

Capítulo IX
Bioensayo de toxicidad por Microtox®

*“¿Qué existe que no pueda considerarse venenoso?
Todas las cosas son venenosas y nada carece de veneno.
Solamente la dosis determina la toxicidad de una sustancia”.*
Paracelso (1493-1541, Médico y químico suizo)

La difusión de metales en el medio ambiente asegura que una proporción significativa de la población se encuentra expuesta a estos contaminantes (Adriano, D.C., 2001c). La rápida y continua detección de toxicidad medioambiental causada por materiales peligrosos es de gran importancia para la conservación de los ecosistemas y la salud pública (Cho, J-C et al., 2004).

La ecotoxicología, disciplina científica relativamente joven, desarrollada a partir de la toxicología y la química medioambiental y definida por Cairns y Mount (1990) como “el estudio del destino y efecto de agentes tóxicos en los ecosistemas”, incluye el estudio de los efectos tóxicos a nivel celular, individual, poblacional y

comunitario. Integra varias disciplinas, incluyendo la biogeoquímica ambiental, toxicología y ecología, tratando los mecanismos, procesos y respuestas, versando sobre las interacciones entre los organismos, los agentes tóxicos (en este caso metales pesados) y el medio ambiente (Adriano, D.C., 2001c).

Actualmente en ecotoxicología se utilizan bioensayos que proporcionan información para la evaluación del riesgo e investigan los efectos y mecanismos de acción de nuevas sustancias químicas. Además, se usan modelos ecotoxicológicos para la detección, control y monitorización de la presencia de contaminantes en el agua, el suelo, residuos, etc. (Repetto et al., 2001).

La mayoría de los procedimientos utilizados en toxicología son llevados a cabo sobre mamíferos, pero está creciendo la presión pública para minimizar la utilización de vertebrados en ensayos de ecotoxicidad (Walter et al., 1998; Repetto et al., 2001) y el interés científico en promocionar el estudio de los efectos de las sustancias químicas sobre organismos terrestres (incluyendo vegetales) y ambientes acuáticos. Las alternativas más prometedoras en ecotoxicología abarcan la utilización de unos pocos organismos con sensibilidad limitada y/o que no están protegidos por la legislación. Estos incluyen bacterias, hongos, algas, plantas y animales invertebrados (Repetto et al., 2001).

Los ensayos de biotoxicidad han adoptado una importancia creciente en la evaluación de la toxicidad potencial de muestras medioambientales, puesto que son rápidos y no necesitan la completa caracterización química de las mismas (Boluda, R. et al., 2002). Sin embargo, algunos autores (Pedersen et al., 1988; Ruíz et al., 1997) indican la necesidad de combinar los ensayos ecotoxicológicos y químicos para evaluar dicha toxicidad potencial y establecer su naturaleza.

Estos ensayos aspiran a la predicción realista del comportamiento de sustancias tóxicas en el medioambiente. Es razonable investigar si los bioensayos de

ecotoxicidad proporcionan una importante información por la cual puede reconocerse el posible riesgo potencial de una muestra medioambiental (Boluda, R. et al., 2002).

Los ensayos de ecotoxicidad se utilizan normalmente para detectar efectos agudos o crónicos de sustancias en organismos representativos, especialmente acuáticos, como bacterias marinas luminiscentes (*Vibrio fischeri*), pulgas de agua (*Daphnia magna*) o algas (*Zooglea sp.*) (Boluda, R. et al., 2002).

Dichos ensayos, en bacterias y otros microorganismos, tienen la ventaja de que presentan rutas bioquímicas similares a las de los organismos superiores, ciclos de vida cortos y además responden rápidamente a los cambios en el medio ambiente (García, M.L., 2004).

9.1.- El bioensayo Microtox®.

Durante los últimos quince años se ha utilizado el bioensayo de toxicidad, distribuido comercialmente como Microtox®, para evaluar la toxicidad de muestras medioambientales. El sistema Microtox® es un bioensayo que examina la toxicidad aguda de muestras medioambientales y compuestos puros basándose en la reducción de la bioluminiscencia natural de la bacteria marina *Vibrio fischeri* en presencia de agentes contaminantes. La toxicidad se expresa como la concentración de agente que produce la reducción del 50% de la luminiscencia inicial (EC₅₀) (Onorati F. et al., 2004).

