

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE Cr^{+6} , Cu^{+2} Y EL EFLUENTE DE CROMADO DE UNA INDUSTRIA METALMECÁNICA UTILIZANDO *PANAGRELLUS REDIVIVUS* COMO ORGANISMO DE PRUEBA

Nahyr Murillo y María Consuelo Díaz'
¹Unidad de Ingeniería Ambiental.
Facultad de Ingeniería. Universidad
Nacional de Colombia. Ciudad
Universitaria, Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Los ensayos de toxicidad son procedimientos en los cuales las respuestas de ciertos organismos acuáticos son utilizadas para detectar el efecto producido por la presencia de sustancias nocivas o tóxicas. Se consideran una herramienta importante de control ambiental, puesto que permitan evaluar de una manera rápida y confiable los impactos de contaminantes tóxicos sobre los ecosistemas, así como evaluar riesgos potenciales de salud. En el presente trabajo se evaluó un bioensayo utilizando como organismo de prueba *Panagrellus redivivus*, nemátodo que ha mostrado una alta sensibilidad a un gran número de sustancias tóxicas. Se determinó que la CL_{50-96h} para cromo hexavalente fue de 43 mg/l y para

sulfato de cobre quelatado de 2,6 mg/l. Aunque la concentración letal, encontrada para estos elementos fue relativamente alta comparada con otros organismos acuáticos, es importante señalar que a concentraciones de 13 mg/l y 0,12 mg/l se observó un efecto significativo sobre el crecimiento y maduración de *Panagrellus redivivus*. Estos hechos señalaron que los metales evaluados pueden generar efectos subletales, aun a bajas concentraciones. Para el efluente evaluado se encontró que la CL_{50-96h} fue de 1,4%, y concentraciones de 0,4 y 0,005 % producen una disminución en el crecimiento y maduración, respectivamente.

INTRODUCCIÓN

El aumento de las actividades industriales tanto en el país como al nivel mundial, ha ocasionado que las concentraciones de materiales tóxicos en el ambiente haya aumentado. Por esta razón, es necesario contar con herramientas de evaluación y control que permitan estimar el riesgo existente tanto para la salud de los ecosistemas acuáticos, como para la salud humana. A nivel mundial, este riesgo es calculado con base en los resultados de pruebas de toxicidad o bioensayos, así como en el patrón dosis-respuesta de los contaminantes. Con base en este riesgo, se establecerán los valores normativos de cada legislación.

Sin embargo, la variabilidad del comportamiento toxicocinético de los contaminantes ambientales con las especies acuáticas utilizadas en las pruebas de toxicidad, han restringido su aplicación y su extrapolación a especies superiores. Por esto, que día tras día, en la literatura, se presentan estudios con nuevos organismos de prueba que den una rápida respuesta a una amplia gama de contaminantes tóxicos. Aunque la utilización de nemátodos como organismo de prueba en ensayos de toxicidad, se recomienda desde hace mucho tiempo, su uso mediante un protocolo estandarizado para muestras ambientales, solo se presenta hasta 1980 (Samoiloff, 1980). En este trabajo se plantean las ventajas de nemátodos de vida libre como modelo experimental para el estudio del comportamiento toxicológico de agentes químicos y físicos sobre un sistema vivo. En este mismo año, se propone un protocolo de prueba para la evaluación de contaminantes acuáticos utilizando *Panagrellus redivivus* (Samoiloff y Col., 1980).

Este organismo se caracteriza por contener aproximadamente 530 células somáticas organizadas en tejidos y órganos. Durante su desarrollo experimentan cinco etapas larvianas hasta el estado adulto, para lo cual requieren un período de 96 horas. En condiciones ambientales son adversas, ellos pueden morir o presentar retardo en crecimiento y desarrollo. Al exponer una población de neonatos (J2) a sustancias tóxicas durante un periodo de 96 h, efectos letales o subletales pueden ser observados. El número de

animales muertos, indicarán la letalidad de la sustancia, mientras el número de animales que permanecen en el estadio J2, J3 o J4 dará una medida de los efectos subletales ya sea por efecto crónico o genotóxico.

Aunque existen muchos estudios enfocados a la evaluación de sustancias mutagénicas sobre el cromosoma X de *P. redivivus* (Burke y Samoiloff, 1980; Samoiloff y col, 1983; Denich y Samoiloff, 1984; Ager y col., 1984), el protocolo propuesto permite estimar solamente efectos letales y subletales que no necesariamente son el resultado de un cambio mutagénico, ya que el crecimiento del estadio J2 a J4 requiere una baja actividad genética y sólo en el paso de J4 a adulto se dan una gran actividad genética (McInnis, 1995).

