

EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE RESIDUOS ORGÁNICOS

TOXICOLOGICAL EVALUATION OF ORGANIC RESIDUES

Eduardo de la Peña de Torres y Óscar Herrero Felipe

Laboratorio de Genotoxicología y Mutagénesis Ambiental. Departamento de Agroecología. Centro de Ciencias Medioambientales. CSIC.

RESUMEN

Se reseña el empleo de los ensayos de corta duración para la caracterización de los residuos orgánicos, en especial de algunos de los métodos de evaluación toxicológica, mutagénica, genotóxica y citotóxica (*Vibrio fischeri*, *Salmonella typhimurium* y *Allium cepa*) que son empleados en la caracterización de lixiviados de mezclas complejas ambientales. Estos métodos forman parte, junto a otros bioensayos, de la valoración por identificación toxicológica (VIT), que permite la valoración de otros tipos de efectos ecotoxicológicos: a) inhibición de la bioluminiscencia en *Vibrio fischeri*; b) tasa de germinación y longitud de las raíces en *Lepidum sativum*; c) longitud de las raíces en *Allium cepa* y *Tradescantia sp.*; d) inhibición de la movilidad en *Daphnia magna*; y e) anomalías en el desarrollo en *Oryzias latipes*, o pez medaka. Todos estos ensayos forman parte de la batería de bioensayos empleada en la UE, que se aplican para discriminar y seleccionar las matrices ambientales que deben ser objeto de una específica caracterización química más compleja.

Se hace una revisión de los métodos de evaluación toxicológica que se emplean en la caracterización de los compuestos o las mezclas complejas, así como de la utilización de sus resultados en la evaluación del riesgo para el ser humano y el medio ambiente. Esta evaluación consta, en síntesis, de la identificación de los peligros, la evaluación de la relación dosis-respuesta, la valoración de la exposición y la caracterización del riesgo, con el consecuente análisis, manejo y comunicación del mismo. Se destaca de alguno de estos bioensayos el alto valor predictivo que tiene sobre la carcinogenicidad de un producto.

Se indica la utilidad y oportunidad de emplear los ensayos de corta duración a la hora de evaluar sustancias, productos y mezclas de sustancias, lo que contribuiría a un incremento en el conocimiento toxicológico de un mayor número de sustancias. Ésta

ABSTRACT

It is pointed out the importance of short term assays for the characterization of organic residues, specially some methods for toxicological, mutagenic, genotoxic and cytotoxic evaluation (*Vibrio fischeri*, *Salmonella typhimurium* and *Allium cepa*), used in the characterization of environmental complex mixtures lixiviates. These methods take part together with other bioassays in the evaluation by toxicological identification (VIT), which allows the evaluation of other ecotoxicological effects: a) bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*; b) germination and root length of *Lepidum sativum*; c) root length of *Allium cepa* and *Tradescantia sp.*; d) inhibition of the mobility of *Daphnia magna*; and e) abnormalities in the development of *Oryzias latipes*, or medaka fish. All these assays take part in the EU battery of bioassays, applied to discriminate and select between those environmental matrixes which must be subject to more complex and specific chemical characterizations.

We make a review of the methods for toxicological evaluation, used for the characterization of chemical compounds or complex mixtures, as well as the use of its results for the human and environmental risk assessment. This evaluation consists, in short, of the identification of dangers, evaluation of dose-response ratio, evaluation of exposure and risk characterization, resulting in the analysis, use and communication of this risk. It is emphasized the high predictive value for carcinogenicity of some of these bioassays.

It is shown the utility of short term assays for the evaluation of substances, products and complex mixtures, which would contribute to improve the toxicological knowledge of a greater number substances. This is a vital need in the EU, due to the lack of complete toxicological information of about the 70% of the 106.000 existing and used substances.

Correspondencia: Eduardo de la Peña de Torres. Laboratorio de Genotoxicología y Mutagénesis Ambiental. Dpto. de Agroecología. Centro de Ciencias Medioambientales. CSIC. C/Serrano 115 dpdo. 28006 Madrid. epena@ccma.csic.es

es una necesidad imperiosa en la UE, dada la carencia de datos toxicológicos completos del 70% de las 106.000 sustancias ya existentes y empleadas.

Se destaca el gran valor que los ensayos de mutagenicidad representan dentro de las pruebas toxicológicas de nivel básico, que se emplean en la evaluación de las sustancias nuevas y existentes. También con ello se contribuye a un mejor conocimiento del elevado número de las sustancias con datos toxicológicos incompletos. Otro aspecto a considerar de estos métodos es que son una alternativa a la experimentación animal, cumpliendo con ello uno de los requisitos básicos que establece la nueva política sobre sustancias en la UE, que se denomina y reconoce como REACH (acrónimo de registro, evaluación y autorización de sustancias químicas), parte fundamental de la estrategia europea sobre medio ambiente y salud (SCALE).

PALABRAS CLAVE: Residuos. Toxicidad. Ecotoxicidad. Fitotoxicidad. Mutagenicidad. Genotoxicidad. Citotoxicidad. VIT. SCALE. REACH.

INTRODUCCIÓN

La utilización de los residuos orgánicos en la agricultura (lodos, material compostado, etc.) es una práctica muy usual en España, dada la carencia en materia orgánica que tienen la mayoría de los suelos españoles, siendo por ello empleados como enmiendas orgánicas en la práctica agrícola. Desde hace tiempo se realiza la caracterización de estos residuos y tradicionalmente se viene valorando la presencia de metales pesados, pero esta valoración y su sensibilidad no son las mismas con respecto a los productos químicos contaminantes orgánicos, cuya carga o presencia en estas enmiendas prácticamente se desconoce.

Es un hecho que los problemas de medio ambiente se acaban transformando en problemas de salud (Martí-Boscà, 2004)¹, lo que nos lleva a considerar de máxima prioridad la evaluación toxicológica de los productos químicos presentes en los residuos orgánicos.

El objetivo de este trabajo es hacer una llamada de atención a la necesidad de una evaluación toxicológica de los residuos que entran dentro de la valoración, de forma previa a su uso. "Es mejor conocer que un compuesto no tiene un efecto tóxico, que ignorar si un compuesto tiene un efecto tóxico". La utilización de una batería de bioensayos permite valorar el efecto tóxico de una matriz ambiental o mezcla compleja, sin necesidad de conocer qué sustancias o compuestos están presentes, que sólo podría conocerse a través de una estricta, compleja y costosa caracterización química (Carballo et al., 2002²; Aguayo et al., 2004³; de la Peña 2004⁴).

