

AVISO de consulta pública de los proyectos de normas mexicanas PROY-NMX-AA-012/1-SCFI-2009, PROY-NMX-AA-012/2-SCFI-2009, PROY-NMX-AA-087-SCFI-2009, PROY-NMX-AA-093-SCFI-2009, PROY-NMX-AA-117/1-SCFI-2009, PROY-NMX-AA-117/2-SCFI-2009, PROY-NMX-AA-153-SCFI-2009 y PROY-NMX-AA-154-SCFI-2009.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Economía.- Subsecretaría de Competitividad y Normatividad.- Dirección General de Normas.- Dirección de Normalización.

AVISO DE CONSULTA PUBLICA DE LOS PROYECTOS DE NORMAS MEXICANAS QUE SE ENLISTAN

La Secretaría de Economía, por conducto de la Dirección General de Normas, con fundamento en lo dispuesto por los artículos 34 fracciones XIII y XXXI de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 51-A, 51-B de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización y 19 fracciones I y XV del Reglamento Interior de esta Secretaría, publica el aviso de consulta pública de los proyectos de normas mexicanas que se enlistan a continuación, mismos que han sido elaborados y aprobados por el Comité Técnico de Normalización Nacional de Medio Ambiente y Recursos Naturales (COTEMARNAT).

De conformidad con el artículo 51-A de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, estos proyectos de normas mexicanas, se publican para consulta pública a efecto de que dentro de los siguientes 60 días naturales los interesados presenten sus comentarios al Comité Técnico de Normalización Nacional de Medio Ambiente y Recursos Naturales (COTEMARNAT) que los propuso, ubicado en Boulevard Adolfo Ruiz Cortines número 4209 piso 5, colonia Jardines en la Montaña 14210, México, D.F., o al correo electrónico pedro.sanchez@conagua.gob.mx con copia a esta Dirección General, dirigida a la dirección descrita en el párrafo siguiente.

El texto completo del documento puede ser consultado gratuitamente en la Dirección General de Normas de esta Secretaría, ubicada en Puente de Tecamachalco número 6, Lomas de Tecamachalco, Sección Fuentes, Naucalpan de Juárez, 53950, Estado de México o en el Catálogo Mexicano de Normas que se encuentra en la página de Internet de la Dirección General de Normas cuya dirección es <http://www.economia.gob.mx>.

CLAVE O CODIGO	TITULO DE LA NORMA
PROY-NMX-AA-012/1-SCFI-2009	ANALISIS DE AGUA-DETERMINACION DEL OXIGENO DISUELTO-METODO DE PRUEBA-PARTE 1-METODO IODOMETRICO (CANCELARA A LA NMX-AA-012-SCFI-2001).
Síntesis Este proyecto de norma mexicana tiene como objetivo describir el método iodométrico para la medición del oxígeno disuelto en agua por el "Procedimiento Winkler" modificado a fin de tener en cuenta ciertas interferencias. Este proyecto de norma es de aplicación nacional y el campo de aplicación del método es para todo tipo de agua que tenga una concentración de oxígeno disuelto de al menos 0,2 mg/L, hasta el doble de la saturación de oxígeno (aproximadamente 20 mg/L), la cual está libre de sustancias interferentes. NOTA 1: Interfieren Sustancias orgánicas fácilmente oxidables tales como taninos, ácido húmico y ligninas. Compuestos de azufre oxidables tales como sulfuros y tiourea también interfieren, como sistemas de respiración activa los cuales fácilmente consumen el oxígeno. En presencia de tales sustancias es preferible el uso del método electroquímico especificado en B.1. Concentraciones de nitritos superiores a 15 mg/L no interfieren en la medición porque son destruidos por la adición de la azida de sodio. Si la oxidación o reducción de sustancias está presente, es necesario hacer modificaciones al método; éstas son descritas en la sección 9. Si está presente materia suspendida, capaz de fijar o consumir el yodo, el método debe ser aplicado con la modificación descrita en el anexo, pero es preferible el uso del método electroquímico.	
PROY-NMX-AA-012/2-SCFI-2009	ANALISIS DE AGUA-DETERMINACION DEL OXIGENO DISUELTO EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS-METODO DE PRUEBA-PARTE 2-METODO ELECTROQUIMICO (CANCELARA A LA NMX-AA-012-SCFI-2001).
Síntesis 1.1 El objetivo de este proyecto de norma mexicana es establecer un método electroquímico para la medición del oxígeno disuelto en agua por medio de una celda electroquímica la cual está aislada de la muestra por una membrana permeable al gas. Es de aplicación nacional. 1.2 El campo de aplicación del presente proyecto de norma está definido dependiendo del tipo de prueba empleada, la medición puede ser hecha como concentración de masa de oxígeno en miligramos por litro, porcentaje de saturación (% de oxígeno disuelto) o ambos. El método mide el oxígeno en el agua desde un 0% hasta un 100% de saturación. Sin embargo, muchos instrumentos permiten	

mediciones de valores mayores al 100% i.e. sobresaturación.	
1.3 El método es apropiado para mediciones hechas en campo y para monitoreo continuo de oxígeno disuelto así como mediciones hechas en el laboratorio. Este método es el preferido para aguas muy coloreadas y turbias y asimismo para aguas conteniendo fierro y sustancias que fijen el yodo, tales como las que interfieren en el método iodométrico y que están indicadas en B.1. Los gases y vapores tales como el cloro, dióxido de azufre, sulfuro de hidrógeno, aminas, amoníaco, dióxido de carbono, bromo y yodo que se pueden difundir a través de la membrana, si están presentes, pueden interferir afectando la medición. Otras sustancias presentes en la muestra pueden interferir con el proceso de medición ya sea por obstrucción o deterioro de la membrana o corrosión de los electrodos. Estas sustancias incluyen solventes, aceites, sulfuros, carbonatos y algas. 1.4 El método es apropiado para aguas naturales, residuales y salinas. Si es empleado en aguas salinas tales como agua marina, o de estuario, es esencial la corrección por salinidad.	
PROY-NMX-AA-087-SCFI-2009	ANÁLISIS DE CALIDAD DEL AGUA-EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA CON <i>Daphnia magna</i> , Straus (Crustácea-Cladocera)-MÉTODO DE PRUEBA (CANCELARA A LA NMX-AA-087-1995-SCFI).
Síntesis El presente proyecto de norma mexicana establece el método para la medición de toxicidad aguda, utilizando al organismo dulceacuícola <i>Daphnia magna</i>, Straus 1820 (Crustácea-Cladocera). Este método es aplicable para la evaluación de toxicidad aguda en aguas y en sustancias solubles en agua. En cuerpos de agua dulce, aguas residuales industriales y municipales, efluentes agrícolas y sustancias puras o combinadas disolubles o lixiviados y la fracción solubilizable en suelos y sedimentos. Es de aplicación nacional.	
PROY-NMX-AA-093-SCFI-2009	ANÁLISIS DE AGUA-DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA-MÉTODO DE PRUEBA (CANCELARA A LA NMX-AA-093-SCFI-2000).
Síntesis Este proyecto de norma mexicana es de aplicación nacional y especifica un método para la medición de la conductividad eléctrica en todos los tipos de agua. NOTA 1: En algunos casos, los valores absolutos son importantes, en otros casos sólo los cambios relativos son de interés. Este proyecto de norma es aplicable para aguas naturales, residuales y residuales tratadas.	
PROY-NMX-AA-117/1-SCFI-2009	ANÁLISIS DE AGUA-MEDICIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (HTP) EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS-MÉTODO DE PRUEBA-PARTE 1-MÉTODO POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJO (CANCELARA A LA NMX-AA-117-SCFI-2001).
Síntesis Este proyecto de norma mexicana es de aplicación nacional y especifica un método de prueba para la determinación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. El intervalo de trabajo del método es de 0,1 mg/L a 40 mg/L y puede ser extendido por dilución del extracto de la muestra. El campo de aplicación es aguas naturales, aguas residuales y aguas residuales tratadas. El método no es aplicable a la medición cuantitativa del contenido de aceites minerales volátiles. Sin embargo, sobre el espectro de referencia, se puede obtener la información cualitativa y la composición de la contaminación por aceite mineral.	
PROY-NMX-AA-117/2-SCFI-2009	ANÁLISIS DE AGUA-MEDICIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (HTP) EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES Y RESIDUALES TRATADAS-MÉTODO DE PRUEBA-PARTE 2-MÉTODO POR CROMATOGRFIA DE GASES (CANCELARA A LA NMX-AA-117-SCFI-2001).
Síntesis Este proyecto de norma mexicana especifica un método para la medición del índice de hidrocarburos del petróleo en aguas por medio de cromatografía de gases. Es de aplicación nacional. El campo de aplicación es aguas naturales, aguas residuales y aguas residuales tratadas y permite la medición de un índice de hidrocarburos del petróleo en concentraciones por encima de 0,1 mg/L. El método no es aplicable a la medición cuantitativa del contenido de aceites minerales volátiles. Sin embargo, sobre el cromatograma y de los picos de referencia, se puede obtener la información cualitativa y la composición de la	

