



Congreso Nacional del Medio Ambiente
Cumbre del Desarrollo Sostenible

COMUNICACIÓN TÉCNICA

Nuevos instrumentos para evaluar la calidad ambiental del suelo.

Autor: Diego Balletero

Institución: Universidad San Jorge
E-mail: dieballetero@gmail.com

Otros autores: Juan Ribó(Centro de Investigación e innovación en Toxicología(CRIT)); M^a Rosa Pino(Universidad San Jorge); M^a Carmen Riva(Centro de Investigación e innovación en Toxicología(CRIT))



RESUMEN:

El colémbolo *Folsomia Candida* es uno de los artrópodos más comunes en el suelo. En el laboratorio pueden ser expuestos a distintos contaminantes por distintas vías: suelo, alimentación, etc para estudiar su respuesta en referencia a la supervivencia, reproducción y comportamiento. La facilidad de su mantenimiento como organismos de experimentación en laboratorio los convierte en buenos candidatos para ensayos de toxicidad, para la evaluación global de los efectos de contaminantes en suelos. La mayoría de los ensayos de toxicidad que utilizan organismos terrestres para evaluar la calidad de suelos, se basan en ensayos de mortalidad o de reproducción que requieren respectivamente 14 y 28 días de experimentación para obtener resultados fiables. Recientemente se han descrito ensayos de corta duración, para determinar los efectos de contaminantes del suelo sobre estos organismos. La respuesta final en estos ensayos se refiere a su comportamiento cuando estos organismos están expuestos a la presencia de contaminantes en el suelo. En esta comunicación se describe el trabajo realizado para poner a punto y verificar un ensayo de toxicidad basado en la respuesta de colémbolos utilizados como organismos de experimentación. El ensayo mide el grado de alejamiento de zonas de suelo contaminadas de los organismos de experimentación. El grado de alejamiento de los colémbolos, puede relacionarse con la calidad ambiental (grado de contaminación) de los suelos ensayados. Un ensayo de estas características, rápido, fiable, reproducible y cuyos resultados pueden correlacionarse con resultados obtenidos con otros ensayos, puede ser de mucha utilidad para evaluar de forma rápida la calidad ambiental de suelos y sedimentos, y permitir la toma de decisiones respecto a la contaminación el suelo. En los trabajos realizados se ha verificado la reproducibilidad de este ensayo y se ha comparado la respuesta obtenida tras un corto período de exposición (100 minutos) con los resultados utilizando ensayos más largos obtenidos para los mismos contaminantes y suelos.



1.- INTRODUCCIÓN.

La evaluación de la calidad y seguridad de suelos en referencia al riesgo para la salud humana y medioambiental es una cuestión primordial desde el punto de vista de la utilización del suelo. En este contexto, las exigencias de calidad de un suelo pueden ser diferentes dependiendo del uso al que esté destinado.

La determinación de la calidad medioambiental de suelos está relacionada con:

- episodios de derrames que potencialmente pueden causar contaminación de suelos
- recalificación de suelos o cambio de uso del suelo (ej. suelo industrial recalificado como urbano, suelo industrial recalificado como equipamientos, etc.)
- utilización de un suelo para uso agrícola.

Para reducir el riesgo potencial de daños a la salud o al medio ambiente, es importante tener conocimiento del grado de contaminación del suelo.

Las características parámetros a determinar, determinaciones analíticas a realizar, pueden estar definidas en las legislaciones correspondientes. Las características de calidad de un suelo deben estar relacionadas con el uso previsto de este suelo.

El recubrimiento con vegetales y tierras de un vertedero de residuos municipales, puede ser suficiente para rehacer el paisaje de la zona, pero puede no ser suficiente para uso agrícola, viviendas, escuelas, zonas de juego infantil, o zonas que deban estar en contacto con personas o animales.

Asimismo el grado de descontaminación de una zona contaminada industrialmente puede ser más o menos intensivo dependiendo del uso planeado para aquella zona.

En consecuencia, el número y tipo de parámetros fisicoquímicos a determinar es variable, y la realización de un estudio de calidad de un suelo concreto puede llegar a ser muy complicado y económicamente inviable.

Es por ello que se desarrollan ensayos y baterías de ensayos que incluyen ensayos fisicoquímicos y bioensayos, con objeto de simplificar y reducir el coste de la evaluación de la calidad de un suelo.

Los ensayos fisicoquímicos dan una respuesta muy concreta sobre las características fisicoquímicas del suelo (materia orgánica, humedad, pH, presencia de metales, de pesticidas, de compuestos químicos tóxicos, etc.), pero el riesgo potencial que un suelo representa para la salud humana o medioambiental, viene dado por los efectos combinados de todos los componentes del suelo en cuestión. Se han realizado modelos que simulan la contribución de todos estos parámetros al efecto tóxico o contaminante global, indicando la calidad del mismo.