La Ley de Residuos (Ley 10/1998)⁵, de 21 de abril, establece en el anexo I el sistema de identificación de

It is emphasized the great value that mutagenicity assays represent inside the toxicological tests in the basic level, which are used in the evaluation of new and existing substances. It also helps to improve the knowledge about substances with incomplete toxicological data. Another aspect to consider about these methods is that they represent an alternative to animal experimentation, carrying out one of the basic requirements that the EU establishes in the new policy about substances, which is known as REACH, the acronym of record, evaluation and authorization of chemical substances. This policy is a basic part of the European strategy on environment and health (SCALE).

KEYWORDS: Residues. Toxicity. Ecotoxicity. Phytotoxicity. Mutagenicity. Genotoxicity. Cytotoxicity. VIT. SCALE. REACH.

residuos tóxicos y peligrosos, que permite clasificar los residuos en base a sus características potencialmente peligrosas, mediante el código H. Así, describe estas características con un sistema alfanumérico, con la letra H y un número correlativo del 1 al 14 (por ejemplo: H6 - Tóxico, H7 - Cancerígeno, H11 - Mutagénico, y H14 - Ecotóxicos).

El Real Decreto 363/1995⁶ establece las características de las sustancias mutagénicas y cancerígenas, señala el conjunto de pruebas toxicológicas y, de entre ellas, las utilizadas para clasificar a los residuos, que son las mismas que se aplican a las sustancias químicas peligrosas. Este decreto sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, establece los criterios y características que van a permitir clasificarlos como tóxicos y peligrosos.

La Orden de 13 de octubre de 1989⁷, por la que se determinan los métodos de caracterización de los residuos tóxicos y peligrosos, en su anexo, especifica que un residuo se identificará con el código H si cumple alguna de las siguientes condiciones:

- Contener productos cancerígenos o probablemente cancerígenos, de acuerdo con el IARC, con una concentración igual o superior al 0,01%.
- Se considerarán sustancias cancerígenas, mutagénicas y tóxicas para la reproducción (teratogénicas) las así definidas en el Real Decreto 2216/1985⁸, por el que se aprueba el Reglamento sobre declaración de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas, y que en su anexo III relaciona el listado de sustancias con riesgos específicos (el Real Decreto 725/1988 y la Orden de 7 de septiembre de 1988, modifican al Real Decreto 2216/1985 y actualizan los anexos técnicos del mismo).

- Presentar, en conejo, una toxicidad DL50 para dosis oral igual o inferior a 2000 mg/Kg o una toxicidad DL50 por contacto con la piel para una dosis de 400 mg/Kg; o, en rata, una toxicidad CL50 por inhalación para una dosis de 2 mg/1/4 horas.
- Que los lixiviados obtenidos según alguno de los métodos de lixiviación descritos en el apéndice III de este anexo presenten una CL50 a concentración inferior o igual a 750 mg/l, o inferior a 3000 mg/l, según los bioensayos homologados de inhibición de la movilidad en *Daphnia magna*^a y de la bioluminiscencia en *Vibrio fischeri*^b respectivamente.

En la Comunidad de Madrid, la Ley 10/1993, de 26 de octubre⁹, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento, tiene como fin proteger las instalaciones de saneamiento, los recursos hidráulicos y, por tanto, el medio ambiente y la salud de las personas. Establece los métodos analíticos para el análisis de los vertidos, contemplando los estudios de toxicidad que deben emplearse para valorar los efectos adversos, siendo éstos los mismos bioensayos de luminiscencia y de toxicidad aguda, en *V. fischeri* y *D. magna* respectivamente.

Los resultados obtenidos mediante estos bioensayos determinan la necesidad de llevar a efecto una caracterización química exhaustiva de los diferentes analitos de las muestras, mucho más compleja y costosa, ya que al tratarse de muestras complejas y con variabilidad estacional podrían poseer un marcado potencial tóxico y genotóxico, representando un riesgo tanto para el hombre como para el medio ambiente.

Existen trabajos que estudian la relación ecotóxica y genotóxica en otros países con condiciones climáticas muy diferentes, por lo que proponemos la evaluación conjunta de la ecotoxicidad y la genotoxicidad de los residuos orgánicos. Por un lado, el estudio en paralelo de la actividad tóxica con dos bioensayos (*Vibrio fischeri* y *Daphnia magna*), y genotóxica en *Salmonella*, permite controlar la posible descontaminación de los residuos a causa de los tratamientos térmicos o de otra índole a los que son sometidos de forma previa a su potencial utilización agrícola, que comprenden la valoración de los residuos sólidos urbanos y de los lodos de depuradoras. Por otro lado, el seguimiento de la toma de medidas paliativas contribuye a la conservación del medio natural, de gran relevancia para la salud humana.

La evaluación ecotóxica y genotóxica que aplicamos al estudio de los residuos orgánicos se lleva a cabo mediante los bioensayos de valoración de la ecotoxicidad, con los métodos anteriormente descritos, y la valoración de los efectos genotóxicos con *S. typhimurium* y *Allium cepa* (Barrueco et al., 1999)¹⁰.

La evaluación genotóxica y mutagénica es una de las tres piezas fundamentales de la evaluación toxicológica de las sustancias químicas (de la Peña et al., 1995¹¹ y 1999¹²; Barrueco et al., 1999¹⁰; Herrero y de la Peña, 2005¹³). En este último trabajo se muestran los

ensayos reconocidos por la IARC en sus monografías, utilizados en la evaluación del riesgo cancerígeno para el hombre dado el alto valor predictivo de los datos de genotoxicidad y mutagenicidad sobre la carcinogenicidad de las sustancias y productos químicos.

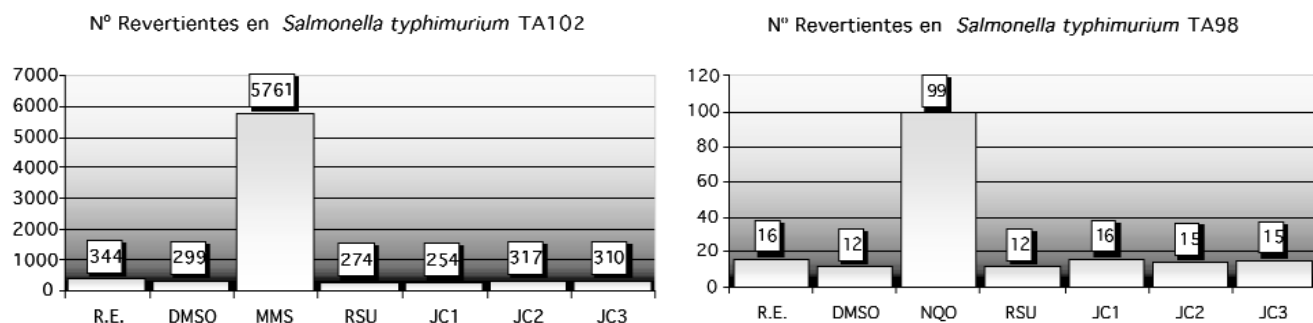
Actualmente, la manera óptima de llevar a cabo una evaluación toxicológica es, inicialmente, mediante baterías de bioensayos de corta duración, que permiten obtener resultados de distintos estudios en un corto espacio de tiempo y, por tanto, reducir el coste de dicho estudio. Además, en caso de que alguna de las pruebas no sea concluyente por sí misma, se pueden complementar con otros bioensayos (*Daphnia magna*, *Artemia salina*, *Chlorella vulgaris*, *Oryzias latipes*) con el objetivo de llegar a una determinación toxicológica y ecotoxicológica precisa (Herrero et al., 2005¹⁴; de la Peña y Gómez, 2005¹⁵).

