

6-2-2009

## Manual práctico de ensayos de toxicidad en medio acuático con organismos del género *Daphnia*

Pedro Miguel Escobar Malaver

Rubén Dario Londoño Pérez

*Universidad de La Salle, Bogotá*, [rlondono@unisalle.edu.co](mailto:rlondono@unisalle.edu.co)

Follow this and additional works at: [https://ciencia.lasalle.edu.co/edunisalle\\_medioambiente](https://ciencia.lasalle.edu.co/edunisalle_medioambiente)

---

### Recommended Citation

Escobar Malaver, Pedro Miguel and Londoño Pérez, Rubén Dario, "Manual práctico de ensayos de toxicidad en medio acuático con organismos del género *Daphnia*" (2009). *Medioambiente*. 5.  
[https://ciencia.lasalle.edu.co/edunisalle\\_medioambiente/5](https://ciencia.lasalle.edu.co/edunisalle_medioambiente/5)

This Libro is brought to you for free and open access by the Catálogo General at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Medioambiente by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact [ciencia@lasalle.edu.co](mailto:ciencia@lasalle.edu.co).



**UNIVERSIDAD DE LA SALLE**  
"Educar para Pensar, Decidir y Servir"  
Acreditación Institucional de Alta Calidad

# **Manual práctico de ensayos de toxicidad en medio acuático con organismos del género *Daphnia***

Pedro Miguel Escobar Malaver  
Rubén Darío Londoño Pérez

Universidad de La Salle  
Facultad de Ingeniería  
Programa de Ingeniería Ambiental y Sanitaria  
Bogotá, D.C.  
2009

ISBN: 978-958-8572-09-3

Oficina de Publicaciones  
Universidad de La Salle  
Cra. 5 N° 59A-44  
Teléfono: 3 48 80 00 exts.: 1224-1225  
Fax: 217 08 85

Directora editorial:  
Aída María Bejarano Varela

Coordinación editorial:  
Sonia Montaña Bermúdez

Corrección de estilo:  
Eduardo Franco Martínez

Diseño y diagramación:  
Mauricio Salamanca

Diseño de Carátula:  
Paola Rivera Leguizamón

Impresión:  
JAVEGRAF

Impreso en Colombia  
Agosto de 2009

# Contenido

Introducción .....	3
1. Glosario de términos.....	7
2. Fundamentación conceptual.....	12
2.1. Ecosistemas acuáticos.....	12
2.2. Toxicología.....	15
2.3. Toxicología ambiental.....	17
2.4. Ecotoxicología ambiental .....	18
2.5. Ensayos de toxicidad (bioensayos) .....	21
2.6. Clasificación de ensayos de toxicidad .....	25
2.6.1.Ensayos de toxicidad según su respuesta.....	25
2.6.2.Ensayos de toxicidad según su técnica .....	26
2.7. Factores que afectan la toxicidad .....	27
3. Diseño experimental.....	29
4. Protocolos .....	36



# Introducción

Los ensayos de toxicidad son pruebas diseñadas para evaluar la potencia relativa de un agente o una sustancia contaminante sobre una o más especies de organismos de los sistemas biológicos acuáticos y terrestres, al tiempo que permiten caracterizar la relación concentración-respuesta entre el agente contaminante y el organismo sometido a prueba. La toxicidad de una sustancia es la propiedad que tiene esta de causar daños a la salud humana o la muerte de un organismo vivo, mediante la comparación del efecto del agente con el de una solución patrón o estándar.

Los resultados de las pruebas de toxicidad en sistemas acuáticos constituyen un criterio importante para determinar el efecto y el riesgo de la descarga de sustancias contaminantes sobre los ecosistemas acuáticos, así como para establecer valores límites permisibles para el control de sustancias tóxicas que son incorporadas a los ecosistemas acuáticos.

Con el auge de la ecotoxicología —ciencia que predice los efectos de los agentes potencialmente tóxicos en los ecosistemas naturales (Hoffman, 1995)— se ha reforzado la idea de realizar monitoreos y pruebas de toxicidad para la detección, predicción y control de los efectos de diferentes tipos de sustancias sobre los ecosistemas, en particular, el acuático.

La evaluación más común de la toxicidad es la medida de la letalidad a corto plazo. Para una sustancia o vertimiento dado, esta medida implica la determinación de la concentración media que es letal para una porción fija (50%) de una población de organismos de prueba, después de una exposición continua durante un tiempo fijo denominada  $CL_{50}$  (concentración letal media).

Los organismos pertenecientes al género *Daphnia* son ampliamente utilizados como especie test o de referencia para la realización de pruebas de toxicidad, ya que son representantes importantes de la comunidad zooplanctónica, presentando generaciones cortas, con altas tasas reproductivas, de fácil aclimatación a condiciones de laboratorio (Bruce, 2005).