Los ensayos biológicos, determinan la respuesta de organismos de laboratorio cuando están expuestos a suelos potencialmente contaminados. Son utilizados para evaluar el riesgo de suelos potencialmente contaminados, y proporcionan una respuesta concreta y más aproximada del posible efecto dañino que la contaminación presente en un suelo puede tener sobre organismos vivos.

Obviamente, como en todos los estudios de toxicidad o de ecotoxicidad, los resultados derivados de la respuesta obtenida utilizando un organismo de ensayo concreto deben ser extrapolados a otros organismos más elevados en la escala biológica, y finalmente a la persona humana.



Desde el punto de vista de una evaluación de los posibles efectos globales tóxicos de un suelo potencialmente contaminado, los ensayos biológicos proporcionan una respuesta más global, relacionada con las interacciones potenciales de los contaminantes presentes en el suelo, y las funciones biológicas del organismo de prueba, incluyendo no sólo los efectos directos de los contaminantes químicos presentes, pero también los efectos debidos a interacciones sinérgicas o antagonistas entre ellos.

Los ensayos utilizados generalmente para la determinación de la toxicidad en suelos tienen un período de exposición entre 14 y 28 días, y por lo tanto los invalida para una evaluación de la calidad del suelo de forma rápida y cuyos resultados permitan la toma de decisiones sobre, por ejemplo, usos del suelo.

En esta comunicación se describen los trabajos realizados para la puesta a punto de un ensayo de laboratorio dirigido a la evaluación de la calidad de suelos, con el objetivo de establecer un procedimiento estandarizado y validado que permita de forma rápida, económicamente viable y representativa tomar decisiones fundamentadas respecto a la calidad ambiental de suelos potencialmente contaminados, y al riesgo que puedan representar para la salud humana y medioambiental.

2.- ENSAYOS DE TOXICIDAD DE SUELOS

La literatura describe numerosos ensayos de toxicidad de suelos utilizando diversos organismos de prueba, (tanto animales como vegetales), con el objetivo de obtener datos cuantitativos sobre la calidad del suelo mediante ensayos de laboratorio.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la utilización de datos obtenidos con organismos de laboratorio para predecir posibles efectos tóxicos de suelos potencialmente contaminados proporciona información incompleta. Los resultados de experimentos de laboratorio indican solamente el efecto del suelo contaminado sobre el organismo de ensayo utilizado.

A pesar de ello, la respuesta obtenida representa, como se ha mencionado, el efecto tóxico global de aquel suelo, sin indicar el tipo ni la cantidad de componentes que pueden contaminarlo.

Por otra parte, el ensayo utilizado debe estar caracterizado y proporcionar garantías de calidad de los resultados obtenidos. Debe conocerse su reproducibilidad, variabilidad y adecuación al tipo de suelo analizado y a sus componentes. El conocimiento de los parámetros de adecuación del ensayo (variabilidad, coeficiente de variación, reproducibilidad inter- e intra-laboratorio, sensibilidad, robustez, etc.) debe ser utilizado para establecer las conclusiones, el dictamen, y la discusión de los resultados obtenidos.

De entre los ensayos actualmente publicados y homologados por la comunidad internacional destacan los ensayos de toxicidad de suelos con gusanos (*Eisenia Fetida*) (ver OCDE 1984, OCDE 2004) y con colémbolos (*Folsomia candida*) (OCDE, 2005).

Se encuentran en la literatura comunicaciones describiendo ensayos de alejamiento tanto utilizando gusanos de tierra, como otros invertebrados (Yeardley, 1996, Hund, 2001, Amorim et al., 2005]. Con la participación de grupos de investigadores en este campo se está elaborando una norma ISO con el objetivo de estandarizar este ensayo [ISO/DIS 2008]



2.1.- ENSAYOS DE TOXICIDAD CON COLÉMBOLOS (FOLSOMIA CANDIDA)

La **Folsomia** es uno de los artrópodos más comunes y extendidos en todo el planeta, debido a su facilidad de adaptación a los distintos suelos y a su alto índice de reproducción. Como parte integral de los ecosistemas terrestres, estos invertebrados son vulnerables a la contaminación del suelo donde habitan. En el laboratorio, estos colémbolos pueden ser expuestos a contaminantes potenciales por distintas vías: suelo, alimentación, y estudiar sus efectos sobre su supervivencia, reproducción y comportamiento.

Los colémbolos han sido muy estudiados, y en la literatura existen abundantes publicaciones que describen las características fisiológicas de estos organismos, así como su comportamiento (*Fontain et al., 2005*). Otras publicaciones describen la realización de ensayos de reproducción y supervivencia con *Folsomia* [Environment Canada, 2007]. Asimismo, el ensayo de reproducción con *Folsomia* ha sido estandarizado y publicado [ISO, 1999], para ser utilizarlo en la evaluación de toxicidad de suelos.