Son varios los autores que indican que una evaluación toxicológica se puede realizar mediante distintos ensayos con procariotas (Shen et al., 2003)¹⁶, con células vegetales (Monarca et al., 2003¹⁷; Knasmüller et al., 2003¹⁸), con células de mamífero (Lu et al., 2002)¹⁹ o mediante la combinación de cualquiera de ellos (Biscardi et al., 2003)²⁰. Ello permite afinar al máximo a la hora de determinar las características toxicológicas de una mezcla compleja, como son las muestras de tipo medioambiental (Rams et al., 1997)²¹.

Según el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, los bioensayos con plantas son unos de los más sensibles a la hora de detectar efectos genotóxicos de agentes medioambientales y pueden servir como una primera alerta ante la presencia de riesgos medio ambientales en aguas, suelos y aire (Sanz et al., 1980)²². Entre ellos se encuentran los bioensayos con *Allium cepa* y *Tradescantia* sp. (Hazen, 1999²³; de la Peña et al., 2005²⁴), recomendados y reconocidos por la EPA en el Programa Internacional de Seguridad Química (Sandhu et al., 1994)²⁵. Los bioensayos de ecotoxicidad se integran en la evaluación del riesgo ecotóxico de los productos químicos sobre el medio ambiente (Koëter, 1995)²⁶.

El borrador del nuevo proyecto de Real Decreto^c –Cartera de Servicios Básicos y Comunes del Sistema Nacional de Salud– propone para la protección y promoción de la sanidad ambiental: 1) Vigilancia y evaluación de riesgos ambientales para la salud; y 2) Identificación y evaluación del riesgo para la salud inducido por agentes físicos, químicos o biológicos, mediante el diseño, implantación y desarrollo de programas de intervención orientados a disminuir los riesgos para la salud relacionados con las siguientes acciones que están relacionadas con el objeto de este trabajo y que son de nuestro interés:

- Contaminación del agua ligada a actividades humanas: agua de consumo humano, zonas de baño continentales y marítimas, piscinas y otros usos recreativos del agua, aguas mineromedicinales y reutilización de aguas residuales depuradas.



Figuras I y II. Se muestran resultados obtenidos con distintos tipos de residuos de depuradoras en los ensayos con las cepas TA 98 y TA102 de *S. typhimurium*, para la valoración de varias enmiendas orgánicas aplicadas en los cultivos agrícolas (Herrero O., Fernández J.M., Hernández D., Montes P., Polo A., de la Peña E. *Evaluación mutagénica y ecotoxicológica de muestras de residuos de depuradora de utilidad en agronomía*, Actas de la XIV Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental SEMA, Oviedo, 2005: 38)¹⁴.

- Toxicología y seguridad química: actividades relacionadas con el uso de biocidas y la clasificación, envasado y etiquetado de sustancias y preparados químicos.
- Contaminación del suelo.
- Vivienda y entornos saludables; alojamientos turísticos.

Se promueve la protección de la sanidad ambiental mediante la puesta en marcha de programas de intervención intersectoriales orientados a disminuir, paliar o evitar los riesgos para la salud relacionados con las aguas de consumo y continentales, la contaminación del suelo, los residuos, y los productos químicos. Remarcamos la importancia de evaluar el efecto adverso de los compuestos presentes en dichos residuos, mediante una evaluación de la presencia de contaminantes, dada la repercusión que estos contaminantes en enmiendas agrícolas puede tener en la contaminación de suelo.

Estas acciones se suman a las actuaciones que se vienen llevando adelante en la Unión Europea mediante la nueva estrategia sobre productos químicos del Libro Blanco (UE, 2001)²⁷ y la puesta en marcha del Programa de Registro, Evaluación, Autorización, Sustitución y Restricción de los Productos Químicos (REACH), donde se propone una política de reducción de los animales de ensayo mediante la aplicación de las 3 R. Sin olvidar el programa SCALE, enmarcado en el Programa de Salud y Medio Ambiente de la OMS.

METODOLOGÍAS

Los lixiviados, o diluciones acuosas, obtenidos de un producto o residuo permiten conocer analíticamente la concentración de las sustancias tóxicas que el residuo contiene (caracterización), pudiendo así determinar de forma previa su toxicidad mediante la realización de distintos bioensayos.

1. Ensayo de mutación reversa con

Salmonella/microsoma, o Test de Ames

El ensayo de *Salmonella typhimurium* permite medir la reversión de *his⁻* a *his⁺* de las cepas TA100, TA102, TA104 y TA98, deficientes para la histidina, inducida

por sustancias químicas. Asimismo, permite detectar mutaciones de sustituciones de bases C-G y A-T y mutaciones de desplazamiento de la lectura (Maron y Ames, 1983²⁸; Barrueco et al., 1991²⁹). El ensayo se realiza con y sin activación metabólica, utilizando el sobrenadante de la fracción microsomal de animales tratados con un inductor enzimático.

La evaluación genotóxica se realiza mediante el método de *Salmonella/microsoma*, o test de Ames, empleando el ensayo cualitativo en disco y/o el ensayo cuantitativo en placa, métodos descritos por Ames et al. (1975)³⁰ y Maron y Ames (1983)²⁸. Hemos utilizado estos ensayos en la evaluación de plaguicidas (Barrueco et al., 1989³¹, 1991²⁹ y 1999³⁰; de la Peña et al., 1995¹¹; Guadaño et al., 1998³²; de la Peña, 2004³³; Herrero et al., 2005³⁴) (figuras I y II).