El ensayo Microtox® es ampliamente utilizado por sus bondades en cuanto a sensibilidad, poder discriminante, reproducibilidad y fácil aplicación para contaminantes orgánicos e inorgánicos (Qureshi et al., 1982; Kaiser y Ribo, 1988; Blum y Speece, 1991; Codina et al., 1993; Riisberg et al., 1996; Salizzato et al., 1998; Onorati et al., 2004). Además resulta más rápido y barato que otros ensayos biológicos (Onorati et al., 2004).

Aunque Microtox® se aplicó inicialmente para medir la toxicidad aguda de aguas naturales y residuales también es aplicable tanto a muestras sólidas (sedimentos y suelos) como a sus extractos acuosos (Bulich et al., 1992; Azur Environmental, 1994; Onorati et al., 2004).

Los ensayos de toxicidad aguda utilizando bacterias han adquirido esta gran importancia en los últimos años no sólo por las características mencionadas anteriormente, sino también debido a la correlación existente entre los resultados obtenidos a través de estos ensayos y los bioensayos convencionales de amplia utilización. Así, para muchos compuestos y muestras, los datos de toxicidad obtenidos con el ensayo Microtox® se corresponden bien con las toxicidades agudas

obtenidas con los ensayos de toxicidad estándar (Kaiser y Palabrica, 1991; Toussaint et al., 1995; Weideborg et al., 1997; Arufe et al., 2004); por tanto, la toxicidad en *V. fischeri* puede aplicarse para predecir toxicidad para otros organismos acuáticos (Blum y Speece, 1990; Chen y Que Hee, 1995; Ribo y Kaiser, 1983; Zhao et al., 1995; Arufe et al., 2004).

De hecho, Microtox® es el ensayo que ha mostrado mayor sensibilidad y correlación con los resultados obtenidos en peces y en *Daphnia*, siendo desde 1984 una de las pruebas recomendadas por la EPA (Environmental Protection Agency), junto con pruebas en dáfidos, en la evaluación de la toxicidad aguda de muestras de agua (García, M.L., 2004).

9.1.1.- Fundamento del método Microtox®.

El bioensayo bacteriano Microtox®, diseñado por Strategic Diagnostic Inc. (Azur Environmental) se basa en monitorizar los cambios en las emisiones de luz natural de una bacteria luminiscente (Aruldoss, J. A. y Viraraghavan, T. 1998), *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*).

Vibrio fischeri es una bacteria gram negativa, anaerobia facultativa, de la familia *Vibrionaceae* cuya característica más representativa es la bioluminiscencia (producción de luz por parte de ciertos organismos vivos). Es importante destacar la estabilidad en la emisión de luz así como la gran sensibilidad que presenta a una amplia variedad de sustancias tóxicas (García, M.L., 2004).

Las reacciones de emisión de luz en la mayoría de las bacterias involucran la oxidación de riboflavin fosfato reducido (FMNH₂) en una larga cadena de un

aldehído con emisión de luz verde-azulada, $\lambda_{\text{max}} = 490\text{-}505 \text{ nm}$ (Lin, J-W. et al., 1993). La reacción en conjunto se muestra a continuación:



Dicha reacción está catalizada por la enzima luciferasa bacteriana, una heterodimérica ($\alpha\beta$) flavin monooxigenasa.

En la figura 9.1 se esquematiza la reacción de luminiscencia bacteriana.

