



*“Determinamos los efectos
de la contaminación”*

Determinación de la efectividad destoxificante de camas biológicas

Lic. Pablo Mayorga
SEPRA

Ciudad de Guatemala, 26 y 27 de
junio 2014



HOST PARA GUATEMALA DE
GLOBALG.A.P.
The Global Partnership for Good Agricultural Practices



¿Cómo se pueden determinar los riesgos de la contaminación?

Enfoque químico

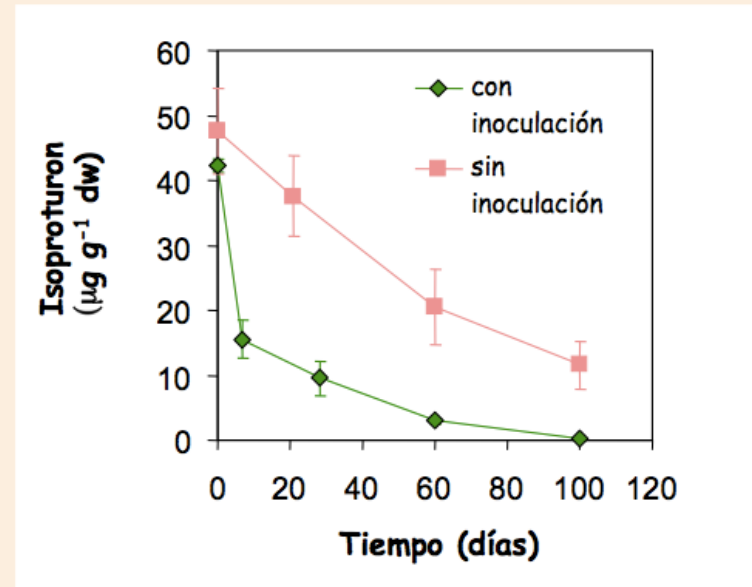
(análisis químicos de los contaminantes)

Enfoque ecotoxicológico

(pruebas de toxicidad -bioensayos-)

¿Como se evalúa la eficiencia de camas biológicas?

- ◆ Reducción de concentración de compuestos que ingresan al sistema
- ◆ Desventajas
 - ◆ No dice si causa efectos nocivos en seres vivos o si hay interacciones entre sustancias presentes
 - ◆ Límites de detección
 - ◆ Metabolitos?



Castillo, 2003

Pruebas de toxicidad

- Señal del impacto (efectos) de todos los químicos presentes
- Indicadores biológicos: posibles impactos en seres vivos
- Asegurar que lixiviados que salen de las camas biológicas no son tóxicos