Dada la importancia de los nemátodos en el medio acuático así como en el suelo, la introducción de este bioensayo dentro de una batería de pruebas de toxicidad permitiría ampliar el control de contaminantes ambientales, con una prueba de relativa corta duración, y a su vez brindaría información sobre el riesgo de generar efectos subletales a largo plazo.

Por estas razones, el objetivo de este trabajo fue evaluar el protocolo de prueba recomendado (Samoiloff y col, 1980), así como evaluar el efecto del cromo hexavalente, el cobre divalente y el efluente del proceso de anodizado de una industria metalmeccánica, sobre la supervivencia, el crecimiento y la maduración de *Panagrellus redivivus*. Adicionalmente, se estudiaría las condiciones óptimas de cultivo que permitirán obtener una población sana para estas pruebas. Con los resultados obtenidos, se esperaba determinar la sensibilidad de este organismo al dicromato de potasio como sustancia de referencia, calcular la concentración letal y efectiva media (CL_{50} ; CE_{50}) para el cromo, el cobre y el efluente estudiado.

I. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Cultivo y mantenimiento de *P. redivivus*

La cepa de *Panagrellus redivivus* fue obtenida del National Water Research Institute (NWRRI). Para su cultivo se siguió el protocolo recomendado por esta institución, en el cual se incluye la propagación masiva en un medio de harina integral agua, y el mantenimiento de bajas densidades de nemátodos en placas de agar-agua, y alimentados cada cuatro días con una solución de levadura (McInnis 1995).

Tanto los cultivos masivos como los de agar se mantuvieron en una Incubadora a 20°C, y semanalmente se iniciaron nuevos cultivos para evitar la contaminación con hongos. Para iniciar los nuevos cultivos, los organismos transferían en buffer M9Y al centro de una caja de Petri con harina integral, como medio de cultivo. Al cabo de dos a tres semanas, los nemátodos adultos fueron observados al interior de la tapa de la placa. Los adultos nuevamente fueron transferidos a placas de agar-agua, para obtener así los neonatos J2 que se utilizarían en cada bioensayo. En forma similar, cada dos semanas se iniciaron nuevos cultivos en placas de agar-agua.

B. Estandarización de protocolo de prueba

Los bioensayos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo estandarizado por NWRRI (1995) y que se resume en la figura 1. Durante esta etapa, se realizaron bioensayos para la determinación del intervalo de prueba, así como las pruebas de sensibilidad del cultivo a la sustancia de referencia que en este estudio fue dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), como lo recomienda la USEPA (1994). Los resultados de las 30 pruebas se graficaron y se estableció el intervalo de sensibilidad.

C. Bioensayos con las muestras seleccionadas

Para la realización de los bioensayos se preparó una solución patrón de 10.000 mg/l de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), y una 100 mg/l de sulfato de cobre quelatado, cuya concentración fue confirmada por espectrofotometría de

absorción atómica (APHA, 1992). A partir de estas soluciones patrón, se prepararon diluciones entre 1.000 y 0,1 mg Cr^{+6} /L para cromo, y entre 10 y 0.12 mg/l para cobre, utilizando como agua de dilución medio M9Y.

Para el efluente industrial se tomaron muestras del efluente del tanque de sellado en la línea de anodizado, y se diluyó volumen a volumen en un intervalo de 100 % a 0,020% siguiendo el mismo procedimiento utilizado para los compuestos puros. La concentración de metales en la muestra del efluente fue analizada por espectrofotometría de absorción atómica (APHA, 1992), y los resultados se presentan en el cuadro 1 (Hidromecánicas, 1995).

Cuadro 1. Concentración de algunos metales presentes en el efluente del proceso de anodizado después de la etapa de sellado de una industria metalmeccánica

Metal	Concentración (mg/l)
Níquel	409
Zinc	0,86
Cobre	1.000
Cromo total	1.200
Cromo hexavalente	600
pH	3,0

Para el cálculo de la CL_{50-96h} y CES_{50-96h} para cromo, se utilizaron los resultados de los 20 bioensayos definitivos, y para cobre y el efluente los resultados de 10 bioensayos definitivos. Para el cálculo de estos valores se utilizó el paquete estadístico TOXTAT (APHA, 1992) donado por la USEPA. Adicionalmente, se elaboraron las curvas concentración-respuesta de cada uno de los compuestos para cada una de las respuestas estudiadas (supervivencia, maduración y crecimiento).

