

Evaluación ecotoxicológica del bioproducto IHPLUS® en *Physella acuta*

Ecotoxicological assessment of the bioproduct IHPLUS® in *Physella acuta*

Marrero, Osmany^{1*}; Rojas, Amanda¹; Águila, Edisleidy¹; Castañedo, Zoe¹; Meneses, Alfredo¹; Fonte Leidy²

¹Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central «Martha Abreu» de las Villas, CP 54830, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

²Estación Experimental de Pastos y Forrajes «Indio Hatuey», Universidad de Matanzas, CP 44280, Matanzas, Cuba.

*omarrero@uclv.edu.cu

Recibido: 19 de junio de 2025

Aceptado: 13 de noviembre de 2025

Editora: Natalia Guiñazú

Resumen: Los bioensayos son herramientas clave en ecotoxicología para evaluar el efecto de agentes tóxicos de origen antropogénico en ecosistemas acuáticos y terrestres. El bioproducto IHPLUS® es una mezcla de diferentes microorganismos tanto aerobios como anaerobios, utilizado para mejorar el rendimiento agrícola y como probiótico en la alimentación animal. En el proceso de elaboración, manipulación, envasado y utilización del IHPLUS® se liberan al medio ambiente volúmenes considerables, por lo que resulta indispensable evaluar sus efectos potenciales sobre organismos representativos, como los moluscos. Este estudio tuvo como objetivo determinar la toxicidad del IHPLUS® activado en *Physella acuta* e identificar los factores responsables de dichos efectos. Se realizaron bioensayos en régimen estático (96 horas) con una disolución del bioproducto al 6% (60 000 mg/L) y con una carga microbiana de 10⁶ UFC mL⁻¹. La mortalidad fue la variable principal evaluada. Además, se determinó la concentración letal media (CL₅₀) y se evaluó el efecto del pH sobre la toxicidad. Los resultados mostraron que el IHPLUS® produjo mortalidad total a partir de una concentración de 5,04% (50 400 mg/L) en *Physella acuta*, pero no fue tóxico a 10⁶ UFC mL⁻¹. La CL₅₀ fue de 3,78% (37 800 mg/L), lo que clasifica al bioproducto como no peligroso para organismos acuáticos. Se determinó que el pH ácido resulta el principal factor de toxicidad.

Palabras clave: Bioproducto; IHPLUS®; *Physella acuta*; Toxicidad; Ecotoxicología.

Abstract. Bioassays are widely used tools in ecotoxicology to evaluate the effects of toxic agents of anthropogenic origin on aquatic and terrestrial ecosystems. The bioproduct IHPLUS® is a mixture of different microorganisms, both aerobic and anaerobic, used to improve agricultural yield and as a probiotic in animal feed. During the manufacturing, handling, packaging, and use of IHPLUS®, considerable volumes are released into the environment, making it essential to assess its potential effects on representative organisms such as mollusks. This study aimed to determine the toxicity of activated IHPLUS® on *Physella acuta* and identify the factors responsible for these effects. Bioassays were conducted under static conditions (96 hours) with a 6% (60,000 mg/L) solution of the bioproduct and a microbial load of 10⁶ CFU mL⁻¹. Mortality was the main response variable measured. Additionally, the median lethal concentration (LC₅₀) was determined, and the effect of pH on toxicity was evaluated. Results showed that IHPLUS® caused total mortality at concentrations ≥ 5.04% (50,400 mg/L) in *Physella acuta*, but was non-toxic at 10⁶ CFU mL⁻¹. The LC₅₀ was 3.78% (37,800 mg/L), classifying the bioproduct as non-hazardous to aquatic organisms. The pH was identified as the primary factor responsible for toxicity.

Keywords: Bioproduct; IHPLUS®; *Physella acuta*; Toxicity; Ecotoxicology.

INTRODUCCIÓN

La ecotoxicología es una disciplina científica que estudia los efectos de los contaminantes en los ecosis-

temas, con un enfoque particular en los organismos vivos y sus interacciones con el medio ambiente (Sánchez-Bayo y Goka 2014). En las últimas décadas, el aumento de la actividad industrial y agrícola ha ge-

nerado una mayor liberación de sustancias químicas al medio ambiente, lo que ha llevado a la necesidad de evaluar su impacto en los ecosistemas acuáticos y terrestres (De Castro-Català *et al.* 2016). Los bioensayos, como herramientas experimentales, permiten cuantificar los efectos tóxicos de estas sustancias bajo condiciones controladas, utilizando organismos indicadores que representan la biodiversidad de los ecosistemas (Chapman 1996).

