



18/6/2018

UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI

TRABAJO  
FINAL DE  
GRADO

*METODOLOGÍA DE DIAGNÓSTICO DE  
TOXICIDAD DEL SUELO MEDIANTE EL USO DE  
EISENIA FOETIDA*

Tutor Académico | Ricardo Cordero Otero

Tutor Profesional | Jaume Bori Dols

Grado en Biotecnología | David García Rodríguez

## Tabla de contenido

Datos del centro.....	2
Resumen.....	4
Glosario.....	4
Introducción.....	5
Hipótesis.....	8
Objetivo.....	8
Metodología.....	8
PREPARACIÓN DEL SUELO ARTIFICIAL.....	9
TEST CON PAPEL DE FILTRO.....	9
PRUEBA DE SUELO ARTIFICIAL.....	10
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	12
Resultados y Discusión.....	12
Estudio con cloruro potásico.....	12
Estudio con cloracetamida.....	15
Estudio con fármaco.....	17
Discusión General.....	19
Conclusión.....	20
Bibliografía.....	21
Autoevaluación.....	23

## Agradecimientos

Agradezco en primer término a mi tutor académico, el doctor Ricardo Cordero, por aconsejarme y guiarme en este largo proceso que es el trabajo de final de grado. Me ha motivado para finalizar este proyecto y alimentar mi curiosidad científica para ser el mejor profesional posible.

También agradecer a mi tutor profesional, el doctor Jaume Bori, por enseñarme el mundo laboral que me espera cuando termine de cursar mis estudios. Por alentarme a continuar mis estudios y esculpir en mi un futuro investigador.

Y en último lugar, pero no menos importante, a mis padres por hacer posible esta oportunidad y darme los estudios que harán de mi la persona que quiero ser.

## Datos del centro

Eurecat, proveniente de *Eureka* y *Cataluña*, es la consolidación de diversas empresas del ámbito de la investigación. Resulta de la unión de Ascamm, Barcelona Media, Barcelona Digital, Cetemmsa y CTM.

Actualmente es la organización más potente de Cataluña a nivel tecnológico. Ofrece soluciones a las empresas que requieren sus servicios: ya sea realizando estudios para estas o como consultoría para estudios propios de empresa. Eurecat abarca investigaciones del sector alimentario, automoción, comercio, turismo, salud, recursos energéticos, recursos ferroviarios, aeronáuticos, etc.

Por lo que representa a la financiación, recibe subvenciones del estado para hacer estudios de ámbito público. Aunque la principal fuente de ingresos pertenece a los servicios que ofrece a las empresas privadas. La plantilla de la empresa consta de más de 600 profesionales titulados. Está desarrollando más de 160 proyectos de investigación dando servicio a más de 1000 empresas. Con este fin, Eurecat ha conseguido 73 patentes y 8 *spin-offs*.

Por tanto, los tres grandes ámbitos de actuación de Eurecat son el sistema público de I+D, la investigación aplicada al desarrollo tecnológico y el sistema productivo destinado a empresas privadas.

En la actualidad cuenta con 10 sedes corporativas, nueve de las cuales están en Cataluña. La décima sede se encuentra en Brasil.

De esta sinergia de entidades tecnológicas, el centro tecnológico de nutrición y salud (CTNS) ubicado en Reus, es uno de los centros que destina sus investigaciones al sector alimentario. En esta sede se realizan estudios para empresas privadas, a la vez que se desarrollan proyectos públicos en colaboración con la Universitat Rovira i Virgili.

La sede corporativa de Reus alberga además del CTNS, otra entidad, el Centro de Ciencias Ómicas (COS). Este centro dedica sus investigaciones a la proteómica, transcriptómica, genómica, metabolómica y epigenómica. (Centro Tecnológico de Nutrición y Salud. CTNS 2018)

## Resumen

La metodología elaborada en este ensayo propone establecer una relación directa por la que se conoce el efecto que causa una sustancia en el medio ambiente. Para ello se utiliza un organismo modelo y un medio de cultivo que simule este posible escenario. La lombriz roja californiana es el organismo modelo que se encuentra en gran variedad de ambientes terrestres, por lo que se ha escogido para realizar el experimento. En cuanto al medio de cultivo, se elabora un suelo artificial a base de arena, arcilla y turba que simula las propiedades de un suelo con un pH, capacidad de retención de agua y textura categorizadas de estándar.

La mortalidad del 50% de la población con cloruro potásico es de 4,34g/kg de suelo, y en cloracetamida es 6,84g/kg de suelo. En la sustancia test, la concentración de mortalidad del 50% de la población es 4,01g/kg de suelo. En base a las sustancias de referencia analizadas, se puede establecer una relación entre la concentración de tóxico y el número de individuos muertos en la experimentación. Comparando la sustancia test, se puede aproximar que la metodología aplicada si ofrece unos resultados que validen la toxicidad de dicha sustancia.