Aunque la familia de los colémbolos es muy amplia, la *Folsomia* es el organismo preferido para realizar análisis toxicológicos en Europa y América. Sin embargo en autores australianos han utilizado especies de colémbolos autóctonos como la *Proisotoma minuta* y la *Sinella communis*, en ensayos de ecotoxicidad. [*Greenslade y Vaughan, 2003*]

En la mayoría de los ensayos descritos, individuos de la especie *Folsomia* se exponen a diferentes contaminantes, tales como fungicidas, hidrocarburos y metales pesados, y se estudia su respuesta, relacionada normalmente con la supervivencia o la reproducción, y otros efectos, como la influencia de metales pesados en el comportamiento de asociación y en la dieta de estos organismos [*Guillet y Ponge 2003*].

La inhibición de la reproducción de colémbolos por cobalto ha sido estudiada [Loch et al, 2004] en un ensayo de inhibición de la reproducción a 20 días.

Asimismo, se han ensayado otros puntos finales en la determinación de la ecotoxicidad de residuos orgánicos, como, por ejemplo, la inhibición de los hábitos de alimentación de estos organismos

También se han utilizado ensayos con *Folsomia* con vertidos acuosos orgánicos por su influencia directa sobre la calidad de los suelos [*Domene et al., 2007a y 2007b*]

Desde el año 1999, existe la norma ISO 11267:1999 [ISO, 1999] que estandariza el procedimiento del ensayo de inhibición de la reproducción con *Folsomia*, y donde se describen los materiales y las pautas necesarias para realizar el test de reproducción de 28 días.

La característica común a todos estos ensayos es la duración del período de exposición, lo que hace muy lento el proceso de obtención de los resultados. Por ejemplo, el ensayo de supervivencia se describe con una exposición de 14 días, y el ensayo de inhibición de la reproducción tiene una exposición de 28 días.

Recientemente se han publicado ensayos de menor tiempo de exposición, basados en el alejamiento de los organismos de prueba de un suelo contaminado. Se trata de los “test de fuga” o “avoidance tests” que publican distintos autores y que se han aplicado a diferentes contaminantes (por ejemplo [*Martínez Aldaya et al, 2006 y Boitaud, et al., 2006*]). En este tipo de ensayos, la duración de la exposición de los organismos de ensayo al suelo contaminado es normalmente entre 1 y 2 horas. Los ensayos de alejamiento se han realizado tanto con colémbolos como con gusanos.



2.- MATERIALES

2.1 SUELO SUSTRATO

Para la preparación de suelo utilizado como sustrato para la cría se mezcla en proporción 8:1, yeso y carbón activo hasta tener una mezcla homogénea (120 gramos de yeso y 15 de carbón activo). A la mezcla homogénea, se adicionan 120 ml de agua ultrapura y se agita durante 30 segundos, hasta obtener de nuevo una mezcla pastosa uniforme. La mezcla se vierte en la placa Petri utilizada como recipiente de cría, llenando hasta una altura de 1 cm, teniendo la precaución de no dejar burbujas, procurando conseguir una superficie plana. Se deja reposar así unas tres horas. Una vez endurecida la superficie, se añade agua ultrapura hasta casi saturación. El agua añadida se queda en la superficie. Las placas así preparadas se pueden almacenar unas tres semanas, evitando la desecación ya que esto podría provocar la formación de grietas y huecos, destruyendo la uniformidad del sustrato. El pH del sustrato debe estabilizarse a 6-7.

2.2.- ORGANISMOS DE ENSAYO

Los ensayos de alejamiento se realizaron con organismos adultos de *Folsomia* obtenidos del CREAM (Centro de investigación ecológica y aplicaciones forestales. Universidad Autónoma de Barcelona). Los organismos se cultivan en placas Petri de 15 centímetros de diámetro. Manteniendo los cultivos en la oscuridad a una temperatura entre 20-22 °C, en un armario germinador.

La alimentación se realiza con levadura seca, que se humedece por goteo con agua desionizada. Los cultivos se alimentan una vez a la semana, aprovechando ese momento para airear los cultivos. El alimento sobrante que no haya sido ingerido debe ser retirado con el fin de evitar problemas en los cultivos.

El sustrato de los cultivos debe cambiarse cada dos meses. El traslado de los individuos a un nuevo sustrato favorece la ovodeposición. A los dos días comienzan a aparecer huevos de color marrón, acumulados en formas racimosas. Los huevos depositados se trasladan a una placa con sustrato nuevo, humedecido y con un poco de alimento. A los 4 días los huevos eclosionan.

2.2 SUELO PARA EL ENSAYO

El suelo utilizado se obtuvo de la zona de Terrassa (Barcelona), en una zona con las siguientes coordenadas: Latitud: 41° 33' 23" 53" N. Longitud: 2° 3' 31' 57" E.

El suelo es de características arenoso-arcilloso y no se tiene constancia de que haya sido contaminado. Se tamiza a un tamaño de 2 mm. No contiene materia orgánica ni organismos que puedan interferir en el ensayo.