contaminación por aceite mineral.	
NOTA 1 La concentración total de la grasa animal y vegetal en la muestra no debe exceder de 150 mg/L, ya que con valores más altos la capacidad de adsorción del empaque de la columna de limpieza puede ser insuficiente. NOTA 2 En el caso de agua residual altamente contaminada, especialmente si contiene una alta cantidad de agentes tensoactivos, podría ocurrir una pérdida en la recuperación de los hidrocarburos.	
PROY-NMX-AA-153-SCFI-2009	ANALISIS DE AGUA-MUESTREO-GUIA PARA EL MUESTREO DE AGUAS SALINAS.
Síntesis Este proyecto de norma es de aplicación nacional y proporciona las guías sobre los principios a ser aplicados para el diseño de los programas de muestreo, técnicas de muestreo y el manejo y preservación de muestras de agua salina y salinas interiores epicontinentales, de zonas de marea (por ejemplo, estuarios, regiones costeras y el mar abierto, etc.). No aplica a la recolecta de muestras para análisis microbiológicos o biológicos. Para la guía general de muestreo véase A.4.	
PROY-NMX-AA-154-SCFI-2009	ANALISIS DE AGUA-DETERMINACION DE NITROGENO DE NITRITOS EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES, RESIDUALES TRATADAS Y MARINAS-METODO DE PRUEBA.
Síntesis Este proyecto de norma mexicana es de aplicación nacional y especifica un método de prueba espectrofotométrico para la determinación de nitrógeno de nitritos. El método es aplicable en aguas naturales, residuales, residuales tratadas incluyendo, el agua de mar y efluentes en un intervalo de (0,01 a 1) mg/L de N-NO₂.	

México, D.F., a 28 de junio de 2010.- El Director General de Normas, **Francisco Ramos Gómez**.- Rúbrica.



PROYECTO DE NORMA MEXICANA

PROY-NMX-AA-087-SCFI-2009

**ANÁLISIS DE CALIDAD DEL AGUA - EVALUACIÓN DE
TOXICIDAD AGUDA CON *Daphnia magna*, Straus
(Crustacea - Cladocera) - MÉTODO DE PRUEBA
(CANCELA A LA NMX-AA-087-1995-SCFI)**

**WATER QUALITY ANALYSIS–ACUTE TOXICITY EVALUATION
WITH *Daphnia magna*, Straus (Crustacea – Cladocera)
TEST METHOD**



PREFACIO

En la elaboración del presente proyecto de norma mexicana, participaron las siguientes empresas e instituciones:

- ANÁLISIS DE AGUA, S.A. DE C.V.
- ARVA, LABORATORIO DE ANÁLISIS INDUSTRIALES, S.A. DE C.V.
- ATLATEC, S.A. DE C.V.
- CENICA
- CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO EN ELECTROQUÍMICA, S.C.
- CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA
- CIATEC, A.C.
- COMISIÓN DEL AGUA DEL ESTADO DE MÉXICO
- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA.
- CONTROL QUÍMICO NOVAMANN INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- ECCACIV, S. A. DE C. V.
- ENTIDAD MEXICANA DE ACREDITACIÓN, A.C.
- FASIQ INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- GRUPO ECOTEC, S.A. DE C.V.
- HACH COMPANY
- INDEX-LAB



- INTEMA, S.A. DE C.V.
- INSTITUTO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE TAMAULIPAS, A.C.
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA EN SANEAMIENTO
AMBIENTAL (CITSA)
- INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO
- INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA
- LABORATORIO DE CALIDAD QUÍMICA VERACRUZANA, S.C.
- LABORATORIO DE QUÍMICA DEL MEDIO E INDUSTRIAL, S.A. DE
C.V.
- LABORATORIO IDECA, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO FERMI, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO QUÍMICO INDUSTRIAL
- LABORATORIO SERVICIOS AMBIENTALES
- LABORATORIOS ABC QUÍMICA, INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS, S.A.
DE C.V.
- MERCURY LAB, S.A. DE C.V.
- MÓNICA OROZCO MÁRQUEZ
- PERKIN ELMER DE MEXICO, S.A.
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO CANGREJERA
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO MORELOS
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO PAJARITOS
- PROTECCIÓN AMBIENTAL Y ECOLOGÍA, S.A. DE C.V.



- PROYECTOS Y ESTUDIOS SOBRE CONTAMINACIÓN INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE AGUA Y DRENAJE DE MONTERREY, S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE INGENIERÍA Y CONSULTORÍA AMBIENTAL
- SISTEMA DE AGUAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO DEL GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Ciencia y Tecnología Ambiental.
- UNIVERSIDAD DEL NORESTE, A.C.
UNELAB - Centro multidisciplinario de servicios ambientales y de alimentos
- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Química
Instituto de Biología
Instituto de Ingeniería

ÍNDICE DEL CONTENIDO

Número de Capítulo	Página
1	OBJETIVO
2	CAMPO DE APLICACIÓN
3	PRINCIPIO
4	REFERENCIAS
5	DEFINICIONES
6	EQUIPO Y MATERIALES
7	REACTIVOS
8	MUESTREO
9	PROCEDIMIENTO
10	EXPRESIÓN DE RESULTADOS
11	INFORME DE LA PRUEBA
APÉNDICES NORMATIVOS	
A	Condiciones ambientales para el cultivo y mantenimiento de organismos de <i>Daphnia magna</i>
B	Medios para el cultivo de algas con fines de alimentación de cultivos de <i>Daphnia magna</i> .
C	Lavado de material y cristalería
12	VIGENCIA
13	BIBLIOGRAFÍA
14	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
APÉNDICE INFORMATIVO	



PROYECTO DE NORMA MEXICANA

PROY-NMX-AA-087-SCFI-2009

ANÁLISIS DE CALIDAD DEL AGUA - EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA CON *Daphnia magna*, Straus (Crustacea - Cladocera) - MÉTODO DE PRUEBA- (CANCELA A LA NMX-AA-087-1995-SCFI)

WATER QUALITY ANALYSIS–ACUTE TOXICITY EVALUATION WITH *Daphnia magna*, Straus (Crustacea – Cladocera) TEST METHOD

1 OBJETIVO

La presente Norma Mexicana establece el método para la medición de toxicidad aguda, utilizando al organismo dulceacuícola *Daphnia magna*, Straus 1820 (Crustacea – Cladocera).