2. Ensayo de *Allium cepa*

El ensayo se realiza mediante el estudio en los meristemas radiculares de bulbos de *Allium cepa*, cuando las raíces alcanzan una longitud de 15-20 mm. En ese momento se analizan las metafases, observando el número de intercambios de cromátidas hermanas (Hazen, 1999)²³. También permite analizar otros parámetros:

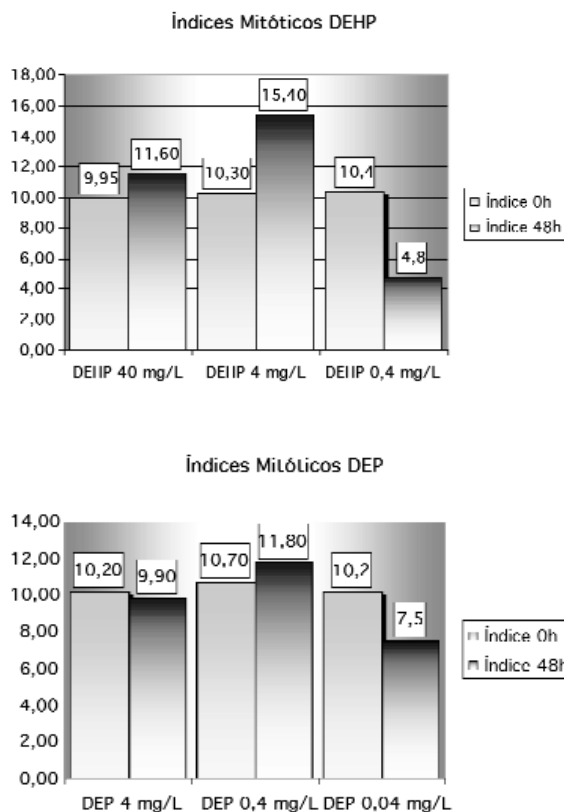
- 1) inhibición del crecimiento radicular (cálculo de CE50, concentración a la que se inhibe el crecimiento de la raíz en un 50%);
- 2) índice mitótico (efectos sobre la división de células meristemáticas), y
- 3) índice de anafases y telofases anómalas (consecuencia de efectos graves en el huso mitótico) (figuras III y IV).

3. Ensayo de *Tradescantia sp*

Se valora el crecimiento longitudinal de las raíces, los intercambios de cromátidas hermanas, el índice mitótico y el índice de ana-telofases anómalas, al igual que en ensayo de *Allium cepa* (figuras V y VI).

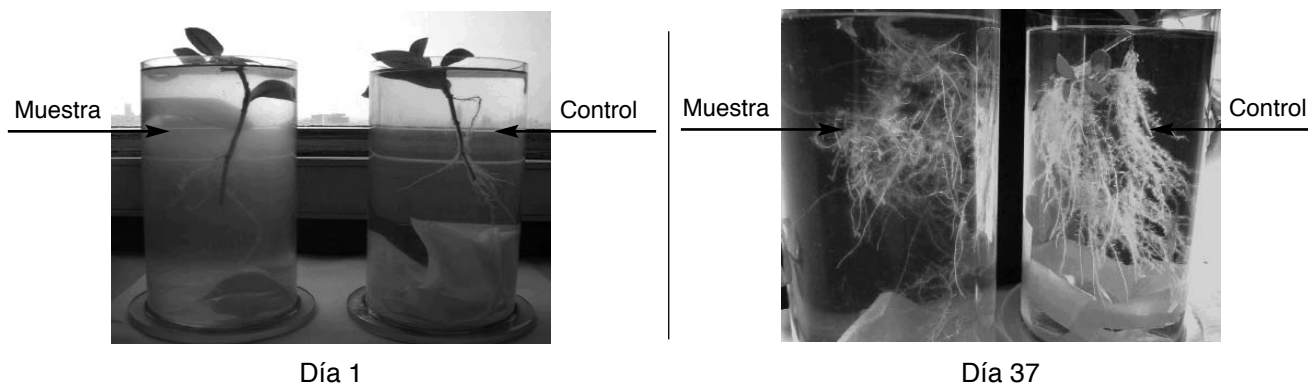
4. Ensayo de inhibición de la luminiscencia en *Vibrio fischeri*

Con el método Microtox®, se comprueba el poten-



Figuras III y IV. Evaluación de los efectos citotóxicos de ftalatos (DEHP y DEP) mediante la valoración del índice mitótico en el ensayo con células meristemáticas de *Allium cepa* (Herrero O., Aguayo S., de la Torre A., Carballo M., Muñoz M.J., Hazen M.J., de la Peña E. *Estudio de los efectos mutagénicos, genotóxicos y ecotóxicos del dietil ftalato, el Di(2-etilhexil)ftalato y sus mezclas*. Actas XIII Reunión Científica de la SEMA, Universidad S.E.K, Segovia, 2004: 61)³⁵.

cial citotóxico y genotóxico de una muestra (Dizer et al., 2002)³⁶ mediante las bacterias luminiscentes marinas, gram(-) y anaerobias facultativas (*Vibrio fischeri*, antes denominada *Photobacterium phosphoreum*). Éstas se comercializan liofilizadas y tienen la propiedad de generar luz fría mediante procesos metabólicos. La relación entre la bioluminiscencia y los procesos metabólicos de las bacterias permite detectar



Figuras V y VI. Efecto cualitativo de un residuo sólido sobre el crecimiento de dos plantas de *Tradescantia sp.* (de la Peña, E. Ponencia Marco: Evaluación del riesgo medioambiental. residuos orgánicos. II Encuentro Internacional de Gestión de Residuos Orgánicos, Universidad de Navarra, 28-29 de Octubre, 2004)³⁴.

cualquier limitación del metabolismo bacteriano a causa de agentes tóxicos y calcular la CE_{50} (concentración a la cual disminuye en un 50% la luminiscencia de las bacterias, medida de su mortalidad) (figura VI).

El procedimiento del test de fotobacterias está basado en la determinación de la influencia de una serie de diluciones de la muestra en la luminiscencia de las bacterias. Dichas diluciones se ponen en contacto con las fotobacterias y, tras incubar a 15 °C durante 30 minutos, se determina el valor final más o menos disminuído de lumiscencia. Paralelamente se mide la luminiscencia de las bacterias como preparación control.

El mecanismo de producción de luz en estos microorganismos es el resultado de la interacción del enzima luciferasa, oxígeno y la forma reducida del mononucleótido de Flavina. Esta reacción bioquímica parte del sistema de transporte de electrones de la cadena respiratoria y la emisión de luz depende de este flujo de electrones. La emisión de luz es una forma de liberación de energía como resultado del metabolismo del organismo (DIN 38412 parte 34; AFNOR T-90-320).

5. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia final de compuestos orgánicos en medio acuoso determinando la demanda de oxígeno en un respirómetro cerrado

Método para la evaluación, en medio acuoso, de la biodegradabilidad final de los compuestos orgánicos y de las aguas residuales a una concentración dada, bajo la acción de microorganismos aerobios y mediante la determinación de la demanda de oxígeno en un respirómetro cerrado. Se realiza el seguimiento de la degradación durante un período de 28 días, determinando el consumo de oxígeno.

La cantidad de oxígeno consumida por el compuesto orgánico se expresa como porcentaje de la demanda teórica de oxígeno (DTO), calculada a partir de la fórmula del compuesto, o bien como porcentaje de la demanda química de oxígeno (DQO).