El procedimiento para la realización de las pruebas de toxicidad acuática, generalmente, incluye las siguientes fases:

- 1) selección y ubicación del sitio de muestreo de organismos de prueba;
- 2) recolección de organismos de prueba;
- 3) verificación del tipo de microorganismo seleccionado;

- 4) cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba;
- 5) alimentación de los organismos de prueba;
- 6) preparación del medio de cultivo para algas y centrifugación de algas verdes;
- 7) preparación del agua reconstituida;
- 8) preexperimentación (pruebas de sensibilidad y pruebas preliminares);
- 9) determinaciones físico-químicas de las condiciones de los ensayos;
- 10) experimentación;
- 11) obtención y cálculo de la  $CL_{50}$  para el tiempo de exposición preestablecido.

La información obtenida de las pruebas de toxicidad en un medio acuático puede aplicarse al establecimiento de criterio de calidad del agua, asegurando niveles de concentración de sustancias cuestionables, y en la evaluación del posible impacto de sustancias sobre el medio acuático, con el fin de reglamentar la calidad de efluentes específicos para establecer un límite aceptable o para determinar el grado de tratamiento de vertimientos industriales en su lugar de origen.

El presente manual es el resultado de la dedicación y experiencia de los investigadores del Laboratorio de Bioensayos, a partir de un proyecto de investigación realizado en la Universidad de La Salle en el año 2007, que utilizó como sustancias tóxicas el arsénico (As) y el níquel (Ni), y como organismo de prueba la pulga de agua o *Daphnia pulex*. En tal sentido, se presentan los siguientes protocolos como ayuda fundamental para la realización de pruebas de toxicidad, tanto de sustancias químicas puras, como de efluentes, lixiviados, agua potable y aguas naturales superficiales y subterráneas.

Los protocolos descritos incluyen los procedimientos desde el montaje del cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba, así como la realización de pruebas de toxicidad, sensibilidad del organismo utilizado y validación de los resultados, que comprenden las recomendaciones de entidades internacionales, tales como la CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental 'Compañía de Tecnología de Saneamento Ambiental', 1992); la USEPA (United States Environmental Protection Agency 'Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos), 1994), y la ASTM (American Section of the International Association for Testing Materials, 1986); por lo cual se obtuvo una base teórico-práctica para la realización de futuros estudios que ayuden a conocer los límites permisibles de las diferentes sustancias presentes en un cuerpo de agua para su posterior aplicación en la regulación que, por parte de las entidades del Estado, están a cargo de la protección del medioambiente acuático.

Los protocolos que incluyen el presente manual de pruebas de toxicidad acuática son:

- |      |  |
|------|--|
| LB01 | Preparación del agua reconstituida.                      |
| LB02 | Preparación del medio Bristol y cultivo de algas verdes. |
| LB03 | Conteo de algas con la cámara Neubauer.                  |
| LB04 | Mantenimiento del cultivo <i>Daphnia pulex</i> .         |
| LB05 | Pruebas de toxicidad.                                    |
| LB06 | Análisis de resultados mediante el método probit.        |
| LB07 | Análisis de varianza (Anova).                            |

# 1. Glosario de términos

**Aditividad.** Es la toxicidad de una mezcla de agentes químicos que es aproximadamente equivalente a aquella esperada por la simple suma de las toxicidades de los agentes químicos individuales presentes en la mezcla.

**Antagonismo.** Es el fenómeno en el cual la toxicidad de una mezcla de agentes químicos es menor del esperado por la simple suma de la toxicidad de los agentes químicos individuales presentes en la mezcla.

**Bioacumulación.** Término genérico que describe el proceso por el cual los agentes químicos son absorbidos y retenidos por los organismos a partir del ambiente en que viven o por medio de su alimentación.

**Biodisponibilidad.** Propiedad del agente químico que determina el efecto tóxico en el organismo. La reducción de la biodisponibilidad del agente químico resulta en una disminución de su efecto tóxico.

**Bioensayo.** Método utilizado para evaluar la potencia relativa de un agente químico sobre organismos vivos a través de la comparación del efecto de ese agente con el efecto de una solución patronizada.

**Carga tóxica.** Contribución tóxica del efluente para un cuerpo receptor obtenida mediante la multiplicación de la toxicidad del efluente (expresada en unidades tóxicas) por su caudal.

**CER.** Concentración del efluente en el cuerpo receptor después de la mezcla completa.

**Concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>).** Concentración del agente tóxico que causa efecto agudo (por ejemplo inmovilidad) al 50% de los organismos de prueba en un determinado período de exposición.