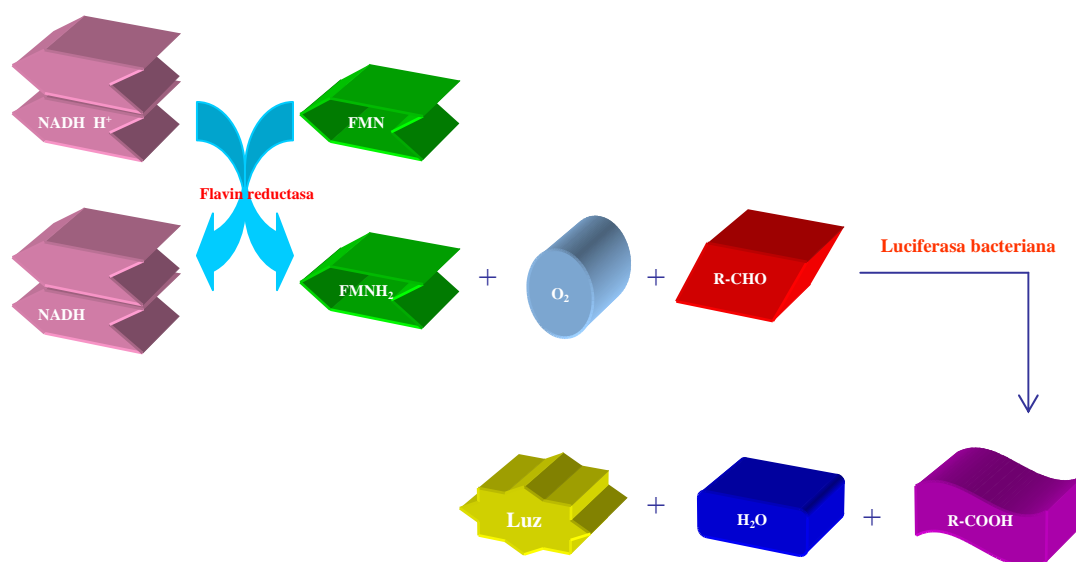
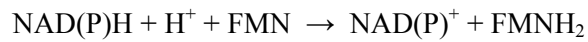


Figura 9.1.- Reacción de luminiscencia bacteriana.

Flavin mononucleótido, FMN, junto con flavin adenin dinucleótido, FAD, son los dos coenzimas que se derivan de la riboflavina (vitamina B₂). De la reacción anterior queda puesto de manifiesto que, en una bacteria luminosa, la forma reducida de FMN (FMNH₂) es un componente esencial de la reacción de luminiscencia (Strehler et al., 1954; Inouye, S., 1994) y FMNH₂ puede ser suministrada in vivo por

NAD(P)H y FMN mediante la siguiente reacción enzimática (Strehler, B. L. 1953; McElroy et al., 1953; Inouye, S., 1994), catalizada por flavin reductasa.



FMNH₂ es oxidado rápidamente por el oxígeno molecular para dar peróxido de hidrógeno y FMN (Gibson et al., 1962; Walsh et al., 1978; Inouye, S., 1994), según el siguiente esquema: flavin reductasa es una flavoproteína que contiene un mol de FMN como grupo prostético por mol de enzima. Cuando NADH se une a flavin reductasa, dos hidrógenos (electrones) son transferidos por una reacción enzimática a FMN para dar FMNH₂, que se disocia inmediatamente del enzima. Bajo condiciones aeróbicas, FMNH₂ es rápidamente oxidado no enzimáticamente por oxígeno molecular para dar peróxido de hidrógeno y FMN, que se une al apoenzima (figura 9.2).