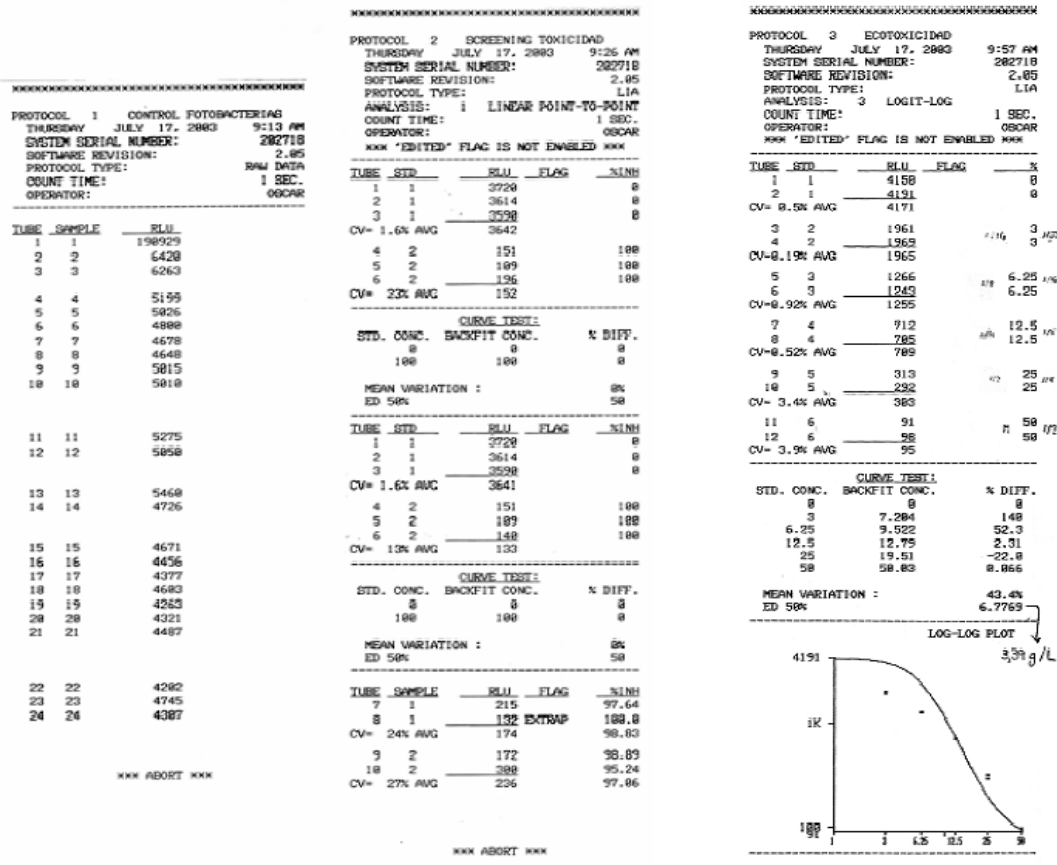


Figura VI. Muestra del efecto sobre la inhibición de la luminiscencia de *Vibrio fischeri* (de la Peña E., Ponencia Marco: Evaluación del riesgo medioambiental. residuos orgánicos. II Encuentro Internacional de Gestión de Residuos Orgánicos, Universidad de Navarra, 28-29 de octubre, 2004)³⁴.

6. Determinación de la respiración microbiana

Este método sirve para determinar la respiración microbiana del suelo mediante el cálculo del consumo de oxígeno, añadiendo o no un sustrato. De esta forma, se pueden analizar los efectos del producto sobre el metabolismo de los microorganismos.

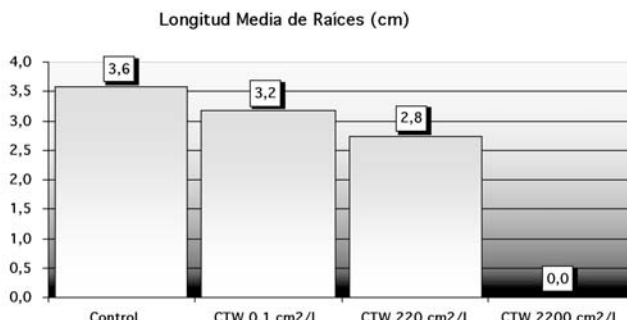
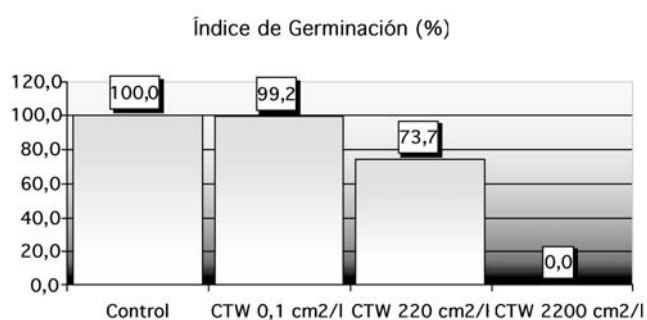
7. Test de Zucconi

Se realiza con semillas de *Lepidum sativum* (berro), cultivado en oscuridad durante seis días. Transcurrido ese tiempo, se observa el efecto que sobre la germinación y el crecimiento radicular tienen las

fracciones acuosas de un producto a estudio (figuras VII y VIII).

8. Ensayo de Toxicidad Aguda con *Daphnia magna* S

Ensayo de ecotoxicidad que utiliza como organismo de prueba el microcrustáceo *Daphnia magna Straus*. Se basa en determinar la concentración de la muestra que en 24 y 48 horas inmoviliza al 50% de las *Daphnia magna*, expuestas bajo unas determinadas condiciones. Se consideran inmovilizados los organismos que son incapaces de desplazarse durante



Figuras VII y VIII. Efecto sobre el índice de germinación y longitud de las raíces de *Lepidum sativum* (De la Peña E., Herrero O., Aguayo S., de la Torre A., Carballo M., Muñoz M. J., Fernández J.M., Hernández D., Montes P. y Polo A. *Valoración Toxicológica de Matrices Ambientales*, Revista Brasileira de Toxicologia 18 (suplemento outubro), 2005: 224)²⁴.

los 15 segundos siguientes a una ligera agitación del recipiente.

En una serie de recipientes se realizan diferentes diluciones y se colocan 10 individuos de *Daphnia magna* en cada uno de ellos. La serie problema tendrá siempre su correspondiente control. Al final del test de 24 y 48 horas, se calcula el porcentaje de inmovilización para cada concentración, relacionado con el número total de individuos de *Daphnia magna* usado, y se determina la concentración eficaz inhibitoria: concentración de muestra que inhibe la movilidad del 50% de los organismos de prueba expuestos a ensayo a las 24 y 48 horas de contacto.