**Concentración de efecto observado (CEO).** La menor concentración de un agente tóxico que causa efecto deletéreo estadísticamente significativo en la supervivencia, crecimiento y reproducción de los organismos de prueba en un determinado período de exposición.



**Concentración de efecto no observado (CENO).** La mayor concentración del agente tóxico que no causa efecto deletéreo estadísticamente significativo en la supervivencia, crecimiento y reproducción de los organismos de prueba en un determinado período de exposición.

**Concentración incipiente ( $CL_{50}$  I).** Concentración de un agente tóxico que causa efecto agudo (letalidad) al 50% de los organismos de prueba en un período de exposición lo suficientemente largo para que el efecto agudo cese.

**Concentración letal inicial media ( $CL-I_{50}$ ).** Concentración nominal del agente tóxico al inicio de la prueba que causa efecto agudo al 50% de los organismos en un determinado período de exposición.

**Concentración letal media ( $CL_{50}$ ).** Concentración del agente tóxico que causa efecto agudo (letalidad) al 50% de los organismos de prueba en un determinado período de exposición.

**Curva concentración-respuesta.** Curva que describe la relación entre la concentración de un agente tóxico y el porcentaje de respuesta de una población de organismos acuáticos en una prueba de toxicidad.

**Efecto agudo.** Efecto deletéreo causado por agentes químicos a organismos vivos, que se manifiesta rápida y severamente. Generalmente, este efecto ocurre después de un corto período de exposición (0 a 96 horas).

**Efecto crónico.** Efecto deletéreo causado por agentes químicos a organismos vivos, que normalmente se manifiesta después de días o años, dependiendo del ciclo vital de la especie estudiada. Ese efecto ocurre, en general, después de un prolongado período de exposición.

**Efecto letal.** Respuesta a un estímulo, en concentraciones de un agente tóxico, que causa la muerte por acción directa.

**Efecto subletal.** Respuesta a un estímulo, en una concentración, de un agente tóxico, que está por debajo del nivel que causa la muerte directamente.

**Límite de tolerancia media ( $LT_{50}$ ).** Concentración del agente tóxico en el que el 50% de los organismos de prueba sobreviven en un determinado período de exposición.

**Mezcla completa.** Homogenización total del efluente en el cuerpo receptor.

**Prueba de toxicidad.** Método utilizado con el fin de detectar y evaluar la capacidad inherente del agente tóxico para producir efectos deletéreos en organismos vivos.

**$Q_{7-10}$ .** Caudal mínimo anual del río. Media de siete días consecutivos con probabilidad de diez años de retorno.

**Sinergismo.** Fenómeno en el cual la toxicidad de una mezcla de agentes químicos es menor del que se esperaría por la simple suma de la toxicidad de los agentes químicos individuales presentes en la mezcla.

**Toxicidad.** Propiedad inherente del agente químico que produce efectos dañinos a un organismo cuando este se expone, durante cierto período, a determinadas concentraciones.

**Toxicidad aguda.** Simula una situación ambiental en la cual el organismo es expuesto, durante un corto período de tiempo, a concentraciones elevadas de un agente tóxico. Puede ser preliminar o definitivo.

**Toxicidad crónica.** Simula una situación ambiental en la cual un organismo es expuesto, durante largos períodos, a bajas concentraciones de un agente tóxico. Puede ser preliminar o definitivo.

**Unidad tóxica (UT).** Unidad que expresa la transformación de la relación inversa de la toxicidad obtenida a través de la ecuación:  $UT = 100 / CL_{50}$ .

**Valor crónico.** Media geométrica de los valores de CENO y CEO.

**Valor límite permisible.** Es la concentración del elemento, compuesto o sustancia contenida en un vertimiento o en un cuerpo de agua que, al ser excedida, puede causar daños a la salud, los organismos acuáticos o al ecosistema mismo.



## 2. Fundamentación conceptual

### 2.1. Ecosistemas acuáticos

Son sistemas abiertos que están interactuando constantemente con los ecosistemas que los rodean, convirtiéndose en los receptores temporales o finales de agentes contaminantes; estas sustancias vertidas poseen ciertas particularidades que transforman sus características físicas, químicas y biológicas, y causan un efecto nocivo, tanto para la biota acuática, como para los demás organismos que intervienen en la cadena alimenticia, llegando hasta el hombre (Marcano, 2007).