2 CAMPO DE APLICACIÓN

Este método es aplicable para la evaluación de toxicidad aguda en aguas y en sustancias solubles en agua. En cuerpos de agua dulce, aguas residuales industriales y municipales, efluentes agrícolas y sustancias puras o combinadas disolubles o lixiviados y la fracción solubilizable en suelos y sedimentos.

3 PRINCIPIO

Este método se basa en la medición de la toxicidad aguda, mediante la definición de la concentración efectiva media (CE₅₀), donde la respuesta que se evalúa es la ausencia de movilidad o muerte, bajo condiciones de exposición controlada del crustáceo del Orden Cladocera *D. magna*, durante 48 horas.

4 REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de la presente norma mexicana, se deben consultar las siguientes normas mexicanas, o su versión vigente:

NMX-AA-003- 1980	Aguas residuales-Muestreo
NMX-AA-014- 1980	Cuerpos receptores-Muestreo
NMX-152-IMNC-2005	Metrología en Química. Vocabulario

5 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta Norma Mexicana se establecen las siguientes definiciones:

5.1 Aclimatación

Adaptación fisiológica del organismo de prueba a las condiciones ambientales de control de laboratorio.

5.2 Agua desionizada

Agua que ha sido tratada para remover iones de la disolución.

5.3 Agua dura reconstituida o de dilución

Es agua desionizada a la que se le adicionan sales inorgánicas para obtener agua dulce sintética libre de contaminantes y con características deseables de pH y dureza para el organismo de prueba. Con ella se preparan las distintas

diluciones o concentraciones de pruebas de búsqueda o definitivas. Así como los sistemas de control positivo y negativo. Ver Apéndice A.

5.4 Agua intersticial

Agua que llena los espacios libres entre las partículas de los sedimentos.

5.5 Cladóceras

Suborden de crustáceos branquiópodos, al que pertenecen las comúnmente llamadas “pulgas de agua”. Tienen el cuerpo cubierto por un caparazón dispuesto en dos valvas que cubren el tronco y los apéndices.

5.6 Concentración efectiva media (CE50)

Es la concentración de sustancias puras, combinadas, cuerpos receptores, efluentes, lixiviados y la fracción soluble de los de suelos y sedimentos que afecta al 50 por ciento de la población expuesta, por un periodo de exposición de 48 horas. En esta norma, el efecto medido es la inmovilidad o muerte de los organismos.

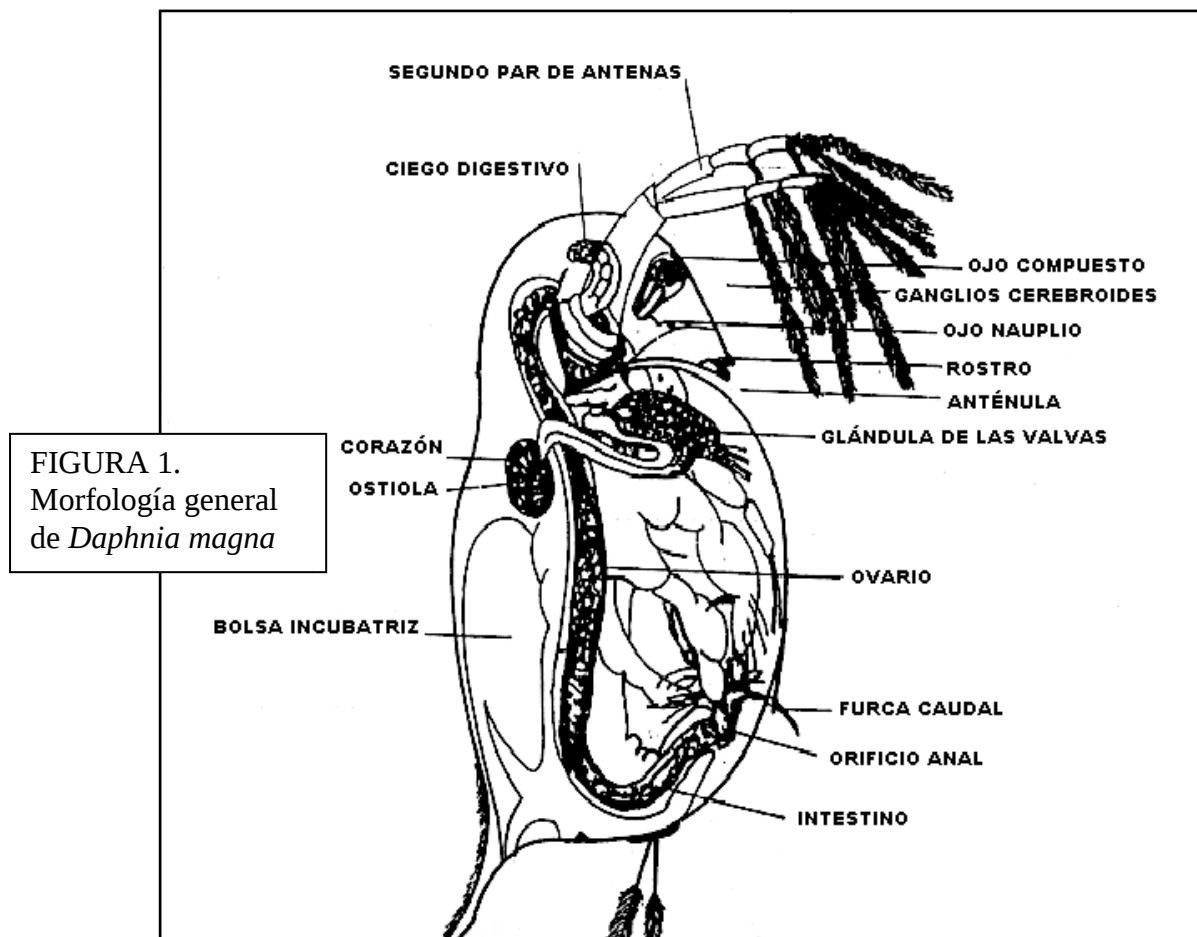
5.7 Dáfnidos

Es el nombre en castellano que reciben los organismos del género *Daphnia* conocidos como “pulga de agua”.

5.8 *Daphnia magna*

Es un crustáceo del Suborden Cladocera de 1 a 1,5 mm de longitud los neonatos, y de 4 a 6 mm los adultos (ambos, visibles a simple vista).

Es un representante importante de las comunidades dulceacuícolas con gran sensibilidad a una amplia gama de compuestos tóxicos, siendo ésta una de las características principales para que sea usado internacionalmente en pruebas de toxicidad. Asimismo, su ciclo de vida corto y fácil cultivo en laboratorio, permite realizar pruebas rápidas y económicas (ver figura 1).