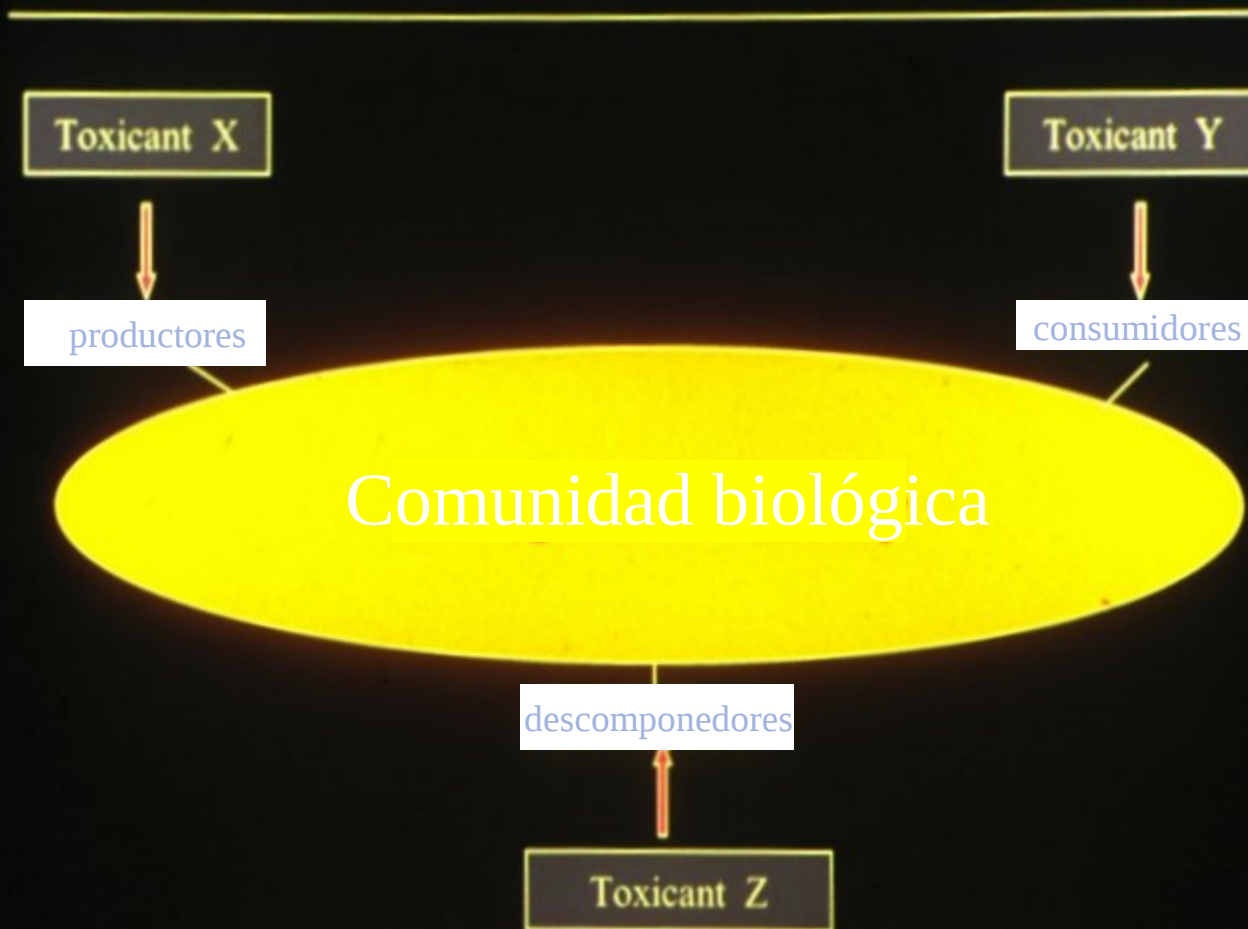
Organismos utilizados en bioensayos de toxicidad

- ◆ Bacterias
- ◆ Algas azulverdosas
- ◆ Levaduras
- ◆ Hongos
- ◆ Protistas ciliados y flagelados
- ◆ Algas unicelulares (verdes, rojas, cafés)
- ◆ Plantas vasculares
- ◆ Celenterados
- ◆ Nemátodos

Organismos utilizados en bioensayos de toxicidad

- ◆ Rotíferos
- ◆ Lombrices de tierra
- ◆ Moluscos
- ◆ Crustáceos
- ◆ Insectos
- ◆ Erizos de mar
- ◆ Peces
- ◆ Ranas
- ◆ Aves
- ◆ Mamíferos (problemas éticos)