Las condiciones físicas y químicas dominantes en los medios acuáticos determinan el tipo de organismos que vive en ese medio. Se han propuesto varias clasificaciones ecológicas de los organismos acuáticos, la más aceptada, hoy día, es la que presentamos a continuación:

- **Plancton.** Comprende los organismos que viven suspendidos en las aguas y que, por carecer de medios de locomoción o ser estos muy débiles, se mueven o se trasladan a merced de los movimientos de las masas de agua o de las corrientes. Generalmente, son organismos pequeños, la mayoría microscópicos. Está constituido por el fitoplancton y el zooplancton. El primero es una población de pequeñas plantas microscópicas, que representan el primer eslabón de la cadena alimenticia; junto con las plantas superiores, que habitan las aguas dulces, constituyen los organismos productores, las cuales son consumidas por la comunidad herbívora perteneciente al zooplancton, cuyos miembros son organismos acuáticos que realizan una importante labor como es la de mantener el equilibrio entre el aumento de la población y la disponibilidad del alimento; la mayoría de los organismos que pertenecen al zooplancton se alimentan de otros animales más pequeños, y está compuesto, desde el punto de vista trófico, por consumidores primarios o herbívoros y consumidores secundarios.

El segundo (el zooplancton) está clasificado en rotíferos y dos clases de crustáceos (copépodos, cladóceros), y su principal objetivo es la importancia en la dinámica trófica de los ecosistemas acuáticos, teniendo en cuenta la ictiofauna de un lugar determinado (Campo, 2002).

- **Necton.** Son todos los organismos que nadan libremente en el agua y, por tanto, se trasladan de un lugar a otro recorriendo, a veces, grandes distancias (migraciones). La zona litoral es rica en especies nectónicas; frecuentemente, esta diversidad de especies va acompañada de gran abundancia de individuos. Entre los invertebrados que forman el necton, tenemos los insectos (larvas y adultos) y los crustáceos (Campo, 2002).

- **Bentos.** Comprende los organismos que viven en el fondo del agua o fijos a él y, por tanto, dependen de este para su existencia. Sus comunidades se caracterizan por ser muy ricas en especies y formas, y la mayoría de los organismos que forman el bentos son invertebrados.
- **Neuston.** A este grupo pertenecen los organismos que nadan o “caminan” sobre la superficie del agua. La mayoría son insectos.
- **Perifiton.** Organismos vegetales y animales que se adhieren a los tallos y hojas de plantas con raíces fijas en los fondos.

El equilibrio de este sistema depende del balance que debe existir entre la entrada y salida de agua, entre la entrada de materia y energía, dándose una distribución de estas dentro del ecosistema, que va ascendiendo entre sus miembros, y forma así una cadena trófica (cadena alimenticia), demostrando que cada individuo desempeña un papel específico y que este es afectado por alteraciones en las funciones de otros individuos y las características de su medio (Albert, 1977).

Los ecosistemas acuáticos son muy susceptibles a modificaciones en sus condiciones ambientales naturales. Por ejemplo, por una intervención antrópica (directa o indirecta), que surge cuando a estos llega un vertimiento industrial, agrícola y doméstico, que los contaminan cambiando sus características químicas, físicas y biológicas. Por su parte, los efectos biológicos de la contaminación se miden a través del cambio que experimentan las comunidades a medida que reciben las descargas de desechos de diferente orden.

## 2.1. Toxicología

La toxicología estudia los efectos nocivos de agentes físicos, químicos y biológicos, las alteraciones en la estructura y respuesta de los organismos vivos. Esta rama de la ciencia se centra en las sustancias que son tóxicas para el hombre (Samiter, 2007).

Si se fuese a establecer el origen de la toxicología, se debería situar paralelamente con el origen de la biología, puesto que, en el momento en que aparece la vida, surge el riesgo de estar en contacto con agentes nocivos que ponen en peligro el funcionamiento normal del organismo. La toxicología es una rama de la medicina que, cada vez, adquiere mayor importancia en el mundo entero (Vallejo, 1997).

En toxicología es fundamental conocer el potencial tóxico de la sustancia que esté generando el efecto adverso para poder evaluar el peligro que representa. El efecto tóxico es el producido por uno o varios agentes tóxicos sobre un organismo, población o comunidad, que se manifiesta por cambios biológicos.

Su grado se evalúa por una escala de intensidad o severidad y su magnitud está relacionada con la dosis (cantidad de sustancia administrada, expresada generalmente por unidad de peso corporal) o la concentración (sustancia aplicada en el medio) del agente tóxico.

En este sentido:

La dosis letal (DL) es la cantidad de la sustancia tóxica que causa la muerte a la totalidad de la población expuesta.

La dosis letal cincuenta ( $DL_{50}$ ) es la cantidad del tóxico que, al ser administrada una sola vez en un determinado período, produce una mortalidad del 50% de los organismos que son expuestos; esta es expresada en miligramo de la sustancia por kilogramo del animal (ml/Kg) (Vallejo, 1997).