5.9 Dureza

Es la medida de la concentración de iones de calcio y magnesio en agua, expresada en mg/L de carbonato de calcio o equivalente.

5.10 Efecto agudo

Es un efecto adverso que se induce en los organismos por exposición a un material de prueba, durante un periodo menor o igual a 48 horas. Para fines de

este método de prueba, el efecto agudo estará referido a la inmovilidad o muerte.

5.11 Efecto crónico

Es la respuesta a un estímulo que se produce durante una gran parte del ciclo de vida del organismo expuesto, generalmente se manifiesta en su crecimiento y reproducción para el caso de los dáfidos.

5.12 Elutriado

Disolución acuosa obtenida por la adición de agua a una sustancia sólida (sedimento y/o suelo), la cual se agita por un tiempo determinado. Posteriormente la mezcla obtenida se centrifuga, se filtra o se decanta el sobrenadante para obtener la fase líquida.

5.13 Extracto

Disolución obtenida por un proceso químico entre un solvente(s) y una sustancia sólida (sedimento y/o suelo) para obtener los compuestos presentes en la muestra sólida.

5.14 Fotoperiodo

Es la duración de los periodos de iluminación y oscuridad en un lapso de 24 horas.

5.15 Inmovilidad

Incapacidad de los dáfidos para mover cualquier parte de su cuerpo, después de 10 segundos de ser observado al microscopio y expuesto a la luz blanca. Es recomendable no manipular con pipetas, pinzas o cualquier objeto para extraer a los organismos en la revisión de las 24 horas.

5.16 Lixiviado

Es el líquido producido por la percolación del agua a través de cualquier material permeable, desechos sólidos o columna de suelo y que contiene

sólidos disueltos o en suspensión, componentes que se adicionan por arrastre o reacción.

5.17 Neonatos

Son los dáfnidos de edad menor a 24 horas que son utilizados en pruebas de toxicidad.

5.18 Prueba de toxicidad (bioensayos de toxicidad)

Es la exposición controlada de organismos a sustancias puras, combinadas y aguas provenientes de cuerpos de agua, para evaluar su efecto. Una prueba de toxicidad, usualmente mide la proporción de organismos afectados por su exposición a concentraciones específicas de dichas sustancias y aguas.

5.19 Tiempo de exposición

Es el período al que se someten los organismos de prueba a las disoluciones de sustancias puras, combinadas o muestras de agua residual o cuerpos de agua en un bioensayo de toxicidad.

5.20 Toxicidad

Potencial inherente o capacidad de una sustancia para causar efectos adversos en organismos vivos.

5.21 Toxicidad aguda

Es el efecto que se manifiesta en los organismos de prueba, luego de exponerlos a las muestras problema por una sola vez, durante un período de 48 horas.

5.22 Tóxico

Es cualquier sustancia (pura o combinada) o efluente, que al entrar en contacto con los organismos produce daños estructurales, alteraciones bioquímicas o fisiológicas o incluso la muerte. La intensidad de su efecto depende de la concentración y del tiempo de exposición.

5.23 Tóxico de referencia

Sustancia químicamente pura, utilizada en ensayos de toxicidad y cuyo efecto a una serie de dosis predeterminadas es conocida. Este es empleado como testigo en el control de la sensibilidad de los organismos de prueba, lo que permite respaldar las mediciones de toxicidad efectuada a muestras. La determinación regular de la toxicidad de dicha sustancia de referencia, permite dar seguimiento a la estabilidad de la respuesta de los organismos de prueba.

5.24 Toxicología acuática

Es el estudio cualitativo y cuantitativo de los efectos adversos producidos por productos químicos y materiales antropogénicos sobre los organismos acuáticos.

5.25 Unidades de Toxicidad

Forma de expresar el grado de toxicidad de una muestra de la cual no se conoce la concentración de las sustancias que contiene. Es aplicable solo a descargas y mezclas complejas. Se calcula: $UT = 100 / CE_{50}$. En donde 100 es la concentración inicial de la muestra referida en por ciento.

6. EQUIPO Y MATERIAL

6.1 Equipo

- Agitador magnético
- Autoclave
- Balanza analítica
- Conductivímetro
- Controlador de fotoperiodo (temporizador o Timer)
- Luxómetro
- Oxímetro
- Potenciómetro
- Refrigerador (de 0 a 4°C)
- Termómetros (entre el rango de -50 a 50°C)
- Mecheros

6.1.1 Equipo complementario

- Centrífuga
- Congelador
- Microscopios de campo claro y estereoscópico

6.2 Material

- Cámara de Neubauer
- Cajas Petri
- Cubre boca
- Frascos ámbar con tapón de plástico
- Vasos de precipitado 100, 500 y 1000 mL
- Bidón de plástico de 20 L
- Guantes de látex desechables
- Matraces Erlenmeyer de 1000 mL
- Matraces volumétricos de diferentes capacidades
- Pipetas graduadas de 1 mL, 5 mL y 10 mL
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Pipetas Pasteur con bulbo desechables
- Pipetas volumétricas de diferentes capacidades
- Micropipetas automáticas de 1 a 1000 µl de capacidad (volumen fijo o ajustable)
- Probetas graduadas de 50 y 100 mL
- Propipetas
- Recipientes de polietileno, polipropileno o de vidrio borosilicato de 2 L
- Recipientes de vidrio o plástico no tóxico con capacidad mínima de 40 mL.

7. REACTIVOS (grado analítico)

- Ácido bórico (H_3BO_3)
- Ácido etilén diamino tetra-acético (EDTA)
- Ácido nítrico (HNO_3)
- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)
- Acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$)
- Agua desionizada
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
- Cloruro de calcio di hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de manganeso tetra hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Detergente libre de fosfatos
- Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) Reactivo utilizado como tóxico de referencia. Debe tener una pureza mínima del 99.95%
- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)
- Fosfato di básico de potasio (K_2HPO_4)
- Hidróxido de potasio (KOH)

- Nitrato de cobalto hexa hidratado $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Nitrato de sodio NaNO_3
- Óxido de molibdeno (MoO_3)
- Selenito de sodio (Na_2SeO_3)
- Sulfato de cobre penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato ferroso hepta hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato de magnesio hepta hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato de zinc hepta hidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

8 MUESTREO

Las muestras se colectan y almacenan en recipientes nuevos y limpios de vidrio ámbar o polipropileno, de boca angosta de capacidad mínima de 500 mL. Deben ser llenados totalmente y cerrados perfectamente. Los envases no deben volver a utilizarse para muestras de toxicidad. Los recipientes deberán tener tapa de teflón, polipropileno de alta densidad o baquelita, en caso contrario puede emplearse un cuadro de papel aluminio colocado en la boca y cuerda del frasco para evitar el contacto con los plásticos de la tapa.

Si la muestra contiene más de una tercera parte de sólidos o lodos, es necesario recolectar el doble de muestra en un mismo recipiente de mayor capacidad, para asegurar el volumen mínimo requerido para las pruebas.