El suelo obtenido presentó un contenido en agua del **13.4%**, y un pH de 6,1.



Suelo control

El suelo control se preparó añadiendo agua desionizada al suelo seco sin contaminar hasta alcanzar un contenido de agua de 40%.

Suelo de ensayo (suelo contaminado)

El suelo a ensayar se prepara añadiendo contaminante al suelo control. La forma de preparar el suelo test depende del estado físico del contaminante:

1. Sustancias solubles en agua: Se disuelve en agua la cantidad de sustancia en la concentración suficiente para realizar las repeticiones necesarias. La solución se mezcla con el suelo control y se agita manualmente hasta obtener una mezcla homogénea. Si es necesario, se añade agua hasta alcanzar una humedad del 40-60%
2. Sustancia insoluble en agua pero soluble en disolvente orgánico: Se disuelve la cantidad de sustancia de ensayo suficiente para obtener la concentración deseada en un disolvente volátil (p. ej. acetona o hexano). Seguidamente se coloca en el recipiente de ensayo con el suelo control, se mezcla y se evapora el disolvente colocando el recipiente bajo una campana de ventilación. Después se añade agua hasta llegar a un contenido del 40 o 60 %.
3. Sustancia insoluble en agua y en disolventes orgánico: Mezclar arena de sílice finamente molida y la cantidad de sustancia de ensayo suficiente para obtener la concentración deseada. Trasladar esta mezcla, junto con el suelo control al recipiente de ensayo, añadiendo el agua necesaria.

La concentración del contaminante en la placa de ensayo se expresa como: mg de contaminante / kg de suelo seco.

3.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

El ensayo de alejamiento con *Folsomia* se realiza en placas Petri de 5 cm de diámetro. La placa Petri se divide en dos mitades semicirculares utilizando papel de filtro, y se sitúa a un lado el suelo control y al otro lado el suelo contaminado, anotando claramente cada tipo de suelo. La altura del suelo debe ser de unos 2 milímetros y la superficie debe ser lo más lisa posible ya que los organismos de ensayo tienden a buscar los orificios para ocultarse. Debe quedar la mínima separación entre suelo test y suelo control.

Seguidamente se colocan 10 individuos de la especie *Folsomia*, en la línea que separa ambos tipos de suelo. Después de un período de exposición de 20 minutos, se cuenta el número de individuos que se han situado en el suelo contaminado y los que han emigrado al suelo control, repitiendo el recuento cada 20 minutos hasta llegar a 100 minutos de exposición.

Los individuos muertos no se contabilizan, mientras que los que se quedan justo en el medio, entre los dos tipos de suelo, se cuentan como 0.5 individuos para cada lado.



Si en una misma placa Petri, se detecta más de un individuo muerto, dicha placa no se incluye en el recuento.

Inicialmente se realizan tres réplicas con ocho placas y 10 individuos cada una con suelo control en las dos mitades de la placa Petri, con el objetivo de determinar la ausencia de otras interferencias (iluminación, tipo de suelo, humedad, temperatura) que no sean las del contaminante. El objetivo de estos ensayos iniciales es verificar que la distribución de los individuos es aleatoria, y tiende idealmente al 50%, en los dos lados de la placa Petri.

Para iniciar el ensayo de alejamiento se debe buscar el rango de concentraciones del contaminante a ensayar.

Se determina la concentración mínima de cada contaminante que causa un efecto máximo, es decir aquella concentración para la cual el porcentaje de alejamiento es máximo.

Seguidamente se determina la concentración máxima para la cual no se observa alejamiento. El ensayo se realiza con 6 concentraciones distintas entre la máxima y la mínima.

Para cada concentración a ensayar se realizan tres réplicas de 5 placas cada una.

El porcentaje de alejamiento en cada placa se calcula con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Alejamiento} = 100 * ((N_{\text{Control}} - N_{\text{Test}}) / N_{\text{total}}) * 100$$

Donde:

N_{Control} = N° de individuos en la zona del suelo control al final del período de exposición

N_{Test} = N° de individuos en la zona del suelo contaminado al final del período de exposición

N_{total} = N° total de individuos al inicio

Un porcentaje negativo se entendería como que no se produce alejamiento del suelo contaminado, y se contabiliza como el 0 % de alejamiento.

El porcentaje de alejamiento para cada una de las concentraciones se calcula mediante el promedio de alejamiento calculado en las tres réplicas realizadas.

A partir del porcentaje de alejamiento calculado para cada una de las concentraciones de suelo contaminado ensayadas, se utiliza el método Probit para calcular la CE50 (concentración efectiva que causa el 50% de alejamiento, para el contaminante ensayado).

4.- RESULTADOS EXPERIMENTALES

Para verificar el comportamiento de los organismos de ensayo *Folsomia*, se han determinado los porcentajes de alejamiento causados por un Cadmio y Carbendazim. Inicialmente, se verifica experimentalmente el comportamiento de los organismos en un suelo control sin contaminantes añadidos.

