

Trabajo de Revisión

Ecotoxicología

Los Bioensayos de Toxicidad en Sedimentos Marinos

Onelio Carballo Hondal¹, Gustavo Arencibia Carballo¹, Joel Concepción¹.

Mercedes Isla Molleda¹.

¹Centro de Investigaciones Pesqueras. 5^{ta} Ave. Y 248, Barlovento, C.Habana. Cuba.

Correspondencia E-mail: onelio@cip.telemar.cu

Resumen

Muchos contaminantes orgánicos e inorgánicos que se originan desde las actividades humanas son depositados y concentrados en los sedimentos acuáticos. El propósito de este trabajo de revisión, es analizar y discutir los objetivos, metodologías y aplicaciones de los bioensayos en sedimentos marinos, y reflexionar sobre la posibilidad de implementar regulaciones en el monitoreo ambiental de estos estudios en nuestro país para mejorar la calidad ambiental y su manejo en zonas costeras. El principal objetivo es exaltar el entendimiento de la apropiada aplicación e interpretación de los bioensayos. Se presenta un resumen de reportes, conocimientos y análisis relacionados con los sedimentos marinos, la determinación de la toxicidad de sedimentos incluyendo, el análisis químico, la determinación directa de cambios ecológicos, los bioensayos de toxicidad y las líneas multiplex de evidencia, los objetivos de las pruebas de toxicidad de sedimentos, las metodologías y consideraciones más importantes de bioensayos en sedimentos completos. Una de las conclusiones más convincente que se presenta sería evaluar la calidad ambiental no solo evaluando la química del sedimento y la estructura de la comunidad bentónica, sino incorporando las pruebas de toxicidad como una línea de evidencia fundamental en la triada de calidad del sedimento.

Palabras claves: Toxicidad, bioensayos, sedimentos marinos, triada y calidad ambiental.

Abstract

Toxicity bioassays in marine sediments

Many organic and inorganic contaminants originated from human activities are deposited and concentrated in aquatic sediments. The purpose of this review article is to analyze and discuss, the objectives, procedures and applications of bioassays on the triad of marine sediments, aiming at a reflection on the possibility of implementing regulations on the environmental monitoring of these studies in our country, so as to improve the environmental quality and its management on coastal zones. The main objective is to highlight the understanding of the adequate application and interpretation of bioassays. A summary of reports is presented, knowledge and analysis concerning marine sediments including, the chemical analysis, the direct determination of ecological changes, the toxicity bioassays and the lines of multiple evidence, the objectives of the toxicity test on sediments, the most important approaches and considerations of bioassays on whole sediments. One of the most convincing conclusions is the need of evaluating the environmental quality not only testing the chemistry of the sediment and structure of the benthic community, but incorporating the toxicity tests as a line of fundamental evidence on the triad of sediment quality.

Key words: Toxicity, bioassays, marine sediments, triad and environmental quality.

Introducción

La toxicidad derivada de la contaminación tiene diferentes efectos sobre los organismos acuáticos y terrestres en la naturaleza. Para su evaluación se están utilizando cada vez más los ensayos biológicos, estos se consideran como un complemento a la caracterización fisicoquímica convencional y para ello se utilizan especies de diferentes niveles tróficos de la cadena alimentaria. Los resultados obtenidos de la aplicación de los bioensayos de toxicidad han demostrado que pueden ser usados para identificar áreas de mayor o menor contaminación, también pueden ayudar a la selección de sitios para los cultivos de especies acuáticas, son utilizados en programas de monitoreo ambiental evaluando la calidad del agua y los sedimentos, así como los efluentes residuales que vierten en ríos y zonas costeras; también se han utilizado para determinar la relación entre efectos tóxicos y biodisponibilidad, para investigar interacciones entre contaminantes, determinar distribución espacial y temporal de la contaminación y evaluar los peligros del material dragado y clasificar áreas para limpieza, entre las aplicaciones más estudiadas. (Ingersoll, 1995; Chapman, 2007).

Ciertos contaminantes ambientales, en su proceso de compartimentación se asocian al material particulado en los sedimentos y se producen equilibrios en la interfase agua-sedimentos, en la cual importantes procesos de sorción y desorción pueden determinar la biodisponibilidad de sustancias tóxicas. El estudio de los efectos biológicos de los contaminantes en la fracción soluble (agua intersticial o agua de poro), o los asociados a las partículas por procesos de sorción, es un aspecto muy importante de las evaluaciones ecotoxicológicas.

Muchos contaminantes orgánicos e inorgánicos que se originan desde las actividades humanas son depositados y concentrados en los sedimentos acuáticos. La presencia de sedimentos contaminados en ambientes acuáticos, ya sea en aguas continentales o en aguas marinas, es un hecho constatado a nivel mundial, sobre todo a partir de la segunda mitad del siglo XX. La existencia de estos sedimentos es debida tanto a los vertidos incontrolados desde industrias como a la utilización de productos químicos tales como los pesticidas que van a parar a los sedimentos una vez que son transportados desde zonas agrícolas por las aguas. En <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

otros casos, éstos son debidos a los vertidos "controlados" tales como emisores submarinos que vierten aguas residuales principalmente domésticas, aunque en aquellas zonas donde no existe separación de tratamiento y "conducción", se mezclan las aguas residuales industriales con las domésticas, aumentando la carga contaminante y el nivel de toxicidad (Jiménez, 2001). Los tóxicos que entran a las aguas marinas de fuentes municipales, agrícolas e industriales pueden permanecer suspendidos en la columna de agua, ser incorporados a la biota acuática o depositados sobre el fondo e incorporarse en los sedimentos marinos. Algunos de estos contaminantes químicos son muy persistentes, mientras que otros son más susceptibles a transformaciones físicas, químicas o biológicas (Beg *et al.*, 2001). Muchos esfuerzos de protección ambiental reconocen a los sedimentos como una porción crítica de los ecosistemas acuáticos y requieren de su evaluación para las actividades de dragado y su remediación (Boese *et al.*, 2000).

Los sedimentos son un componente ecológicamente importante en el habitat acuático, y es un reservorio natural de contaminación. (Chapman, 1989). Los contaminantes orgánicos polares son menores y más tóxicos de los elementos trazas, fuertemente reactivos con materiales particulado y acumulados en los sedimentos a concentraciones en orden de magnitud superior que en solución y estos contaminantes también están retenidos a través del tiempo por los sedimentos. De esta manera los sedimentos pueden ser un componente seguro de contaminantes de entrada que progresivamente va aumentando con la contaminación acumulada desde fuentes crónicas y de contaminantes retenidos desde episodios históricos de entrada (Luoma, S.N. *et al.*, 1998)

Los sedimentos en el medio acuático juegan un papel fundamental en el transporte y acumulación de agentes tóxicos, y de manera importante los iones metálicos, de tal manera que su efecto tóxico se modifica por las condiciones fisicoquímicas presentes (Lima-Cazorla *et al.*, 2005). Una variedad de organismos están expuestos a los contaminantes en los sedimentos, directamente o indirectamente, una de las formas de exposición serán los animales que ingieren sedimentos o detrito particulado como alimento, ó mientras buscan alimento están directamente expuestos a los contaminantes.

Los sedimentos también son afectados por la concentración de los contaminantes en la columna de agua y en agua intersticial a través del equilibrio durante la reacción de sorción y desorción. En este sentido los sedimentos son biológicamente afectados por exposición de contaminantes en solución, especialmente para organismos vivos sobre, cerca o dentro del sedimento. Finalmente, la contaminación del sedimento puede ser extendida a el ecosistema lejos de la fuentes de entrada a través de la resuspensión y el transporte particulado (Luoma, 1990).

La toxicidad de sedimento en el sentido extenso es definido por cambios ecológicos y biológicos que son causados por sedimentos contaminados. La toxicidad de sedimentos también puede ser definido operacionalmente, en términos toxicológicos, como una respuesta adversa observada en un organismo de prueba expuesto a un sedimento contaminado. La toxicidad de sedimento ha sido bien demostrada en estudios toxicológicos y ecológicos (Meador *et al.* 1990).

El propósito de este trabajo es analizar y discutir los objetivos, metodologías, aplicaciones e interpretación de la utilización de los bioensayos en sedimentos, la cual es una importante herramienta empleada para evaluar la toxicidad de sedimentos en ambientes estuarinos y marinos.

Discusión

Existen muchos criterios que se han discutido en la literatura sobre los bioensayos de toxicidad, pensamos que lo más importante es el uso adecuado y la interpretación que se le den a estas herramientas, tan importantes para las evaluaciones de toxicidad en los medios naturales, tanto como para predecir, mitigar y clasificar la toxicidad en un determinado cuerpo de agua y sedimento.