Para muestras sólidas, suelos o sedimentos, se sugiere emplear recipientes de vidrio de boca ancha con capacidad mínima de 500 mL, ámbar o claro cubierto con papel aluminio, tapa de baquelita o plástica con contratapa de teflón, de no ser posible el empleo de esta última, sustituir por un cuadro de papel aluminio colocado en la boca y cuerda del frasco antes de cerrar. El llenado del frasco debe ser al 75% de su capacidad, eliminando en lo posible el excedente de líquido.

Las muestras deben mantenerse a una temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta su llegada al laboratorio.

El análisis de toxicidad de las muestras de agua o líquidos deberá iniciarse dentro de los primeros cinco días posteriores a su colecta.

Para muestras de sedimentos y suelos se recomienda mantenerlas en refrigeración de 2 a $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ e iniciar su análisis dentro de las dos semanas posteriores a su colecta. Sin embargo si se mantienen a $-20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ pueden ser conservados hasta por seis semanas.

Si se producen extractos de sedimentos con disolventes, el análisis debe efectuarse durante las seis semanas posteriores a su producción.

Para las muestras líquidas y sólidas que requieran un pretratamiento, ya sea la elaboración de extractos, elutriados, extracción de agua intersticial, o de concentración por eliminación de los volúmenes de líquido (en caso de muestras de agua), dicho procesamiento deberá iniciarse dentro de los periodos señalados en los párrafos anteriores y, al término del pretratamiento efectuar a la brevedad el análisis de toxicidad correspondiente.

Para la medición de la toxicidad de productos químicos o derivados experimentales, que no cuenten con información sobre el tiempo de almacenamiento, esto no es una restricción para llevar a cabo dicho análisis, puesto que no existe regulación para el control de su caducidad.

El análisis de la toxicidad en efluentes o mezclas, deberá hacerse con base en muestras simples, excepto en los casos en que la autoridad permita el uso de muestras compuestas.

8.1 Muestreo en cuerpos de agua

El muestreo en corrientes, lagos, lagunas, presas y otros cuerpos de agua debe llevarse a cabo tomando una muestra instantánea o simple del volumen requerido, siguiendo los lineamientos descritos en las normas aplicables al muestreo (Ver inciso 4 Referencias).

Las características inmediatas que deben medirse de la muestra en el sitio de colecta son: pH, conductividad, oxígeno disuelto y temperatura. Asimismo, anotar las características aparentes como olor, color y presencia o ausencia de espumas o burbujas. De esta manera, al rescatar estos datos de campo al momento del análisis, se asegura la no contaminación de la muestra, mediante el uso de electrodos que comúnmente se utilizan en laboratorio con otro tipo de muestras.

9. PROCEDIMIENTO

Para fines de pruebas sólo podrán ser empleados los neonatos que provengan a partir de la 3ª generación de hembras grávidas. No deberán emplearse los neonatos que se obtengan después de que la hembra alcanzó los 30 días de vida.

Para garantizar que los organismos de prueba se encuentran en condiciones óptimas y asegurar la calidad de los resultados que se obtengan de la aplicación de este método, es indispensable realizar actividades previas en el laboratorio para estar en condiciones de iniciar en tiempo y forma.

El cuidado de los organismos en cultivo conduce a tener un lote controlado de dáfnidos cuya densidad no debe ser mayor de 15 organismos/L en agua dura reconstituida de dureza de 250 ± 25 mg/L. Cada lote debe ser iniciado con neonatos de menos de 24 horas de nacidos en estado óptimo, colocándolos en recipientes de boca ancha. La madurez sexual de los organismos que define un óptimo crecimiento es de 7 a 15 días, a partir de su nacimiento. Una vez alcanzada la madurez sexual, los dáfnidos producen neonatos, el número de ellos es muy variable y depende de las condiciones del manejo del cultivo y de su alimentación (APÉNDICE NORMATIVO A). Sin embargo, puede considerarse normal cuando la producción de neonatos durante su ciclo de vida es superior a 40 organismos por hembra.

9.1 Agua dura de dilución

9.1.1 Uso de agua dura

El uso del agua reconstituida es necesario porque:

- Es de composición química conocida.
- Permite resultados reproducibles.
- Permite crecimiento y reproducción adecuada.

Para cultivos de *D. magna* se utiliza agua reconstituida cuya dureza sea de 250 ± 25 mg/L y el pH de $8,0 \pm 0,2$. Su preparación debe efectuarse al menos con 24 horas de anticipación, cuidando que se efectúe tal y como se indica en el punto siguiente, ya que de ello depende en gran parte tanto el cultivo óptimo de los organismos como la culminación exitosa de la prueba.

9.1.2 Preparación de soluciones stock

- i.* Disolución de cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Disolver 11,76 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L.

- ii.* Disolución de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Disolver 4,93 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L.

- iii.* Disolución de bicarbonato de sodio (NaHCO_3)

Disolver 2,59 g del reactivo en agua destilada y aforar a 1 L.

- iv.* Disolución de cloruro de potasio (KCl)

Disolver 0,23 g de cloruro de potasio en agua desionizada y aforar a 1 L.

Por cada litro de agua dura que se quiera elaborar, mezclar 25 mL de cada una de las soluciones stock, en orden de *i* a *iv* y aforar a 1 L con agua desionizada.

El agua dura una vez elaborada se mantiene en aireación hasta que se alcanza la saturación del oxígeno disuelto. Después, conservarse a temperatura ambiente o en refrigeración, cuidando que para el momento de las pruebas se encuentre a $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$

9.1.3 Adición de selenito de sodio (Na_2SeO_4)

El suministro de nutrientes como el selenito de sodio se realiza sólo en los lotes reproductores. Cuando se montan pruebas, el agua dura para hacer las diluciones no debe contenerlos.

La disolución stock de selenito de sodio se prepara pesando 0,001 g del compuesto y se aforan a 100 mL con agua destilada. Se guarda en un envase de vidrio ámbar y en refrigeración ($4 \pm 2^\circ\text{C}$). Por cada litro de agua dura se agregarán 0,2 mL de la disolución stock.

Para detectar la calidad óptima del agua reconstituida, se deben colocar durante 24 horas 10 neonatos en una muestra de 30 mL. Si al término del

tiempo no se registra mortalidad, el agua puede ser utilizada en el cultivo y en las pruebas.

9.2 Prueba con el tóxico de referencia

El tóxico de referencia utilizado en esta Norma Mexicana es el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$). Sin embargo, para muestras control pueden ser empleados otros tóxicos, siempre y cuando, la respuesta sobre el organismo de prueba sea conocida. Los reactivos deberán tener una pureza mínima del 99,5%.

Para preparar las diluciones de prueba se elabora una disolución madre, pesando 45 mg de $K_2Cr_2O_7$ que se aforan a 100 mL con agua desionizada. Dicha disolución puede conservarse en oscuridad y refrigeración ($4 \pm 2^\circ C$) hasta por doce meses y valorarla para garantizar su valor real durante este tiempo. A partir de esta disolución madre, se elabora tanto la serie de diluciones necesarias para el cálculo de la CE_{50} a las 48 horas del tóxico de referencia, así como la disolución que se emplea como control positivo.

El ámbito de respuesta aceptable de la CE_{50} para el dicromato de potasio a las 48 horas será de (0,2 a 0,4) mg/L.

