$	$3,0 \times 10^{13}$	$2,0 \times 10^7$
Tratado 10^6 UFC/mL	$1,42 \times 10^6$	$1,83 \times 10^{12}$	$2,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^7$	$2,75 \times 10^{13}$	$1,6 \times 10^7$

Leyenda: HT: Hongos Totales, BT: Bacterias Totales.

HT (*, **); BT (*, **); Levaduras (*, **): Difieren estadísticamente según prueba de U-Mann Whitney.

Discusión

El suelo representa uno de los ecosistemas más complejos y diversos de la tierra. Constituye el principal soporte ambiental para la mayoría de las plantas, proporciona el hábitat para una gran diversidad de animales y taxones de microorganismos. La actividad biológica está altamente concentrada en las capas más superficiales, principalmente dentro de los 30 cm superiores, donde también se encuentran las concentraciones más altas de material orgánico. Por dicha razón, la

contaminación del suelo es un tema alarmante. La comunidad científica realiza esfuerzos por reemplazar los fertilizantes de origen químicos por biológicos, lográndose un alto impacto en la agricultura y en el ambiente.

En Cuba se establecen reglamentos para el uso de formulados plaguicidas y su liberación al ambiente depende de que no produzcan daños colaterales a las comunidades terrestres y acuáticas ([Dzul, 2016](#); [GO, 2007](#)). En el centro de Bioactivos Químicos, cumplimentando dichas regulaciones, se evalúan los posibles efectos ecotoxicológicos que pudieran tener productos químicos y biológicos en diferentes biomodelos.

En el estudio que se le realizó al IHPLUS[®] no se observó mortalidad y efecto adversos en *E. fetida*, esto pudiera estar dado a que el bioproducto es obtenido por vía similar a la de los microorganismos eficientes, constituyendo una mezcla compleja de bacterias y hongos. Según Tanya y Leiva-Mora, ([2019](#)) estas mezclas de microorganismos mejoran la estructura y agregación de las partículas del suelo, reduce su compactación, incrementa los espacios porosos, mejora la infiltración del agua, la disponibilidad de nutrientes en el suelo y eliminan efectos no deseables de la materia orgánica no descompuesta. También restablecen el equilibrio microbiológico del suelo y suprimen microorganismos dañinos, lo cual crea un hábitat adecuado para el desarrollo de los factores bióticos.

Al analizar el sustrato del mantenimiento de las lombrices durante el estudio se produce un aumento de la carga microbiana (hongos, bacterias y levaduras 28,2; 19 y 121,2 veces, respectivamente), en comparación con el inóculo inicial. A pesar de este aumento microbiano, se observó un incremento del peso promedio de las lombrices. Estos criterios son avalados por Acuña *et al.* ([2006](#)), quienes refieren, que los microorganismos en el suelo mantienen una mayor sensibilidad frente a procesos no deseables tales como: la contaminación o el mal manejo. Además, Luna y Mesa ([2016](#)) plantean que el aumento de la población de microorganismos eficientes, como una comunidad en el medio en que se encuentran, incrementa la actividad de los microorganismos naturales, enriquece la microflora, balancea los ecosistemas microbiales y suprime microorganismos patógenos.

De forma general podemos plantear que el bioproducto IHPLUS[®] no produce toxicidad sobre *E. fetida*; sin embargo para avalar la inocuidad ambiental de este producto es necesario la evaluación en otros biomodelos representativos de diferentes sistemas de organización y niveles tróficos del suelo, además de poder evaluarse con organismos de otras matrices como agua en caso de querer estudiar la posible llegada de estos biopreparados a los ecosistemas acuáticos.

Conclusiones

El ensayo realizado bajo las condiciones experimentales evaluadas indican que el bioproducto IHPLUS[®], no es tóxico, ni patogénico sobre el biomodelo *E. fetida* representativo de la fauna del ecosistema terrestre.