Determinación de la toxicidad del sedimento.

Debido a que el sedimento puede ser tóxico, existen necesidades legales y regulatorias para determinar si sedimentos específicos son tóxicos. Existe en general una necesidad para <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

entender como la toxicidad en sedimentos está contribuyendo a la degradación de los recursos acuáticos; desde hace tiempo las agencias regulatorias han reconocido la importancia de entender la toxicidad de los sedimentos. Ya en el 1977 se publicaron directrices para la evaluación caso a caso de la toxicidad de materiales dragados que se desechan en los océanos (US EPA, 1977). En la actualidad muchos países, están considerando los criterios para regular las concentraciones de contaminantes específicos en sedimentos y evaluar los sedimentos contaminados (Melzian, 1990; Casado-Martínez MC *et al.* 2006a).

Las herramientas disponibles para evaluar o regular la toxicidad de los sedimentos incluyen los análisis químicos, los estudios ecológicos y los bioensayos en sedimentos, pero cada uno de ellos tiene fortalezas y limitaciones, las cuales se describen más adelante.

- **Análisis químico**

Los análisis químicos son las herramientas más ampliamente utilizadas para detectar problemas de contaminación en sedimentos. En la literatura se encuentran disponibles metodologías analíticas sensibles para determinar las concentraciones totales de muchos contaminantes (metales, compuestos orgánicos, bifenilos policlorados, hidrocarburos policíclicos aromáticos, etc.) y la interpretación química de los datos de concentración es confiable. Casi todos los criterios existentes de la calidad del agua son tomados de concentraciones químicas específicas, de modo que existe un precedente para aplicar este concepto a los sedimentos. (Chapman, 1989).

Los análisis químicos se recomiendan como una parte esencial de cualquier evaluación de la toxicidad de sedimentos. Sin embargo, estos tienen algunas limitaciones importantes cuando se emplean solos para evaluar el potencial de toxicidad (Chapman, 1983). Existen capacidades analíticas confiables en la detección y cuantificación en la mayoría de las sustancias químicas orgánicas en los sedimentos, y para algunas sustancias existen métodos que son muy costosos para la aplicación de rutina. Nuestra comprensión limitada de la disponibilidad de los contaminantes procedentes de los sedimentos también afecta la interpretación de los análisis químicos. La toxicidad y la bioacumulación de todos los

contaminantes está influenciada por la geoquímica de los sedimentos y los procesos geoquímicos pueden causar bioacumulación o toxicidad que puede variar en 100 veces o más, de una función simple de concentraciones de contaminantes (Di Toro *et al.*, 1990). Se han propuesto algunos principios generales para explicar los efectos geoquímicos en la biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos. La fugacidad, basada en las fases de los coeficientes de partición (ej. octanol - agua) parece gobernar las distribuciones de las sustancias químicas orgánicas en la naturaleza entre la biota (sobre una base lipídica), agua y sedimento en equilibrio. El equilibrio de partición expande su concepto específicamente al sedimento, y se está empleando para establecer valores en los criterios de calidad de los sedimentos para sustancias químicas específicas. El equilibrio de partición sugiere que las concentraciones de sustancias químicas orgánicas no iónicas en el agua de poro se determinan por el coeficiente de partición del agente químico, por la concentración del agente químico y por las concentraciones del carbono orgánico. La toxicidad del sedimento es entonces evaluada al comparar las concentraciones en el agua de poro predescritas por un cálculo del equilibrio de partición para un conjunto seleccionado de datos de toxicidad de agua. En una de las pocas pruebas de este concepto para ambientes marinos se realizó una evaluación de la toxicidad del fluoranteno y se explicó exitosamente en un bioensayo con anfipodos (*Rhepoxinius abronius*), (Swartz *et al.*, 1990). No se ha establecido ampliamente cómo las generalizaciones del equilibrio de partición se pueden aplicar a los sedimentos marinos. Los estudios futuros necesitan considerar una variedad de especies e incertidumbres para poder relacionarlos a los diferentes tipos de pruebas de toxicidad.

Los efectos de la química del agua y los diferentes tipos de materia orgánica necesitan ser estudiados más, al igual que las influencias de transferencia de la cadena alimentaria y otras incertidumbres inherentes en la aplicación del concepto a los ecosistemas marinos (Bierman, 1990).

La biodisponibilidad de los elementos trazas de los sedimentos aún no están bien desarrolladas, en algunos estudios en estuarios se surgieron la normalización del hierro, plomo total y arsénico, ayudando a la predicción de la biodisponibilidad de estos elementos en

algunas circunstancias. La normalización en las concentraciones del sulfuro ácido volátil (SAV) aumenta las predicciones de la toxicidad del Cd y el Ni en los bioensayos (DiToro *et al.*, 1990).

Aún si la biodisponibilidad fuera predecible, los análisis químicos solamente pueden ser interpretados, contaminantes por contaminante, entonces la predicción de la toxicidad desde los análisis químicos es difícil cuando están presentes mezclas de contaminantes. Diferentes estudios muestran interacciones antagónicas, aditiva, sinérgicas o neutrales en las mezclas de compuestos. Las generalizaciones no están lo suficientemente desarrolladas como para predecir cuales o cuando ocurren las interacciones.

- **Determinación directa del cambio ecológico**

El enfoque para evaluar la toxicidad del sedimento mediante la determinación directa de los cambios ecológicos y biológicos causados en la naturaleza por los contaminantes, ha sido descrito por algunos estudios que han correlacionado con éxito las concentraciones químicas en los sedimentos marinos con la comunidad o los cambios en la población, especialmente cuando los gradientes de los contaminantes fueron identificados por los análisis químicos (Chapman *et al.*, 1991). Con mayor frecuencia es difícil demostrar el cambio ecológico y biológico y aún más difícil atribuirsele conclusivamente a los contaminantes. La bioacumulación y el cambio bioquímico, son respuestas más bajas a los contaminantes que son de fácil detección y pueden ser contaminantes específicos, tales cambios son buenos indicadores de exposición para los contaminantes, pero el vínculo entre estas respuestas y el cambio ecológico no siempre está claro (Luoma, *et al.*, 1990).

Probar conclusivamente que la toxicidad del sedimento ha causado cambios en la población o comunidad, está más comprometido que correlacionar la estructura de la comunidad con las concentraciones de contaminantes o evaluar la respuesta de un organismo en una muestra de sedimento simple tomada fuera de su contexto ambiental. Los resultados ambiguos y las conclusiones, falsos positivos o negativos acerca de la toxicidad, son comunes en estudios que consideran de forma inadecuada el contexto de las condiciones naturales y son escasas las respuestas población/comunidad específicas para los contaminantes. Es probable

también que los efectos de los contaminantes interactúen con los efectos del estrés natural y se potencien o estén potenciados por fuerzas naturales. (Luoma, *et al.*, 1998).

Las trayectorias del cambio ecológico causado por los contaminantes pueden ser complicadas. Por ejemplo, el efecto más simple de contaminación de sedimento es eliminar las especies del bento más sensibles en una comunidad. La comunidad sobreviviente podría tener un número reducido de especies del bento y ser un remanente de una comunidad no afectada anteriormente. En dicho caso, la supervivencia se podría predecir de una serie sistemática de pruebas de toxicidad de especies simples bien definidas. De modo alternativo, las especies más sensibles pueden ser raras y/o sustituidas por especies ecológicamente similares, menos sensibles. En este caso, podría ser que no se detectara cambio en la estructura de la comunidad. Una tercera alternativa es que la eliminación de un contaminante influyente en las especies sensibles puede resultar en la eliminación de especies que dependen ecológicamente de este. En este caso pudiera ser, que no se detectara cambio en la estructura de la comunidad. Las probabilidades de las variadas trayectorias alternativas de las respuestas a la comunidad no son bien conocidas. Eventos de complejidad similar a este último ejemplo caracterizaron la pérdida de poblaciones de peces como resultado de la acidificación en los lagos experimentales de Canadá (Schindler, 1987).

Los estudios ecológicos son una línea de evidencia fundamental en cualquier evaluación de toxicidad de sedimento. Sin embargo, estos estudios son restringidos en su alcance y puede que sea difícil una comprensión de la causa y el efecto, especialmente en los sistemas pocos comprendidos. Revisiones de algunos autores incluye un número de sugerencias para reducir las ambigüedades en estos estudios (Clark, 1989; Luoma *et al.*, 1990).