Impacto de sustancias tóxicas en la cadena alimenticia



Necesidad de una batería de ensayos

		<i>Daphnia magna</i> (24 h)	Streptoxkit F (24 h)	Thamnotoxkit F (24 h)	Rotoxkit (24 h)	Microtox (30´)
1. Compuestos Inorgánicos						
1.1- Metales (mg/l)						
As ³⁺ (As ₂ O ₃)		6.2	8.3		12.1	5600 (5´) ^L
As ⁵⁺ (NaAsO ₂)		3 (26 h)				26 ^L
As ⁵⁺ (Na ₂ HAsO ₄ ·7H ₂ O)		5.4 (48h)				
Be ²⁺ (BeSO ₄ ·4H ₂ O)		4.64				15 (5´) ^L
Ca ²⁺ (CaCl ₂ ·2H ₂ O)		570	830	43	770	
Cd ²⁺ (CdCl ₂ ·2.5H ₂ O)		0.7/0.9 ^L	0.25	0.2	1.2	8 ^L
Cr ⁶⁺ (K ₂ Cr ₂ O ₇)		0.35 ^L	0.31	0.018	8.27	15 ^L
Cu ²⁺ (CuSO ₄ ·5H ₂ O)		0.07/0.536 ^L	0.038	0.079	0.026 ^L	0.2 ^L
Fe ²⁺ (FeSO ₄ ·7H ₂ O)		24.5/30.2	145	41.5	23.53	71 (5´) ^L
Hg ²⁺ (HgCl ₂)		0.022/0.0081	0.06	0.04	0.053	0.05(15´) ^L
K ⁺ (KCl)		980/330		410	880	
Mg ²⁺ (MgSO ₄ ·7H ₂ O)		400	360	620	360	
Mn ²⁺ (MnSO ₄ ·H ₂ O)		10	81.6	23.3	34.6	13.7(15´) ^L
Na ⁺ (NaCl)		400/2200	2700	1800	1500	20000(5´) ^L
Ni ²⁺	Ni(Acet) ₂	21 ^L			4 ^L	
	NiCl ₂ ·2H ₂ O)	10.9				20 ^L
	NiSO ₄ ·6H ₂ O	8.55	3.79	2.21	5.83	
Pb ²⁺	PbCl ₂	0.335 ^L		1.63	9.98	
	Pb(NO ₃) ₂					0.4 ^L
Sb ³⁺ (SbCl ₃)			2.99	5.27		11.2
Ti ⁴⁺ (Ti ₂ SO ₄)		3.38	0.27	0.32	6.18/3.7	920 ^L
Zn ²⁺	ZnSO ₄	2.1/1.2	0.65	0.69	2.42	2 ^L
	ZnCl ₂		0.81	0.23	4.8	1.1 ^L

	<i>Daphnia magna</i> (24 h)	Streptoxkit F (24 h)	Thamnotoxkit F (24 h)	Rotoxkit (24 h)	Microtox (30')
2.4.1- Pesticidas Organofosforados					
Clorpirifós				11.8 ^L	
Diazinón			15.29	29.2 ^L	
Fenitrotión			3.96	6.6 ^L	
Malatión	0.001 ^L	64.6		33.7 ^L	3/60 (5') ^L
Paratión	0.002			29.1	28 (15') ^L

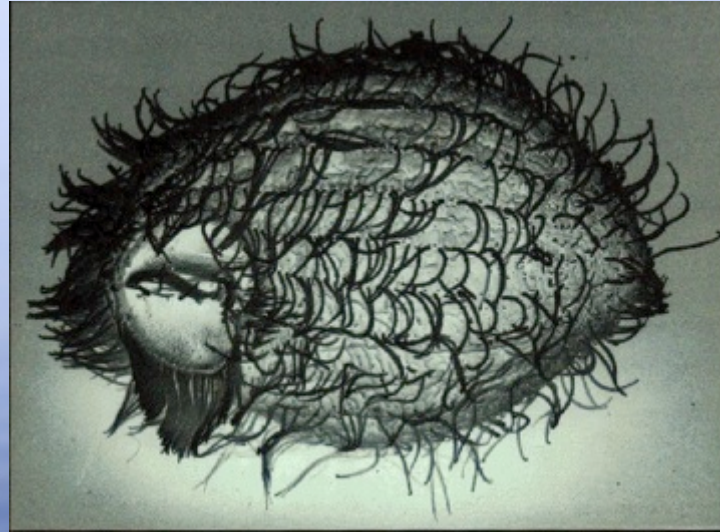
Ejemplos de efectos que se determinan con bioensayos de toxicidad

- ◆ Efecto agudos
 - ◆ P.ej., mortalidad, inmovilidad
- ◆ Efectos crónicos
 - ◆ P.ej., reproducción, crecimiento
- ◆ Mutagenicidad y genotoxicidad (futuros proyectos)
- ◆ *Screening* (muestras sin diluir)
- ◆ Concentraciones letales / inhibitorias / efectivas medias (efecto en el 50% de la población)

Bioensayos usados en Guatemala para determinar la efectividad destoxificante de camas biológicas

Bioensayos con organismos de agua dulce

- Protoxkit F
- Tetrahymena thermophila*
(protozoario de agua dulce)
- OCDE en desarrollo
- Inhibición de reproducción
- 30° C, 24 h, oscuridad