Las poblaciones de *Daphnia magna* deben tener una edad de más de 6 y menos de 24 horas al comienzo del ensayo (ISO 6341) (Gascó et al., 1997)³⁸.

9. Ensayo de Toxicidad en *Orizyas latipes*

Se observan las alteraciones en el desarrollo embrionario de los huevos del pez medaka, dada la transparencia del corión, lo que facilita el seguimiento del citado desarrollo embrionario de un modo no invasivo. Esta característica ha hecho del pez medaka un modelo ideal para su aplicación en los estudios de efectos adversos de compuestos (Gonzalez-Doncel, 2000³⁹; Gonzalez-Doncel et al., 2003⁴⁰, 2005⁴¹).

De las figuras IX a la XI se muestra la simplicidad de este modelo, que nos permite observar cómo la total transparencia del corión permite un seguimiento del desarrollo embrionario. El atlas de dicho desarrollo se presentó en la memoria de tesis doctoral del Dr. González-Doncel.

El empleo del conjunto de los bioensayos que hemos descrito es una contribución neta a la aplicación de las 3 R, que en la nueva política sobre los productos químicos (REACH) queda como una de las principales recomendaciones en pro de la aplicación y el desarrollo de los métodos alternativos a la experimentación con animales, lo que venimos desarrollando desde hace algunos años (de la Peña et al., 1995⁴² y 1999^{12,44}; Gascó et al., 1997⁴³; de la Peña y Guadaño, 2000⁴⁵).

Todo lo expresado pone de manifiesto la necesidad de un control de los efectos adversos de los compuestos orgánicos, que están presentes en los residuos o derivados de los mismos y que se vienen aplicando como enmiendas orgánicas en la agricultura. Éstos son fruto de la política de valorización de los residuos y, en particular, de la actual y creciente eliminación del compostaje de los residuos sólidos urbanos y del constante incremento de los lodos de depuradora mediante el continuo y creciente empleo de los mismos en la agricultura como forma de eliminación por el denominado "sistema de valorización". Esto se pone de manifiesto en el Perfil Ambiental 2004, del Ministerio de Medio Ambiente (MMA, 2005)⁴⁶. Sorprenden los datos del informe sobre la situación de las basuras en Espa-

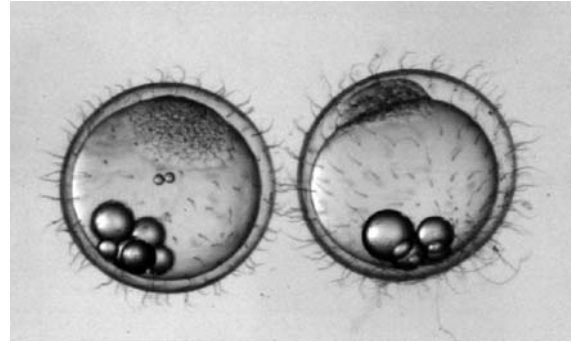


Figura IX. Estadio 5 del desarrollo embrionario del pez medaka, perteneciente al Atlas de la embriogénesis de *Oryzias latipes*, del trabajo de la memoria de tesis doctoral⁴ (González-Doncel, 2000)³⁹.

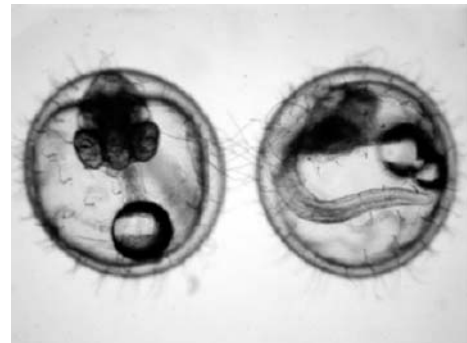


Figura X. Estadio 29 de la embriogénesis del pez medaka, perteneciente al seguimiento de los estadios del desarrollo embrionario en *Oryzias latipes* (González-Doncel, 2000)³⁹.

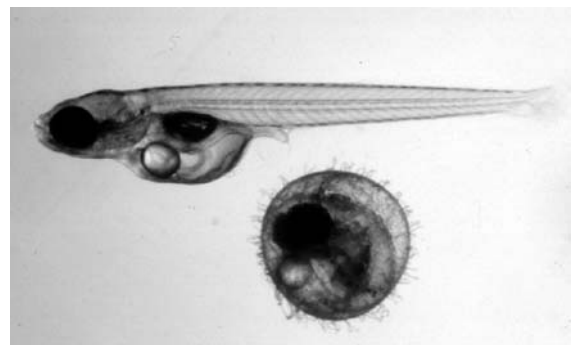


Figura XI. Pez medaka (*Oryzias latipes*) al final de su embriogénesis (Gonzalez-Doncel, 2000)³⁹.

ña, donde se indica que apenas se recicla el 11% de las basuras y que su generación se ha incrementado de 1,06 a 1,38 kilos de basura diaria, lo que incumple el Plan Nacional de Residuos 2000-2006 (Greenpeace, 2005).

Una revisión de toda la legislación sobre residuos está recogida en la tabla I.

CONCLUSIONES

El empleo de los residuos orgánicos como enmienda orgánica de los suelos sin una estimación de la potencial toxicidad de los compuestos orgánicos presentes en los mismos, sin un planteamiento sistemático de una escueta caracterización y desconociendo su posible efecto ecotoxicológico adverso, pone de manifiesto la necesidad creciente de que debemos plantearnos la siguiente afirmación: es mejor conocer que un compuesto no presenta un efecto tóxico, que ignorar si un compuesto presenta un efecto tóxico. Por ello debe ser una exigencia la valorización de los residuos urbanos y de los lodos de depuradora, como paso previo al uso agrícola de los residuos como enmiendas orgánicas.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Dr. José Vicente Martí Boscà por sus comentarios para la edición de este artículo, al Dr. Miguel González-Doncel por la cesión de las figuras correspondientes al atlas de la embriogénesis del medaka, de su tesis doctoral, y a Dña. Antonia Martínez López, ayudante diplomada de investigación, por su colaboración.

NOTAS

^aBioensayo de Inhibición: Toxicidad aguda en *D. magna* sobre la inhibición de la movilidad. En el mismo se considera que un residuo es tóxico si los lixiviados presentan una CL50 inferior o igual a 750 mg/litro.

^bBioensayo de Bioluminiscencia. Ensayo de luminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*). De acuerdo con el mismo se considera que un residuo es tóxico si los lixiviados presentan una EC50

Tabla I*. Normativa básica sobre residuos.