## Glosario

- Clitelo: Estructura tegumentaria glandular característica de las lombrices en estado de madurez sexual o adultas.
- LOEC (lowest observed effect concentration): Concentración más baja de sustancia a la que se observan efectos significativos.
- NOEC (no observed effect concentration): Concentración más elevada a la que no se observan efectos significativos.
- Ring test: Ensayo interlaboratorio que valida un método en base a los diferentes resultados obtenidos por los participantes del estudio.
- Suelo: Medio en el que un ecosistema se desarrolla.
- Turba: Carbón fósil formado de residuos vegetales, de color pardo oscuro, aspecto terroso y poco peso.
- WHC (water holding capacity): capacidad de retención de agua.

## Introducción

La ecotoxicología por definición es el estudio del efecto de compuestos químicos tóxicos sobre los seres vivos, especialmente en cuanto a poblaciones, comunidades y ecosistemas. Este tipo de estudios nace a raíz de los avances que se han hecho en medicina, tecnología, farmacología, etc. La preocupación de mantener la salud de la especie humana y cuanto la rodea es el principal motor de desarrollo de investigaciones. Pero con este avance, es necesario un estudio que documente el impacto que tienen estos nuevos fármacos y residuos en el medio ambiente. Desde los años 80 se implementan nuevas técnicas y metodologías de forma oficial para definir las limitaciones de estas sustancias que acaban siendo tóxicas. El medio ambiente se ve perjudicado por estas sustancias, ya sea por el ecosistema o por el terreno.

Uno de los campos de estudio que más ha desarrollado estudios toxicológicos en el medio ambiente es el descubrimiento y patentado de pesticidas tales como los herbicidas, insecticidas, fungicidas, etc. Estos compuestos, generalmente químicos, previenen que los alimentos sean devorados por plagas de organismos. Se evita mediante un producto que resulta inocuo para los humanos, pero con el tiempo se ha demostrado que causa un efecto adverso en el ecosistema. Los agentes utilizados en pesticidas afectan al suelo, que es donde se acumulan, alterando las propiedades del mismo y a las especies que conviven en ese espacio(G. Yang et al. 2018).

Las últimas guías ecotoxicológicas son del 2016(OECD 2016), por lo que es un tema que preocupa actualmente.

El motivo de utilizar el género *Eisenia* es que es de los organismos que más se encuentran en la biomasa del suelo (60-80%)(Omouri et al. 2018). La interacción que muestran con el suelo es capaz de cambiar las propiedades físicas, biológicas y químicas, generalmente mejorando la descomposición de materia orgánica y por consiguiente el ciclo de nutrientes. Los suelos mejoran la aireación, la fertilidad y la disposición de nutrientes cuando hay presencia de *Eisenia foetida* y *Eisenia andrei*. Por ello son los bioindicadores más utilizados en estudios para remediar la contaminación del medio ambiente.

Los efectos que se observan a simple vista en este organismo son claros: Se aprecia una pérdida de volumen de la lombriz debido a la deshidratación. Aunque en términos reales la pérdida de masa no es grave. *Eisenia* presenta una exanguinación cutánea, una pérdida masiva de sangre a través de la piel. Además de los que se ven a simple vista, las lombrices sufren daños neuronales ocasionados por daños intestinales asociados con el estrés oxidativo (Y. Yang et al. 2018).



*Figura 1: En la figura 1 se muestra el comportamiento de un ejemplar de Eisenia foetida durante un ensayo en cuatro imágenes. En la primera imagen (A) la lombriz se encuentra en un buen estado de salud, se observa el cuerpo de forma regular, estado previo al contacto con la sustancia tóxica. En la segunda imagen (B) cuando se le aplica el tratamiento con una sustancia tóxica el animal reacciona con espasmos retorciéndose sobre sí mismo. El primer contacto con el tóxico provoca una primera pérdida de agua. En la tercera imagen (C) la lombriz se acostumbra al tóxico aunque sigue haciendo efecto en su organismo. Se aprecia una forma irregular de su cuerpo debido a la pérdida de agua que ha sufrido. El animal se encuentra en pleno estudio, por lo que continúa absorbiendo tóxico continuamente. En la última imagen (D) la lombriz ya no responde a estímulos mecánicos, está muerta. La deshidratación es completa, se observa una pérdida de color por la exanguinación. Imagen extraída de (Gao et al. 2007)*

Para que este tipo de estudios se consideren válidos la sustancia de referencia debe estar biodisponible durante el ensayo. Una sustancia de referencia ideal causa efecto en un porcentaje elevado de la población mostral de un estudio en una concentración inferior a 1g/kg de suelo (Niemeyer et al. 2018).

La mayoría de ensayos ecotoxicológicos que se desarrollan con lombrices combinan diferentes estudios. Para dar unos resultados completos y caracterizar el estudio se combinan las guías de letalidad (OECD 1984) y reproductibilidad (OECD 2016). Combinando ambos estudios se consiguen datos del porcentaje de supervivencia, resistencia a la sustancia tóxica, y el grado de reproducción/fertilidad en su presencia. En función de cual sea el tóxico, se ve más afectada una de estas características, por eso se estudian las tres como un

conjunto. Con triclosán se ve más afectada la reproductibilidad que no el porcentaje de mortalidad(Zaltauskaite and Miskelyte 2018). En cambio, con Clotianidina se muestra una letalidad elevada a bajas concentraciones en comparación con otros pesticidas que son de uso extendido(G. Yang et al. 2018).