4.1.- EXPERIMENTOS CON SUELO CONTROL

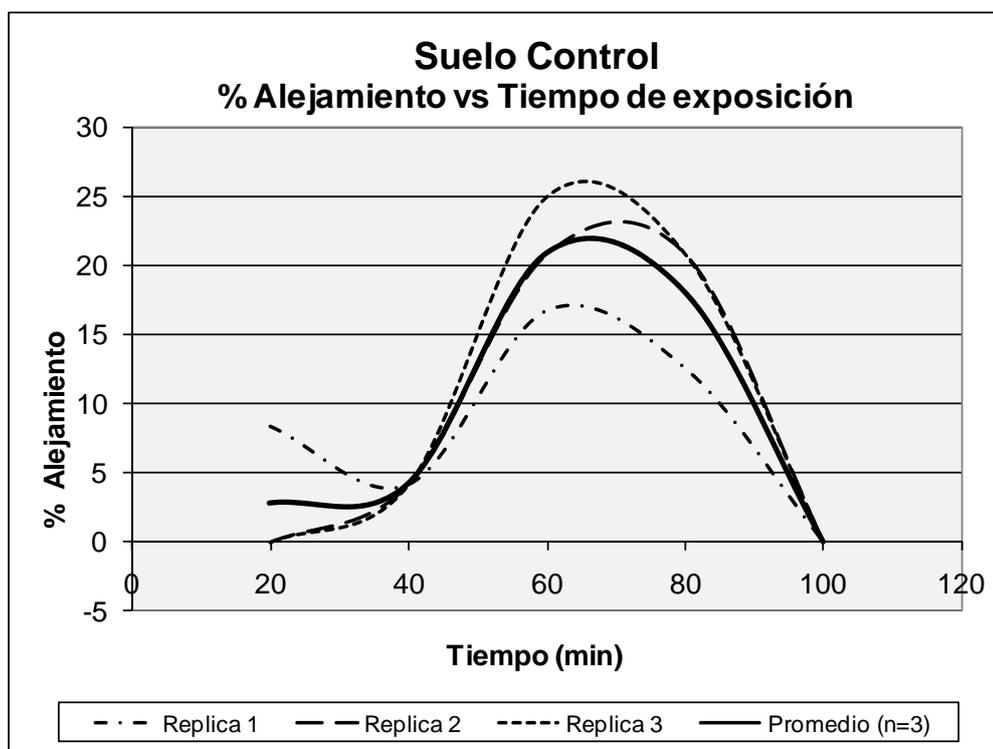
Se realizaron tres series de experimentos preliminares utilizando suelo control en ambos lados de la placa Petri.

Cada experimento se realizó utilizando 5 placas Petri con 10 individuos en cada una de ellas. El porcentaje de alejamiento se calculó contando los individuos desplazados a cada lado de la placa Petri después de intervalos de 20 minutos y hasta 100 minutos de exposición.

En este experimento se verifica la distribución aleatoria de los organismos de ensayo a ambos lados de la placa Petri, para confirmar la ausencia de otras interferencias. Se contabiliza el número de individuos en cada lado de la placa Petri. El porcentaje de alejamiento se calcula según la fórmula indicada más arriba.

Los resultados obtenidos utilizando suelo control se presentan en la tabla siguiente.

Tiempo de exposición	% alejamiento			
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio (n=3)
20	8	0	0	3
40	4	4	4	4
60	17	21	25	21
80	13	21	21	18
100	0	0	0	0



Relación entre el % de alejamiento de los organismos de prueba y el tiempo de exposición, utilizando suelo control



Se observa que, a tiempo de exposición 100 minutos, el porcentaje de alejamiento cae hasta cero, es decir, no se detecta preferencia hacia ninguno de los dos lados de la placa Petri.

4.2.- EXPERIMENTOS CON SUELO CONTAMINADO

4.2.1.- SUELO CONTAMINADO CON CLORURO DE CADMIO

Preparación del suelo contaminado:

Se mezcla una disolución de $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$ (cloruro de cadmio hemipentahidrato, 98% SIGMA) en agua destilada con suelo control hasta obtener un suelo contaminado con Cd en las concentraciones adecuadas.