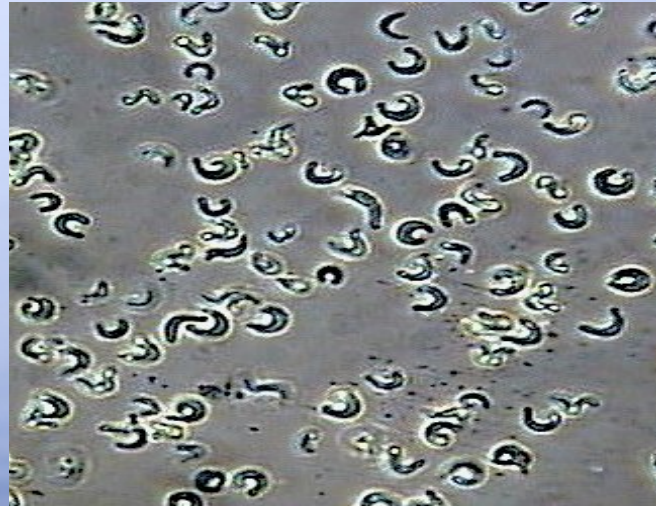


Medición de efectos:

Absorbancia a 440 nm
(desaparición del sustrato).

Cálculo de CL50 con
programa adecuado.

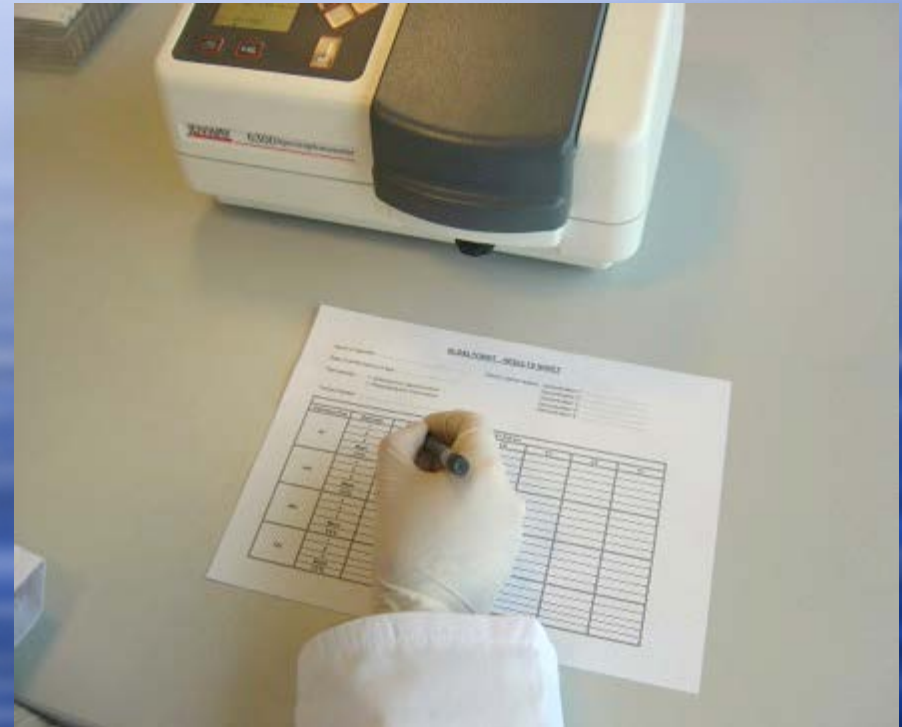




- Algaltoxkit F
- *Selenastrum capricornutum* (alga verde unicelular de agua dulce)
- COGUANOR NTG/ISO 8692, en revisión (OCDE 201, ASTM E1218-91)
- Inhibición de reproducción
- 72 h, $23^{\circ} \pm 2$ C, 4000 lux inferior, 1000 lux lateral
- Posible detectar estímulo de reproducción por exceso de nutrientes