Las sustancias de referencia escogidas para elaborar esta metodología son el cloruro potásico (KCl) y la cloracetamida ( $\text{ClCH}_2\text{CONH}_2$ ). El cloruro potásico es una sal que se emplea tanto para la cocina como para la síntesis de medicinas. También se utiliza para ejecuciones legales (inyección letal). Para la síntesis de medicinas de consumo humano o animal (animales de granja y de compañía). Aunque de todas las aplicaciones la que ocupa la mayor cantidad es la de producción de fertilizante. Se administra para suplementar potasio a los cultivos. La dosis a administrar es un factor importante, en caso de sobrepasar la dosis o de acumularse en el suelo nacen los problemas de contaminación.

La cloracetamida es un herbicida de uso extendido. Además de proteger los cultivos de plagas de insectos, también se aplica como preservante. Este producto está catalogado como tóxico en caso de ingestión. Provoca fuertes reacciones alérgicas en contacto con la piel. Principalmente es un contaminante del agua, pero también se acumula en tierras. En función de la capacidad de retención de agua de cada sustrato, se acumula más cloracetamida o menos. En la mayoría de suelos, así como en la composición del suelo artificial (medio de cultivo para este estudio), la capacidad de retención de agua es elevada, por lo que el factor de contaminación es elevado.

La sustancia test escogida es otro pesticida, el clorantraniliprol. Es el cuarto tipo de pesticida más usado en todo el mundo(Liu et al. 2018). Se trata de un insecticida de primera generación, con el grupo diamida como grupo reactivo. Mediante este reactivo, los insectos que sufren su efecto liberan un exceso de iones calcio, muriendo por parálisis muscular. Cuando se aplica en el campo, parte del pesticida filtra a la tierra, donde su vida media oscila entre los 30 y los 1130 días. Este compuesto no forma parte de ningún *ring test*, por lo que sirve para obtener una  $\text{LC}_{50}$  y comparar los resultados con otros estudios existentes para corroborar el método.

## Hipótesis

El método descrito en este trabajo puede aproximar las consecuencias inmediatas de una sustancia, inicialmente conocida como tóxica, en el medio en el que se libera.

## Objetivo

El objetivo de este estudio es comprobar si la metodología elaborada da resultados fehacientes que relacionen directamente una sustancia con la muerte de un organismo. Dicho organismo modelo es *Eisenia foetida* y se analiza el efecto del tóxico en un medio de cultivación que simula el medio natural.

## Metodología

Determinar la toxicidad de un compuesto y medir sus efectos en el medio ambiente es un papel difícil de numerar o calificar debido a todas las variables que se deben tener en cuenta. No solamente entendemos medio ambiente como la tierra a la que afecta, sino a todo el ecosistema que lo habita. Para elaborar una metodología que se pueda aceptar es necesario escoger un suelo que tenga las características comunes de varios microambientes. Al mismo tiempo, el organismo escogido debe ser un organismo modelo que esté bien caracterizado y se encuentre en gran variedad de microambientes. En cuanto a la sustancia tóxica se utiliza más de una para validar el ensayo. En base a estudios anteriores, los tóxicos de referencia son una sal común, cloruro potásico (KCl) y un herbicida de uso extendido, cloroacetamida ( $C_2H_4ClNO$ ). Para acabar de corroborar la metodología se utiliza un último tóxico, un fármaco que se destina comúnmente a campos de cultivo. Estos fármacos acaban en su mayor parte en el suelo, por lo que se filtran al ecosistema residente de ese suelo.

El suelo es uno de los puntos críticos de la metodología, escogiendo un suelo artificial del cual se conoce los componentes se consigue controlar la adsorción del tóxico para un buen estudio. El suelo artificial más utilizado en estudios anteriores se basa en dos componentes: arena y arcilla. Con estos dos compuestos se consigue una tierra artificial cuya granulación es tan baja que la mezcla es prácticamente homogénea. La sustancia tóxica en este medio se distribuye lenta pero totalmente. Para añadir la cantidad de nitrato y fosfato

necesaria para el organismo modelo en este ensayo se añade un tercer componente, la turba.

En un ecosistema conviven todos los reinos de seres vivos, por lo que definir cuan tóxico es un compuesto en base a una única especie no se puede calificar de riguroso. En este ensayo se detalla la metodología para *Eisenia foetida*, con el nombre común de lombriz roja californiana. Este organismo modelo se ha utilizado para estudios ecotoxicológicos, por lo que la validez del ensayo depende de los datos que se comparen con la biblioteca disponible.

Después de varias modificaciones de un PNTM (procedimiento normalizado de trabajo de metodologías), el proyecto final queda a disposición de la empresa en la que hice las prácticas.