Concentraciones ensayadas:

1000, 500, 100, 10 mg CdCl_2 / kg suelo, y control (0 mg CdCl_2 / kg suelo)

Para cada una de las concentraciones se realizaron cinco series de experimentos con 6 placas de Petri con 10 individuos cada una de ellas. Los resultados de alejamiento a 100 minutos de exposición, son el promedio de los 3 replicados

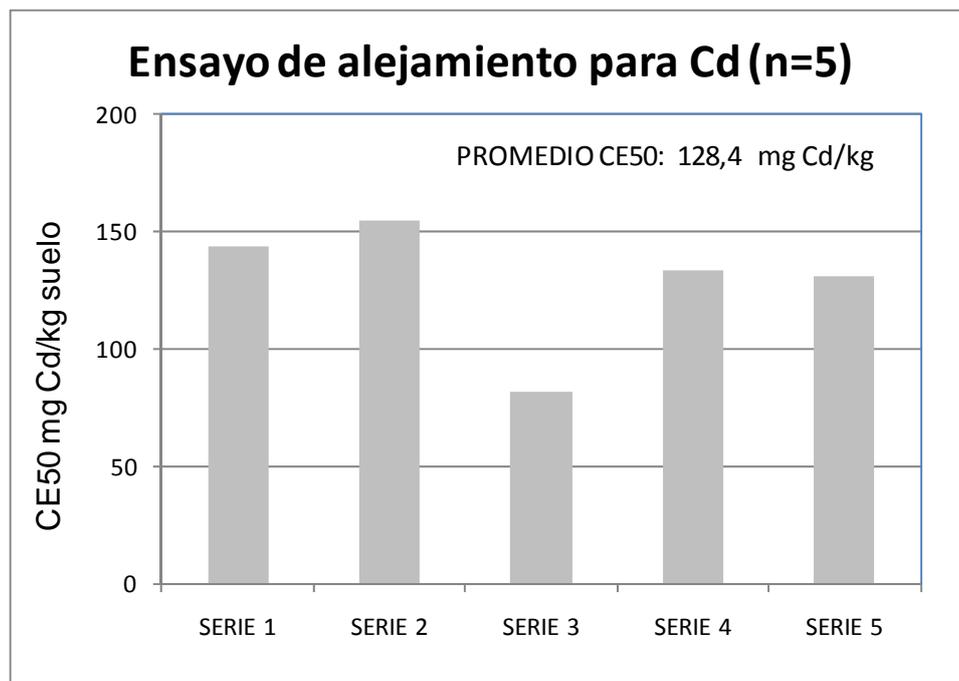
Tabla resumen:

Conc. (mg/kg)	% de alejamiento (promedio de 3 replicados por serie)				
	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4	Serie 5
0 (CONTROL)	0	18,67	5,33	2,67	6,67
10	18,67	14,67	18,67	14,67	12,00
100	38,67	21,33	38,67	29,33	21,33
500	45,33	44,00	56,00	44,00	53,33
1000	70,67	81,33	80,00	81,33	81,33

A partir de la regresión lineal entre el log C de la concentración y el valor probit para el % de alejamiento, se calcula, para cada serie, la Concentración Efectiva de contaminante que causa el 50% de alejamiento. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla:

Réplica	CE50	
	mg CdCl_2 /kg	mgCd/kg
1	297	143,28
2	319	153,89
3	169	81,53
4	275	132,67
5	271	130,74
Promedio	266,2	128,42
Desv Std	57,6	27,80
CV%	21,6 %	21,65

En la literatura consultada encuentran resultados sobre ensayos de toxicidad de Cadmio utilizando como ensayo la inhibición de reproducción de *Folsomia candida*. La CE50 se establece en 150 mgCd/kg (*IPCS International Program on Chemical Safety 02-28-08* <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v95pr19.htm>), mientras que para el mismo ensayo otros autores comunican una EC50 de mgCd/kg . (Y. Crouau,et al., 1999).



Resultados del ensayo de alejamiento utilizando *Folsomia candida* como Organismo de ensayo (CE50: 128,4 mgCd / kg de suelo)

El coeficiente de variación resultante está dentro del intervalo de coeficientes de variación de ensayos de toxicidad.

4.2.2 SUELO CONTAMINADO CON CARBENDAZIM

Preparación en suelo contaminado:

El carbendazim es insoluble en agua, en este caso se pesa la cantidad necesaria de carbendazim y se mezcla con 10 gramos de arena de sílice. Una vez obtenida una mezcla homogénea se añade la cantidad de suelo seco para tener la concentración necesaria. A la hora de añadir el suelo se deberá haber tenido en cuenta la cantidad de arena de sílice añadida.

La determinación de la CE50 es el resultado del promedio de los valores obtenidos en cinco determinaciones. Cada serie se realiza por triplicado.

Concentraciones de carbendazim ensayadas: 2000, 1500, 1000, 500, mg de carbendazim / kg suelo, además del suelo control (0 mg/kg).