9.3 Desarrollo de pruebas

9.3.1 Separación de organismos de prueba

Los neonatos utilizados para pruebas deberán tener menos de 24 horas de nacidos. Veinticuatro horas antes de iniciar la prueba en los lotes reproductores deben mantenerse únicamente las hembras. Previo al montaje de los bioensayos son separados los nuevos neonatos, juntándolos en un recipiente limpio. Para ello se sugiere emplear pipetas despuntadas o cualquier otro medio que permita su trasvase por medio de succión. Posteriormente colocar diez neonatos en cada uno de los recipientes de prueba que contendrán a las diversas diluciones de exposición.

Antes de iniciar el análisis tomar un poco de la muestra en un recipiente y medir el pH con papel indicador o electrodo, la temperatura y la conductividad y anotar los resultados en la bitácora de analista. No utilizar esa sección de la muestra para el análisis.

Si el análisis no va a ser efectuado inmediatamente, mantener la muestra de acuerdo al inciso 6 de esta Norma Mexicana hasta que sea procesada. Cuando las muestras de sedimentos lleguen congeladas al laboratorio, debe descongelarse a temperatura ambiente.

Las muestras para análisis, deben ser evaluadas a partir de una prueba exploratoria y posteriormente, si es necesario, efectuar una definitiva.

Cuando la muestra contenga más de una tercera parte de sólidos o lodos suspendidos que interfieran con la visibilidad de los organismos en los recipientes de prueba, es recomendable mantener la muestra en reposo hasta que se asiente la mayor parte de los sólidos y tomar para el análisis sólo la fase del sobrenadante. Si posteriormente es necesario evaluar los sólidos, esto se hará mediante tratamientos especiales como la extracción, aireación u otros, tomando en cuenta lo señalado en el inciso 8, párrafo 8, respecto al pretratamiento.

9.3.2 Prueba exploratoria

Esta prueba sirve para determinar si un efluente es tóxico o no y en su caso, permite definir el intervalo de concentraciones que se deben aplicar en una prueba definitiva. En este bioensayo puede probarse la muestra sólo al 100% pero si se desea se puede ampliar el número de concentraciones tomando una escala logarítmica como son al 10 y 1%. En esta prueba exploratoria se debe considerar el análisis de los controles negativo y positivo. A las 24 horas es necesario hacer una revisión de los recipientes de modo que si se observa el 100% de mortalidad en ellos pueda suspenderse y reiniciarse a una concentración menor. Al término de las 48 horas se toman las lecturas finales y se definen las nuevas concentraciones que se aplicarán para la prueba definitiva. El diseño de la prueba exploratoria se presenta en la Tabla 1.

TABLA 1. Condiciones de la prueba exploratoria con *D. magna*.

	CONDICIÓN
Tipo de prueba	Estática sin renovación de la disolución de prueba
Duración	48 horas

Calidad de luz	Fluorescente, blanca y fría
Luminosidad	600 - 1000 lx
Fotoperíodo	16 horas luz / 8 horas oscuridad*
Volumen de los recipientes de prueba	40 mL como mínimo
Edad de los organismos	Menos de 24 horas de nacidos
Número de réplicas por dilución	2
Número de réplicas en el control positivo	3
Número de réplicas en el control negativo	3
Número de organismos por recipiente	La densidad de neonatos en los recipientes de prueba no debe ser mayor de 1 por cada 2 mL.
Aireación de los recipientes de prueba	No
Agua de dilución	Reconstituida dura (250 ± 25) mg/L
Temperatura	20 ± 2°C
Alimentación	No
Volumen total (agua reconstituida más muestra)	Mínimo 30 mL
Respuesta evaluada	Inmovilidad a 48 horas
Criterio de aceptación de la prueba	Sobrevivencia ≥ 90 % en testigos
Control Positivo	Concentración de dicromato de potasio cercana a la CE ₅₀ y con un efecto del 33 al 57% de mortalidad.

* Si se conoce la presencia de compuestos foto degradables, incubar las pruebas preferentemente en oscuridad.

9.3.2.1 Determinación del intervalo de concentraciones

Una vez registradas las observaciones obtenidas en la prueba exploratoria, se determina el intervalo de concentraciones que debe ser usado en la prueba definitiva. Ver los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Suponer que al final de la prueba exploratoria, se obtienen las siguientes mortalidades:

TABLA 2. Relación hipotética de concentración y % de mortalidad

Concentración (%)	Mortalidad (%) *
1,00	0,00
10,00	5,00
50,00	30,00
100,00	70,00

$$* \text{ \% Mortalidad} = \frac{A}{B} \times 100$$

Donde:

- A es el número de organismos muertos por concentración.
B es el número de organismos expuestos por concentración.

En este caso, teóricamente la CE₅₀ a las 48 horas está entre la concentración al 50% y al 100%, por lo cual es factible seleccionar para la prueba definitiva las concentraciones entre 50 y 100%. Sin embargo, aquí es importante considerar lo siguiente:

- El estado que presentan los organismos al final de la prueba exploratoria en la concentración al 50%. Esto es, si los organismos, a diferencia de los testigos (los cuales, en condiciones normales tienden a moverse activamente por toda la columna de agua) mueven muy lentamente su segundo par de antenas y además permanecen en el fondo o en la superficie, seguramente a las 48 horas van a estar completamente inmóviles.

En este caso, es erróneo seleccionar para la prueba definitiva, el 50% como la concentración mínima, ya que es más adecuado utilizar valores todavía menores. Por ejemplo 40% y 30%.

Ejemplo 2:

Suponer ahora, que al final de la prueba exploratoria se obtienen los siguientes valores de mortalidad:

TABLA 3. Relación hipotética de concentración / % de mortalidad

Concentración (%)	Mortalidad (%)
1,00	0,00
10,00	80,00
50,00	100,00
100,00	100,00

En este caso, como se puede apreciar se tiene un efluente extremadamente tóxico ya que 12,5% del mismo ocasiona una mortalidad del 80% en los organismos expuestos.

En este sentido y al igual que en el ejemplo 1 de este apartado, teóricamente se tiene que seleccionar para la prueba definitiva a 1,00% y 10,00% como las concentraciones mínima y máxima, respectivamente (ya que la finalidad de la prueba es obtener la CE₅₀, la cual está definida como la concentración en este caso de un efluente, que origina un efecto letal en el 50% de los organismos expuestos). Sin embargo y para el caso de este ejemplo, si los organismos en la concentración al 1,00% presentan un movimiento similar al de los testigos, es adecuado considerar a este como el valor mínimo durante la prueba definitiva, en caso contrario dos concentraciones menores a esta (tal vez 0,5% y 0,25%) pueden ser utilizadas en la prueba definitiva.

Del mismo modo, se tiene que observar detenidamente a los organismos que quedan vivos en la concentración al 10,00%, ya que si se encuentran muy afectados esto es, en el fondo y con movimientos apenas perceptibles, es adecuado que en la prueba definitiva se consideren concentraciones todavía menores a esta (por ejemplo 5,0 y 2,5%).

Ejemplo 3:

Suponer que al final de la prueba exploratoria no se observa mortalidad en ninguna de las concentraciones como se muestra en la siguiente Tabla:

TABLA 4. Relación hipotética de concentración / % de mortalidad

Concentración (%)	Mortalidad (%)
1,00	0,00
10,00	0,00
50,00	0,00
100,00	0,00

En este ejemplo, el efluente presenta un efecto agudo no detectado después de 24 horas de exposición de los organismos de prueba. Por lo que tendrá que esperar la lectura de las 48 horas.