## PREPARACIÓN DEL SUELO ARTIFICIAL

1. Mezclar los componentes del suelo en seco (utilizar un tamizador para facilitar la mezcla)

COMPONENTE	PORCENTAJE
ARENA INDUSTRIAL	70
ARCILLA	20
TURBA	10

2. Aportar el 80% de la WHC con agua destilada (35g de agua destilada en 100g de suelo artificial)
3. Mezclar hasta que quede todo el suelo húmedo.
4. Ajustar el pH hasta que tenga un valor de  $6.0 \pm 0.5$  con carbonato cálcico.

## TEST CON PAPEL DE FILTRO

Este primer test se elabora para comprobar que la concentración de tóxico es suficiente para causar efecto en las lombrices. Se observa cual es el comportamiento de *Eisenia foetida* en contacto con el tóxico y el tiempo que tarda en aclimatarse al cambio de medio.

1. Se preparan 5 concentraciones de tóxico además de la solución control, reproduciendo 10 réplicas de cada concentración.

Amount applied to filter paper		Concentration of solution applied
1.0	mg/cm <sup>2</sup>	$7 \times 10^{-2}$ g/ml
0.1	mg/cm <sup>2</sup>	$7 \times 10^{-3}$ g/ml
0.01	mg/cm <sup>2</sup>	$7 \times 10^{-4}$ g/ml
0.001	mg/cm <sup>2</sup>	$7 \times 10^{-5}$ g/ml
0.0001	mg/cm <sup>2</sup>	$7 \times 10^{-6}$ g/ml

Figura 2: Tabla de concentraciones para el test con papel de filtro

2. Preparar gusanos en papel de filtro húmedo 3 horas antes de la experimentación. Se les vacía el intestino para que no alteren los resultados de pesaje.
3. Aclarar gusanos y secar en papel de filtro.
4. Cubrir el interior de los recipientes (placas de Petri) con papel de filtro.
5. Pipetear 1mL de sustancia tóxica en la placa de Petri.
6. Desechar el tóxico a temperatura ambiente. Con esto la sustancia se absorbe en el medio y no contamina al organismo en el primer contacto, sino que lo absorbe del medio progresivamente imitando el medio natural.
7. Pipetear 1mL de agua destilada para rehumedecer el papel de filtro.
8. Introducir un ejemplar por placa.
9. Cubrir la placa para evitar que las lombrices escapen. La lombriz intenta escapar debido al rechazo que le crea el tóxico.
10. Incubar a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas sin luz (permitido hasta 72 horas para obtener más resultados).
11. Se considera muerto una lombriz cuando se le estimula mecánicamente su extremo delantero (próximo al clitelo). Si después de estimular no hace ningún movimiento el sistema nervioso ha dejado de funcionar.

### PRUEBA DE SUELO ARTIFICIAL

Este estudio ofrece los resultados definitivos para la correlación de la sustancia tóxica y el organismo modelo.

1. Preparar 6 tubos con 0, 1.59, 3.17, 6.34, 12.68 y 25.36g de sustancia tóxica por kilogramo de peso seco de suelo artificial. La concentración

máxima se pone en función del límite establecido(Niemeyer et al. 2018)

2. Se preparan 6 recipientes de concentraciones distintas, con cuatro réplicas por concentración (un total de 24 recipientes). Cuantas más réplicas de cada concentración, más información se obtiene. Con cuatro réplicas se obtiene la  $LC_{50}$ , la concentración más baja a la que se observa mortalidad (LOEC), y la concentración más elevada a la que no se observa mortalidad (NOEC).
3. Pesar 750g de suelo artificial en cada recipiente.
4. Se mezcla el tóxico con el suelo para que se distribuya de forma homogénea. Este paso se realiza en un recipiente esférico para evitar las esquinas y que la distribución sea más cómoda y eficiente.
5. Aclimatar lombrices 24h antes de ponerlos en contacto con el tóxico. Reposan en suelo artificial al 80% de la WHC sin comida para que se acomoden al medio de cultivo.
6. Se deja secar los recipientes de ensayo a temperatura ambiente.
7. Se añade agua destilada en la misma proporción que se añadió el tóxico. De este modo las lombrices absorben el tóxico progresivamente emulando una tierra contaminada.
8. Se introducen 10 lombrices por recipiente y se tapa con parafilm para evitar que se fuguen.
9. Realizar perforaciones en el parafilm para evitar la falta de oxígeno y favorecer el intercambio de gases.
10. Incubar a  $20 \pm 2^{\circ}C$  con exposición continua de luz durante 14 días.
11. Si es necesario, reponer la cantidad de agua destilada que se haya evaporado para mantener el 80% de la WHC. Controlar que las lombrices estén en contacto con el medio de cultivo (evitar que se acomoden en parafilm).
12. Observar la mortalidad a los 7 días y 14 días. A los 7 días se retiran las lombrices muertas para evitar que induzcan el mismo efecto en el resto de organismos del recipiente.

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los datos se recogen en una plantilla que se adjunta con el PNTM. Y el grosor del análisis de resultados se realiza con programas estadísticos.