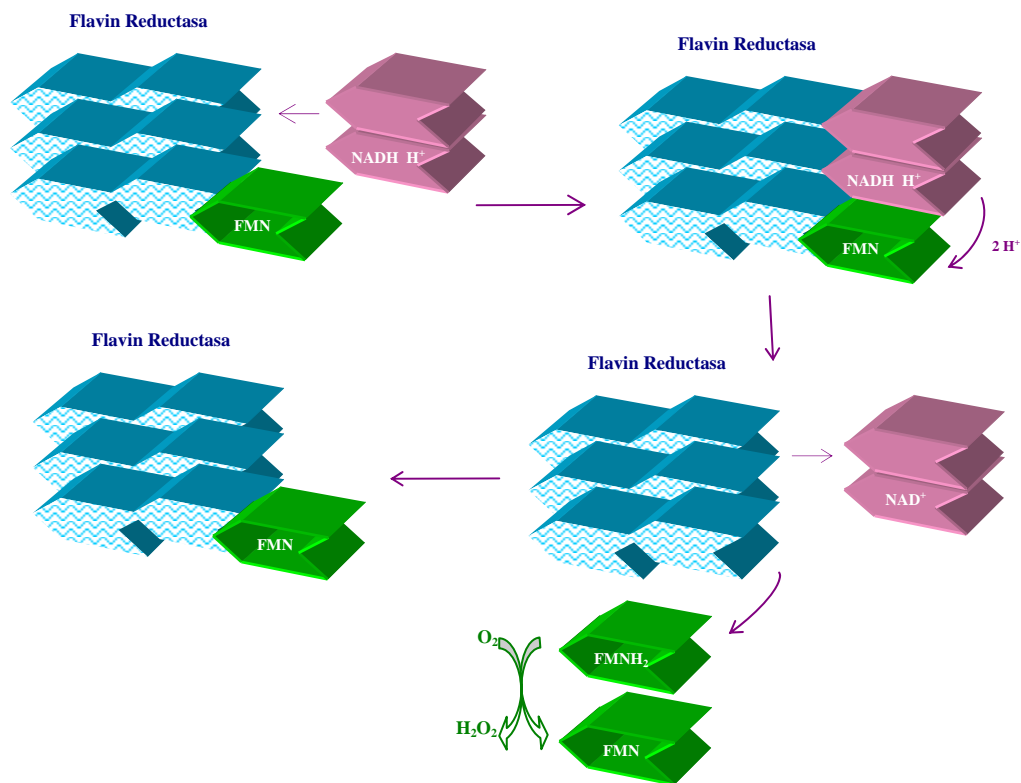


Figura 9.2.- Esquema de reacción de flavin reductasa bajo condiciones aeróbicas.

Sin embargo, en bacterias luminosas, el FMNH₂ libre es utilizado para la reacción de luminiscencia. Luciferasa bacteriana cataliza la reacción de producción de la luz utilizando el citado FMNH₂, oxígeno molecular y un aldehído alifático (Cormier, M.J. y Strehler, B.L., 1953; Inouye, S., 1994).

En esta reacción, FMNH₂ libre se une a luciferasa, que es proporcionada por flavin reductasa (Inouye, S., 1994).

La reacción de bioluminiscencia bacteriana está ligada al sistema de transporte de electrones en la respiración celular y es indicativa del estado metabólico de la célula, de modo que una disminución de la bioluminiscencia indica la disminución de la respiración celular. Los contaminantes físicos, químicos y biológicos afectan a la respiración celular alterando el porcentaje de síntesis de proteínas y lípidos y modificando por tanto el nivel de emisión de luminiscencia (García, M.L., 2004).

En presencia de agentes contaminantes, la bioluminiscencia natural de *Vibrio fischeri* disminuye y la toxicidad se expresa como concentración efectiva 50 (CE₅₀): concentración del agente contaminante que produce una reducción del 50% en la emisión de luz inicial (Onoratti et al., 2004).

9.1.2.- Aplicaciones del método.

El bioensayo Microtox® tiene aplicabilidad en muchos campos entre los que podemos citar (García, M.L., 2004):

- Efluentes de plantas de tratamiento de aguas.
- Evaluaciones de reducción de la toxicidad y evaluaciones de identificación de toxicidad.
- Monitoreo de aguas superficiales para la identificación de fuentes de contaminación.
- Monitoreo de aguas de bebida para detectar contaminación.
- Ensayos en sedimentos.
- Monitoreo y seguimiento de suelos contaminados en procesos de remediación.
- Monitoreo de biocidas en aguas industriales.

9.2.- Metodología aplicada.

Para la realización del estudio de ecotoxicidad se han empleado los extractos correspondientes a la extracción residuo/suelo:agua (1:5) de los residuos procedentes de la hidrometalurgia del cinc y de los SIC por los productos de alteración de los residuos, así como las aguas de esorrentía recogidas tras un episodio de lluvia, siendo la metodología aplicada para dichos análisis la que se expone a continuación (Gomensoro, S.A., 2002).