En caso de que los organismos a pesar de no estar inmóviles, si presentan cierto grado de afectación (el cual, para fácil identificación debe ser comparado con los testigos) en cualquier concentración, excepto en la muestra al 100%, debe observarse en cuál de ellas se evidencia la afectación y a partir de esa, considerar el valor máximo que debe ser preparado para la prueba definitiva.

9.3.3 Prueba definitiva en descargas municipales y no municipales

TABLA 5. Condiciones de la prueba con *D. magna*.

	CONDICIÓN
Tipo de prueba	Estática sin renovación de la prueba
Duración	48 horas
Calidad de luz	Fluorescente, blanca y fría
Luminosidad	600 - 1000 lx
Fotoperiodo	16 horas luz / 8 horas oscuridad*
Volumen de los recipientes de prueba	40 mL como mínimo
Volumen total (agua reconstituida más muestra)	Mínimo 30 mL
Edad de los organismos	Menos de 24 horas de nacidos
Número de réplicas por concentración	3

Número de organismos por recipiente	La densidad de los neonatos en los recipientes de prueba no debe exceder a 1 por cada 2 mL.
Aireación de los recipientes de prueba	No
Agua de dilución	Reconstituida dura (250 ± 25 mg/L
Temperatura	$20 \pm 2^{\circ}\text{C}$
Alimentación	No
Respuesta evaluada	Inmovilidad a 48 horas
Criterio de aceptación de la prueba	Sobrevivencia $\geq$ al 90 % en los testigos
Control Positivo	Concentración de dicromato de potasio cercana a la CE_{50} y con un efecto del 33 al 57% de mortalidad.

* Si se conoce la presencia de compuestos foto degradables, incubar las pruebas preferentemente en oscuridad.

9.4 Medidas de seguridad

Para la preparación de las diferentes disoluciones, debe contarse con medidas de seguridad para evitar entrar en contacto directo con las muestras de aguas residuales. Se recomienda utilizar pro pipetas, guantes de látex desechables y cubre bocas.

Al finalizar la prueba exploratoria, deben efectuarse observaciones a los organismos que continúan vivos para determinar de acuerdo al estado de afectación, si es adecuado o no modificar el intervalo seleccionado para la prueba definitiva.

Es importante señalar, que los organismos sobrevivientes que fueron utilizados en pruebas, no deberán reutilizarse ni para nuevas pruebas ni para establecer nuevos cultivos.

9.5 Prueba definitiva en cuerpos de agua

El número mínimo de diluciones que se requiere en esta prueba es de 3. Estas se elaboran considerando un factor de dilución de 0,5, utilizando para ello material aforado de 100 mL y pipetas de graduación necesaria de tal forma que se obtenga, por ejemplo, la siguiente serie de concentraciones: 100%, 50%, 25% y 6,25%; además por supuesto, de los controles positivos y negativos. El número de réplicas por dilución es de 3, al igual que en pruebas para descargas de aguas residuales municipales y no municipales.

El conteo de inmovilidad y cálculo de la CE_{50} , debe efectuarse a las 48 horas.

9.6 Control de calidad analítico

El control de calidad analítico del método de prueba con *Daphnia magna* se evalúa mediante la determinación de la CE_{50} en un bioensayo de 48 horas. El método y las condiciones de prueba deben ser los descritos en la presente Norma Mexicana.

El laboratorio deberá efectuar el análisis del tóxico de referencia, dependiendo del número de análisis y su periodicidad cada vez que se inicia un nuevo lote de reproductoras o de forma periódica, con el fin de verificar la sensibilidad de los organismos respecto a los valores de CE_{50} de la carta control y de sus límites de confianza.

Cada laboratorio que realice pruebas de toxicidad debe contar con un programa de control de calidad que incluya el seguimiento de la respuesta para el tóxico de referencia, controles positivos y negativos, así como el análisis de muestras replicadas, cuyos resultados sean contrastados con los criterios de calidad analíticos siguientes.

9.6.1 Control positivo

Provee evidencia de que para cada lote de muestras analizadas, los organismos de prueba contaban con la sensibilidad necesaria. El control positivo es una disolución de dicromato de potasio, cuya concentración corresponderá al valor promedio de la CE_{50} histórica que caracteriza la respuesta de los cladóceros al tóxico y que es esquematizada en la carta control. En general, una concentración de 0,45 mg/L en el control positivo debe generar un efecto de

inmovilidad a la población expuesta del 33 al 57%, valores que son los criterios que se aplicarán como guía para este control.

9.6.2 Control Negativo

El agua reconstituida con dureza de 250 ± 25 mg/L, es la disolución empleada como control negativo, no deberá adicionarse disolución de Selenito de sodio.

Este control es de utilidad para dar seguimiento del estado óptimo de salud de los organismos de prueba.

9.6.3 Pruebas replicadas

Por cada grupo de muestras analizadas, el laboratorio deberá efectuar como mínimo, un duplicado, seleccionando aleatoriamente una muestra del lote analítico. Los análisis duplicados deberán realizarse a lo largo de la misma sesión de trabajo y bajo condiciones idénticas de manejo.

El resultado de la prueba de significancia es empleado para poder evidenciar la precisión del análisis y respaldar la confianza analítica de la medición, por lo que la aceptación de los resultados estará sujeta también a que las diferencias numéricas de los análisis replicados de la muestra seleccionada, sean no significativos.

9.6.3.1 Análisis de significancia estadística en pruebas replicadas

La prueba de significancia estadística para el análisis de las diferencias de la CE₅₀ de los análisis replicados puede ser efectuada de la siguiente manera:

1) Cálculo de factores:

Réplica1	Réplica 2
$F_1 = \frac{CE_{50_1}}{\text{Min IC}_1}$	$F_2 = \frac{CE_{50_2}}{\text{Min IC}_2}$

Donde:

F= Factor para establecer los límites, con un 95% de confianza, del valor de CE₅₀

CE₅₀ = definido como CE₅₀ en el reporte impreso de la prueba

Min IC = límite inferior del intervalo de confianza

2) Relación de factores

$$F_{1,2,3} = \text{anti log} \sqrt{(\log F_1)^2 + (\log F_2)^2 + (\log F_3)^2}$$

3) Relación entre los valores de CE₅₀ de las réplicas de acuerdo a:

$$\frac{CE_{50\max}}{CE_{50\min}}$$

4) Significancia

A partir de los cálculos anteriores, si la resultante de CE_{50 max} /CE_{50 min} excede el valor obtenido para F_{1,2,3}, entonces la diferencia entre las CE₅₀ de las muestras replicadas, es **significativa**, mientras que en el caso de ser menor o igual, la diferencia será **no significativa**.

9.6.4 Interpretación de resultados de control de calidad analíticos

Cuando los valores de la CE₅₀ excedan el ámbito aceptable para el tóxico de referencia y para el control positivo, o cuando la mortalidad excede el criterio óptimo en el control negativo o se detectan problemas en la reproducibilidad, evidenciada mediante el análisis de pruebas replicadas, el laboratorio deberá revisar los posibles factores de variabilidad, entre los cuales se considera a los siguientes.