Área	Normas básicas	Observaciones
Traslado fronterizo	Convenio de Basilea	El convenio tiene por objeto reducir el volumen de los intercambios de residuos para proteger la salud humana y el medio ambiente, estableciendo un sistema de control de las exportaciones e importaciones de residuos peligrosos y de su eliminación.
Estrategia y normas integradas	Estrategia comunitaria de gestión de residuos <ul style="list-style-type: none"> • Comunicación de la Comisión - COM (96) 399. • Resolución del Consejo de 24/2/97 (97/C 76/01). • Comunicación de la Comisión - COM (2003) 301. • Directiva 2000/53/CE relativa a los vehículos al final de su vida útil. • Directiva 2002/95/CE sobre restricciones a la utilización de determinadas sustancias peligrosas en aparatos eléctricos y electrónicos. • Ley 16/2002 sobre prevención y control integrados de la contaminación 	
Gestión de los residuos	<ul style="list-style-type: none"> • Ley 10/98 de Residuos. • Ley 11/97 de Residuos de Envases. • R. D. 833/88 aprueba Reglamento Residuos Tóxicos y Peligrosos • R. D. 952/97 modifica R.D. 833/88. • R. D. 782/98 Reglamento de Envases y Residuos de Envases. • R. D. 9/2005 sobre suelos contaminados. • R. D. 1310/90 regula utilización de lodos en agricultura. 	
Tratamiento de los residuos	<ul style="list-style-type: none"> • R. D. 653/2003 sobre incineración de residuos. • R. D. 1481/2001 regula la eliminación de residuos mediante depósito en vertedero. • R. D. 1383/2002 sobre gestión de vehículos al final de su vida útil. • R. D. 208/2005 sobre aparatos eléctricos y electrónicos y la gestión de sus residuos. • Orden de 13 de Junio de 1990 que modifica la Orden de 28 de febrero de 1989. • R. D. 1378/99 medidas para la eliminación y gestión de PCBs y PCTs y aparatos que los contengan 	
Planificación de la gestión	<ul style="list-style-type: none"> • Planes nacionales • Planes autonómicos 	

* La situación de las basuras en España. Febrero 2006. Greenpeace 2006. 65 pp.

(15 minutos, 15 °C) inferior o igual a 3000 mg/l).

°Aportaciones de la Sociedad Española de Sanidad Ambiental (SESA), para ayudar a definir y catalogar los servicios y prestaciones de salud pública en general y de salud ambiental en particular (08/02/06).

“Tesis doctoral del Dr. Miguel Gonzalez Doncel, titulada *El pez medaka (Orizias latipes) como modelo para la evaluación del riesgo de contaminantes ambientales: método de fertilización in vitro*, realizada en el Centro Nacional de Sanidad Ambiental CNSA, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda; bajo la dirección de los Dres. Carmen Barrueco Fernández Cuervo CNSA/ISCIII y Eduardo de la Peña de Torres CCMA/CSIC; defendida en la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid (2000)³⁹.

BIBLIOGRAFÍA

- Martí-Boscà J.V. El medio ambiente y su impacto en la salud. *Gac. Sanit.*, 2004, 18 (Supl 1) 221.
- Carballo M., Aguayo S., Roset J., de la Peña E., de la Torre A. y Muñoz M.J. Valoración de las aguas residuales mediante procedimientos analíticos y biológicos. *Rev. salud ambient.*, 2002, 1: 32-38.
- Aguayo S., Muñoz M.J., de la Torre A., Roset J., de la Peña E. y Carballo M. Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents. *Scienc. Total Environ* 2004; 328: 69-81.
- De la Peña E., Herrero O., Aguayo S., de la Torre A., Carballo M. y Muñoz M.J. Evaluation of the Mutagenic Effects of Urban and Industrial Waste Water in The Canary Islands (Spain). *Proceedings of the 34th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS)*, Maastricht, Holanda, 2004: 122.
- Ley de Residuos (Ley 10/1998), de 21 de abril, por la que se establece el sistema de identificación de residuos tóxicos y peligrosos (BOE núm. 96, 22/ 4/98).
- Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo de 1995, por el que se regula la notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas (BOE núm. 133, 5/6/95).
- Orden de 13 de octubre de 1989, sobre residuos tóxicos y peligrosos, por la que se determinan los métodos de caracterización de los residuos tóxicos y peligrosos (BOE núm. 10/11/89).
- Real Decreto 2216/1985, por el que se aprueba el reglamento sobre declaración de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas (BOE núm. 27/09/85).
- Comunidad de Madrid, Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento (BOCM 12.11. 93).
- Barrueco C., Guadaño A., Caballo C., Herrera A., Valcarce E. y de la Peña E. Evaluación mutagénica y genotóxica de los productos químicos. En: “Evaluación Mutagénica y Genotóxica”. E. de la Peña, I. Burguete, A. Guadaño (eds.). DGICYT, MRCIA98-SEMA, Madrid, 1999: 271-288.
- De la Peña E., Barrueco C., Herrera A. and Caballo, C. Genotoxic and cytotoxic effects of pesticides. In: “Cell Biology in Environmental Toxicology”. Cajaraville M.P. (ed.). Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco, Leioa., 1995): 289-299.
- De la Peña E., Burguete I. y Guadaño A. (eds.). “Evaluación Mutagénica y Genotóxica”. DGICYT, MRCIA98-SEMA, Madrid, 1999), 308 pp.
- Herrero O. y de la Peña E. Evaluación de Mutagenicidad y Genotoxicidad. En: de la Peña E. y Gómez E. (eds.) “Toxicología Ambiental: Seguridad Química”, Asociación Española de Toxicología, CD-ROM, Madrid, 2005.
- Herrero O., Fernández J.M., Hernández D., Montes P., Polo A., de la Peña E. Evaluación mutagénica y ecotoxicológica de muestras de residuos de depuradora de utilidad en agronomía. *Actas de la XIV Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental (SEMA)*, Universidad de Oviedo, 2005: 38.
- De la Peña E. y Gómez E. *Toxicología Ambiental: Seguridad Química*. Edita: Asociación Española de Toxicología. CR-ROM, Madrid, 2005.
- Shen L., Wu J., Lin G.F., Shen J.H., Westendorf J. y Huehnerfuss H., The mutagenic potentials of tap water samples in Shanghai. *Chemosphere* 52 (9), 2003: 1641- 1646.
- Monarca S., Rizzoni M., Gustavino B., Zani C., Alberti A., Feretti D. y Zerbini I.. Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using in situ plant tests. *Environ Mol Mutagen* 2003, 41 (5), 353-359.
- Knasmüller S., Majer B.J. y Grulmmt T. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in soils and in the aquatic environment. En: “From Hazard to Risk”. *Proceeding European Environmental Mutagen Society, 33rd Annual Meeting*. Aberdeen, Scotland, UK (2003), 46.
- Lu W.Q., Chen X.N., Yue F., Jenter C., Gminski R., Li X.Y., Xie H. y Mersch-Sundermann V. Studies on the in vivo and in vitro mutagenicity and the lipid peroxidation of chlorinated surface (drinking) water in rats and metabolically competent human cells. *Mutation Research* 2002, 513 (1-2), 151-157.
- Biscardi D., Monarca S., De Fusco R., Senatore F., Poli P., Buschini A., Rossi C., y Zani, C. Evaluation of the migration of mutagens/carcinogens from PET bottles into mineral water by tradescantia/micronuclei test, comet assay on leukocytes and GC/MS. *Sci Total Environ* 2003, 302 (1-3), 101-108.
- Rams M.A., Gascó P., Pastor A., Ortega A., Martínez M.A., Piga J. y Sancho M. “Estudio químico-toxicológico de 55 muestras de vertidos, relacionadas con presuntos delitos ecológicos (P-57). En: “Resúmenes del 1er Congreso Ibérico sobre Contaminación y Toxicología Ambientales”. Universidad de Coimbra. Coimbra, 1995: 177.
- Sanz F., Salas J., Martín J., Caballo C., García-Lorente A., Martín M., Santa-María A., Barea M. y de la Peña E. Evaluación mutagénica de aguas de río contaminadas con colorantes textiles mediante el test de *Escherichia coli*. *Bol. Cent. Nac. Alim. Nutri.*, 1980, 1: 11-14.
- Hazen, M.J. Las células vegetales como sistema de ensayo para la evaluación de compuestos fotoactivos. En: “Evaluación Mutagénica y Genotóxica”. de la Peña E., Burguete I., Guadaño A. (eds.). DGICYT, SEMA-MRCIA98, Madrid, 1999: 271-288.
- De la Peña E., Herrero O., Aguayo S., de la Torre A., Carballo M., Muñoz M.J., Fernández J.M., Hernández D., Montes P. y Polo A. Valoración toxicológica de matrices ambientales, *Revista Brasileira de Toxicología* 18 (suplemento outubro), 2005: 224.
- Sandhu S.S., de Serres F.J., Gopalan H.N., Grant W.F., Veleminsky J. y Becking G.C. Environmental monitoring for genotoxicity with plant systems. An introduction