1. Estimular el extremo más próximo al clitelo para comprobar el estado de cada lombriz. Si la lombriz articula movimiento se considera sana. También se observa el extremo más alejado del clitelo, si está amarillo denota estrés en el animal. Cualquier comportamiento anormal se debe anotar.
2. Registrar la mortalidad de cada recipiente en una plantilla a los 7 días y a los 14 días. Además, se pesan las lombrices para contabilizar la masa perdida de cada recipiente.
3. Calcular la  $LC_{50}$  con los límites de confianza correspondientes mediante una prueba estadística (*probit analysis*).
4. Realizar el análisis estadístico *Probit analysis* (SPSS) con los datos registrados en la plantilla. El modelo estadístico *Probit* se describe como la inversa de la función cuantil, asociada a la distribución normal estándar. Ofrece datos con “unidades de probabilidad” o *probits*. Con los datos registrados se elabora una gráfica que estudia la dinámica y estima la probabilidad del factor objeto.
5. Anotar la  $LC_{50}$ , la NOEC y la LOEC. Explicar los comportamientos anormales registrados en función de la concentración a la que han sido expuestos.

## Resultados y Discusión

El registro de datos obtenidos de la experimentación se anota en la plantilla de *Microsoft Office Excel*.

### Estudio con cloruro potásico

Después de estimular las lombrices de forma mecánica se registra los datos en la plantilla. Mediante el *probit* se obtiene las diferentes probabilidades, de las cuales se obtiene como resultado la  $LC_{50}$ , correspondiente al *probit 0,500*.

	Probabilidad (%)	95% de límites de confianza para concentración		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT <sup>a</sup>	1	2,124	-1,514	3,161
	2	2,384	-,776	3,382
	3	2,548	-,319	3,532
	4	2,672	,019	3,653
	5	2,773	,288	3,755
	6	2,859	,513	3,847
	7	2,934	,707	3,931
	8	3,002	,877	4,010
	9	3,063	1,029	4,084
	10	3,119	1,167	4,155
	15	3,353	1,705	4,478
	20	3,538	2,094	4,775
	25	3,698	2,396	5,061
	30	3,841	2,642	5,343
	35	3,973	2,849	5,624
	40	4,099	3,029	5,908
	45	4,220	3,190	6,197
	50	4,340	3,335	6,493
	55	4,460	3,471	6,799
	60	4,581	3,600	7,119
	65	4,707	3,726	7,458
	70	4,840	3,851	7,822
	75	4,983	3,979	8,222
	80	5,142	4,115	8,674
	85	5,327	4,265	9,208
	90	5,561	4,446	9,890
	91	5,617	4,489	10,056
	92	5,679	4,534	10,236
	93	5,746	4,584	10,435
	94	5,821	4,639	10,658
	95	5,907	4,701	10,913
	96	6,008	4,772	11,214
	97	6,132	4,860	11,584
	98	6,297	4,974	12,078
	99	6,556	5,150	12,860

Figura 3: Resultado del ensayo de cloruro potásico a los 14 días

La  $LC_{50}$  de cloruro potásico a los 7 días es de 4,340g/kg de medio de cultivo. Con unos límites de confianza del 95%, los márgenes superior e inferior respectivamente son de 6,493g/kg y 3,335g/kg de medio de cultivo. Los grupos de concentraciones más elevadas (C1, C2 y C3) se desecharon al no tener sujetos vivos. Los datos obtenidos a los 14 días de ensayo no varían con los datos obtenidos a los 7 días, por lo que es el mismo.

Este resultado está dentro de los parámetros definidos por el *ring test* por lo que el método es fiable para analizar éste tóxico.

Además de conocer la concentración de tóxico correspondiente al 50% de mortalidad, también se controla el peso para conocer en qué estado se encuentran las lombrices que se consideran vivas. El control de peso se aplica a los grupos control, C5 y C4 ya que son los que han finalizado el experimento con sujetos vivos.

<i>Muestras</i>	<i>Peso inicial (g)</i>	<i>Peso final (g)</i>	<i>Diferencia de peso (g)</i>	<i>Media de peso por grupos</i>	<i>Media de peso total</i>
<i>Control 1</i>	4,078	3,648	0,430		
<i>Control 2</i>	4,374	4,036	0,338	0,318	
<i>Control 3</i>	4,033	3,846	0,187		
<i>C5.1</i>	3,371	2,733	0,638		
<i>C5.2</i>	3,983	3,935	0,048	0,314	0,403
<i>C5.3</i>	4,336	4,078	0,258		
<i>C4.1</i>	3,270	2,107	1,163		
<i>C4.2</i>	3,202	2,795	0,407	0,577	
<i>C4.3</i>	3,898	3,737	0,161		

En general, las lombrices han perdido, de media, 400 gramos a lo largo del experimento. Por lo que los que han mostrado resistencia a la sustancia tóxica también muestran daños. Únicamente un sujeto del estudio ha mostrado daños físicos asociados al estrés del medio de cultivo, cola amarillenta. Observando las medias de peso perdido por grupos, se puede definir una relación de concentración de tóxico y masa perdida. A mayor concentración de tóxico, mayor pérdida de peso observada.

### Estudio con cloracetamida

El estudio con cloracetamida plantea resultados menos bruscos que el cloruro potásico. Se observa en los diferentes grupos un gradiente de sujetos muertos al incrementar la concentración de sustancia tóxica.