- **Los bioensayos de toxicidad**

Los bioensayos de sedimento son usualmente, exámenes relativamente simples que evalúan la respuesta de los organismos de prueba en un sedimento contaminado bajo condiciones controladas. Sus ventajas potenciales han sido citadas por numerosos autores (Chapman & Long, 1983, Hair, 1986; Swartz, 1987; Chapman, 2007). La mayoría de los

bioensayos son menos costosos y consumen menos tiempo que los estudios ecológicos. Empíricamente los bioensayos se dirigen a los problemas de interacciones de mezclas de contaminantes (Chapman, 1989) y miden directamente una respuesta biológica de la contaminación en una muestra de sedimento.

Debe tenerse especial cuidado en las características más comunes y la selección del tipo de ensayo ecotoxicológico, para asegurar que las concentraciones en el ambiente se mantengan constantes durante largos períodos de tiempo del ensayo, y que cada cierto tiempo deben chequearse y conocerse, así como los criterios para la selección del organismo de ensayo. Generalmente, para los organismos acuáticos se distinguen en:

Tipos de ensayos:

- De Laboratorio: Reproducción parcial de las condiciones reales del ambiente
- De Campo: Organismos mantenidos en contenedores adecuados, sometidos a las condiciones del medio.

Según sea la renovación del medio, los ensayos pueden ser:

- Estático: Se establece la concentración del tóxico al principio del ensayo; el medio no se renueva, ni se permite ocurra flujo.
- Semiestático: Renovación periódica del medio de ensayo y del tóxico cada 24 ó 48 horas
- Flujo continuo: Renovación continua del medio de ensayo y del tóxico

Según el tiempo de exposición los ensayos pueden ser:

- Agudo: Período de exposición corto en relación al tiempo de generación del organismo de prueba
- Subcrónico: El período de exposición cubre, al menos, el 10% del tiempo de generación del organismo de prueba
- Crónico: El período de exposición cubre, al menos, una generación del organismo de prueba

- De Reproducción: El período de exposición cubre, al menos, tres generaciones del organismo de prueba
- De Recuperación: El período de exposición es seguido por la transferencia y observación en un medio no tóxico.

El sistema de flujo continuo simula en algún grado las condiciones naturales mucho mejor que los sistemas estáticos y además existe un mayor grado de seguridad de que las concentraciones a las cuales han estado expuestos los organismos de ensayo se han mantenido constantes.

En la evaluación de los efectos ecotóxicos de una sustancia química sobre los sistemas bióticos es necesario tener en cuenta tanto la estructura como las funciones del mismo. La estructura está relacionada, entre otras cosas, con la biomasa relativa de especies coexistentes y la función con la dinámica del ciclo geoquímico, así como con la entrada de energía al sistema.

Características comunes de los bioensayos:

- Exposición de grupos de organismos de la misma población en buenas condiciones de salud con aclimatación previa.
- Mantenimiento de condiciones ambientales constantes y estandarizadas.
- Exposición a concentraciones graduadas del agente.
- Grupos control adecuados.
- Observación de signos de toxicidad del efecto presentes.
- Medición y registro detallado de efectos biológicos en grupos control y tratados.
- Observación patológica de grupos control y tratados.
- Análisis estadístico de resultados.

Criterios para la selección del organismo de ensayo:

- Amplio rango de sensibilidad (batería de ensayos con distintos organismos).
- Sensibilidad constante de la población utilizada.
- Alta disponibilidad y abundancia (amplia distribución geográfica).
- Estabilidad genética y uniformidad de las poblaciones usadas en los ensayos.
- Organismos autóctonos o representativos del ecosistema que se evalúa.
- Conocimiento de su biología, fisiología y hábitos nutricionales.
- Preferencia por especies de importancia recreacional, comercial o ecológica.
- Disponibilidad de ejemplares a lo largo de todo el año.
- Sencillo mantenimiento y cultivo en condiciones de laboratorio.
- Preferencia por especies de tamaño reducido para facilitar la obtención de gran número de datos.
- Existe un limitado número de especies "standard".
- En ensayos de campo pueden utilizarse especies no estandarizadas.

Criterio para la selección de efectos:

- Inequívoco.
- Relevante.
- Rápidamente observable.
- De fácil descripción.
- Mensurable.
- Biológicamente significativo.
- Reproducible.
- "Screening tests": mortalidad
- Subletalidad.
- Crecimiento.
- Reproducción.
- Cualitativo.

- Cuantitativo.
- Se establecen como índices de toxicidad:
 - CL50 – tiempo: Concentración letal del 50 %.
 - CE50 – tiempo: Concentración efectiva del 50 %.
 - IC 50 – tiempo: Concentración de inhibición del 50 %.

▪ **Triada de calidad del sedimento**

Como es de conocimiento en la literatura, las guías de calidad ambiental incluyen las guías de calidad del sedimento y agua. Estas guías son recomendable usarlas con base en el sentido común, no inflexiblemente teniendo en cuenta sus limitaciones como: que no considera sinergismo entre contaminantes, biomagnificación o envenenamiento secundarios; solo se basa en toxicidad a receptores biológicos, no considera salud humana, no se debe usar para decisiones de remediación. Los usos de estas guías debe ser, identificar y describir la contaminación, identificar y priorizar contaminantes de preocupación potencial como los compuestos orgánicos persistentes y como parte de un esquema de toma de decisiones basado en el peso de las evidencias. El peso de la evidencia incorpora observaciones (La comunidad bentónica) e investigaciones (Pruebas de toxicidad). Como ejemplo están los sedimentos con sus tres líneas de evidencia fundamentales: La Triada de Calidad del Sedimento:

- Química del sedimento.
- Toxicidad del sedimento.
- Estructura de la comunidad bentónica.

La triada de calidad del sedimento fig. 1, fue desarrollada en 1980 (Long and Chapman, 1985), es ahora ampliamente utilizada para la conducción de la valoración integrada de la calidad del sedimento basada en la medición de la química, la toxicidad y el bentos (Chapman, 2006, 2007). (Ver Figura 1)

Objetivos de las Pruebas de toxicidad en sedimentos.

Las metas más simples y menos ambiguas de los bioensayos en sedimentos son puramente empíricas para definir la contaminación del sedimento mediante una respuesta seleccionada en una especie escogida. En un bioensayo realizado para propósitos empíricos la especie de prueba se emplea como sensor. Por ejemplo, un bioensayo permite la determinación directa de si puede ocurrir una respuesta biológica a una mezcla de agentes químicos. Es posible una variedad infinita de mezclas entre diferentes sedimentos. De igual modo, el organismo de ensayo puede responder a un número de estas mezclas. Es decir, no es práctico calibrar y predecir la respuesta del bioensayo a todas las posibles mezclas, pero es posible interpretar como evidencia empírica que la toxicidad podría ocurrir de la mezcla particular en cuestión igual que cualquier instrumento, diferentes bioensayos también serán más sensibles a algunas variables, contaminantes e interferencias que otras. La respuesta debe interpretarse en términos de aquellas sensibilidades, como mejor se conocen. Las predicciones ecológicas no son un requerimiento ni tampoco parte de la interpretación de un bioensayo empleado en un contexto empírico.

La aplicación ideal de los bioensayos en sedimentos marinos es hacer predicciones ecológicas. Desafortunadamente, las insuficiencias en la comprensión del proceso y la complejidad de la respuesta ecológica limitan tales predicciones. Con frecuencia las suposiciones necesarias para predicciones exactas no son razonables. Por ejemplo predecir la supervivencia de una especie en un ambiente contaminado requiere entender, más bien si una, o hasta algunas etapas de vida pueden sobrevivir una corta exposición al contaminante. Las características de los antecedentes de la vida, entre otros procesos pueden afectar la supervivencia en formas complicadas (Luoma., *et al.*, 1990). Extrapolar la supervivencia de una especie en la naturaleza desde los resultados de las pruebas de toxicidad a otra es difícil, especies sustitutas añaden inexactitudes adicionales. Las sensibilidades a los contaminantes en las pruebas de toxicidad difiere ampliamente entre las especies y las causas de estas diferencias no se entienden bien (Blanck, 1984). Además las especies difieren ampliamente en las características taxonómicas, ecológicas, fisiológicas y antecedentes de vida que afectan la

supervivencia en la naturaleza. No se comprenden bien las influencias específicas de los sedimentos contaminados en estos procesos (Cairns y Mount, 1990). Predecir las respuestas de la comunidad por ensayos de especies únicas se está tornando cada vez más complejo. La complejidad inherente en las respuestas de la comunidad, y las limitaciones inherentes de los bioensayos sugieren que será difícil la extrapolación.