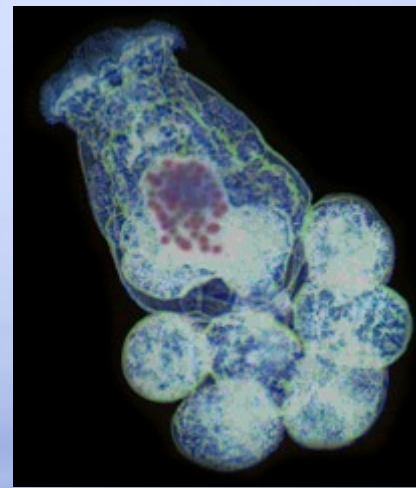


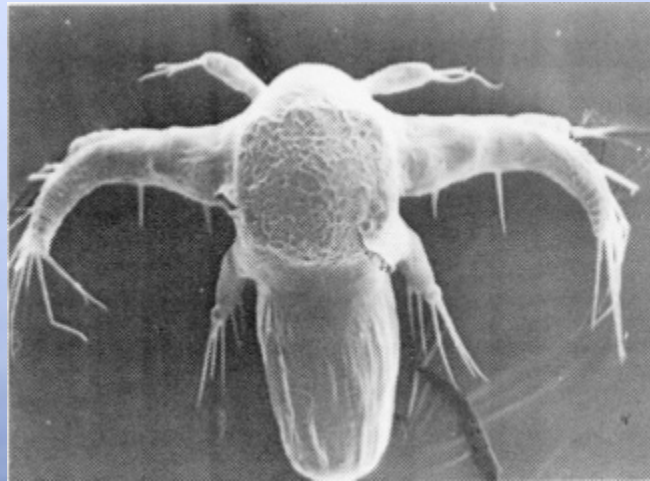
Medición de efectos



Densidad óptica a 670 nm, cálculo de efecto con programa adecuado (tasa de crecimiento, área bajo la curva o número de algas)

- Rotoxkit F acute
- *Brachionus calyciflorus* (rotífero de agua dulce)
- Acute: COGUANOR/ASTM E1440-91
- Mortalidad
- 25° C, 24 h, oscuridad





- Thamnotoxkit F
- Thamnocephalus platyurus*
(Crustacea:Anacostraca, agua dulce)
- COGUANOR NTG/ISO 14380
- Mortalidad
- 25° C, 24 h, oscuridad



Medición de efectos

Conteo de individuos muertos (pruebas agudas).

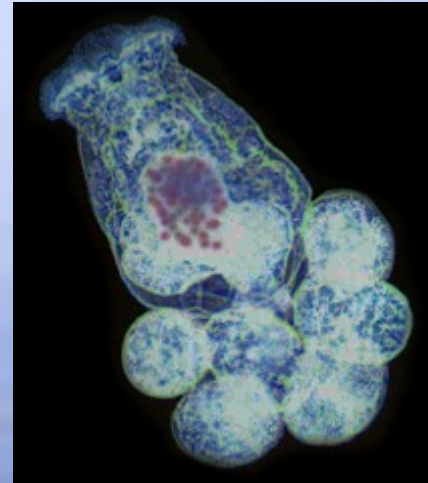
Conteo de descendencia (prueba crónica).

Cálculo de CL50 con programa adecuado.



Otros bioensayos disponibles (para agua dulce)

- Rotoxkit F chronic
- *Brachionus calyciflorus* (rotífero de agua dulce)
- Chronic: AFNOR T90-377, ISO 20666
- Reproducción
- 25° C, 48 h, oscuridad





- Daphtoxkit F magna y Daphtoxkit F pulex
- *Daphnia magna* y *D. pulex*
(Crustacea:Cladocera, agua dulce)
- OCDE 202, ISO 6391
- En proceso en COGUANOR
- Inmovilidad y mortalidad
- 20° C, 24 y 48 h, oscuridad





- Ceriodaphtoxkit F (prueba aguda)
- *Ceriodaphnia dubia*
(Crustacea: Cladocera, agua dulce)
- Ejemplo: EPA-821-R-02-012
- Mortalidad
- 25° C, 24 h, oscuridad
- Hay prueba crónica ISO 20665





- Ostracodtoxkit F
- *Heterocypris incongruens* (Crustacea: Ostracoda, sedimentos en agua dulce)
- ISO 14371
- Elongación corporal y mortalidad
- 25° C, 6 días, oscuridad



