



Resumen

Desde el año 2000, el Laboratorio Tecnológico del Uruguay ha estado trabajando en la aplicación de bioensayos de toxicidad aguda con el microcrustáceo cladótero *Daphnia magna* en distintas matrices de interés ambiental (aguas naturales, efluentes, lixiviados de residuos peligrosos, elutriados de sedimentos y sustancias químicas). La validación en este tipo de ensayos es tanto o más importante que en los métodos químicos. La garantía de calidad puede obtenerse utilizando sustancias tóxicas patrón, gráficos de Shewhart y participando en estudios interlaboratorios. El objetivo del trabajo presentado es brindar una guía para la aplicación de las técnicas de acuerdo a la matriz considerada y las normas de ensayo usadas, así como las reglamentaciones pertinentes y particularidades del cultivo y del tratamiento estadístico a emplear. También, exponer la concordancia en la clasificación de sustancias químicas por su ecotoxicidad en estudios que comparan el ensayo con la bacteria bioluminiscente (*Vibrio fischeri*) y el de *Daphnia magna*. Otros estudios paralelos tales como el de biodegradabilidad y parámetros físico-químicos, permiten caracterizar las posibles acciones sobre el medio ambiente de una sustancia una vez que ingresa en un curso de agua y permite ingresar la información en las fichas de datos de seguridad.

Introducción

En el LATU, se comenzó a investigar en Ecotoxicología dentro del Departamento de Aguas y Productos Químicos a partir del año 1995. Se participó en proyectos a partir del año 2000. Para ese entonces el LATU ya tenía desarrollado el ensayo de ecotoxicidad aguda (48 Hs) con *Daphnia magna*.

Uno de los primeros fue un proyecto conjunto entre Dinama (Dirección Nacional de Medio Ambiente), Facultad de Ciencias y LATU, en el año 2002: "Los bioensayos como herramienta para evaluar la toxicidad de los efluentes en Uruguay". Se contó con el apoyo de CID (IDRC, Canadá).

El objetivo de este proyecto era estudiar los efluentes de un gran número de industrias a fin de tener información que pudiera ser de utilidad para la incorporación a la normativa existente, información ecotoxicológica. Para ello se recurrió al uso de una batería de bioensayos que incluía *Hydra attenuata*, *Daphnia magna*, *Cnesterodon Decemmaculatus* y *Microtox*.

Con el tiempo se comenzó a investigar en otros tipos de matrices como ser lixiviados, elutriados y sedimentos.

Se realiza un estudio comparativo de la toxicidad de los lixiviados de distintas sustancias químicas generadas por diversas industrias, utilizando *Daphnia magna* y *Microtox*. Este estudio sirvió para evaluar o no la concordancia de estos dos métodos y la necesidad o no de analizar un muestra por los dos métodos.

Se participó luego en un proyecto binacional (Argentino-Uruguayo), el Proyecto Freplata "Protección Ambiental del Río de la Plata y su Frente Marítimo: Prevención y Control de la Contaminación y Restauración de Hábitats". Se realizaron bioensayos aplicados a sedimentos de dragado de aguas dulces y salobres, así como sobre elutriados de los mismos.

Se empieza luego a trabajar sobre el control de las sustancias químicas en cuanto a su toxicidad y su posible impacto en el medio ambiente.

En las cartillas de seguridad (MSDS) se comienza a incluir una parte de Información Ecológica en la cual se describe el comportamiento de la sustancia cuando se la vierte a suelo, agua y aire. Se especifica la biodegradabilidad y bioacumulación en ellos.

También se incluyen bioensayos con diferentes organismos de referencia entre los cuales se incluye *Daphnia magna* y *Pimephales promelas*. También se realizan ensayos de biodegradabilidad de las sustancias químicas por métodos respirométricos.

La validación de los métodos es de vital importancia. Para ello se lleva controles en paralelo con las muestras, con agua de dilución a fin de verificar el buen estado de los organismos. También se testea periódicamente la respuesta a un tóxico patrón. En nuestro caso, al igual que Environment Canada, se elige como tóxico patrón el cloruro de sodio por ser de baja toxicidad para los analistas pero de toxicidad medible para el organismo testeado. Se construye con estos datos un gráfico de control de Shewhart para evaluar la respuesta de los organismos frente a un tóxico (sensibilidad).