La concentración letal cincuenta ( $CL_{50}$ ) es la cantidad de un agente tóxico que es administrado al medio; causa la muerte al 50% de la población de organismos en un determinado período y es expresada en miligramos por litro (mg/L).

Los casos en que la contaminación atmosférica, la destrucción de los ecosistemas o la desaparición de especies afectaban a los seres humanos, incluyendo a su descendencia, empezaron a presentarse desde el inicio de la Revolución Industrial, pero en la literatura especializada aparecieron a finales de los años veinte; sin embargo, no se les prestó mayor importancia. Aunque con el tiempo, el número, la frecuencia y la gravedad de accidentes, entre ellos, las intoxicaciones con metilmercurio en Irak, con pesticidas órgano-clorados como el paratión en México y Colombia, fue aumentando, la mayoría de los investigadores seguían tomando esto como algo que ocurría en lugares remotos, que afectaba solo a los grupos marginados por la cultura, la ubicación geográfica o por razones económicas (Campo, 2002).

Fue hasta los años sesenta y setenta que, en los países desarrollados, los casos de enfermedad y muerte causados por la contaminación atmosférica aumentaron notablemente, atrayendo así la atención de las comunidades y de los Gobiernos, que comprendieron que la contaminación no era solo una molestia, sino que, de seguir ignorándola, podía llegar a poner en riesgo la existencia de la humanidad.

Por este motivo, se generó un desarrollo rápido de la toxicología ambiental y de una de las disciplinas relacionadas con ella: la ecotoxicología. Actualmente, la toxicología ambiental ya no es una rama de la toxicología, sino que es el motor que origina los estudios experimentales, las acciones de monitoreo ambiental, los estudios de prevención y epidemiológicos (Albert, 1997).

### **2.3. Toxicología ambiental**

La toxicología ambiental estudia los efectos que causan los agentes tóxicos sobre organismos individuales al ser expuestos a una duración, intensidad y frecuencia determinadas para prevenir los riesgos que se puedan presentar en los ecosistemas intervenidos. Estos efectos dependen de si la toxicidad se presenta directamente sobre el organismo o en el ambiente en el que este se desarrolla.

En el área de la toxicología ambiental, los componentes químicos se estudian más por el reflejo de la peligrosidad potencial que por su toxicidad relativa, aplicándolos más bien a determinadas condiciones de exposición, puesto que, de lo contrario, no tendría significado.

Las poblaciones simples no responden a los agentes químicos de una manera natural en régimen de aislamiento; por esta razón, los estudios toxicológicos no deben ser realizados en estas poblaciones, sino en poblaciones complejas, ya que las interacciones que se presentan en estas requieren conductas y respuestas, las cuales no son evidentes en el aislamiento. Por consiguiente, la toxicología ambiental presenta su propia metodología para la evaluación de los efectos que generan los contaminantes (Vallejo, 1997).

## 2.4. Ecotoxicología ambiental

En 1950, Truhaut sustituyó el término de toxicología ambiental por el de ecotoxicología, que se usaba hasta ese momento. Posteriormente, se pretendió mostrar una diferencia entre los dos términos al designarle a la ecotoxicología todo lo referente a la contaminación de los ecosistemas y a la toxicología ambiental lo referente a la contaminación originada por el hombre, considerando al contaminante como un agente físico o una sustancia química que se encuentra en el ambiente y que tiene un efecto letal sobre los organismos vivos; pero muchas veces esta diferencia era imposible (Palacio, 1993).

Entonces se puede decir que la ecotoxicología ambiental estudia los efectos nocivos de sustancias altamente tóxicas (químicas o físicas) presentes en el ambiente sobre organismos vivos, los cuales son parte esencial en los ecosistemas (vegetales, microorganismos, animales y el hombre). En la ecotoxicología interviene la toxicología y la ecología. Su finalidad es evaluar el riesgo ecológico que se puede presentar por la presencia de sustancias potencialmente tóxicas en un ambiente acuático, reuniendo así la suficiente información para la protección de los ecosistemas. Entre las características que se deben valorar están: la distribución en el ambiente, los patrones de descarga, los efectos en organismos vivos, la degradación, la actividad biológica, las formas de bioacumulación, etcétera, así como las características y propiedades de los ecosistemas (Campo, 2002).

Con esta valoración se evalúa la probabilidad de ocurrencia de efectos adversos que pueden surgir o están surgiendo en ecosistemas que se encuentran en exposición a sustancias de interés sanitario que producen estrés en los organismos, evaluación que está determinada en dos elementos:

- Exposición de organismos en estudio con agentes contaminantes: interacción entre frecuencia, intensidad y respuesta de los organismos frente a sustancias que alteran su ecosistema.
- Características de los efectos producidos por sustancias tóxicas: relación dosis-respuesta entre la sustancia química contaminante y los efectos que produce en el organismo.