Bibliografía

- ACUÑA, O.; PEÑA, W.; SERRANO, E.; POCASANGRE L.; ROSALES, F.; DELGADO, E.; TREJOS J.; SEGURA, A.; FERRERA-CERRATO Y PÉREZ-MORENO, J. (2006). La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de los suelos. *Acorbat. XVII. Reunión Internacional de Bananicultura un Negocio Sustentable, 15-20 de octubre, Joinville-Santa Catarina*. Brasil: 222-223.
- ASTM. American society for testing and materials (2021). Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid Potworm *Enchytraeus albidus*. Pensilvania, Estados Unidos: ASTM E1676-12.
- BHATTACHARYYA, P.; GOSWAMI, M.; BHATTACHARYYA, L. (2016). Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: A Review. *Journal of Phytology*, 8: 26-41. doi:<https://doi.org/10.19071/jp.2016.v8.3022>.
- CLASEN, B. AND MOURA, R. (2019). Chapter 2: Ecotoxicological Tests as a Tool to Assess the Quality of the Soil. In: Vázquez-Luna, D. and Cuevas-Díaz, M. *Soil Contamination and Alternatives for Sustainable Development*. [en línea] Reino Unido: IntechOpen. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.82192>. [consultada: 3 septiembre 2021].
- DZUL, R. (Agosto - Diciembre, 2016). Respuestas toxicológicas en la lombriz de tierra *Eisenia foetida*, como bioindicador sensible a plaguicidas: revisión entre estudios laboratorio-campo. *Jaina Boletín Informativo*, 27(2): 17-25.
- 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. y Milera-Rodríguez, M. (2020). Obtención y utilización de microorganismos nativos: el bioproducto IHPLUS®. Proyecto Biocarbono. Cuba. <https://www.researchgate.net/publication/339916260>
- EPA. Environmental Protection Agency (1996). Background for Nontarget Organism Testing of Microbial Pest Control Agents. Washington DC. United States: EPA. 885.4000.
- EPA. Environmental Protection Agency (2012). Earthworm Subchronic Toxicity Test. Washington DC. United States: EPA 850.3100.
- 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: FAO 18-24 p.
- GO. Gaceta Oficial. (2007). Reglamento de uso de formulados plaguicidas. Año CV, No 16. Ministerio de Justicia. República de Cuba. <http://www.gacetaoficial.cu/>
- HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, A.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; BOSCH-INFANTE, D. Y CASTRO, N. (2019). La clasificación de los suelos de Cuba: énfasis en la versión de 2015. *Cultrop*, 40 (1): 15.
- LUNA, M. Y MESA, J. (2016). Microorganismos eficientes y sus beneficios para los agricultores. *Revista científica Agroecosistemas*, 4 (2): 31-40.
- MIGLANI, R. AND SINGH, S. (Oct, 2019). World of earthworms with pesticides and insecticides. *Interdiscip Toxicol*, 12(2): 71-82.
- MUÑOZ, J.; MORALES, Y.; BÁEZ, A.; QUINTERO, V.; RIVERA, A. y PÉREZ, R. (2016). Capítulo 5. Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos. En: *Instituciones de Educación Superior. La labor investigadora e innovadora en México*. Estados Unidos: Science Associated Editors L.L.C. SCASED, 67-82.
- OECD. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico. (1984). Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264070042-en>
- RAMÍREZ, P. Y MENDOZA, A. (2008). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 211-223 p.
- RODRÍGUEZ-EUGENIO N.; MCLAUGHLIN M. y PENNOCK D. (2019). La contaminación del suelo: una realidad oculta. Roma: FAO. 7-8 p.
- SHEKIN, D.J. (2011). Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures. New York: Chapman and Hall/CRC.



TANYA, M. y LEIVA-MORA, M. (abril-junio, 2019). Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Revista Centro Agrícola*, 46(2): 93-103.

TELLEZ-SORIAS, T. y ORBERÁ, T.R. (2018). Efecto estimulador del crecimiento de dos biopreparados biotecnológicos en cultivos de remolacha (*Beta Vulgaris* L.). *Rev. Cubana Quím*, 30 (3): 483-494

van GESTEL, C., LOUREIRO, S. AND ZIDAR, P. (Dec, 2018). Terrestrial isopods as model organisms in soil ecotoxicology: a review. *ZooKeys*, 801:127–162. <https://doi.org/10.3897/zookeys.801.21970>

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*. *Revista Ciencias Agronómicas*, (39), e019. <https://doi.org/10.35305/agro39.e019>



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).