1. Preparación de la muestra: para realizar el ensayo de ecotoxicidad la muestra debe ser salada con NaCl al 2%.
2. A la hora de realizar el ensayo se requiere NaCl al 2% y NaCl al 20%. La razón principal de utilizar estas disoluciones salinas es garantizar el adecuado equilibrio osmótico de la bacteria, asegurándose así que la disminución de la emisión de luz de la bacteria se debe exclusivamente al efecto de los contaminantes (Onorati, F.; Mecozzi, M., 2004).
3. Otro factor a controlar, junto con la salinidad y la temperatura, es el pH que debe estar en un rango comprendido entre 6 y 8.
4. Una vez preparada la muestra inicial se realizan una serie de diluciones de la misma con NaCl al 2%.
5. Resuspensión de la bacteria, con NaCl 2% e incubación de la suspensión durante una hora.
6. Cuando ya se ha atemperado la suspensión de bacterias se preparan alícuotas de 100 µl y se le añade a cada una de ellas 100 µl de cada una de las disoluciones.

En la tabla 9.1 se muestra la disposición de las muestras en el Peltier:

	I	II	III	IV	V	VI
Hilera A	Blanco	1/16	1/8	1/4	1/2	Muestra Original
Hilera B	100 µl de bacterias + 100µl de blanco	100 µl de bacterias + 100µl de muestra 1/16	100 µl de bacterias + 100µl de muestra 1/8	100 µl de bacterias + 100µl de muestra 1/4	100 µl de bacterias + 100µl de muestra 1/2	100 µl de bacterias + 100µl de muestra sin diluir

Tabla 9.1.- Disposición de las muestras en el Peltier.

7. Dejar pasar 15 minutos de incubación.
8. De cada uno de los estándares se realiza la medida por duplicado y una vez que se han medido todos los tubos, el luminómetro BG-1 da los valores de la concentración efectiva 50 (CE₅₀) y la curva de inhibición de luz.
9. Para comprobar la validez de los resultados, se ha empleado un patrón de ZnSO₄, cuyo valor de CE₅₀ es conocido.
10. Si una muestra no presenta disminución en la emisión de luz a ninguna dilución, la muestra no se considera tóxica y no existe para ella valor de concentración efectiva 50 (CE₅₀).
11. Para el caso de vertidos o aguas, la legislación recoge los valores en $\text{equitox/m}^3 = (1/ \text{CE}_{50}) * 100$.
12. En el caso de lixiviados, el valor de toxicidad se da en mg/l, que se corresponde con la expresión $\text{CE}_{50} * 10.000$.

9.3.- Resultados y discusión.

9.3.1.- Residuos procedentes de la hidrometalurgia del cinc.

En la tabla 9.2 están expuestos los valores de CE_{50} para los extractos (1:5) de los residuos procedentes de la hidrometalurgia del cinc.

	CE_{50} (%)	CE_{50} (mg/l)	pH	Zn (mg/l)	Pb (mg/l)	Cd (mg/l)	As (mg/l)
R1	0.32	3200	4.0	4654.0	1.7	46.0	0.8
R2	0.34	3400	3.6	3166.0	3.8	63.0	0.1
R3	0.44	4400	4.4	866.5	3.7	75.0	0.1
R4	0.43	4300	6.5	1279.0	1.0	16.0	0.4
R5	1.25	12500	6.9	1127.0	0.8	3.3	<Id
R6	0.58	5800	7.0	1059.0	0.5	5.7	<Id
R7	0.38	3800	6.2	47780.0	1.4	84.0	<Id
Media	0.53	5300	5.5	8561.6	1.8	41.9	0.4
Desv. Est.	0.33	3300	1.5	17350.7	1.3	33.7	0.3

Tabla 9.2.- Valores de CE_{50} (% , mg/l) de los residuos procedentes de la hidrometalurgia del cinc.

Como puede verse todos los extractos (1:5) de las muestras de residuos son tóxicos, pues todos presentan valores muy bajos de CE_{50} . Las muestras más tóxicas son R1, R2 y R7 ya que tienen los menores valores de CE_{50} , mientras que dentro de la serie, R5, con el mayor valor de CE_{50} , resulta menos tóxica para las bacterias.