Las sustancias ecotóxicas son aquellas que, al ser liberadas en el ambiente, producen un impacto ambiental significativo, de naturaleza reversible o irreversible, debido a procesos conocidos de toxicidad como la bioacumulación, la persistencia y la residualidad. Por consiguiente, la ecotoxicología no se enfoca a que cierto agente haga desaparecer a la mitad de los individuos de una especie, sino a determinar el impacto ecológico que produce, ya que muchos contaminantes no tienen efectos sobre los organismos individualmente, pero aun así su consecuencia ecológica es digna de tenerse en cuenta (Palacio, 1993)

Las sustancias ambientales que son el resultado de las actividades del hombre son conocidas como xenobióticos; en otras palabras, son aquellas que, por sus estructuras químicas, creadas por el hombre, no pueden ser asimiladas por los microorganismos, por lo tanto, no son biodegradables y, por ende, constituyen uno de los principales factores de destrucción del equilibrio del medioambiente.

Si partimos de que los ecosistemas naturales son un conjunto armónico consecuente con sus propios equilibrios biológicos y que las sustancias químicas pueden, en ocasiones, perturbar estos equilibrios y trastornar dicha armonía, no solo se originan muertes, sino también se altera la capacidad de sobrevivir en las condiciones ecológicas producidas. Esto es lo que causa que, en la ecotoxicología, no sea suficiente la evaluación de la toxicidad que se realiza en la toxicología convencional, ya que los efectos tóxicos tienden siempre a ser remotos.

Por consiguiente, la respuesta de posibles riesgos ecológicos frente a la exposición de un contaminante se realiza mediante pruebas o bioensayos ecotoxicológicos, principalmente, desarrollados en organismos de una determinada población, obteniendo así respuestas del daño a la biota y ecosistemas de manera rápida, aun cuando algunas sustancias altamente tóxicas no puedan ser detectadas por análisis rutinarios (análisis fisicoquímicos), ya que sus características son tan complejas que son casi imposibles de detectar y, por ende, difícil de pronosticar el efecto en el ecosistema. Estos bioensayos ecotoxicológicos también suministran evidencia de los posibles efectos acumulativos en las cadenas tróficas que alteran la cadena alimenticia presente en el ecosistema (Vallejo, 1997).

En ocasiones, la única diferencia entre *toxicología* y *ecotoxicología* parece estar centrada en las especies seleccionadas para las pruebas toxicológicas.

Sin embargo, la diferencia esencial entre las dos ciencias radica en su enfoque frente al problema. La *toxicología* concierne a los efectos sobre los organismos individuales, estudia estos efectos, los impactos de la introducción directa del compuesto dentro del organismo y focaliza su atención en una sola especie, incluido el hombre. En los estudios toxicológicos se habla de dosis de aplicación.

Por su parte, la *ecotoxicología* se ocupa de los efectos sobre los ecosistemas y estudia las consecuencias de la introducción del xenobiótico en el medio. Su interés abarca toda la biota, incluyendo los aspectos estructurales y funcionales del ecosistema expuesto. Asimismo, estudia los procesos de transformación del xenobiótico en el medio, además, de su degradación, absorción del xenobiótico o sus metabolitos, su redistribución al ser liberados y los procesos de bioacumulación y biomagnificación. En los estudios ecotoxicológicos, se habla de concentración del xenobiótico en el medio (Palacio, 1993).

## 2.5. Ensayos de toxicidad (bioensayos)

Los ensayos de toxicidad están definidos con el objeto de evaluar y reconocer la reacción que puede producir sobre organismos vivos una sustancia altamente tóxica en un período determinado, permitiendo establecer la respuesta de un organismo (miembro de un ecosistema presente en



cualquier recurso) a cambios específicos en su hábitat, lo que hace de este método una opción para determinar los límites de tolerancia de diferentes sustancias de interés sanitario y evaluar los efectos potenciales e impactos en los cuerpos de agua, biota acuática y ecosistemas presentes.

Son herramientas que se utilizan en ecotoxicología con las que se estudia el efecto y destino de los contaminantes antropogénicos tóxicos en ecosistemas acuáticos y terrestres, a través de mediciones experimentales en condiciones controladas en laboratorio, lo que permite concluir que, en ciertos casos, existen concentraciones muy bajas de contaminantes.

Son un elemento clave en el control de la contaminación, si se tiene en cuenta que las caracterizaciones físico-químicas no dan la suficiente información para determinar la concentración en la que un vertimiento se vuelve tóxico para los ecosistemas presentes (Bruce, 2005).