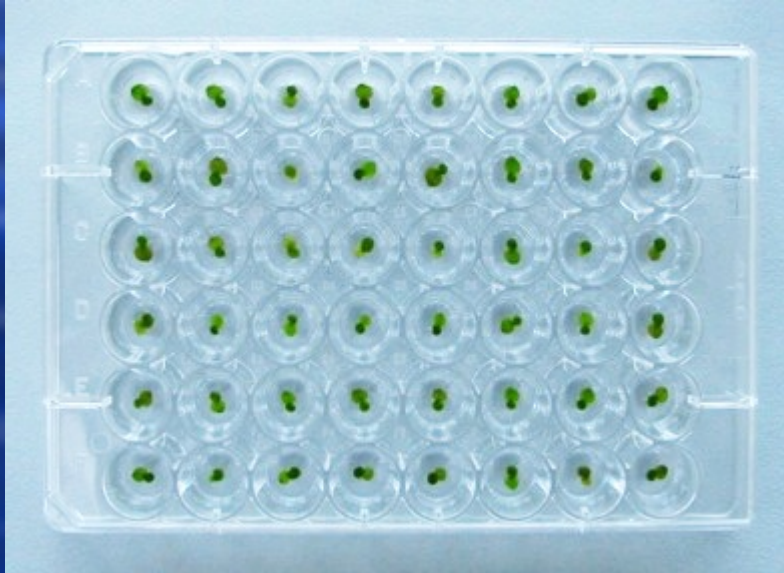
Pruebas de toxicidad aguda con peces

- *Brachydanio rerio* y otras especies
- OCDE 203 y otros
- Mortalidad
- 21-25° C, 96 h, 12 h a 16 h de luz



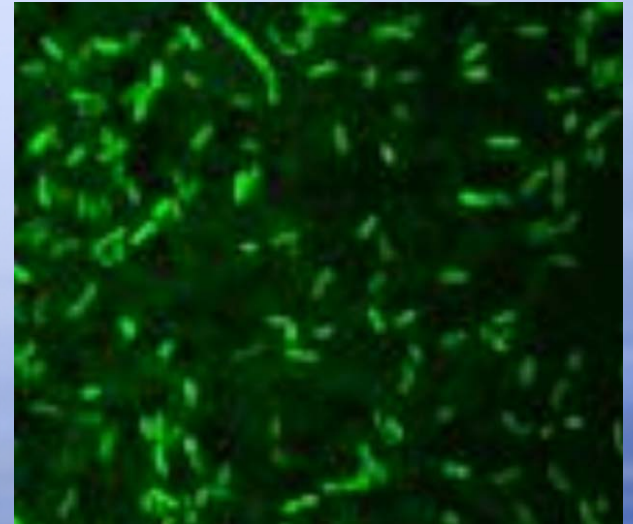
Nuevo bioensayo en desarrollo

- *Spirodela polyrhiza*
- Comparación interlaboratorios internacional, finalizada en marzo 2014
- 56 laboratorios de 22 países (2 de Guatemala)
- Propuesto para método ISO



Bioensayos disponibles con organismos de agua salobre o salada

- Microtox
- *Vibrio fischeri* (bacteria marina)
- COGUANOR NTG/ISO 11348-3
- Inhibición de luminiscencia
- 15° C, 5 y 15 min
- También se utiliza para agua dulce



- Toxi-screening kit
- Vibrio fischeri* (bacteria marina)
- Lineamientos de COGUANOR NTG/ISO 11348-3
- Inhibición de luminiscencia
- 15 a 25° C, 30 min, oscuridad
- Prueba de campo o laboratorio