Para realizar las concentraciones de cloracetamida se han seguido mismas diluciones que en el estudio anterior, siendo la concentración media 6,34g/kg de medio de cultivo.

**Límites de confianza**

	Probabilidad (%)	95% de límites de confianza para concentración		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	1	-1,510	-4,182	,129
	2	-,532	-2,877	,937
	3	,089	-2,055	1,456
	4	,556	-1,441	1,850
	5	,936	-,945	2,174
	6	1,260	-,525	2,453
	7	1,543	-,159	2,699
	8	1,797	,166	2,922
	9	2,028	,461	3,126
	10	2,241	,730	3,316
	15	3,121	1,822	4,124
	20	3,820	2,658	4,798
	25	4,420	3,348	5,403
	30	4,959	3,943	5,972
	35	5,458	4,473	6,521
	40	5,932	4,956	7,060
	45	6,391	5,408	7,598
	50	6,842	5,838	8,142
	55	7,293	6,257	8,697
	60	7,751	6,672	9,272
	65	8,225	7,093	9,874
	70	8,725	7,528	10,517
	75	9,263	7,990	11,218
	80	9,863	8,498	12,006
	85	10,563	9,082	12,932

90	11,443	9,808	14,106
91	11,655	9,983	14,390
92	11,886	10,172	14,700
93	12,140	10,379	15,041
94	12,424	10,610	15,422
95	12,747	10,873	15,857
96	13,127	11,181	16,370
97	13,594	11,559	17,001
98	14,215	12,060	17,841
99	15,194	12,846	19,167

Figura 4: Resultado del ensayo de cloracetamida a los 14 días

La LC<sub>50</sub> de la cloracetamida al final del test es de 6,842g/kg de suelo artificial, con unos límites superior e inferior de 8,142g/kg y 5,838g/kg de suelo artificial respectivamente. Las concentraciones que se han aproximado en un inicio han cumplido el porcentaje de mortalidad del 50% de la población en la concentración media.

En este caso el resultado está ligeramente desviado del *ring test*, concretamente 0,842g/kg de medio de cultivo. Pero los límites son tan amplios que es aceptable, de modo que este estudio de referencia también valida el método.

Muestras	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Diferencia de peso (g)	Media de peso por grupos	Media de peso total
Control 1	3,017	2,873	0,144	0,309	0,473
Control 2	5,067	4,724	0,343		
Control 3	3,225	2,786	0,439		
C5.1	3,589	3,179	0,410	0,317	
C5.2	3,324	2,976	0,348		
C5.3	4,005	3,812	0,193		
C4.1	4,235	3,792	0,443	0,565	
C4.2	3,897	3,210	0,687		
C4.3	3,641	3,077	0,564		
C3.1	3,689	3,002	0,687	0,702	
C3.2	3,488	2,698	0,790		
C3.3	3,043	2,415	0,628		

C2.1	4,226	--
C2.2	5,263	--
C2.3	3,357	--
C1.1	3,526	--
C1.2	4,238	--
C1.3	3,356	--

Al igual que en el ensayo de cloruro potásico, las medias de pérdida de peso se incrementan de forma directa con la concentración de cloracetamida. Esta medida es meramente orientativa, ya que no se puede establecer una correlación directa entre la pérdida de peso y el porcentaje de muertes. Sí sirve para establecer una relación de causalidad entre la pérdida de peso y la concentración de tóxico utilizada en cada grupo del estudio. Se ha obviado el pesaje final de la concentración C2, solamente había un ejemplar vivo.

### Estudio con fármaco

El fármaco de estudio es la Clorantraniliprol. Este pesticida se aplica directamente a campos de cultivo, donde las plantas lo absorben. El problema que plantea este pesticida es la bioacumulación en el suelo de cultivo. Cuando se rocía en el campo, parte de este fármaco acaba en la tierra.

Con esta sustancia se han elaborado concentraciones de tóxico distintas a las sustancias de referencia.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN
CONTROL	0 g/kg
C1	10g/kg
C2	7g/kg
C3	5g/kg
C4	3g/kg
C5	1g/kg

En base a estas concentraciones se hicieron tres réplicas de cada una, obteniendo los resultados.

	Probabilidad (%)	95% de límites de confianza para concentración		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT 1		,669	-,735	1,496
2		1,061	-,200	1,812
3		1,309	,138	2,015
4		1,496	,391	2,168
5		1,648	,596	2,294
6		1,777	,770	2,401
7		1,890	,922	2,496
8		1,992	1,058	2,581
9		2,084	1,181	2,659
10		2,169	1,294	2,731
15		2,521	1,757	3,035
20		2,801	2,117	3,283
25		3,041	2,420	3,502
30		3,256	2,686	3,705
35		3,456	2,926	3,900
40		3,645	3,147	4,091
45		3,828	3,354	4,283
50		4,009	3,551	4,479
55		4,189	3,742	4,681
60		4,372	3,928	4,893
65		4,562	4,115	5,119
70		4,762	4,305	5,363
75		4,977	4,505	5,633
80		5,217	4,720	5,940
85		5,496	4,965	6,304
90		5,848	5,265	6,769
91		5,933	5,337	6,883
92		6,026	5,414	7,006
93		6,127	5,499	7,143
94		6,241	5,593	7,295
95		6,370	5,700	7,470
96		6,522	5,825	7,676
97		6,709	5,977	7,930
98		6,957	6,179	8,268
99		7,348	6,495	8,804