Los moluscos, y en particular los gasterópodos dulceacuícolas como *Physella acuta*, son ampliamente utilizados en estudios ecotoxicológicos debido a su sensibilidad a los cambios ambientales y su papel clave en las redes tróficas de los ecosistemas acuáticos (Iannacone *et al.* 2002). Además, su fácil cultivo en laboratorio y su respuesta rápida a los contaminantes los convierten en modelos ideales para evaluar la toxicidad de sustancias químicas (Nebeker y Schuytema 1998).

El IHPLUS® es un bioproducto cubano basado en microorganismos eficientes (ME), desarrollado para mejorar la productividad agrícola y la salud animal (Tellez y Orberá 2018). Aunque su uso ha demostrado beneficios en la germinación de semillas y el crecimiento de cultivos, su liberación al medio ambiente durante su producción y aplicación podría representar un riesgo para los ecosistemas acuáticos, especialmente si se considera su potencial impacto en organismos no objetivo, como los moluscos (Rodríguez *et al.* 2013). Por ello, este estudio tuvo como objetivo evaluar la toxicidad del IHPLUS® en *Physella acuta* D., determinar su concentración letal media (CL₅₀) e identificar los factores responsables de sus efectos tóxicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustancia de ensayo

El IHPLUS® es un producto obtenido mediante fermentación líquida anaerobia de microorganismos nativos, incluyendo bacterias aerobias y anaerobias, levaduras y hongos no modificados genéticamente. La sustancia de ensayo fue suministrada por la Estación Experimental de Pastos y Forrajes «Indio Hatuey». Para los bioensayos se prepararon diluciones del bioproducto en agua de clorada, ajustando las concentraciones a 6% (60 000 mg/L), concentración recomendada para uso agrícola y 10⁶ UFC mL⁻¹, carga microbiana estándar. Además, se evaluó el bioproducto atenuado, el cual se preparó mediante autoclave a 121 °C y 103 kPa durante una hora.

Modelo experimental

Se utilizaron moluscos juveniles de *Physella acuta*, con menos de 72 horas de eclosionados, obtenidos

de una cría artificial en el Centro de Bioactivos Químicos. Los organismos se mantuvieron en vasos de polipropileno de 250 mL, con 100 mL de agua de clorada y alimentación diaria con suspensión de pienso para peces. Condiciones ambientales: 23 ± 2 °C, fotoperiodo 12:12 horas luz:oscuridad.

Ensayo de toxicidad

Los bioensayos se realizaron mediante las directrices de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA 1996a; EPA 1996b). Se conformaron cuatro grupos experimentales:

- Control (sin tratamiento)
- Tratado con IHPLUS® al 6%
- Tratado con 10⁶ UFC mL⁻¹
- Bioproducto inactivado al 6%

Cada grupo constó de 40 moluscos (4 réplicas de 10 individuos). La exposición se realizó en régimen estático durante 96 horas, sin recambios de agua. La mortalidad se registró a las 4, 24, 48, 72 y 96 horas post-exposición. Además, se midieron parámetros físico-químicos del agua (pH, conductividad y oxígeno disuelto) al final del ensayo.

Determinación de la CL₅₀

Se realizó un bioensayo de toxicidad aguda de 96 horas para calcular la concentración letal media (CL₅₀) del IHPLUS®. Para ello, se preparó una serie de seis diluciones consecutivas del producto, con un factor de dilución de 1:1,19, abarcando un rango de concentraciones desde el 6% hasta el 2,5%. Cada concentración fue evaluada mediante su exposición a un grupo independiente de moluscos. La mortalidad se monitoreó periódicamente a lo largo del ensayo, y los datos obtenidos al final de las 96 horas se utilizaron para el cálculo estadístico de la CL₅₀. Con los resultados se confeccionó la curva dosis-respuesta y se calculó la CL₅₀ mediante ajuste no lineal a una curva Sigmoide utilizando el paquete estadístico Statística, v10.

Factores responsables de los efectos tóxicos en la toxicidad del IHPLUS®

Se formaron grupos con la misma cantidad de larvas y réplicas para evaluar los posibles factores o parámetros que pudieran determinar o influenciar en la mortalidad de los organismos de ensayo. Para ello se evaluó una concentración específica de IHPLUS® del 6%, bajo tres condiciones diferentes (Tabla 1).

La mortalidad se comparó entre todos los grupos para determinar la influencia del pH en los efectos tóxicos. La toxicidad del IHPLUS® se clasificó según el Sistema Globalmente Armonizado (SGA) de las

Tabla 1. Ensayos de toxicidad del IHPLUS® activado bajo diferentes condiciones.