Los investigadores de las agencias financieras y reguladoras, han estado en contradicciones con las interpretaciones de los bioensayos (Chapman, 1991). Es loable tener como objetivo final el empleo de los bioensayos para proteger los ecosistemas al predecir sus respuestas y sugerimos que los bioensayos de los sedimentos ambientales se diseñen para detectar la toxicidad en problemas de contaminación. Los usos regulatorios de los bioensayos en sedimentos se pueden lograr sin suponer predictibilidad ecológica. Por ejemplo, cualquier respuesta del bioensayo se puede seleccionar como criterio para definir un problema de un área, la eliminación de una draga afectada (Alden y Butt, 1987), un nivel adecuado de remediación o una norma de protección de la calidad del sedimento (Chapman, 1989).

Una recomendación bien importante en todas las aplicaciones de los bioensayos de sedimentos marinos, es que el estudio debe identificar si un bioensayo se está usando para propósitos empíricos o predictivos, para evaluar objetivamente las interpretaciones que son adecuadas, y plantear las metas que son alcanzables con suposiciones científicas razonables.

La homogeneidad de los protocolos a utilizar debe asegurar la compatibilidad de los resultados que se obtengan por diferentes investigadores para garantizar la calidad de los bioensayos sobre sedimentos.

Si los resultados van a ser utilizados con fines de regulación en estudios contaminación marina el personal de laboratorio debería estar entrenado mediante la participación de ejercicios y cursos de evaluación continuada, lo que permitiría una evaluación de la variabilidad inter e intralaboratorio para cada uno de los bioensayos que se utilizarían en la gestión del material dragado y en cualquier tipo de sedimento en investigación en el país.

Se recomienda una batería de ensayos que incluya distintas medidas y distintos medios de exposición para proteger de modo efectivo todos los compartimentos ambientales, se han

desarrollado diferentes estrategias de combinaciones de bioensayos con diferentes especies por diferentes laboratorios y países. Cada ensayo podrá ser utilizado con éxito en dependencia al tipo de sedimento y a la selección de la especie, por ejemplo un bioensayo en bivalvos puede ser utilizado con éxito en la evaluación de toxicidad de sedimentos costeros afectados por contaminación metálica y pueden ser no recomendable para la evaluación de la toxicidad de materiales de dragados. A continuación presentamos algunos procedimientos de protocolos de bioensayos de toxicidad de los más estudiados para evaluar toxicidad de sedimentos marinos, principalmente para nuestro país donde todavía estas herramientas son poco utilizadas, siendo así en correspondencia al desarrollo de la ecotoxicología, la cual todavía está en sus comienzos y en fase de estandarización de protocolos, tanto para fines regulatorios como para investigación.

Protocolos de bioensayos de toxicidad. Características.

En la literatura existen protocolos en especies estándar y no estándar, en dependencia de los fines de la investigación se utilizará un protocolo u otro. La homogeneidad de los protocolos a utilizar debe asegurar la compatibilidad de los resultados que se obtengan por diferentes investigadores para garantizar la calidad de los bioensayos sobre sedimentos.

Criterios para la selección de protocolos de ensayo

- Aceptación de la comunidad científica.
- Capacidad de predicción de los efectos de un amplio rango de tóxicos sobre diferentes organismos.
- Base estadística – reproducibilidad.
- Rango de concentración - duración de la exposición.
- Datos obtenidos utilizables para la evaluación de riesgo.
- Costo - eficiencia
- Sensibilidad – realismo.
- Ensayos uniespecíficos.

- Ensayos multiespecíficos.
- Experimentos de laboratorio en condiciones controladas.
- Experimentos de campo con un alto número de variables.
- Validación.

Se recomienda una batería de ensayos que incluya distintas medidas y distintos medios de exposición para proteger de modo efectivo todos los compartimentos ambientales, se han desarrollado diferentes estrategias de combinaciones de bioensayos con diferentes especies por diferentes laboratorios y países, se han reportado con buenos resultados ensayos de microtox con la bacteria marina luminiscente *Vibrio fischeri* (Casado-Martínez *et al.*, 2006d); el bioensayo con anfípodos desarrollado sobre la fase sólida, el ensayo de desarrollo larvario con embriones de erizo de mar sobre los lixiviados de los sedimentos, el bioensayo con ostiones y almejas, ensayos con copepodos, ensayos con poliquetos, entre los más estudiados, cada ensayo podrá ser utilizado con éxito en dependencia al tipo de sedimento y a la selección de la especie, por ejemplo un bioensayo en bivalvos puede ser utilizado con éxito en la evaluación de toxicidad de sedimentos costeros afectados por contaminación metálica y pueden ser no recomendable para la evaluación de la toxicidad de materiales de dragados y otros organismos se han utilizado en bioensayos con sedimentos ya mencionados anteriormente en el acápite de bioensayos en sedimentos totales.

La estandarización del método es un paso importante requerido para la aprobación de cualquier ensayo biológico antes que estos puedan ser incorporados en programas regulatorios (Casado-Martínez *et al.*, 2006a). Según Burton *et al.*, (1996), todos los métodos presentan una variabilidad específica y esto debe ser considerado y apropiadamente cuantificado. Los ejercicios de habilidad interlaboratorio juegan un papel importante en garantizar la comparabilidad del resultado del bioensayo (Ricci *et al.*, 2007). Es importante el efecto de la sensibilidad de las especies a utilizar en la toma de decisiones, puede ser evitado mediante el uso de análisis estadísticos para la clasificación de las muestras como tóxicas o no tóxicas,

otros factores deben tenerse en cuenta para el análisis de los resultados. Entre estos el tamaño del grano puede tener efectos en algunas especies de anfipodos.

Para la toma de muestra de los sedimentos de la naturaleza, estos se recogen en la superficie de 2 – 5 cm de la interfase sedimento – agua. Los sedimentos se mezclan u homogenizan para ayudar la reproducibilidad. Para cada prueba, en un estudio óptimo se emplean cinco replicas de la muestra del sedimento. Se filtran los sedimentos mediante una gaza de 0.5 mm para eliminar la fauna natural y 2 cm de sedimento se sitúa en el fondo de un beaker de 1 litro con 775 ml de agua de mar aereada continuamente. Los animales y el sedimento de dilución (si se emplean) se recogen de un hábitat descontaminado. Por ejemplo, el anfípodo *Rhepoxinius abronius* es aclimatado a la densidad de la prueba durante 4 días, luego se añaden 20 animales a cada cámara de prueba, estática durante 10 días. Las exposiciones son más prolongadas para otras especies (60 días para la *L. pictus*, (Thompson *et al.*, 1989); algunos procedimientos más modernos recomiendan 28 días. En algunos estudios la exposición se aproxima al año o el tiempo de generación de la especie, es más prolongado. La salinidad óptima y las características son muy específicas para las especies y con frecuencia estas se consideran a la hora de definir la especie.

Los controles en los bioensayos de sedimento total incluyen los sedimentos limpios con la misma distribución de tamaño de partícula, un control portador en las pruebas sembradas, o una respuesta control que emplea un sedimento químico con una toxicidad conocida. La supervivencia ha demostrado ser el punto final más reproducible para la mayoría de los anfípodos, pero también se han empleado la capacidad para enterrarse y emerger de los sedimentos.

Características de algunos protocolos bioensayos en sedimentos marinos.

El sistema Microtox®:

Este sistema utiliza un cultivo estandarizado de una bacteria marina, *Vibrio fischeri* (previamente conocida como *Photobacterium phosphoreum*), cuya emisión de luz puede

medirse, lo cual permite determinar de manera inmediata si las muestras contienen sustancias tóxicas, ya que la bioluminiscencia se vincula directamente a la vitalidad y estado metabólico de la célula. El agente tóxico causa cambios en la pared celular, membranas, transporte de electrones, enzimas y constituyentes citoplásmicos, lo que se refleja rápidamente en un decremento de la emisión lumínica de la bacteria. El ensayo se desarrolló inicialmente para evaluar toxicidad aguda de muestras de aguas y aguas residuales así como para extractos. Posteriormente este protocolo fue utilizado para la evaluación de sedimentos mediante la exposición de las bacterias a los lixiviados, al agua intersticial o a extractos con disolventes orgánicos. Este protocolo ha sido ampliamente utilizado para caracterizar sedimentos, pudiéndose detectar bajas concentraciones de algunos tóxicos (Casado-Martínez *et al.*, 2006d). Más recientemente se ha adaptado como ensayo sobre la fase sólida. De esta manera este nuevo protocolo incorpora el contacto directo de las bacterias con las partículas del sedimento, así como con el agua intersticial (Microbics, 1992).