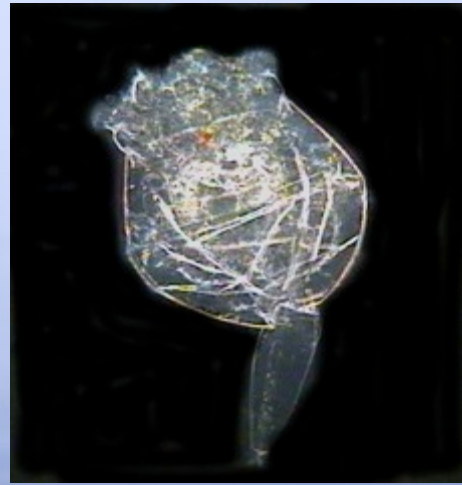


© Pablo Mayorga, SEPR, 2014



- Marine Algaltoxkit
- *Phaeodactylum tricornutum* (diatomea marina)
- COGUANOR NTG/ISO 10253
- Inhibición de reproducción
- 72 h, $20^{\circ} \pm 2$ C, 4000 lux inferior, 10000 lux lateral
- Posible detectar estímulo de reproducción

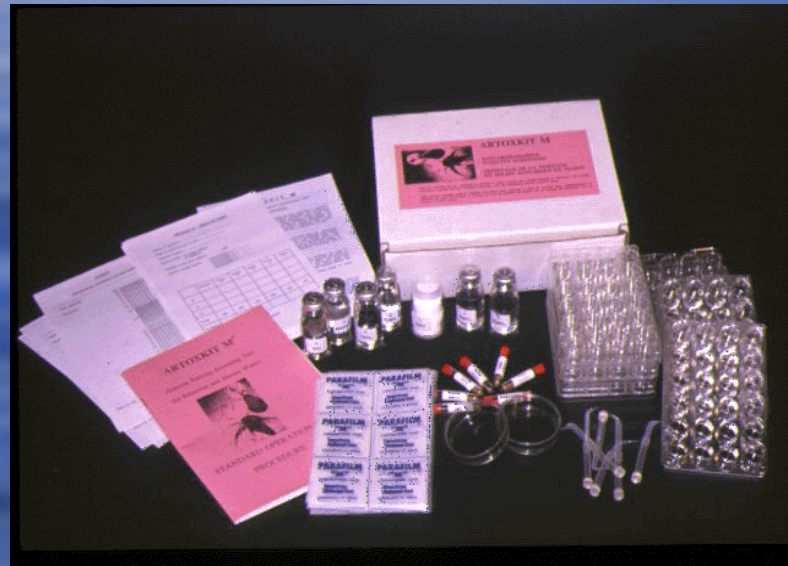




- Rotoxkit M
- *Brachionus plicatilis* (rotífero marino)
- COGUANOR NTG/ASTM E1440-91
- Mortalidad
- 25° C, 24 a 48h, oscuridad



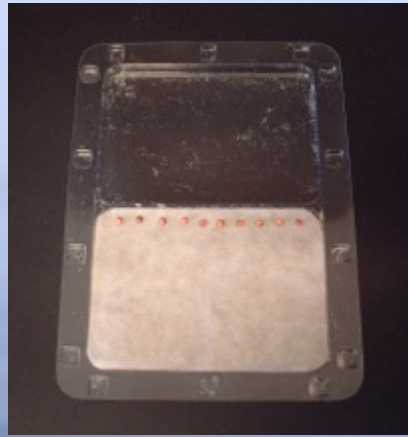
- Artoxkit M
- Artemia salina*
(Crustacea:Anacostraca,
marino)
- ARC test
- Mortalidad
- 25° C, 24-48 h, oscuridad



Bioensayos con plantas terrestres

Fitotoxicidad de:

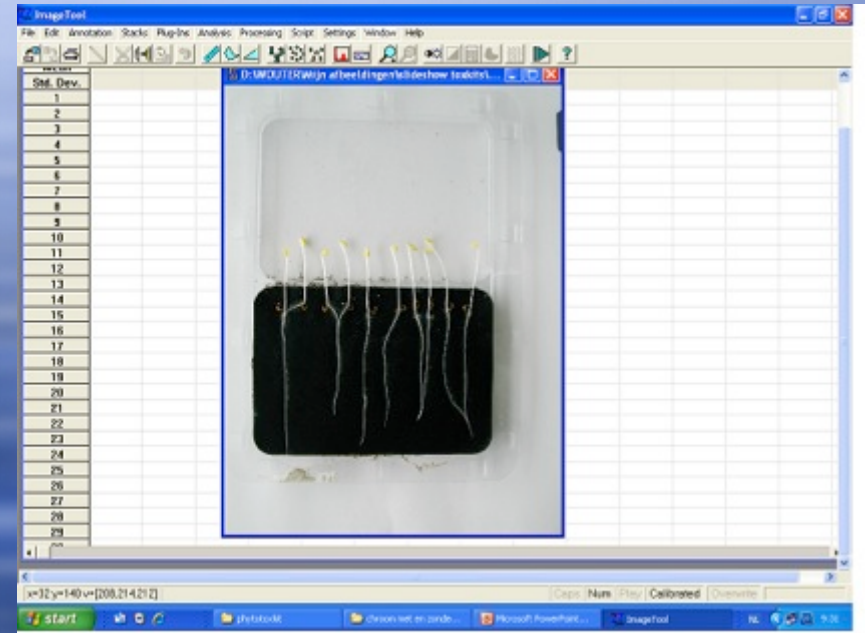
- Sedimentos
- Dragados
- Suelos
- Composts
- Agua de riego
- Lixiviados (p.ej., de camas biológicas)
- Lodos (de procesos)
- Químicos
- Biocidas
- Productos fitosanitarios
- Sustrato agotado de camas biológicas (en proyecto)



- Phytotoxkit
- Monocotiledónea *Sorghum saccharatum* y dicotiledóneas *Lepidium sativum*, *Sinapis alba*
- En proceso en ISO
- Germinación y elongación de raíz
- 25° C, 3 días, oscuridad



Medición de efectos



Fotografía de placas, transferencia de archivo a computadora, conteo de semillas germinadas y medición de raíces con Image Tools (freeware). Cálculo de % de inhibición de elongación de raíces con programa adecuado.



No tóxico



Tóxico

Lo que se ha hecho en Guatemala

- ◆ Se evaluaron mesas y camas biológicas
- ◆ Residuos de lavado de tanques de fumigación
- ◆ Sin tratamiento, toxicidad muy alta (80 a 100% de efecto)
- ◆ En algunos casos, hasta el agua de mezcla era muy tóxica
- ◆ Reducción de toxicidad hasta un poco más del 20%, en casos exitosos

Lo que se ha hecho en Guatemala

- ◆ Desventaja de bioensayo con algas verdes unicelulares cuando se aplican biocidas y fertilizantes simultáneamente, al evaluar residuos de lavado de tanques de mezcla
 - ◆ Inhibición en muestras sin diluir
 - ◆ En diluciones, desaparece la toxicidad y aparece estímulo de crecimiento de las algas por los fertilizantes
- ◆ Hay que trabajar esta prueba con diluciones

Propuesta para límites permisibles de toxicidad de lixiviados de camas biológicas

Con algunas ideas tomadas de:

- ◆ Legislación italiana, decreto D.L. 152/99
 - ◆ Pruebas de toxicidad obligatorias en efluentes (y agua):
 - ◆ Toxicidad aguda en *Daphnia magna* o *Ceriodaphnia dubia*
 - ◆ Inhibición de crecimiento de algas con *Selenastrum capricornutum*
 - ◆ Inhibición de luminiscencia en bacterias
 - ◆ Toxicidad aguda en *Artemia salina* (para descargas salinas)

La propuesta para Guatemala

- ◆ Usar batería representativa de ensayos
- ◆ Pruebas de tamizaje sin efectuar diluciones. Se hacen diluciones para averiguar CE50 si hay efecto igual o mayor a 50%.
- ◆ Lo ideal: toxicidad menor o igual a 20%
- ◆ Lo aceptable: toxicidad menor a 50%
- ◆ Lo inaceptable: toxicidad igual o mayor a 50%
- ◆ Esto en todos los bioensayos. Si no se cumple en uno de los 3, no cumple.
- ◆ Si hay estímulo en vez de inhibición en los productores, considerar remoción de nutrientes.

La propuesta para Guatemala

- ◆ Basado en Persoone, G. *et al.* 2003.
Environmental Toxicology 18: 395-402

The background features a large, light blue circular arrow pointing clockwise. Inside the circle are stylized wavy lines representing water, and several small, dark blue silhouettes of aquatic organisms including a fish, a crab, a shrimp, and a cluster of small round objects.

www.sepra.gt
lab.ecotox@sepra.gt