Se comenzó además a participar en el interlaboratorio Aquacheck de ecotoxicología en el año 2005, con resultados satisfactorios, todo lo cual permitió validar la técnica.



Normativa aplicable a suelos:

La norma ISO 15799:2004 "Guidance on the ecotoxicological characterization of soils and soils materials", sobre evaluación de residuos sólidos, aplica cuatro bioensayos:

Sobre lixiviado: *Daphnia magna*, *Microtox*® (bacteria bioluminiscente)

Sobre sedimento, suelo o residuo sólido: lombriz californiana (*Eisenia foetida*) y *Lactuca sativa* (semillas de lechuga).

El lixiviado se obtiene según la norma EPA 1311 "Toxicity Characteristic Leaching Procedure"

Normativa aplicable a sedimentos de dragado:

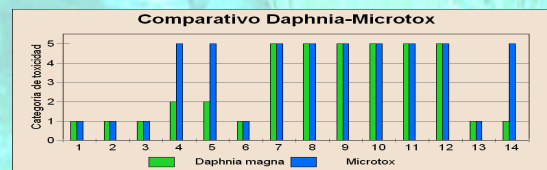
A nivel internacional: US EPA sediment guidelines.
US EPA 823-B-98-004 (1998) "Evaluation of Dredged Material Proposed for Discharge in Waters of the U.S. Testing Manual"

Normativa aplicable a sustancias químicas:

OECD Guideline for Testing of Chemicals (OECD guideline 202).

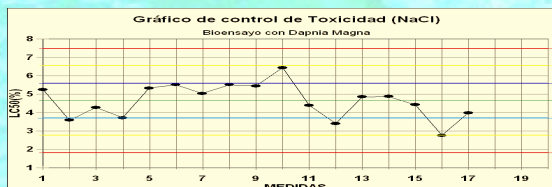
Resultados

Para el comparativo *Daphnia*-*Microtox* en lixiviados se obtuvieron los siguientes resultados:



El 78 % de las muestras coinciden en la categoría de toxicidad asignada por ambos análisis

Se obtuvo el siguiente gráfico de control para el ensayo agudo con *Daphnia magna* (48 Hs) utilizando NaCl como tóxico patrón:



Conclusiones

En el estudio comparativo *Daphnia*-*Microtox* en lixiviados, se evidencia una mayor sensibilidad de *Daphnia magna* en todos los casos.

Existen diferencias marcadas en los casos 4,5 y 14. Las diferencias en la toxicidad de estas muestras, marcan la necesidad de implementar una batería de bioensayos que estudien los efectos tóxicos en distintos niveles tróficos.

El gráfico de control obtenido muestra un ensayo controlado, en el que ninguno de los ensayos excede el límite de $\pm 2\sigma$. Además podemos decir que la sensibilidad del ensayo es adecuada.

Se obtuvo además un LC 50% muy similar al de bibliografía

Se obtuvieron resultados aceptables en todas las pruebas interlaboratorio realizadas hasta el momento.

Materiales y métodos

Condiciones para el cultivo:

- Agua de cultivo de dureza media.
- Fotoperíodo 16:8 (luz-oscuridad).
- Temperatura 20 \pm 2°C.
- Alimentación con Alga *Spirulina* y/o *Selenastrum* y levadura fresca.
- Adición de Cianocobalamina y trazas de selenio.

Condiciones para el test:

- Test estático de 48-h (sin reemplazo de soluciones durante el test).
- Neonatos de menos de 24 hs de edad.
- Diluciones con agua de características similares al agua de cultivo.
- Fotoperíodo 16:8 (luz-oscuridad) u oscuridad total si las sustancias a analizar son fotosensibles.
- Temperatura 20 \pm 2°C.
- Sin alimentación durante el test.

Normativa aplicable a efluentes:

WET (Whole Effluent Toxicity) de la US. EPA.
EPS 1/RM/14 2nd edition "Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to *Daphnia magna*" de la Environment Canada.