- and study design. *Mutation Research* 310 (2), 1994: 169-173.
26. Koëter H.B.W.M. International harmonization of test methods for hazard characterisation taking into account animal welfare issues. In: "ICLAS/CSIC Working Group on Complementary Methods" de la Peña E., Guadaño A., Barrueco C., Repetto G., González F. y García P. (coeds). 19 Comité Español del ICLAS/CICYT/CSIC, Dirección Gral. Investigación Científica y Técnica, Centro de Salud Pública, Talavera de la Reina (España), 1995: 33-34.
 27. Comisión de las Comunidades Europeas (2001). Libro Blanco. Estrategia para la futura política en materia de sustancias y preparados químicos. Bruselas, 27. 2. 2001 COM (2001) 88 final.
 28. Comisión de las Comunidades Europeas (2003). Estrategia europea de medio ambiente y salud. Bruselas, 11.6.2003 COM (2003) 338 final.
 29. Maron D.M. and Ames B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 1983, 113: 173-215.
 30. Barrueco C., Herrera A. y de la Peña E. Mutagenic evaluation of trichlorfon using different assay methods with *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis* 6, 1991: 71-76.
 31. Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 1975, 31: 347-364.
 32. Barrueco C. y de la Peña E. Mutagenic evaluation of pesticides captan, folpet, captafol, dichlofuanid and related compounds with the mutant TA102 and TA104 of *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis*, 1989, 3: 467-480.
 33. Guadaño A., González-Coloma A. y de la Peña E. Genotoxicity of insecticide Rotenone in culture of human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 1998, 414: 1-7.
 34. De la Peña E. Evaluación del riesgo medioambiental. Residuos orgánicos. Ponencia Marco II Encuentro Internacional de Gestión de Residuos, Universidad de Navarra, 28-29 de Octubre, 2004.
 35. Herrero O., Aguayo S., de la Torre A., Carballo M., Muñoz M.J. y de la Peña E. Valoración ecotoxicológica de efluentes de aguas residuales urbanas e industriales. *Rev. salud ambient.* 5 (1), 2005: 69-70.
 36. Herrero O., Aguayo S., de la Torre A., Carballo M., Muñoz M.J., Hazen M.J. y de la Peña E. Estudio de los efectos mutagénicos, genotóxicos y ecotóxicos del dietil ftalato, el Di(2-etilhexil) ftalato y sus mezclas. Actas XIII Reunión Científica de la SEMA, Universidad S.E.K., Segovia, 2004: 61.
 37. Dizer H., Wittekindt E., Fischer B. and Hansen P.D. The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents as determined by bioluminescence, umu-assays and selected biomarkers. *Chemosphere* 2002, 46 (2): 225-233.
 38. Gascó P., Rams M.A., Piga J., Pastor A., Azparren J., Acedo C. y Sancho, M. Toxicity assessment of complex mixtures. *Pharmacol. Toxicol.*, 1997, 80 (Sup. 3): 84.
 39. González-Doncel M. El pez medaka (*Oryzias latipes*) como modelo para la evaluación del riesgo de contaminantes ambientales: método de fertilización in vitro. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid (12 de junio 2000).
 40. González-Doncel M., de la Peña E., Barrueco C. and Hinton D.E. Stage sensitivity of Medaka (*Oryzias latipes*) eggs and embryos to permethrin. *Aquatic Toxicology*, 2003, 62: 255-268.
 41. González-Doncel M., Okihiro M.S., Villalobos M.S. and Hinton D.E. A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrianichthyidae). *Journal App. Ichthyology*, 2005, 21: 39-46.
 42. De la Peña E., Guadaño A., Barrueco C., Repetto G., González Menció F. and García Partida P. (coeds). ICLAS/CSIC Working Group on Complementary Methods. ISBN 84-605-4232-7. Comité Español del ICLAS/CICYT/CSIC, Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Centro de Salud Pública, Talavera de la Reina (Toledo, España), 1995, 101 pp.
 43. Gascó P., Barrueco C. y Guadaño A. Conclusiones de la Reunión para el Desarrollo y la Coordinación con ECVAM de los Grupos Españoles interesados en Métodos Alternativos. Glaxo Wellcome S.A. 21 pp.
 44. De la Peña E., Guadaño A. y Repetto G. Métodos alternativos y métodos complementarios en experimentación animal. En: "Introducción a la experimentación y protección animal". Pérez-García C.C., Díez Prieto I. y García Partida P. (eds.). León, Universidad de León, 1999: 215-223.
 45. De la Peña E. and Guadaño A. Evolution and coordination of the alternative methods in Spain. *Science Total Environ.*, 2000, 247: 333-335.
 46. Agencia Europea de Medio Ambiente. Medio Ambiente en Europa. Tercera Evaluación. Informe de evaluación ambiental. Ministerio de Medio Ambiente, 2004.
 47. La situación de las basuras en España Greenpeace (ed.). Madrid, 2005.