El ensayo sobre la fase sólida, denominado Microtox Solid Phase Test (SPT) fue desarrollado por AZUR Environmental (Carlsbad, CA, USA) y se ha usado durante los últimos años en distintos estudios para evaluar toxicidad aguda (Stronkhorst, 2003, Riba *et al.* 2004, Campisi, *et al.*, 2005, Moralles-Caselles, *et al.*, 2007). El protocolo SPT mide la emisión de la luz de las bacterias después de su incubación en contacto directo con una mezcla de sedimento y disolvente. La principal dificultad para la interpretación de los resultados está relacionada con la granulometría del sedimento, se ha encontrado un efecto directo del contenido en finos de la muestra sobre la toxicidad (Ringwood *et al.*, 1997). Los parámetros y las condiciones para el desarrollo del ensayo SPT se incluyen en la tabla 1 (Casado-Martínez *et al.*, 2006d). Se ha desarrollado un protocolo más simple y rápido que el SPT para muestras sólidas y de sedimento, es el Basic Solid Phase (BSPT). Este protocolo suprime la filtración y mide la emisión de la luz cuando la bacteria está aún en contacto con el sedimento, por lo que la emisión de la luz no se ve afectada por las bajas tasas de recuperación de las bacterias durante ese paso adicional. Los parámetros y las condiciones para el desarrollo del ensayo BSPT se incluyen en la tabla 2. En estudios realizados hasta la actualidad se describe al ensayo

de microtox como una adecuada herramienta para la evaluación de la toxicidad en sedimentos marinos. La comparación entre el protocolo SPT y el nuevo BSPT, resulta más recomendable el BSPT, porque el diseño es más simple y económico en términos de tiempo y esfuerzo, tiene menor variabilidad interlaboratorio, y pudiera ser más recomendable para efectos regulatorios (Casado-Martínez *et al.*, 2006d). (Ver Tabla 1 y 2)

El bioensayo con crustáceos anfípodos se ha convertido en un ensayo de referencia para la caracterización de sedimentos contaminados y material dragado, y ha sido usado rutinariamente para evaluar los efectos biológicos potenciales de este tipo de muestras ambientales. Existe en la actualidad protocolos estandarizados (ASTM 1991, Environment Canada 1992, US EPA 1994, RIKZ 1999, Casado-Martínez *et al.* 2006b) para distintas especies, pero se han utilizado otras especies autóctonas con algunas modificaciones a las condiciones de ensayo (Briggs, *et al.*, 2003, Moralles-Caselles, *et al.*, 2007). Se presenta resumen de protocolo según la tabla 3 (Casado-Martínez *et al.* 2006b). (Ver Tabla 3)

Los bioensayos con estadios embrionarios y larvarios de invertebrados marinos han sido frecuentemente utilizados para evaluar la calidad ambiental de muestras de sedimentos (Carr 1996; Mariño-Balsa, *et al.*, 2003), así como la toxicidad de contaminantes (Cesar *et al.* 2002), y son considerados un método rápido y sensible para la caracterización de la toxicidad de sedimentos marinos. Entre los bioensayos embrio-larvarios más utilizados se encuentran los realizados con ostras (*Crassostrea gigas*) y con erizo de mar (*Paracentrotus lividus*, *Sphaerechinus granularis*, y *Echinometra lucunter*). Estas especies se encuentran distribuidas en las costas y arrecifes, generalmente son fáciles de recoger y pueden ser mantenidas fácilmente en el laboratorio. Los erizos de mar son importantes consumidores de algas y como tal desempeñan un papel clave en el ecosistema arrecifal, evitando la muerte de la comunidad de corales hermatípicos tan importantes para los arrecifes marinos. Son claves para el reciclaje de los elementos minerales y su incorporación al ciclo de los nutrientes, degradando la materia

orgánica hasta un nivel que pueda ser nuevamente aprovechado por los productores primarios (Lawrence, 1975).

Por las numerosas ventajas que presenta, el erizo de mar es uno de los organismos utilizados con más frecuencia, tanto para evaluar la toxicidad de las muestras, como en pruebas de toxicidad con contaminantes particulares (Fernández, 2002) y para sedimentos contaminados (Garmendia, *et al* 2009; Salamanca, *et al.*, 2009).

El erizo de mar presenta una amplia distribución geográfica, es abundante, de fácil recolección y puede mantenerse en el laboratorio sin grandes dificultades. Además, la obtención de gametos y su fecundación *in vitro* son sencillas y su desarrollo embrionario es breve, pudiéndose obtener larvas viables en laboratorio en un corto período de tiempo.

La especie *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) llega a ser muy común en Cuba y alcanza densidades elevadas en el sublitoral rocoso por lo que su influencia sobre la comunidad arrecifal debe ser notable (Aguilar, 1981; Beltrán *et al.*, 1988; Álvarez y Angulo, 1995). Además de ser considerada removedor primario de sedimentos y detrito en el mar, desempeñando un papel muy importante en el ciclo de los metales pesados por lo que fuera propuesta como indicadora y centinela de contaminación por petrolero y metales pesados para las costas cubanas (Beltrán *et al.*, 1988 y Ablanado *et al.*, 1990). La especie *Echinometra lucunter* se ha encontrado con buena distribución en arrecifes de litoral norte de la Ciudad de la Habana, Cuba (Nodarse, 2001).

La obtención de gametos y su fecundación *in vitro* son relativamente simples y, debido a la rapidez con que se completa el desarrollo embrionario, pueden obtenerse resultados en un corto período de tiempo. Hoy en día existen distintos protocolos estándar para la evaluación de la toxicidad de lixiviados de sedimentos con distintas especies entre ellos citamos un resumen de protocolo, tabla 4. (Casado-Martínez MC *et al.* 2006e; Garmendia, J.M., *et al* 2009). (Ver Tabla 4)

Los moluscos bivalvos: Estas especies han sido identificadas como indicadores de contaminantes en sedimentos, como por ejemplo *Scrobicularia plana* (Riba *et al.*, 2003, 2004), *Macoma balthica* (Duquesne *et al.* 2004), *Tapes decussatus* (Mariño-Balsa *et al.* 2003). La almeja *Tapes semidecussatus* es un molusco bivalvo que se entierra en sedimentos blandos y que puede soportar un amplio rango de salinidad y temperatura, por lo que presenta la ventaja de poder ser usada para evaluar la toxicidad de sedimentos estuáricos, es fácil de mantener en condiciones de laboratorio y cumple la mayoría de los criterios establecidos para seleccionar especies para realizar ensayos de toxicidad.

La selección de las especies para cada caso de estudio debe hacerse de acuerdo a las circunstancias particulares, pero siempre que se pueda asegurar que los resultados puedan ser utilizados para la toma de decisiones.

Se describe un protocolo desarrollado en la especie *Ruditapes philippinarum* en la tabla 5, desarrollados en laboratorios de España, en un estudio interlaboratorio. (Casado-Martínez MC *et al.* 2006c). (Ver Tabla 5)

La artemia sp.: Dentro de la clase Crustácea se encuentra el género Artemia (Leach, 1819) con diferentes especies utilizadas como organismos de prueba o de referencia en pruebas de toxicidad. Su distribución geográfica es importante y se encuentran distribuidas en más de 500 lagos salinos naturales o salinas de construcción artificial a lo largo de todo el mundo. La artemia es un filtrador no selectivo y se alimenta filtrando materia particulada de origen biológico así como organismos vivos de tamaño apropiado (bacterias y algas microscópicas), se reproduce de dos maneras diferentes; dependiendo de las condiciones ambientales: reproducción ovovivípara (nauplios como descendencia) y reproducción ovípara (quistes o huevos latentes)

La clasificación sistemática de la *Artemia* hasta el nivel de género es dado por Flössner (1972):

- Clase: Crustacea
- Subclase: Branchiopoda
- Super Orden: Anostraca

- Familia: Artemiidae
- Género: *Artemia*

Originalmente la *Artemia salina* ha sido descrita como la única especie dentro del género *Artemia*. Observaciones de un número creciente de nuevas poblaciones descubiertas, dieron pronto origen a un sin número de nombres específicos.

El uso de la artemia se ha extendido en las investigaciones de toxicología aplicada debido a su disponibilidad comercial de quistes secos, los cuales pueden eclosionar en condiciones estandarizadas de un laboratorio de bioensayos de toxicidad (Sogeloos *et al.*, 1987). Las investigaciones ecotoxicológicas con *Artemia* se iniciaron desde 1975 en Bélgica (Sorgeloos *et al.*, 1978, citado en Artoxkit M, 1990) y a pesar de la abundante literatura relacionada con la relación dosis-efecto de un producto químico aplicado a ella, no es hasta 1981 que se desarrolla el primer ensayo estandarizado de ecotoxicología marina: el ensayo ARC, que es un ensayo de 24 y 48 horas para determinar la concentración letal media (CL₅₀) en nauplios de instares II y III. La confiabilidad y precisión de este ensayo fue investigada durante un extenso ejercicio de calibración donde participaron 80 laboratorios americanos y europeos, dando resultados muy satisfactorios (Persoone and Vanhaecke, 1981, citado en Artoxkit M, 1990; Persoone and Wells, 1987).