La finalidad primordial de las pruebas de toxicidad es establecer la concentración suficiente en la cual un contaminante dado produce efectos tóxicos en organismos vivos, que determina la relación dosis-respuesta. Esta se puede manifestar con la muerte, inmovilización, pérdida del equilibrio, deterioro de la facultad de reproducción, de desarrollo o natatoria, cambios histológicos o bioquímicos, etcétera, dependiendo de las características del bioensayo y del ciclo de vida del organismo que se esté utilizando en él.

Estas son las herramientas más adecuadas para determinar en el laboratorio, en condiciones apropiadas y estandarizadas, el efecto que pueden generar las sustancias tóxicas en una biota acuática determinada, la cual es usada como reactivo estableciendo la relación entre el grado de contaminación y la mortalidad de los individuos (Bruce, 2005).

Existen ciertas características de los ensayos de toxicidad con organismos. Según la EPA (1999), son:

- Suministran información sobre los posibles efectos y probable deterioro de los ecosistemas acuáticos.
- Su predicción es alta cuando en el ambiente acuático existen descargas con alta magnitud de toxicidad.
- Se han entregado concentraciones confiables para muchas sustancias altamente tóxicas que causan efectos de bioacumulación en ecosistemas acuáticos.
- Proveen resultados confiables por estar altamente estandarizados con alta calidad específica, controles, réplicas y comparaciones con otros bioensayos.
- Proporcionan una anticipada señal de alerta para minimizar impactos negativos y tomar medidas sobre ella.
- Al ser interpretados en forma rápida y a corto plazo, permiten la acumulación de dosis-respuesta, caracterizando las aguas residuales o sistemas ambientales.

Al encontrar la relación dosis-respuesta, se puede establecer una curva de toxicidad que permita un análisis estadístico de los resultados para así obtener la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de los organismos prueba, expresada en partes por millón (ppm).

La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) es un agente que se encuentra en el agua, suelo o sedimento que es letal para el 50% de los organismos utilizados en los bioensayos (Bustos, Díaz, 2004).

La forma correcta de realizar los ensayos de toxicidad es mediante el empleo de la respuesta cuantitativa, es decir, considerando solo dos resultados experimentales, muerto o vivo, y a partir de esto se puede determinar la relación entre la concentración y el efecto en porcentaje. Como se dijo, los datos cuantitativos permiten la determinación estadística de la posición e inclinación de la curva de “concentración-mortalidad” para un período de exposición. Con esto, se puede evaluar el peligro y riesgo generado por sustancias de interés sanitario que se encuentran en el medio donde vive el organismo prueba (Escobar, 1997).

Cuando se implementan pruebas de toxicidad, se debe realizar la estandarización de estas, en la cual se establece la sensibilidad de las especies y su secuencia de efecto frente a un tóxico de referencia, según las repeticiones del experimento. Con esto se certifica que la respuesta de la población en estudio se debe al efecto del tóxico de referencia y no a las variaciones de sensibilidad de los organismos o a fallas operacionales en la aplicación del método, lo que permite elaborar cartas de vigilancia, teniendo en cuenta la precisión y exactitud que se debe y puede obtenerse en los resultados generados por un determinado bioensayo.

Este tóxico de referencia debe cumplir con las siguientes características:

- amplio espectro tóxico;
- facilidad de obtención en forma pura;
- alta solubilidad en agua;
- persistencia y estabilidad en solución;
- estabilidad en almacenamiento;
- facilidad de cuantificación.

Estas características determinan el rango de variabilidad máximo aceptable en los resultados, así como el rango de sensibilidad frente al período de exposición, tóxico de referencia y manifestación de organismos (muerte, inmovilización, etcétera) (Bruce, 2005).

## 2.6. Clasificación de ensayos de toxicidad

Las pruebas de toxicidad son clasificadas según el objetivo que se busque con ellas, el área de estudio y el espacio que se límite como se muestra a continuación:

### 2.6.1. *Ensayos de toxicidad según su respuesta*

- 2.6.1.1. Ensayos de toxicidad aguda. Los organismos son expuestos al agente tóxico durante un período corto no mayor que 96 horas, y se presenta una sola vez.