II. RESULTADOS Y ANÁLISIS

A. Efecto del cromo

Los resultados de la prueba de sensibilidad del cultivo al $K_2Cr_2O_7$ se presentan en la figura 2. La concentración letal media promedio fue de (CL_{50-96h}) 44.3 mg Cr^{+6}/l , oscilando entre 20,8 y 67,8mg Cr^{+6}/l .

Aunque para el análisis de sensibilidad se utilizó como respuesta la muerte de los organismos, también se calculó la concentración efectiva media promedio para supervivencia, crecimiento y maduración, cuyos valores fueron: 38, 39 y 13,2 mg Cr^{+6}/l respectivamente.

Comparativamente con otros organismos de prueba como *Daphnia magna*, los valores de letalidad obtenidos señalan que *Panagrellus redivivus* tiene una baja sensibilidad a metales como cromo hexavalente. Sin embargo, es importante señalar que a concentraciones superiores a 3 mg/l la maduración se empieza a ver afectada. Aunque la curva de sensibilidad mostró una amplia variabilidad, es de esperar que al aumentar el número de ensayos con dicromato, el intervalo de sensibilidad disminuya.

La curva dosis-respuesta muestra que existe un efecto relativamente lineal sobre la supervivencia y crecimiento de *P. redivivus*; el efecto sobre la maduración es más marcado a bajas concentraciones. (Figura 3)

B. Efecto del cobre

Al igual que *Daphnia magna* y otros organismos utilizados en pruebas de toxicidad. *P. redivivus*; muestra una mayor sensibilidad al cobre aun en forma quelatada (Hoyos, 1995. Díaz y Roldán 1996). Los resultados obtenidos tanto para letalidad como para supervivencia, crecimiento y maduración fueron 2.6, 2.1, 1.06 y 0.12 mg/l, respectivamente.

Al igual que en el caso del cromo, la respuesta media entre la maduración se presenta a una concentración diez veces menor que la obtenida para la supervivencia y el crecimiento, e

igualmente, a concentraciones superiores a 2 mg/l, la maduración se inhibe completamente. Aunque el cobre es un elemento esencial, altas concentraciones en el medio exterior producen un efecto tóxico sobre organismos incapaces de regular la concentración interna del elemento. La capacidad de este catión, de ligar proteínas, puede llevar a alteraciones de las células somáticas, impidiendo así su crecimiento y maduración.

C. Efluente industrial

Los resultados de los bioensayos realizados con el efluente de la línea de anodizado, cuya concentración de níquel, cromo y cobre alcanzaba valores muy superiores a los valores permitidos en vertimientos, mostró una altísima toxicidad, aun diluido mil veces. La concentración letal media obtenida ($CL_{50-96h} = 1,5\%$), así como la concentración efectiva media para supervivencia, crecimiento y maduración fueron (CE_{50-96h} de 1,5%, 0,44% y 0,005%, respectivamente. Estos bajos valores fueron el resultado tanto del efecto tóxico individual como el posible efecto aditivo de cada uno de los metales presentes en el efluente.

CONCLUSIONES

- La concentración letal cincuenta (CL_{50}) para cromo hexavalente con *Panagrellus redivivus* fue de 44 mg/l, y la concentración efectiva cincuenta CE_{50} para el crecimiento y la maduración fue de 39 y 13.2 mg/l respectivamente.
- Para el sulfato de cobre quelatado la concentración letal cincuenta CL_{50} fue de 26 mg/l y la CE_{50} para crecimiento y maduración fue de 1,06; o, 125 mg/l, respectivamente. Este elemento es aproximadamente cinco veces más letal que el cromo. Igualmente, a muy bajas concentraciones generan efectos subletales que pueden indicar mutagenicidad o toxicidad genética.
- La toxicidad evaluada con el efluente industrial muestra que existe un fuerte efecto tóxico por metales presentes. Sin

embargo, el efecto no está potenciado por la mezcla de los metales presentes en el efluente ya que si se tiene en cuenta, que la concentración promedio de cromo fue de 600 mg/l y existiera una relación lineal entre dosis-respuesta, la CL₅₀ esperada sería de 9,0 mg/l que equivaldría a una concentración efluente de 1%, valor aproximadamente igual a la CL₅₀ encontrada con este efluente.