Grupo	Concentración	Condición alterada	Influencia en la toxicidad
IHPLUS®		-	Toxicidad real
IHPLUS® inactivado	6%	Inactivación	Ausencia de microorganismos viables
IHPLUS® ajustado		pH ajustado a 7	pH
Control	-	-	-

Tabla 2. Sistema de clasificación de toxicidad acuática (SGA 2015)

Categoría de clasificación	CL ₅₀ (mg/L)	Clasificación
Categoría Aguda 1	≤ 1,00	Extremadamente tóxico
Categoría Aguda 2	1,00 < CL ₅₀ ≤ 10,0	Muy tóxico
Categoría Aguda 3	10,0 < CL ₅₀ ≤ 100	Tóxico

Naciones Unidas (2015), que establece las siguientes categorías para peligros a corto plazo (agudo) en organismos acuáticos (Tabla 2).

Consideraciones éticas

El estudio siguió lineamientos éticos para uso de invertebrados acuáticos (Castillo *et al.* 2004). No se requirió aprobación de comité de ética para organismos no protegidos.

Análisis estadístico

Se calculó el porcentaje de letalidad para cada grupo mediante la ecuación:

$$\text{Letalidad} = \frac{\text{Individuos muertos}}{\text{Total de individuos}} \times 100$$

Para comparar los niveles de mortalidad entre los tres grupos experimentales (IHPLUS, IHPLUS Inactivado e IHPLUS ajustado), se realizó una prueba de chi-cuadrado de homogeneidad. Las comparaciones post-hoc se realizaron mediante pruebas de chi-cuadrado por pares con corrección de Bonferroni. El nivel de significancia se estableció en $\alpha = 0,05$. Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico Statística, v10.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados indicaron que la toxicidad aguda del IHPLUS® para *Physella acuta* fue dependiente de la dosis cuando se administró el bioproducto completo. La exposición a altas concentraciones del producto ($\geq 5,04\%$) causó mortalidad total a las 24 horas. Por el contrario, la exposición exclusiva a una carga microbiana de 10^6 UFC mL⁻¹ no mostró una toxicidad significativa en comparación con el control después de 96 horas. Estos hallazgos sugieren que los componentes no microbianos del producto (como el medio de cultivo, metabolitos o excipientes), cuya concentración aumenta con la dosis del bioproducto, podrían ser responsables de la toxicidad observada a altas concentraciones. Sin embargo, no puede descartarse completamente la contribución de una carga microbiana sustancialmente mayor, inherente a la dosis alta del 5,04%.

Parámetros físico-químicos del agua

El pH altera gravemente la osmorregulación y el equilibrio iónico en moluscos (Wood *et al.* 2010; De Castro-Català *et al.* 2016). Durante las evaluaciones de los parámetros físico-químicos del agua se obtuvo pH ácido para los grupos de tratado al 6% e Inactivado 6% (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de los parámetros físico-químicos del agua.

Grupo	pH	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Oxígeno disuelto (mg L^{-1})
Control	7,21 \pm 0,35	214,46 \pm 61,05	4,21 \pm 0,59
Tratado 6%	4,8 \pm 0,24	634,28 \pm 6,66	2,43 \pm 1,18
Tratado 10 ⁶ UFC mL ⁻¹	7,39 \pm 0,2	210,28 \pm 4,32	3,95 \pm 0,34
Inactivado 6%	3,89 \pm 0,5	660,67 \pm 21,93	3,26 \pm 1,56

Determinación de la CL₅₀

El valor de CL₅₀ obtenido para el IHPLUS® fue de 3,78% (37 800 mg L⁻¹). Dado que este valor es muy superior al límite establecido para la Categoría Aguda 3 (≤ 100 mg L⁻¹) según el SGA (2015), el bioproducto no se clasifica como peligroso para organismos acuáticos por toxicidad aguda. Sin embargo, esta clasificación basada únicamente en la CL₅₀ puede subestimar el riesgo ambiental en condiciones específicas. Los datos revelan que la aplicación en cuerpos de agua con pH naturalmente bajo o baja capacidad tampón (alcalinidad) podría exacerbar significativamente su toxicidad. Lo anterior resulta crítico en ecosistemas sensibles como ríos de cabecera o lagos oligotróficos, donde la acidificación puede desencadenar efectos cascada en la biodiversidad (Sánchez-Bayo y Goka, 2014; Mwai-

jengo *et al.* 2020). Estudios recientes enfatizan que la vulnerabilidad a la acidificación es particularmente alta en ecosistemas con suelos pobres en carbonatos o expuestos a deposición ácida.