La artemia tiene una gran importancia en la industria acuícola por sus resultados en la alimentación de larvas de peces y crustáceos (Delbare *et al.*, 1995), pero además ha sido propuesta como un sistema de prueba mundial para medir toxicidad de sustancias químicas y para estudios en el desarrollo de la toxicología (Borowitz and McLaughlin, 1992). Entre los criterios que avalan esta propuesta encontramos que: se puede colectar poblaciones homogéneas de nauplios del instar I metanauplial (fig.3), inmediata caracterización del desarrollo por simples técnicas de medición y demostrar vulnerabilidad diferencial de nauplios durante su desarrollo (Sleet and Brendel, 1985). Se afirma que la artemia cubre ampliamente todos los requisitos de disponibilidad segura, métodos sencillos de obtención, versatilidad y estabilidad en el uso, ya que los nauplios son fáciles de obtener a través de quistes secos que se encuentran disponibles en cualquier parte del mundo (Lavens and Sogeloos, 1996). Por otra

parte, los nauplios son muy tolerantes a diversas condiciones de cultivo, resistiendo incluso manejos bruscos, pueden ser desinfectados, pueden crecer a un tamaño adecuado y ser usados como transportadores de sustancias. La única desventaja, a este respecto, es la variabilidad de la calidad de eclosión que se ha demostrado entre cepas diferentes y entre un mismo lote de quistes (Sorgeloos *et al.*, 1986).

Los ensayos de toxicidad con *Artemia sp.* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, agua de poro y extracciones de sedimentos, entre otros.

En las pruebas de toxicidad con *Artemia sp.* los nauplios de aproximadamente 24 h de edad (Instar II o III) son expuestos a la muestra o compuesto a probar, por un período de 48 h, al término del cual se cuantifica el número de organismos muertos. Con estos resultados se establece la proporción o porcentaje de mortalidad producida. Se describe un protocolo para el bioensayo de toxicidad en la tabla. 6 (González-Lozano *et al.*, 2010). (Ver Tabla 6)

Se han presentado las características más importantes de los bioensayos más estudiados internacionalmente en estudios interlaboratorios para evaluar sedimentos contaminados como una herramienta importante y determinante en los estudios de calidad ambiental de sedimentos marinos y como una de las líneas de evidencias sensibles de la triada de calidad del sedimento para estudios de contaminación y selección de sitios en cultivos marinos.

En este trabajo estamos llamando la atención a la importancia que tiene analizar y establecer desde el punto de vista regulatorio y metodológico el establecimiento de bioensayos de toxicidad en cuanto a la evaluación de la calidad ambiental del sedimento marino y por el impacto que tiene la determinación de la toxicidad en la selección de sitios para el cultivo de especies marinas en la industria pesquera de cada país.

Figura 1. Triada de calidad del sedimento. (Chapman, 1995)



Tabla 1. Parámetros y condiciones del protocolo SPT con la bacteria *Vibrio fischeri*

Parámetros	Condiciones
Facilidades y equipamiento	Fotometro Microtox Analizador, lectura de 490 ± 100 nm; local con temperatura controlada o incubador de $15 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
Solución de reconstitución	Agua pura, no tóxica.
Agua de dilución/control	Diluyente adquirido desde un proveedor comercial o de NaCl 3.5 %.
Temperatura de prueba	$15 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
pH de la muestra, salinidad y turbidez/color	No ajuste o corrección
Aeración	No requerida
Submuestra para contenido de humedad	Tres réplicas de 5 ± 0.2 g seco a $100 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 h
Dilución primaria	7.00 ± 0.05 g total de sedimento homogenizado en 35 ml de agua de dilución en un beaker, mezclar por 10 min. sobre un agitador magnético.
Concentraciones de prueba	Normalmente la concentración de prueba máxima es 197,000 mg/L (19%, vol: peso húmedo) sobre el peso húmedo básico con dos diluciones dobles, para un total de 12 concentración de prueba en tubos de polietileno disponible; cuatro soluciones controles; dejar por 10 min para equilibrar la temperatura de la prueba.
Especies de prueba	Línea estandarizada de <i>Vibrio fischeri</i> ,

	reconstituir girando el vial de tres a cuatro veces, y mezclando 10 veces con pipeta de 0.5 ml y sostener a $5.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 min.
Inoculo	20 μl dentro de cada concentración de prueba, mezclar tres veces con pipeta 1.5 ml.
Incubación	20 min a la temperatura de prueba, filtrar insertando la columna dentro de la cima de los tubos SPT sobre la superficie de las concentraciones de prueba.
Transferir filtrado	500 μl dentro de la cuveta de vidrio disponible a temperatura de prueba.
Observaciones	Niveles de luz de todas las mediciones del control y filtrados de prueba.
Puntos finales	IC50 (mg/L), calculado por Probit (EPA), Normalizado por el contenido de humedad del sedimento.
Tóxico de referencia	Desarrollado dentro de un mes para cada prueba, usando un control positivo y el mismo procedimiento y condiciones para las mediciones de la prueba de toxicidad de sedimento.

Tabla 2. Parámetros y condiciones del protocolo BSPT con la bacteria *Vibrio fischeri*.

Parámetros	Condiciones
Facilidades y equipamiento	Fotometro Microtox Analizador, lectura de 490 ± 100 nm; local con temperatura controlada o incubador de $15 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
Solución de reconstitución	Agua pura, no tóxica.
Agua de dilución/control	Diluyente adquirido desde un proveedor comercial o de NaCl 3.5 %.
Temperatura de prueba	$15 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
PH de la muestra, salinidad y turbidez/color	No ajuste o corrección
Aeración	No requerida
Submuestra para contenido de humedad	Tres replicas de 5 ± 0.2 g seco a $100 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 h
Dilución primaria	7.00 ± 0.05 g total de sedimento homogenizado en 35 ml de agua de dilución en un beaker, mezclar por 10 min. sobre un agitador magnético.
Concentraciones de prueba	Normalmente la concentración de prueba máxima es 99,00 mg/L sobre el peso húmedo básico con dos diluciones dobles, para un total de 12 concentración de prueba; dos soluciones controles; dejar por 10 min para equilibrar la temperatura de la prueba.
Especies de prueba	Línea estandarizada de <i>Vibrio fischeri</i> , reconstituir girando el vial de tres a cuatro veces, y mezclando 10 veces con pipeta de 0.5 ml y sostener a $5.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 min.
Inoculo	10 μl dentro de cada concentración de prueba, mezclar tres veces con pipeta 1.5 ml.
Incubación	500 μl dentro de las cuvetas de vidrio disponibles a la temperatura de la prueba.

Observaciones	Niveles de luz de todas las mediciones del control y concentraciones de prueba.
Puntos finales	IC50 (mg/L), calculado por Probit (EPA), Normalizado por el contenido de humedad del sedimento.
Tóxico de referencia	Desarrollado dentro de un mes para cada prueba, usando un control positivo y el mismo procedimiento y condiciones para las mediciones de la prueba de toxicidad de sedimento.

Tabla 3. Parámetros y condiciones para el bioensayo con crustáceos anfípodos

Parámetro	Condiciones
Tipo de prueba	Estática; sobre sedimento completo
Temperatura	15-20°C
Salinidad	30-40
Fotoperíodo	Natural de la estación, también luz continua
Cámara de prueba	Vidrio, 2 L (Recomendado cilíndrico y tapado)
Volumen de sedimento	250 ml (o 1:4 sedimento: agua)
Volumen de agua	1 L (1:4 sedimento: agua)
Renovación de agua	No
Organismos por vaso	20
Réplicas	5
Régimen de alimentación	No
Aireación	12 h antes de introducir los organismos, para garantizar concentraciones de oxígeno disuelto, igual o mayor de 90 % de saturación.
Calidad del agua	pH, amonio, salinidad y oxígeno disuelto al inicio y al final de la prueba.
Duración de la prueba	10 días
Puntos finales	supervivencia
Aceptabilidad de la prueba	90 % de supervivencia en el control negativo.

Tabla 4. Parámetros y condiciones para el bioensayo con embriones de erizo de mar.