Se ha efectuado una matriz de correlación de Pearson (tabla 9.3) con el fin de establecer posibles relaciones entre la concentración efectiva 50, los metales y el pH.

	pH	Zn	Pb	Cd	As
Zn	0.100				
Pb	-0.851	-0.106			
Cd	-0.636	0.591	0.706		
As	0.168	0.588	-0.798	-0.561	
CE₅₀	0.584	-0.276	-0.437	-0.630	-0.394

Tabla 9.3.- Matriz de correlación de Pearson entre CE₅₀, pH y metales solubles en los residuos procedentes de la hidrometalurgia del cinc.

Se observa que los índices de correlación entre CE₅₀, los metales y el pH no son elevados, pero atendiendo al signo de los mismos vemos que la concentración efectiva 50 establece índices de correlación negativos con la concentración de metales solubles, de manera que cuanto mayor concentración de metales pesados posean las muestras, menores valores de concentración efectiva 50 poseerán o, lo que es lo mismo, mayor toxicidad.

Por el contrario, con el pH el índice tiene un valor positivo lo que indica que al disminuir el pH disminuye la CE₅₀, con lo que la toxicidad aumenta.

9.3.2.- Suelos industriales contaminados.

En la tabla 9.4 se recogen los valores de concentración efectiva 50 correspondientes a los extractos (1:5) de los SIC por los productos de alteración de los residuos procedentes de la hidrometalurgia del cinc estudiados tras la aplicación del bioensayo de toxicidad.

	CE ₅₀ (%)	CE ₅₀ (mg/l)	pH	Zn (mg/l)	Pb (mg/l)	Cd (mg/l)	As (mg/l)
SIC1	9,93	99340	7,5	13,8	0,3	12,5	0,2
SIC2	7,50	75020	8,9	6,6	0,3	0,1	<Id
SIC3	11,46	114600	7,7	37,2	0,8	0,4	0,0
SIC4	10,80	108000	7,7	25,3	1,9	0,4	0,0
SIC5	15,24	152400	8,2	14,3	0,6	0,0	0,0
SIC6	5,90	59020	9,3	0,7	1,5	0,2	<Id
SIC7	8,06	80600	8,8	0,7	0,4	0,1	<Id
SIC8	12,55	125480	7,5	14,0	1,5	0,4	0,0
SIC9	9,68	96800	8,2	7,8	1,3	0,3	<Id
SIC10	10,70	107000	7,8	27,6	0,7	1,6	<Id
SIC11	10,05	100460	7,7	38,0	1,5	0,1	<Id
SIC12	19,00	190000	8,0	17,7	1,4	0,3	<Id
SIC13	17,97	179720	7,9	3,4	0,3	0,0	<Id
SIC14	10,50	105000	8,5	5,4	0,3	0,0	<Id
SIC15	No tóxica	No tóxica	7,7	0,6	0,6	0,0	<Id
SIC16	15,03	150300	8,2	4,2	0,8	0,2	<Id
SIC17	14,04	140400	8,0	0,6	1,2	0,2	0,1
Máx.	19,00	190000	9,3	38,0	1,9	12,5	0,2
Mín.	5,90	59020	7,5	0,6	0,3	0,0	<Id
Media	11,78	117759	8,1	12,8	0,9	1,0	0,1
Desv. Est.	3,65	36522	0,5	12,5	0,5	3,0	0,1

Tabla 9.4.- Valores de CE₅₀ (% , mg/l) de los SIC.

Se observa que todos los extractos son tóxicos, a excepción del extracto (1:5) de la muestra SIC15 que no presenta toxicidad al tratarse de una muestra con baja disponibilidad de metales y con el menor contenido en sales solubles de toda la serie.

Al comparar los valores de CE_{50} de los residuos y SIC puede verse que los correspondientes a los residuos son menores que los de los SIC, es decir que los residuos presentan una mayor toxicidad para la bacteria que los suelos.