Ensayos de toxicidad del IHPLUS® activado bajo diferentes condiciones

El análisis de mortalidad reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (Tabla 4). Tanto el grupo IHPLUS como el IHPLUS Inactivado presentaron mortalidad del 100%, sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$). En contraste, el grupo IHPLUS ajustado mostró una mortalidad significativamente menor (20%), difiriendo estadísticamente de ambos grupos con mortalidad completa ($p < 0,0001$).

Tabla 4. Comparación de mortalidad entre grupos experimentales del IHPLUS®

Grupo	n	Mortalidad n (%)	χ^2	Valor p	Comparaciones post-hoc
IHPLUS	40	40 (100%)	87,27	<0,0001	a
IHPLUS Inactivado	40	40 (100%)			a
IHPLUS ajustado	40	8 (20%)			b

$\chi^2(2) = 87,27$, $p < 0,0001$. Los grupos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas según pruebas de chi-cuadrado por pares con corrección de Bonferroni ($\alpha = 0,0167$).

El pH ácido del IHPLUS® fue identificado como el principal factor de toxicidad. La neutralización del pH redujo la mortalidad del 100% al 20%, lo que confirma que la acidez es responsable de los efectos tóxicos observados. Para gasterópodos, como *Physella acuta*, un pH $< 5,8$ compromete críticamente la formación y mantenimiento de la concha al interferir con la absorción de calcio y la deposición de carbonato de calcio (CaCO_3) (Pynnonen 1995; Gazeau *et al.* 2022). Este estrés fisiológico por acidificación se ha correlacionado con un aumento en la expresión de genes relacionados con la reparación de la concha y la respuesta al estrés en otros moluscos de agua dulce, lo que sugiere un alto costo energético para el or-

ganismo (Zheng *et al.* 2023). Esta bioerosión debida a la acidificación es una amenaza creciente para los organismos calcificadores en diversos ambientes acuáticos. La acidificación del agua puede afectar la disponibilidad de oxígeno disuelto, como se observó en este estudio, donde los grupos expuestos al IHPLUS® al 6% mostraron niveles reducidos de oxígeno disuelto (2,43 \pm 1,18 mg/L) en comparación con el grupo control (4,21 \pm 0,59 mg/L). Esto se debe a que la acidificación puede: a) reducir la solubilidad del oxígeno, b) dañar las branquias y estructuras respiratorias, dificultando el intercambio gaseoso, y c) aumentar la demanda bioquímica de oxígeno (De Castro-Català *et al.* 2016; Chen *et al.*

2021). La hipoxia resultante es un factor coadyuvante clave en la mortalidad observada. Es probable que se produzca un efecto sinérgico, donde el estrés por acidificación y la hipoxia deprimen colectivamente el metabolismo y la capacidad homeostática del organismo (Iwama *et al.* 2023). Además, la acidificación altera la especiación química, aumentando la biodisponibilidad y toxicidad de metales como el aluminio (Al^{3+}) y afectando la disponibilidad de nutrientes esenciales.

La sensibilidad de *Physella acuta* resalta la importancia de evaluar bioproductos en múltiples niveles tróficos y grupos taxonómicos, especialmente bioindicadores sensibles como los moluscos (Iannacone *et al.* 2002). Aunque los Microorganismos Eficaces (ME) se reportan como seguros para peces y crustáceos a dosis estándar (Hussain *et al.* 2019), nuestros hallazgos indican un riesgo potencial para gasterópodos en ambientes propensos a la acidificación o ante derrames. Lo anterior subraya que la «inocuidad» de un bioproducto es específica del organismo y del ambiente, coincidiendo con llamados recientes a una evaluación ecotoxicológica más integral de los bioinsumos (Mishra *et al.* 2024). Sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar los efectos a largo plazo del IHPLUS® en diferentes especies y condiciones ambientales.

Considerando estos resultados se obtuvo que IHPLUS® activado induce mortalidad total en *Physella acuta* a concentraciones $\geq 5,04\%$ (50 400 mg/L), lo que sugiere un umbral de toxicidad aguda relacionado con el pH ácido. El bioproducto no es clasificado como peligroso para organismos acuáticos según el Sistema Globalmente Armonizado, con una CL_{50} de 3,78% (37 800 mg/L) y el bajo pH es el principal factor responsable de la toxicidad del IHPLUS® en *Physella acuta*, lo cual resalta la importancia de considerar las condiciones ambientales en su aplicación.