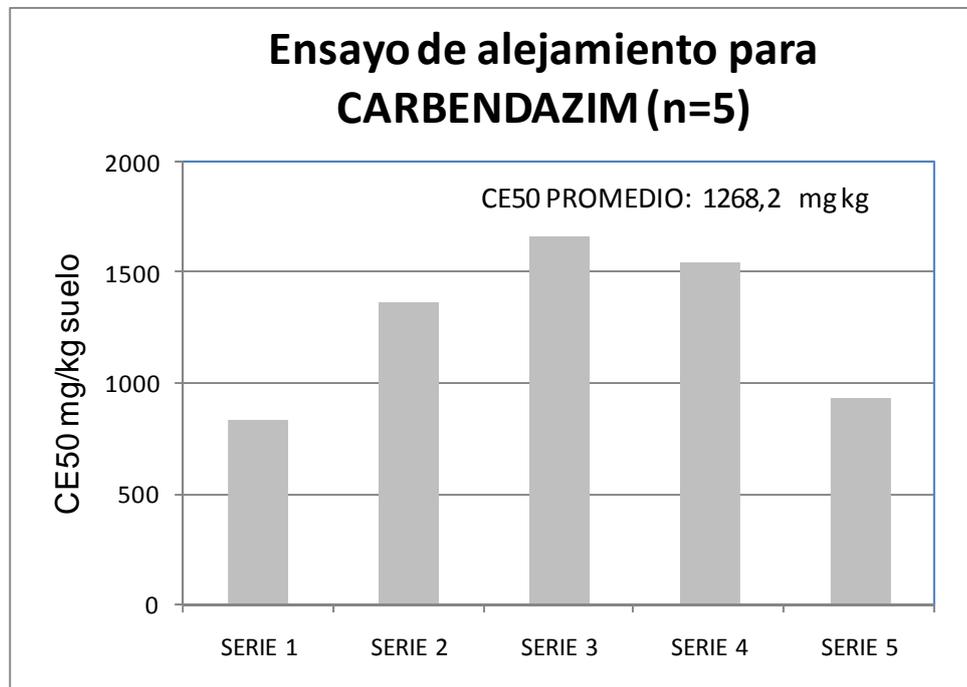
Para cada una de las concentraciones se realizaron tres series de experimentos con 6 placas de Petri con 10 individuos cada una de ellas. Los resultados de alejamiento a 100 minutos de exposición, son el promedio de los 3 replicados

Conc. (mg/kg)	% de alejamiento (promedio de 3 replicados por serie)				
	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4	Serie 5
0 (CONTROL)	5,33	8,00	4,00	5,33	8,00
500	40	29,33	14,67	17,33	41,33
1000	50,67	42,67	24,00	25,33	44,00
1500	54,67	49,33	48,00	44,00	61,33
2000	84	61,33	60,00	68,00	66,67

A partir de la regresión lineal entre el log C de la concentración y el valor probit para el % de alejamiento, se calcula la Concentración Efectiva de Carbendazim que causa el 50% de alejamiento (es decir probit = 5)

CE50% Carbendazim	
Réplica	CE50 (mg/kg)
1	831,5
2	1366,6
3	1663,4
4	1545,4
5	934,1
Promedio	1268,2
Desv. Std.	369,2
CV%	29,1 %

En la literatura consultada se pueden encontrar resultados sobre los efectos tóxicos de Carbendazim. Concretamente en el ensayo de inhibición de reproducción utilizando *Folsomia candida* como organismo de ensayo en suelo artificial, la CE50 se establece en > 1000 mg/kg (IPCS International Program on Chemical Safety 02-28-08 (este resultado se puede consultar en <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v95pr19.htm>))



Resultados del ensayo de alejamiento utilizando *Folsomia* como Organismo de ensayo (CE50: 128,4 mgCd / kg de suelo)

El coeficiente de variación resultante está dentro del intervalo de coeficientes de variación de ensayos de toxicidad.

4.3 INFLUENCIA DE LAS PROPIEDADES DEL SUELO

Recientemente, algunos autores han publicado (Natal-da-Luz, et al, 2008), estudios sobre la influencia de las características del suelo sobre el comportamiento de alejamiento de los colémbolos utilizados en este trabajo.

Los parámetros del suelo que pueden influenciar el resultado del ensayo de alejamiento son:

- **Humedad:** se ha utilizado suelo con un contenido en agua entre el 40% y 60%. Se ha observado que, en ensayos de laboratorio, un aumento de humedad puede ser causa de un desplazamiento más rápido de los individuos.
- **Temperatura:** los ensayos se han realizado siempre a la misma temperatura de 20°C.
- **Tipo de suelo.** en nuestros ensayos siempre se ha utilizado el mismo tipo de suelo, que ha sido contaminado artificialmente.
- **El pH del suelo utilizado:** 6,4.
- **Tamaño de partícula del suelo:** Se tamizó el suelo utilizando un tamiz de 2 mm.
- **Homogeneidad de la distribución del contaminante en el suelo.**



5.- CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos, y de la literatura consultada permite apreciar que:

- el ensayo realizado, cuyo punto final es el grado de alejamiento de los individuos de ensayo de un suelo contaminado artificialmente, permite obtener datos reproducibles en referencia a los efectos de contaminantes sobre el comportamiento de *Folsomia candida*.
- el coeficiente de variación observado está dentro de los intervalos y variabilidad observada en otros ensayos e toxicidad
- el ensayo de alejamiento puede realizarse en un período de tiempo relativamente corto, y especialmente más corto que el tiempo de exposición necesario para obtener datos de toxicidad de suelos utilizando otros ensayos publicados en la literatura
- aunque no hay datos en la literatura sobre la utilización de forma rutinaria de este ensayo, los resultados obtenidos para los dos compuestos ensayados siguen la misma tendencia que los resultados obtenidos con este mismo organismo de ensayo utilizando otros ensayos e toxicidad.
- para completar la puesta a punto de este ensayo y confirmar su fiabilidad, se están realizando más ensayos con otros compuestos que pueden encontrarse en suelos contaminados.
- asimismo se están completando ensayos con gusanos de tierra (*Eisenia Fetida*) con el fin de poder realizar comparaciones y verificar la robustez y utilidad de los resultados obtenidos
- con el fin de completar la idoneidad de este ensayo se ha planificado la realización de diversos experimentos con suelos de distintos tipos y propiedades.

6.- REFERENCIAS

- Amorim M.J. B., Römbke J., Soares A.M.V.M. (2005) Avoidance behaviour of *Enchytraeus albidus*: effects of Benomyl, Carbendazim, Phenmedipham and different soil types.. *Chemosphere*, 59(4), 501-510.
- Boitaud,L., S. Salmon, C. Bourlette, J.-F. Ponge, 2006. "Avoidance of low doses of naphthalene by *Collembola*" *Environmental pollution*, 139(3), 451-454.
- Crouau,Y., P. Chenon, C. Gisclard, 1999. The use of *Folsomia candida* (*Collembola*, *Isotomidae*) for the bioassay of xenobiotic substances and soil pollutants. *Applied Soil Ecology* 12, 103 -111.
- Domene,X., J. Alcañiz, and P. Andrés, 2007a. "Ecotoxicological assessment of organic wastes using the soil collembola *Folsomia*". 2007, *Agriculture, ecosystems & environment*, 35 (3), 461-472.
- Domene,X., T. Natal da Luz, J.Alcañiz, P. Andrés and J.P.Sousa 2007b. "Feeding inhibition in the soil collembolan *Folsomia candida* as an endpoint for the estimation of organic waste ecotoxicity. *Environmental Toxicology & Chemistry*. 26: 1538-1544.
- Environment Canada, 2007 "Biological Test Method: Test for measuring survival and reproduction of springtails exposed to contaminants in soil". Report EPS 1/RM/47. Environment Canada Ottawa. Canada



- Fontain, M.T. and S.P. Hopkin, 2005. "Folsomia (Collembola): "A Standard soil arthropod". Annual review of entomology 50, 201-222.
- Greenslade P. and G. T. Vaughan, 2003. "A comparison of collembola species for toxicity testing of australian soils". Pedobiologia, 47, 171-179.
- Guillet S. and J.-F. Ponge 2003. "Changes in species assemblages and diets of Collembola along a gradient of metal pollution" Applied soil ecology, 22, 127-138.
- Hund/Rinke, K. and Wiechering H. 2001 "Earthworm avoidance test for soil assessments: an alternative for acute and reproduction test" Journal of soils and sediments, 1, 15-20.
- ISO, 1999. Norma ISO 11267:1999 Inhibición de la reproducción de colémbolos (Folsomia) por contaminantes del suelo.
- ISO/DIS 17512-1.2., 2008. Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour. Test with earthworms (Eisenia Fetida and Eisenia Andrei.).
- Lock, K., Because, S., Criel, P., Van Eeckhout, H., and Janssen, C.R., 2004, "Ecotoxicity of cobalt to the springtail Folsomia candida". Comparative biochemistry and physiology. Part C: Toxicology & pharmacology 139(4), 195-199.
- Martínez Aldaya, M., C. Lors, S. Salmon and J.-F. Ponge, 2006. "Avoidance bio-assays may help to test the ecological significance of soil pollution" Environmental pollution, 140(1), 173-180.
- Natal-Da-Luz T., J. Römbke y J. P. Sousa, 2008. Avoidance tests in site-specific risk assessment - influence of soil properties on the avoidance response of collembola and earthworms. Env. Toxicol. Chem. 27(5), 1112-1117
- OECD 1984. Earthworms, acute toxicity tests (Guideline for testing of chemicals: N° 207, Paris, Francia).
- OECD 2004 Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei) (Guideline for testing of chemicals N° 222, Paris, Francia)
- OECD 2005 Draft Document Collembola Reproduction test (Folsomia fimetaria and Folsomia candida) (April 2005)
- Yeardley Jr, R.B., J.M. Lazorchak y L.C. Gast, 1996. "The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites" Environmental toxicology and chemistry, 15,. 1532-1537.

7.- AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. X. Domene del CREAM de la Universidad Autónoma de Barcelona, por su contribución proporcionando los organismos de ensayo, a la Agencia de Residuos de Catalunya y al Instituto de Medio Ambiente de la Universidad San Jorge de Zaragoza, por su soporte parcial y contribución a la realización de este trabajo.