Cuando se lleva a cabo la realización de la matriz de correlación de Pearson entre CE_{50} , pH y metales solubles (tabla 9.5) se observan, igual que en el caso de los residuos, malas correlaciones con índices entre las variables no elevados, pero atendiendo al signo de los mismos vemos el índice de correlación indirecta que existe entre la CE_{50} y el pH de modo que según aumenta el pH, disminuye la CE_{50} o lo que es igual aumenta la toxicidad de las muestras. Otro aspecto importante son los índices de correlación negativos que presenta la CE_{50} con los metales; así al aumentar la concentración, aumenta la toxicidad.

	CE₅₀	pH	Zn	Pb	Cd
pH	-0.458				
Zn	-0.013	-0.534			
Pb	-0.006	-0.166	0.337		
Cd	-0.145	-0.327	0.076	-0.273	
As	-0.368	-0.256	-0.470	-0.542	0.874

Tabla 9.5.- Matriz de correlación de Pearson entre CE_{50} , pH y metales solubles en los SIC.
(*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.001$

9.3.3.- Aguas de escorrentía.

Los resultados de concentración efectiva 50 obtenidos en el caso de las aguas de escorrentía son los que ofrece la tabla 9.6.

	CE ₅₀ (%)	CE ₅₀ (equitox/m ³)	pH	Zn (mg/l)	Pb (mg/l)	Cd (mg/l)	As (mg/l)
A1	3.91	25.58	7.27	226.0	1.0	1.5	0.0
A2	2.79	35.75	5.55	1916.0	7.5	60.0	0.0
A3	2.17	46.08	6.64	1185.0	9.6	75.0	0.1
A4	17.04	5.86	7.11	268.0	3.3	0.9	0.1
A5	5.68	17.60	7.02	192.0	0.9	4.8	0.0
A6	39.95	51.28	2.29	4827.5	9.5	145.0	6.1
Media	11.92	26.17	6.72	757.4	4.5	28.4	0.0
Desv. Est.	14.79	15.61	0.69	769.2	3.9	36.1	0.0

Tabla 9.6.- Valores de CE₅₀ (% , equitox/m³) de las aguas de escorrentía.

En cuanto a las aguas de escorrentía, todas presentan toxicidad pues todas presentan elevadas concentraciones de cinc y algunas (muestras A2 y A3, que son las más tóxicas), de cadmio.

Como era previsible, la muestra de agua confinada A6, mezcla de agua de lluvia y agua del proceso que está evaporándose también es tóxica, tanto por su acidez como por las altas concentraciones de metal que contiene.

Al realizar la matriz de correlaciones de Pearson (tabla 9.7) entre CE₅₀, los pH y metales en las aguas de escorrentía tampoco obtenemos buenas correlaciones, como sucede en el caso de los residuos y SIC.

Análogamente, la concentración efectiva 50 establece, en general, correlaciones indirectas con los metales pesados; así elevadas concentraciones de metales pesados redundan en un menor valor de CE_{50} , o lo que es igual, en una mayor toxicidad.

El signo positivo que presenta con el arsénico es anómalo y puede deberse a que tres de los cinco valores de metal en las aguas de escorrentía son el mismo y al ser tan pocas muestras no es representativo.

	CE_{50}	pH	Pb	Cd	Zn
pH	0.419				
Pb	-0.351	-0.679			
Cd	-0.587	-0.733	0.961		
Zn	-0.501	-0.958	0.839	0.879	
As	0.315	-0.390	0.776	0.575	0.507

Tabla 9.7.- Matriz de correlación de Pearson entre CE_{50} , pH y metales en las aguas de escorrentía.

Los resultados de ecotoxicidad obtenidos están de acuerdo con los correspondientes a los estudios de movilización de metales en medio acuoso y caracterización química de los materiales empleados para este estudio. Por este motivo, el bioensayo de toxicidad por Microtox® es una herramienta complementaria de utilidad en el estudio de residuos procedentes de la hidrometalurgia del cinc, de suelos industriales contaminados por productos de alteración de dichos residuos y de aguas de escorrentía de zonas circundantes a los suelos industriales contaminados.