Parámetro	Condiciones
Tipo de prueba	Lixiviado, estático
Temperatura	20°C
Salinidad	30 -40
Fotoperíodo	16 h luz: oscuridad
Cámara de prueba	20 ml
Renovación de agua	No
Organismos por vaso	500
Réplicas	10 para control; 5 para cada muestra
Tratamientos	Muestra + Control
Aireación	Suave por 5 min. Antes de introducir los embriones.
Calidad del agua	Medidas de temperatura, pH, oxígeno disuelto, salinidad
Duración de la prueba	48 horas
Indicador	Éxito en la embriogénesis
Aceptabilidad de la prueba	Al menos, 90% de larvas plúteus bien

Toxicidad de la muestra	desarrolladas en el control Si el éxito del desarrollo larvario en la muestra es significativamente diferente al del control y, además, la muestra presenta una inhibición del éxito superior en 20% o más a la del control.
Objetivo	Evaluar la toxicidad de un sedimento

Tabla 5. Parámetros y condiciones para el bioensayo con moluscos bivalvos.

Parámetro	Condiciones
Tipo de prueba	Estático, sobre sedimento completo
Temperatura	15-20°C
Salinidad	30-40
Fotoperíodo	Natural de la estación; también luz continua.
Cámara de prueba	Vidrio, 5-10 L recomendado tipo acuario
Volumen de sedimento	1.5-2.0 L (1:4 sedimento/agua)
Renovación de agua	No necesario
Tamaño de los organismos	1-2 cm diámetro es recomendado, puede ser mayor.
Organismos por vaso	20
Réplicas	2
Régimen de alimentación	no
Aireación	12 h antes de introducir los organismos, para garantizar la concentración de oxígeno disuelto igual o mayor de 90 % de saturación.
Calidad del agua	Agua de mar limpia, también se puede utilizar artificial.
Duración de la prueba	Aguda, 7-14 días; subaguda 12 y 48 h.
Puntos finales	50 % de los organismos excavados (TE 50 h ⁻¹ , 12-48 h); supervivencia (7-14 días)
Aceptabilidad de la prueba	TE 50 menos de 5 h en control de negativo; 90 % de supervivencia en el control negativo.

Tabla 6. Parámetros y condiciones para el bioensayo de toxicidad con *Artemia sp.* en extractos acuoso de sedimentos marinos.

Parámetro	Condiciones
Tipo de prueba	Estática sin renovación de la soln. de prueba; sobre suspensión de sedimento
Duración de la prueba	48 h
Luminosidad	600 - 1000 Luxes
Fotoperíodo	16 h Luz/8 h oscuridad
Temperatura	25 °C ± 2 °C
Salinidad	30-35
Alimentación	NO
Volumen de los recipientes de prueba	20 ml
Volumen de suspensión de sedimento	10 ml
Agua de dilución	Agua de mar artificial o agua de mar filtrada de calidad.
Concentración nominal de la suspensión del sedimento.	10, 25, 50, 75 y 100 %
Renovación de agua	NO

Número de organismos por réplica	20
Número de réplicas	3
Edad de los organismos (<i>Artemia sp.</i>)	Aprox. \leq 24 h
Estadios de los nauplios en la prueba	Instar II y III
Aireación	NO
Determinaciones físicoquímicas en la prueba.	pH, temp., salinidad y oxígeno disuelto al inicio y al final de la prueba.
Puntos finales	Inmovilidad o mortalidad, LC50 (mg/L), calculado por Probit (EPA).
Tóxico de referencia	$K_2Cr_2O_7$
Criterio de aceptación de la prueba	Supervivencia igual o mayor al 90 % en el grupo control negativo.

Bibliografía

1. Ablanado, N., H, González, M. Ramírez e I. Torres (1990): Evaluación del erizo de mar *Echinometra lucunter* como indicador de la contaminación por metales pesados, Cuba. *Aquat. Living Resour.*, 3: 113- 120.
2. Aguilar, C. (1981): Estudio de la estructura de las comunidades bentónicas en una zona del sublitoral del Norte de La Habana. *Trabajo de Diploma*, Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de la Habana, 29 pp.
3. Alden, R.W. y Butt, A.J. (1987). Statistical classification of the toxicity and polynuclear aromatic hydrocarbon contamination of sediments from a highly industrialized seaport. *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 673-684.
4. Álvarez, L. y J. Angulo (1995): Influencia de un vertimiento de aguas albañales sobre la distribución de algunas especies bentónicas del sublitoral rocoso. *Trabajo de Diploma*, Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de la Habana, 45 pp
5. Artoxkit M. 1990. *Artemia* toxicity screening test for estuarine and marine waters. Standard Operational Procedure. Creasel, Deinze, Bélgica. 22 pp.
6. ASTM. 1991. Standard guide for conducting 10 day static sediment toxicity test with marine and estuarine amphipods. In: Annual Book of ASTM Standard . Vol. 11.04, E 1367-90. American Society of Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 1052-1076.
7. AZUR. 1998. Solid-Phase Test (SPT). AZUR Environmental, Carlsbad, CA, USA.19 pp.
8. Beg, M.U., *et al.*, 2001. Chemical contamination and toxicity of sediment from a coastal area receiving industrial effluents in Kuwait. *Arch. Env. Contam. Toxicol.* 41: 289 – 297.
9. Beltrán, J., I. Ramos, F. Ruiz, R. Mederos y M., Pereiras (1988): El erizo de mar *Echinometra lucunter* como organismo indicador de la contaminación por petróleo. *Revista del Instituto de Investigaciones del Transporte*, 11: 45- 56.
10. Bierman, V.J. 1990. Equilibrium partitioning and biomagnification of organic chemicals in benthic animals. *Environ. Sci. Technol.* 24, 1407-1412.

11. Blanck, H. (1984). Species dependent variation among aquatic organisms in their sensitivity to chemicals. *Ecol. Bull.* 36, 106-119.
12. Boese, B.L., *et al.*, 2000. Phototoxic evaluation of marine sediments collected from a PAH-contaminated site. *Arch. Env. Contam. Toxicol.* 38: 274 – 282.
13. Borowitz, J.L. and J.L. melaughlin (1992): Evidence for calcium channels in brine shrimp: Diltiazem protects shrimp against cadmium. In: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 48 (3): 435-440. Prudue Univ., Sch Phar. And Pharm. Sci., USA.
14. Briggs, A.D., Greenwood, N., Grant, A., 2003. Can turbidity caused by *Corophium volutator* (Pallas) activity be used to assess sediment toxicity rapidly? *Mar. Environ. Res.* 55, 181-192.
15. Burton Jr GA, Norberg-King TJ, Ingersoll CG, Benoit DA, Ankley GT, Winger PV, *et al.* Interlaboratory study of precision: *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* freshwater sediment toxicity assays. *Environ Toxicol Chem* 1996;15(8):1335-43.
16. Cairns, J.Jr. y Mount, D.I. (1990). *Aquatic Toxicology*. *Environ. Sci. Technol.* 24, 154-161.
17. Campisi, T., Abbondanzi, F., Casado-Martínez, C., DelValls, T.A., Guerra, R., Iacondini, A., 2005. Effect of sediment turbidity and color on light output measurement for Microtox Basic Solid-Phase Test. *Chemosphere* 60, 9-15.
18. Carr, R.S. (1996). Sediment quality assessment studies of Tampa Bay, Florida. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1218-1231.
19. Casado-Martínez MC, Beiras R, Belzunce MJ, González-Castromil MA, Marín-Guirao L, Postma JF, *et al.* Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. IV. Whole sediment toxicity test using crustacean amphipods. *Cienc Mar* 2006b; 32: 149-57.
20. Casado-Martínez MC, Blasco J, González-Castromil MA, Riba I, DelValls TA. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. V. Whole sediment toxicity test using juveniles of the bivalve *Ruditapes philippinarum*. *Cienc Mar* 2006c; 32:159-66.

21. Casado-Martínez MC, Buceta JL, Forja JM, DelValls TA. Ejercicio interlaboratorio de bioensayos marinos para la evaluación de la calidad ambiental de sedimentos costeros. I. descripción del ejercicio y calidad de los sedimentos. *Cienc Mar* 2006a; 32:121-8.
22. Casado-Martínez, M.C., N. Fernández, J. Lloret, A. Marín, C. Martínez-Gómez, I. Riba, R. Beiras, L. Saco-Álvarez, T.A. Del Valls, 2006e. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. III. Bioassay using embryos of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Ciencias Marinas*, 32(1B): 139-147.
23. Casado-Martínez MC, Campisi T, Días A, Lo Re R, Obispo R, Postman JF, Riba I, Sneekes AC, Buceta JL, DelValls TA. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. II. Bioluminescence inhibition test for rapid sediment toxicity assessment. *Cien Mar* 2006d; 32: 129-38.
24. Cesar, A. *et al.*, (2002). Sensitivity of Mediterranean amphipods and sea urchins to reference toxicants. *Cienc. Mar.* 28: 407-417.
25. Chapman, P. M., 1995. Extrapolating laboratory toxicity results to the field. *Environmental toxicology and Chemistry* 14, 927-930.
26. Chapman, P. M., *et al.* (1991) Evaluation of effects associated with an oil platform, using the sediment quality triad. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10, 407-424.
27. Chapman, P.M & Hollert, H. 2006. Should Sediment Quality Triad Become a Tetrad, a Pentad or possibly even a Hexad? *J Soil & Sediments* 6 (1), p 4-8.
28. Chapman, P.M. 1989. Review: current approaches to developing sediment quality criteria. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 589-599.
29. Chapman, P.M. 2007. Determining when contamination is pollution – Weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environmental International* 33: 492-501.
30. Chapman, P.M. y Long, E.R. (1983). The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 14, 82-84.
31. Clark, J.R. (1989). Field studies in estuarine ecosystems: A review of approaches for assessing contaminant effects In: *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*: 12: ASTM STP 1027 (Eds. U.M. Cowgill y L.R. Williams), pp. 120-133. ASTM, Philadelphia.