- 2.6.1.2.** Ensayos de toxicidad subaguda. Los organismos son expuestos al agente tóxico diariamente durante períodos que oscilan entre 15 días y 4 semanas.
- 2.6.1.3.** Ensayos de toxicidad crónica. El período de exposición cubre, al menos, una generación del organismo de prueba. Son considerados como ensayos a largo plazo. Permiten evaluar la exposición continuada al tóxico y efectos subletales, como reducción de crecimiento o reproducción. Sus resultados se expresan en niveles NOEC (no observed effect concentration 'no se observan efectos adversos en los organismos de prueba') y LOEC (lowest observed effect concentration 'causan efectos adversos estadísticamente significativos en los organismos de prueba') y MATCH (es el rango entre el NOEC y el LOEC y la concentración máxima aceptable del tóxico). Este último utilizado ampliamente por la EPA para evaluar pesticidas y químicos industriales (United States Environmental Protection Agency, EPA, 1999).
- 2.6.1.4.** Ensayos de toxicidad subcrónica. En ellos el período de exposición al tóxico cubre al menos el 10% del período de generación del organismo de prueba. Se aplica a organismos que tienen ciclo de vida de por lo menos un año de duración. Permiten la evaluación de la alternancia de períodos de exposición y no exposición al tóxico.

## **2.6.2.** *Ensayos de toxicidad según su técnica*

- 2.6.2.1.** Ensayos estáticos. Este consiste en colocar en cámaras de prueba o montajes las soluciones que se vayan a utilizar en el ensayo y los organismos que se van a examinar.
- 2.6.2.2.** Ensayos semiestáticos. En ellos se renueva periódicamente el medio de ensayo (por ejemplo una vez cada 24 horas).
- 2.6.2.3.** Ensayos de flujo continuo. Son aquellos en los que existe una renovación continua del medio de ensayo.
- 2.6.2.4.** Ensayos de reproducción. El período de exposición cubre, al menos, tres generaciones de los organismos prueba. Permiten evaluar el comportamiento reproductivo como consecuencia de la exposición al tóxico.
- 2.6.2.5.** Ensayos de recuperación. Son aquellos en los que el período de exposición es seguido por la transferencia y observación de los organismos de prueba en un medio no tóxico (Escobar, 1997).

## 2.7. Factores que afectan la toxicidad

Las características del agua, así como las de los microorganismos, pueden modificar la toxicidad de los contaminantes presentes en el agua. Por consiguiente, se deben eliminar los factores extraños que pueden afectar las pruebas de toxicidad, teniendo un control en ellas de OD, pH, dureza y temperatura. Con este registro se mantiene un valor constante de estos parámetros, y se elimina así todas las variables, excepto la concentración del tóxico.

En algunos casos, los cambios en el potencial tóxico están dados por las características del agua de dilución. El conocimiento de las posibles variaciones puede ayudar a ejercer un control estricto para tener certeza sobre los resultados obtenidos.

Tanto las características bióticas como las abióticas actúan como factores modificantes de la toxicidad. Las bióticas incluyen todos los factores que son inherentes a los microorganismos, entre ellas:

- Tipo de microorganismos (algas, insectos, peces, etcétera).
- Especies, toda vez que una especie puede responder en forma diferente a otra especie frente a un tóxico dado en el mismo grupo.
- Estado de la vida (larva, joven, adulto).
- Tamaño del individuo.
- Estado nutricional y salud del individuo.
- Sexo del organismo prueba.
- Estado fisiológico y grado de aclimatación a las condiciones medioambientales.

Dentro de las condiciones abióticas que pueden actuar como factores modificantes se encuentran toda la gama de características fisicoquímicas del agua que rodean el microorganismo: temperatura, pH, oxígeno disuelto, salinidad, dureza, sólidos suspendidos orgánicos e inorgánicos, sales disueltas, nutrientes y sus proporciones relativas, el CO<sub>2</sub> disuelto y otros gases, la intensidad de la luz, el fotoperíodo, el movimiento del agua y las variaciones de todos estos factores en un cuerpo de agua particular (Cruz, 1996).

Considerando la toxicidad como la resultante de los efectos adversos que causan en un organismo los contaminantes presentes en el agua, a una concentración y período de exposición específicos, es claro que el efecto tóxico, así como la respuesta del organismo a tal efecto, pueden modificarse por los factores bióticos y abióticos que afectan, tanto al organismo, como al contaminante mismo; por esta razón, estos factores, en un momento dado, pueden variar los resultados obtenidos. La certeza en el resultado dependerá del hecho de tener constantes estos parámetros en las pruebas de toxicidad.

Normalmente, el organismo más recomendado, en los estándares internacionales para los ensayos de toxicidad acuática de carácter agudo, es el microcrustáceo *Daphnia magna*; sin embargo, la formulación del problema ambiental implica la necesidad de buscar especies propias de los ambientes locales expuestos a la contaminación que se pretende evaluar, por medio de ensayos de toxicidad, en condiciones propias de los ambientes que se quieren proteger y preservar, utilizando organismos que se encuentren naturalmente en esas condiciones, como es el caso de la *Daphnia pulex* recolectada en el humedal de Guaymaral, localizado en el departamento de Cundinamarca. (Escobar, 1997).