A diferencia del cromo, la concentración de cobre presente en las muestras fue de 33 mg/l, lo cual era equivalente a una CL₅₀ de 0,495 mg/l lo cual equivaldría a una concentración efluente del 1%. Sin

embargo, la letalidad encontrada fue 100 veces más alta, indicando un efecto aditivo por la presencia de níquel y cromo en el efluente.

- Aunque el intervalo de sensibilidad de *Panagrellus redivivus* oscila en valores relativamente altos de cromo, el coeficiente de variación obtenido fue bajo, lo cual muestra una baja variabilidad individual entre población.

BIBLIOGRAFÍA

1. APHA, Standard Methods for the Examination of Waste and Wastewater. 18th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C. 1992.
2. AGER, D., SAMOILOFF, M.R. and A. Petkau "Effect of dose-rate on the frequency of X-Linked tethal mutations in the nematode *Panagrellus redivivus*" Mutation Research 140: 107-213. 1984.
3. BURKE, D.J. and SAMOILOFF, M.R. Studies on the X-chromosome of the nematode de *Srellus redivivus*: EMS-induced visible mutations» Can. J. Genet. Cytol. 22: 801 808. 1980.
4. DENICH, K.T. and SAMOILOFF M.R. , "Estimation of mutation rates induced by large doses of gamma, proton and neutron irradiation on the X-Chromosome of the nematode *Panagrellus redivivus*". Mutation Research 140: 103-106 1984.
5. DIÁZ-B, M.C and ROLDAN F. "Evaluation of the agar plate method for rapid toxicity assessment with Some heavy metals and environmental samples. Environmental toxicology and water quality": An International Journal, 11 : 259-263. 1996.
6. HIDROMECAÑICAS LTDA. Planta de tratamiento de efluentes industriales. Informe fnal, Santa Fe de Bogotá D.C. 1995.
7. HOYOS, L. Estandarización de bioensayos con *Daphnia magna* para la evaluación de Toxicidad en aguas contaminadas con metales pesados Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Santa Fe de Bogotá. D.C. 1995.
8. MCLNNIS, R. Nematode Toxicity Assay using *Panagrellus redivivus*. National Water Research Institute. Burlington, Canadá. 1995.
9. SAMOILOFF, M.R. "Action of chemical and physical agents on free-living nematodes." In Free-living nematodes as model experimental systems. B.M. Zuckerman (Ed.). Academic Press, New York. 1980.
10. SAMOILOFF, M.R. et al. "A rapid simple long-term toxicity assay for aquatic contaminants using the nematode *panagrellus redivivus*" Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37 .1167-1174. 1980
11. SAMOILOFF, M.R, et al. "A combined bioassay-chemical fractionation scheme for the determination and rankingof toxic chemicals".
12. USEPA, Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to fresh organisms. Third Edition. Washington, D C. 1994.

Figura 1. Procedimiento general para la realización de ensayos de toxicidad con nemátodos