32. Delbare, D., P. Lavens and P. Sorgeloos (1995). Clownfish as a reference model for nutritional experiments and determination of egg/larval quality. In: Larvi'95-Fish and Shellfish larviculture symposium. P. Laven, E. Jaspers and I. Roelants (Eds), (24): 22-25. Gent, Belgium.
33. DiToro, D.M., *et al.*, (1990). Toxicity of cadmium in sediments: The role of acid volatile sulfide. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1487-1502.
34. Duquesne, S. *et al.*, (2004). Sublethal effects of metal exposure: Physiological and behavioral responses of the estuarine bivalve *Macoma balthica*. *Mar. Environ. Res.* 58: 245-250.
35. Environment Canada. 1992. Biological test method: Acute test for sediment toxicity using marine and estuarine amphipods. Rep. EPS 1/RM/26. Environmental Protection, conservation and Protection. Ottawa, Ontario.
36. Fernández, N., 2002. Evaluación biológica de la contaminación marina costera mediante bioensayos con embriones del erizo de mar *Paracentrotus lividus*. Tesis doctoral. Universidad de Vigo. España. 211 pp.
37. Garmendia, J.M., I. Menchaca, M.J. Belzunce, M. Revilla, (2009). Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Revista de Investigación Marina*. 11: 25 pp
38. González-Lozano MC *et al.*, (2010). Evaluation of toxicity of polluted marine sediments from Bahía Salina Cruz, Mexico. *Journal of Environmental Science and Health Part A*: 45, 121-127.
39. Hair, J.D. (1986). The challenges for toxic management. *Environ. Toxicol. Chem.* 5, 605-607.
40. Ingersoll CG. 1995. Sediment toxicity test. In: Rand GM, editor. *Fundamentals of aquatic toxicology*. 2nd Ed. Washington DC: Taylor & Francis. p 231-255.
41. Jiménez, J.A., 2001. Sedimentos marinos contaminados y alternativas de actuación con énfasis en la técnica de recubrimiento. Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona, España. 322 pp.

42. Lavens, P and P. Sorgeloos (1996). Manual on the production and use of line food for aquaculture. Artemia Reference Center. Unive. Gent, Belgium. 380 pp.
43. Lawrence, J. (1975): On the relationships between marine plants and sea urchins. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 13: 213- 286.
44. Lima-Cazorla *et al.*, 2005. Niveles de plomo, zinc, cadmio y cobre en el río Almendares, Ciudad Habana, Cuba. *Rev. Int. Contam. Amb.* 21: 115-124.
45. Long, E.R. and Chapman, P.M. (1985) A sediment quality triad: measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound. *Marine Pollution Bulletin* 16, 405-415.
46. Luoma, S.N., *et al.* 1990. Effects of trace metals on aquatic benthos. In: *Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications* (Eds. M. Newman & A. McIntosh) pp. 261-300. CRC Press. Boca Raton.
47. Luoma, S.N., HO, K.T. (1998). Appropriate Uses of Marine and Estuarine Sediment Bioassays. In: Callow P. *handbook of Ecotoxicology*. Ed. Blackwell Science. Oxford. Pp. 193-226.
48. Mariño-Balsa, J.C. *et al.*, (2003). Assessment of the toxicity of sediment and seawater polluted by the Prestige fuel spill using bioassays with clams (*Venerupis pullastra*, *Tapes decussates* and *Venerupis rhomboideus*) and microalga *Skeletonema costatum*. *Cienc. Mar.* 29: 115-122.
49. Meador, J.P., *et al.*, 1990. An analysis of the relationship between a sanddollar embryo elutriate assay and sediment contaminants from stations in an urban embayment of Puget Sound, Washington. *Mar. Environ. Res.* 30, 251-272.
50. Melzian, B.D. (1990). Toxicity assessment of dredged materials: Acute and chronic toxicity as determined by bioassays and bioaccumulation tests. In: *Proceedings of the Int. Seminar on the Environmental Aspects of Dredging Activities* (Eds C. Alzieu & B. Gallenne), pp.49-64. Nantes, France.

51. Nodarse, K.A. (2001). Abundancia y distribución del erizo *Echinometra lucunter* (Linnaeus), (Echinodermata, Echinoidea) en un arrecife del litoral Norte de ciudad de la habana. Rev. Invest. Mar. 22(2):107-115.
52. Riba I, DelValls TA, Forja JM, Gómez-Parra A. 2003. Comparative toxicity of sediment from a mining spill using two amphipods species: *Corophium volutator* (Pallas, 1776) and *Ampelisca brevicornis* (A. Costa, 1853). Bull Environ Contam Toxicol .; 71: 1061-8.
53. Riba, I. et al., (2004). Sediment quality in the Atlantic coast of Spain. Environ. Toxicol. Chem., 23: 271-282.
54. Ricci M, Bercaru O, Morabito R, Brunori C, Ipolyi I, Pellegrino C, et al. Critical evaluation of interlaboratory comparisons for PAHs and pesticides in organic standard solutions in support of the implementation of the water framework directive. Trends Anal Chem 2007; 26(8):818-27.
55. RIKZ, (1999). The 10d marine amphipod *Corophium volutator* mortality sediment toxicity test.. Standard Operating Procedure Nr: SPECIE-01. National Institute for Coastal and Marine Management (RIKZ), 17 pp.
56. Ringwood, A.H. et al., (1997). Interpretation of microtox solid phase toxicity test: The effects of sediment compositions. Environ. Toxicol. Chem. 16: 1135-1140.
57. Salamanca, M. J. et al. (2009). Improved sea-urchin embryo bioassay for in situ evaluation of dredged material. Ecotoxicology, 18:1051-1057.
58. Schindler, D.W. (1987). Detecting ecosystem responses to anthropogenic stress. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44, 6-25.
59. Sleet, R.B. and K. Brandel (1985). Homogeneous population of artemia nauplio and their potential use for "in vitro" testing in developmental toxicology in: Teratology in: teratog. Carcinog. Mutag. 5(1): 41-54. Inst. Toxicol. USA.
60. Sorgeloos, P., et al., (1986). Manual para cultivo y uso de artemia en acuicultura. Documento de campo. No.10. Univ. Gent, Belgica, 301 pp.
61. Sorgeloos, P. et al., (1987). Artemia research and it applications. Morphology, genetics. Strain characterization, toxicology. Universa Press. Belgium. 300 pp.

62. Stronkhorst, J. 2003. Ecotoxicological effects of Dutch harbour sediments. The development of an effects-based assessment framework to regulate the disposal of dredged material in coastalwaters of the Netherlands. PhD Thesis, Vrije universiteit.
63. Swartz, R.C. (1987). Toxicological methods for determining the effects of contaminated sediment-bound Chemical in Aquatic Systems. (Eds. K.L. Dickson, A.W. Maki y W.A. Brung). Ch.14. Pergamon Press, New York.
64. Swartz, R.C., *et al.* (1990) Toxicity of fluoranthene in sediment to marine amphipods: A test of the equilibrium partitioning approach to sediment quality criteria. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1071-1080.
65. Thompson, B.E. *et al.*, (1989). Chronic effects of contaminated sediments on the urchin *Lytechinus pictus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 629-637.
66. US Environmental Protection Agency (EPA). US Army Corps of Engineers Technical Committee on Criteria for Dredged and Fill Material (1977) Ecological Evaluation of Proposed Discharge of Dredged Material into Ocean Waters: Implementation Manual for Section 103 of Public Law 92-532. Environmental Effects Laboratory , US Army Water-ways Experiment Station, Vicksburg, Mississippi.
67. US.EPA.(1994). Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipod. United States Environmental Protection Agency. EPA/600/R-94/025.

Recibido: 03/09/10

Aceptado: 04/09/10