Figura 5: Resultado del ensayo de Clorantraniliprol a los 14 días

La LC<sub>50</sub> de este fármaco al final del test es de 4,01g/kg de medio de cultivo, con límites superior e inferior de 4,48g/kg y 3,55g/kg de suelo artificial. En comparación con los artículos ya escritos, se aprecia una diferencia de 0,52g/kg de suelo artificial, por lo que los límites están dentro de los resultados esperados.

<i>Muestras</i>	<i>Peso inicial (g)</i>	<i>Peso final (g)</i>	<i>Diferencia de peso (g)</i>	<i>Media de peso por grupos</i>	<i>Media de peso total</i>
<i>Control 1</i>	3,068	2,894	0,174		
<i>Control 2</i>	3,654	3,487	0,167	0,152	
<i>Control 3</i>	3,367	3,251	0,116		
<i>C5.1</i>	4,235	4,114	0,121		
<i>C5.2</i>	3,657	3,429	0,228	0,174	
<i>C5.3</i>	3,049	2,877	0,172		
<i>C4.1</i>	5,326	4,926	0,400		0,334
<i>C4.2</i>	4,235	3,830	0,405	0,420	
<i>C4.3</i>	4,208	3,754	0,454		
<i>C3.1</i>	3,789	3,107	0,682		
<i>C3.2</i>	3,706	3,099	0,607	0,592	
<i>C3.3</i>	4,027	3,540	0,487		
<i>C2.1</i>	5,228	--			
<i>C2.2</i>	3,269	--			
<i>C2.3</i>	3,476	--			
<i>C1.1</i>	4,235	--			
<i>C1.2</i>	3,426	--			
<i>C1.3</i>	3,205	--			

En cuanto a la diferencia de peso observada podemos establecer una correlación entre la pérdida de peso por grupo y la concentración de tóxico.

## Discusión General

Los datos que aportan el estudio con cloruro potásico, cloracetamida y el fármaco son concluyentes. Los dos primeros estudios validan la técnica, siendo las sustancias de referencia. Se han obtenido resultados similares a los del *ring test*,

por lo que el método elaborado es fiable para obtener datos de ecotoxicología. El tercer ensayo realizado muestra la concentración límite a la cual el organismo modelo *Eisenia foetida* muere por intoxicación.

Asumiendo que el organismo modelo y el medio de cultivo son representativos de la mayoría de ambientes, se puede confirmar que el método es efectivo y proporciona resultados fehacientes.

Los datos necesarios para obtener las medidas LOEC y NOEC se basan en el número de réplicas de cada concentración. Debido al número de lombrices disponibles y la cantidad de medio de cultivo no se ha podido realizar más réplicas. Aun así, las  $LC_{50}$  obtenidas reflejan un elevado nivel de fiabilidad para la técnica.

Respecto a los datos obtenidos del pesaje de las lombrices no se puede obtener una relación exacta que garantice la toxicidad de una sustancia. En los tres ensayos, la pérdida de peso de los grupos control ha sido muy similar a la de los grupos de concentración menor.

El test realizado con papel de filtro es un pre-test que nos sirve para poder aproximar la concentración letal del 50% de la población, para así realizar un ensayo con suelo artificial con las concentraciones más próximas a la  $LC_{50}$ . Con un mayor número de ensayos se podría establecer una ecuación por la cual la concentración de tóxico en papel de filtro sea  $X$  veces la concentración de tóxico en suelo artificial.

## Conclusión

A modo conclusivo, el método elaborado se considera válido para realizar estudios ecotoxicológicos por los resultados obtenidos en los tres ensayos de prueba, siendo del mismo rango que los recogidos en (Yearley, Lazorchak, and Pence 1995). Esta metodología se puede emplear para comprobar la toxicidad de sustancias tales como pesticidas, fármacos y otras medicinas; o bien para determinar si un suelo está ya contaminado con alguna sustancia.

Este método es válido para aproximar las consecuencias inmediatas de una sustancia, inicialmente conocida como tóxica, en el medio en el que se libera.

## Bibliografía

“Centro Tecnológico de Nutrición y Salud. CTNS.” 2018. <http://www.ctns.cat/es> (April 18, 2018).

Gao, Yuhong, Zhenjun Sun, Xinsheng Sun, and Yongzhan Bao. 2007. “Toxic Effect of Olaquinox Antibiotic on *Eisenia Fetida*.” *European Journal of Soil Biology* 43(SUPPL. 1): 252–55.

Liu, Tong et al. 2018. “Growth, Reproduction and Biochemical Toxicity of Chlorantraniliprole in Soil on Earthworms (*Eisenia Fetida*).” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 150(December 2017): 18–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.010>.