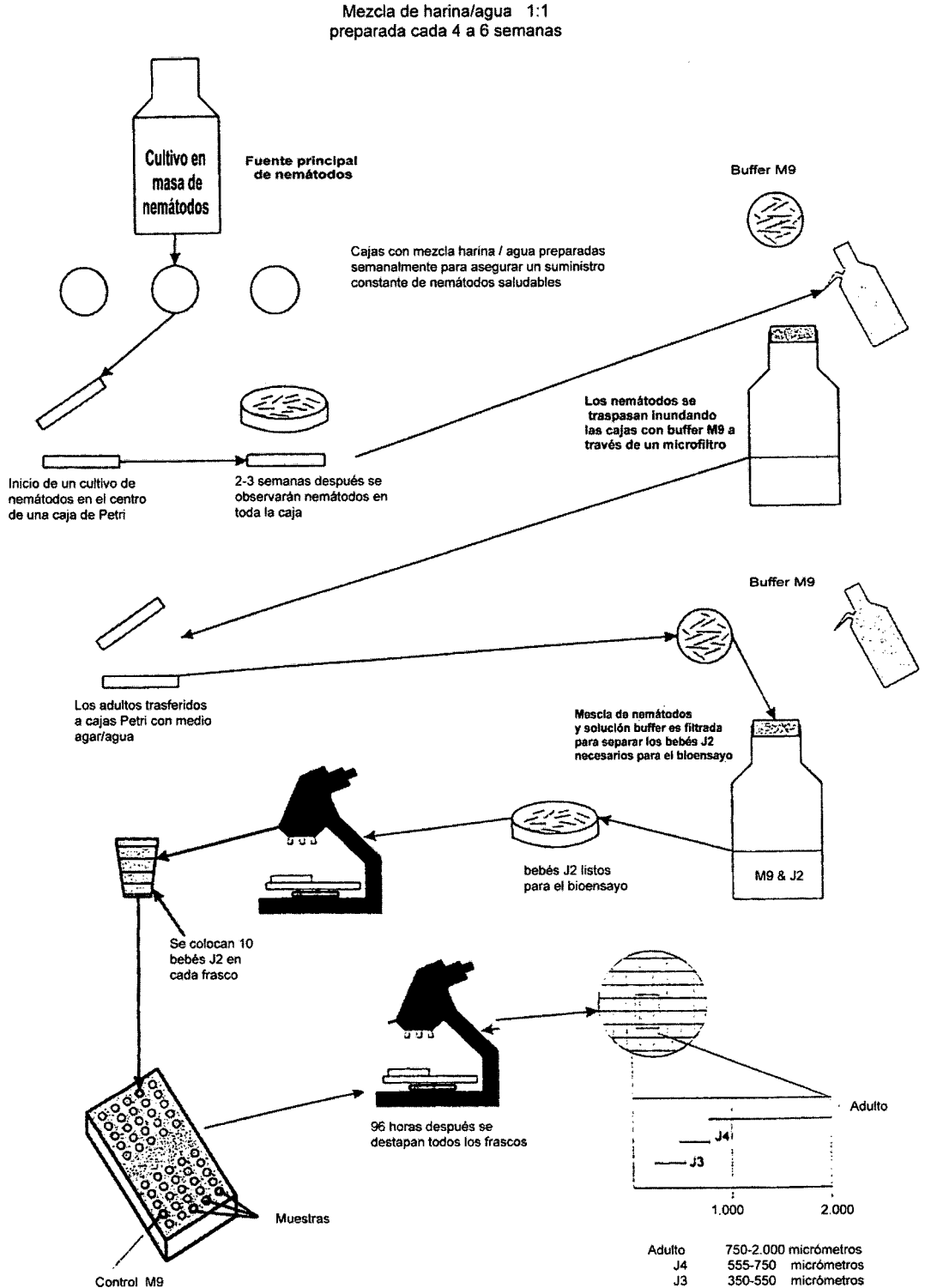


Figura 2. Sensibilidad al dicromato de potasio de *Panagrellus redivivus*.