AGRADECIMIENTOS

A la Estación Experimental "Indio Hatuey", por proveer el bioproducto. Financiado por el Centro de Bioactivos Químicos (proyecto CBQ: 2022-03).

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses para la publicación del presente trabajo.

REFERENCIAS

Castillo G, Díaz MC, Pica Y, Ronco A, Feola G, Forget G, Sánchez-Bain A. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. IDRC.

Chapman PM. 1996. Presentation and interpretation of sediment quality triad data. *Ecotoxicology*. 5(6):327-339.

Chen S, Wang J, Li J, Wang T. 2021. Combined effects of ocean acidification and hypoxia on the early development of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Pollution Bulletin*. 173 (Part A): 112-978. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112978>.

De Castro-Català N, Muñoz I, Riera JL, Ford AT. 2016. Evidence of low dose effects of the antidepressant fluoxetine and the fungicide prochloraz on the behavior of the keystone freshwater invertebrate *Gammarus pulex*. *Environmental Pollution*. 213:629-637.

[EPA] Environmental Protection Agency. 1996a. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1025. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0154-0039>.

[EPA] Environmental Protection Agency. 1996b. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1045. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0154-0037>.

Gazeau F, Alliouane S, Bock C, Bramanti L, López Correa M, Gentile M, *et al.* 2022. Impact of ocean acidification on marine organisms: unifying principles and new perspectives. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 278:108126.

Hussain S, Siddique T, Saleem M, Arshad M, Khalid A. 2019. Bioremediation and Phytoremediation of Pesticides: Recent Advances. In *Microbial Biodegradation of Xenobiotic Compounds Chapter 5*, pp. 87-115. Woodhead Publishing.

Iannacone J, Caballero C, Alvariano L. 2002. Empleo del caracol de agua dulce *Physa venustula* Gould como herramienta ecotoxicológica para la evaluación de riesgos ambientales por plaguicidas. *Agricultura Técnica*. 62(2):212-225.

Iwama AE, Todgham AE, Schulte PM. 2023. Interactive effects of acidification and hypoxia on the physiology of marine and freshwater organisms. *Journal of Experimental Biology*. 226(15):245-332. <https://doi.org/10.1242/jeb.245332>.

Mishra A, Kumar S, Singh J. 2024. Ecotoxicological profiling of microbial-based agricultural products: A need for the One Health approach. *Science of The Total Environment*. 907:167955. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167955>.

Mwaijengo GN, Vogt T, Dullo BW, Msigwa A. 2020. Where does local and international food production agglomerate? Ecological implications of food production assets. *Ecological Indicators*. 118:106-734. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106734>.

Naciones Unidas. 2015. Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA) (7^a ed. rev.). Nueva York y Ginebra: Publicación de las Naciones Unidas. <https://unece.org/sites/default/files/202101/SGA%20S%C3%A9ptima%20edici%C3%B3n%20revisada%20esp.pdf>.

Nebeker AV, Schuytema GS. 1998. Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms and snails. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 35(3):441-446.

Pynnonen K. 1995. Effect of pH, hardness and maternal pre-exposure on the toxicity of Cd, Cu and Zn to the glochidial larvae of a freshwater clam *Anodonta cygnea*. *Water Research*. 29(1):247-254.

Rodríguez H de la C, Barreto G, Bertot A, Vázquez R. 2013. Los microorganismos eficientes como promotores del crecimiento en los cerdos hasta el destete. *REDVET*. 14(9):1-7.

Sánchez-Bayo F, Goka K. 2014. Pesticide residues and bees a risk assessment. *PLoS ONE*. 9(4): 94-482.

Tellez T, Orberá T. 2018. Efecto estimulador del crecimiento de dos biopreparados biotecnológicos en cultivos de remolacha (*Beta vulgaris L.*). *Revista Cubana de Química*. 30(3):483-494.

Wood CM, Matsuo AYO, Wilson RW, Gonzalez RJ, Patrick ML, Playle RC, Val AL. 2010. Protection by natural blackwater against disturbances in ion fluxes caused by low pH exposure in freshwater stingray's endemic to the Rio Negro. *Physiological and Biochemical Zoology*. 83(5):724-734.

Zheng L, Li Y, Wang L, Gao X. 2023. Transcriptomic responses of the freshwater snail *Bellamya aeruginosa* to acid stress: Implications for shell formation and energy metabolism. *Aquatic Toxicology*. 258:106-491. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106491>.