Niemeyer, Júlia Carina et al. 2018. “Boric Acid as Reference Substance for Ecotoxicity Tests in Tropical Artificial Soil.” *Ecotoxicology* 27(4): 395–401.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s10646-018-1915-7>.

OECD. 1984. “OECD 207 -Earthworm, Acute Toxicity Tests.” *OECD Guideline for Testing of Chemicals* 207(April): 9.

———. 2016. “Oecd/Ocde 222.” (July).

Omouri, Zohra, Jalal Hawari, Michel Fournier, and Pierre Yves Robidoux. 2018. “Bioavailability and Chronic Toxicity of Bismuth Citrate to Earthworm *Eisenia Andrei* Exposed to Natural Sandy Soil.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147(August 2017): 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.018>.

Yang, Guiling et al. 2018. “Combined Effects of Four Pesticides and Heavy Metal Chromium (VI) on the Earthworm *Eisenia Fetida* as a Toxicity Endpoint.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 157(March): 191–200.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.067>.

Yang, Yang et al. 2018. “Intestinal Damage, Neurotoxicity and Biochemical Responses Caused by Tris (2-Chloroethyl) Phosphate and Tricresyl Phosphate on Earthworm.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 158(January): 78–86.

Yeardley, Roger B., James M. Lazorchak, and Michael A. Pence. 1995.

“Evaluation of Alternative Reference Toxicants for Use in the Earthworm Toxicity Test.” *Environmental Toxicology and Chemistry* 14(7): 1189–94.

Zaltauskaite, J., and D. Miskelyte. 2018. “Biochemical and Life Cycle Effects of Triclosan Chronic Toxicity to Earthworm *Eisenia Fetida*.” *Environmental Science and Pollution Research*: 1–9.

## Autoevaluación

Mi experiencia en el laboratorio la valoro positivamente. Ha sido una experiencia enriquecedora, ya que he aprendido a desarrollar mis habilidades en el laboratorio. Así como a coordinar mi trabajo con otros compañeros de diferentes ámbitos para conseguir finalizar un proyecto común. Trabajar en un centro de estas características me ha dado una idea de lo que es el mundo de la investigación. He observado como es de competitivo y el esfuerzo que se emplea día a día para poder ofrecer nuevos servicios a las empresas para continuar con el trabajo de investigación. Es una tarea que se desarrolla diariamente y que está bajo revisión continua. Los protocolos y PNT que se utilizan están bajo modificación constante para hacerlos más eficientes en cuanto a tiempo y dinero. Pasan controles internos y externos para validar los métodos y la forma de trabajo de los técnicos. Todo tiene un control de entrada y salida, desde los equipos que se utilizan, los reactivos que se gastan, hasta los propios investigadores, garantizando un seguimiento de la empresa para detectar y corregir errores en el menor tiempo posible.

La experiencia práctica que he adquirido en estas 270 horas me ha servido para aprender, principalmente, a gestionar el tiempo en el laboratorio y trabajar individualmente de la forma más eficiente que he podido. He internalizado mejores hábitos en el laboratorio y he perfeccionado mi técnica para lograr un trabajo más pulcro. Además, he tenido la oportunidad de trabajar con seres vivos, lo que considero un plus de experiencia.

Junto a mi tutor profesional he dirigido un proyecto y he realizado todas las tareas asociadas a este. Por lo que creo que las competencias de investigador las he asimilado en gran parte. He conocido profesionales del ámbito biotecnológico que me han guiado durante el proceso y me han ayudado a trabajar la parte crítica del proyecto. Reproduciendo así un trabajo de calidad del que estoy orgulloso.

A modo crítico, creo que es poco tiempo para involucrarme con un proyecto como el que he desarrollado. Me hubiese gustado poder continuar los protocolos que he iniciado.

Saco de este periodo una experiencia de trabajo plena, y me place poder prorrogar mi estancia en el laboratorio para proseguir con los ensayos.

Creo que el trabajo ha sido muy agradable. He trabajado sin presión y con libertad para decidir en qué orden quería desarrollar el proyecto. He podido hacer de este mi proyecto, siempre consultando cualquier decisión a mi tutor profesional, pero con la confianza de mantener la idea inicial del ensayo. Es una buena empresa para asumir esta asignatura. Como estudiante pienso que he crecido en todos los aspectos profesionales.



## Anexo A: Plantilla de registro de datos del ensayo

		Control (7 días)			Control (14 días)			
Concentraciones	Peso medio (mg)	Muertos	Vivos	Observaciones	Muertos	Vivos	Observaciones	Peso
C1	C1.1							
	C1.2							
	C1.3							
	C1.4							
	C1.5							
C2	C2.1							
	C2.2							
	C2.3							
	C2.4							
	C2.5							
C3	C3.1							
	C3.2							
	C3.3							
	C3.4							
	C3.5							
C4	C4.1							
	C4.2							
	C4.3							
	C4.4							
	C4.5							
C5	C5.1							
	C5.2							
	C5.3							
	C5.4							
	C5.5							
Control	Co.1							
	Co.2							
	Co.3							
	Co.4							
	Co.5							