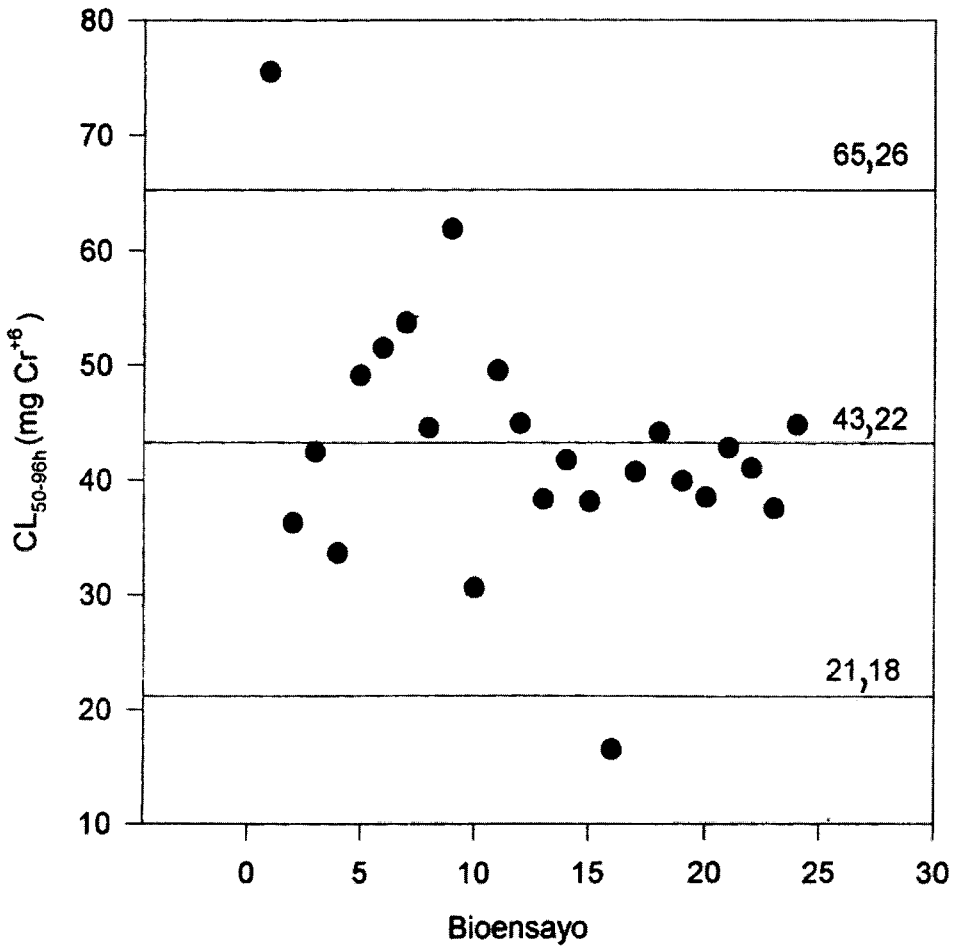


Figura3. Efecto de la concentración de Cr^{+6} sobre la supervivencia, crecimiento maduración de *Panagrellus redivivus*..

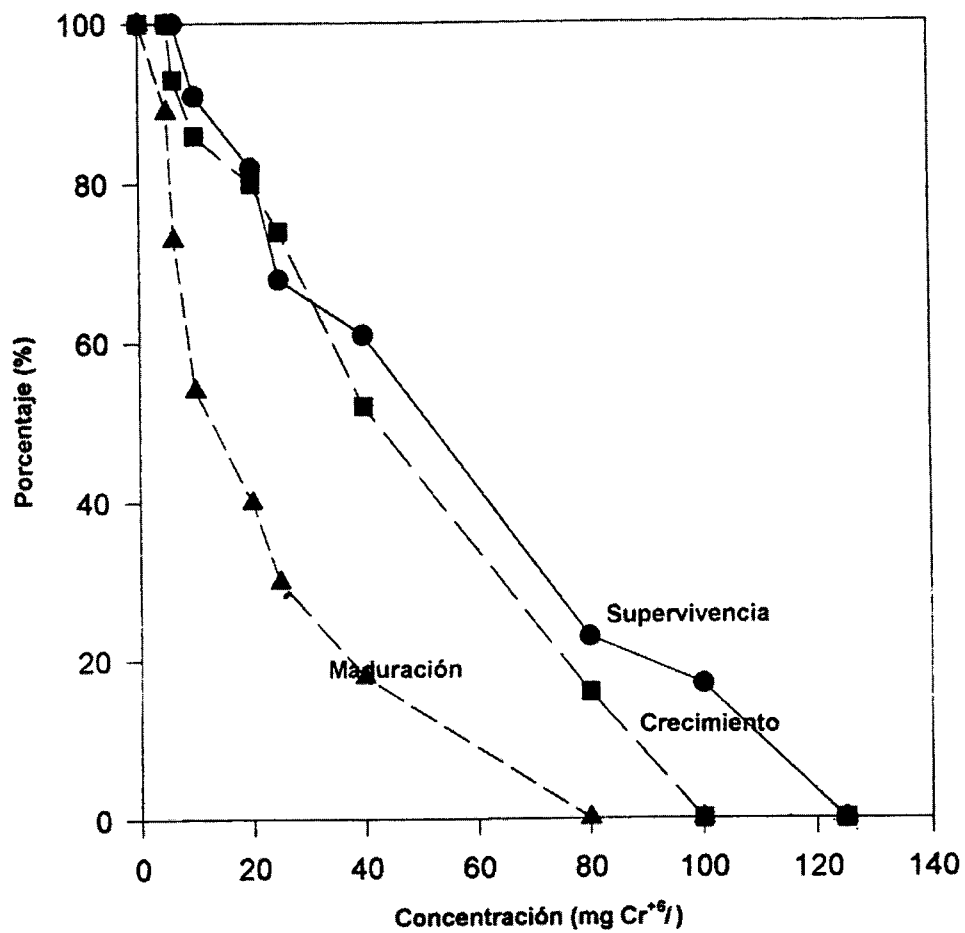


Figura 4. Efecto del cobre sobre la supervivencia, crecimiento y maduración de *Panagrellus redivivus*.