9.6.4.1 Método de cultivo: mantenimiento de los organismos de prueba.

9.6.4.2 Edad y estado de salud de los organismos.

9.6.4.3 Manejo de los neonatos.

9.6.4.4 Pericia y consistencia en la realización de las pruebas por parte de los analistas.

9.6.4.5 Una vez que se han revisado minuciosamente los factores mencionados y que se han descartado los dos últimos como los responsables de la modificación de la sensibilidad del lote de *D. magna* empleado, se debe revisar el método de cultivo. En caso extremo, se recomienda no realizar más bioensayos con dicho lote y sustituirlo con uno nuevo para la prueba, el cual también debe ser evaluado.

9.6.4.6 Las diferentes concentraciones que se preparen en las pruebas exploratorias y definitivas deben realizarse utilizando pipetas y/o matraces volumétricos de diferentes capacidades, excluyendo sólo a las muestras al 100 % y a los testigos.

10. EXPRESION DE RESULTADOS

La determinación de la CE₅₀ deberá realizarse mediante el uso del método Probit, aplicando un programa académico institucional o comercial disponible. En cualquier caso deberá determinarse la CE₅₀ y el intervalo de confianza al 95% (véase APÉNDICE INFORMATIVO A.2).

11. INFORME DE LA PRUEBA

11.1 Validación de resultados

Los resultados se consideran válidos, siempre y cuando el porcentaje máximo de mortalidad o porcentaje de efecto permitido en el control negativo no exceda al 10 %.

11.2 Información que debe estar contenida en la bitácora del analista.

- 11.2.1 Referencia del método de prueba aplicado.
- 11.2.2 Forma de almacenamiento y preservación de la muestra.
- 11.2.3 Fecha de inicio y término del análisis.
- 11.2.4 Tipo de prueba realizada (exploratoria o definitiva).
- 11.2.5 Datos fisicoquímicos al inicio del análisis: pH, oxígeno disuelto, conductividad, temperatura de agua y ambiente.
- 11.2.6 Características aparentes de la muestra: olor, color, presencia o ausencia de burbujas y espuma.
- 11.2.7 Dureza total de la muestra al 100%.
- 11.2.8 pH y oxígeno disuelto al finalizar la prueba en una serie de diluciones, un control positivo y uno negativo.
- 11.2.9 Concentraciones utilizadas en las pruebas exploratoria y definitiva.
- 11.2.10 Anotación de las lecturas de inmovilidad o mortalidad de organismos en cada réplica a las 48 horas.
- 11.2.11 Porcentaje de mortalidad o inmovilidad en cada serie de diluciones.
- 11.2.12 Respuesta obtenida (CE_{50}), expresada como Unidades Toxicológicas (UT) y los límites de confianza al 95%.
- 11.2.13 Firma del(los) responsable(s) de la realización de las pruebas de toxicidad.
- 11.2.14 Cualquier detalle de operación no especificado en esta norma e incidentes que puedan afectar el resultado.

Es importante registrar también el tóxico de referencia utilizado en la prueba de sensibilidad y la CE_{50} obtenida para el lote de prueba.

11.3 Expresión de resultados

Los resultados correspondientes a la CE_{50} a las 48 horas se expresarán como sigue:

- 11.3.1 Cuando se trate de aguas de tipo residual o de cuerpos de agua, los resultados se expresarán en Unidades Toxicológicas (UT).
- 11.3.2 Cuando se trate de sustancias puras, los resultados se expresarán en miligramos por litro (mg/L).

APENDICES NORMATIVOS

APÉNDICE A: Condiciones ambientales para el cultivo y mantenimiento de organismos de *Daphnia magna*

Para la instalación de un cultivo de *D. magna*, es necesario contar con un área libre de sustancias tóxicas (gases, vapores, etcétera), que puedan entrar en contacto directo con los cultivos y alterar su sensibilidad y respuesta. Esta debe tener los aditamentos necesarios para mantener una temperatura entre 18 y 22°C y fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad.

A.1 Iluminación

Es necesario mantener constante la intensidad de luz en el área donde se encuentren los organismos, entre (600 y 1000) luxes (lx).

Para la iluminación del cultivo deben utilizarse lámparas fluorescentes “luz de día” que proporcionen la luminosidad adecuada, la cual debe ser medida de forma regular con un luxómetro. El fotoperíodo debe controlarse para asegurar que se cumplan los periodos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, para ello es de gran utilidad el uso de un temporizador.

A.2 Temperatura

Mantener la temperatura del agua de los cultivos a $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

A.3 Oxígeno disuelto

Los niveles del oxígeno disuelto se deben mantener por arriba de 2 mg/L, esto se logra mediante:

- a) Recuperando cada semana el volumen que se pierde por evaporación y por limpieza del cultivo.
- b) Cada 15 días se recambiarán únicamente tres cuartas partes del total del volumen del cultivo.

A.4 Dureza total (expresada como carbonato de calcio CaCO_3).

Es necesaria una dureza de (250 ± 25) mg/L.

A.5 Recambio de agua

El agua de cultivo, después de un tiempo determinado, pierde sus características iniciales, debido a la materia orgánica acumulada, producto de los desechos de los organismos y de residuos alimenticios, por ende, debe renovarse de forma parcial dos veces por semana y cada 15 días hacer un recambio mayor sustrayendo tres cuartas partes del volumen contenido en cada recipiente.

A.6 Limpieza

Todos los recipientes usados en los cultivos, deben limpiarse al menos dos veces por semana, removiendo los restos de alimento y exubias del fondo.

Todo el material de cristalería, excepto los recipientes usados en los cultivos, debe someterse a una limpieza especial, de acuerdo a lo señalado en el APÉNDICE C. Lavado de material y cristalería.

A.7 Alimentación

La calidad de la alimentación es uno de los aspectos más importantes para el cultivo de organismos, ya que de ello dependen la sobrevivencia y la tasa reproductiva óptima.

El alimento puede estar constituido por cualquiera de las siguientes especies de clorofitas o su mezcla: *Chlorella vulgaris*, Beijerinck; *Ankistrodesmus falcatus*, (Corda) Ralfs; *Scenedesmus incrassatulus*, Bohlin y *Pseudokirchneriella subcapitata*, (Korshikov) Hindak 1990 (antes *Selenastrum capricornutum*, Printz of Skulberg 1964).

La alimentación se realiza hasta 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes, por ejemplo). La cantidad de alimento suministrada a los cultivos es variada. Si se trata de un lote reproductor maduro, es decir, cuando las hembras se encuentran en estado grávido y están produciendo las descendencias de prueba, se recomienda mantener de 750,000 a 800,000 células/mL en el medio de cultivo de los dáfnidos. En el caso de *A. falcatus* se recomienda mantener de 400,000 a 450,000 células/mL. Si se trata de un cultivo joven, es decir desde su inicio con neonatos de menos de 24 horas hasta cuando las hembras dan su primera descendencia, se recomienda un suministro de 450,000 a 500,000 células/mL para evitar acumulación de

alimento en el fondo pero asegurar abundante alimento para su crecimiento. El conteo de las células algales se efectúa con la ayuda de una cámara de Neubauer o hematócmetro.

Las microalgas se separan del medio de cultivo antes de ser suministradas como alimento. La separación se hace por centrifugación, filtración o sedimentación.

Las microalgas concentradas se conservan en obscuridad y refrigeración a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en frascos de vidrio, utilizándose como alimento hasta por un período máximo de 3 semanas, después del cual debe desecharse cualquier remanente y emplear un nuevo concentrado.

Para el cultivo de las microalgas verdes utilizadas para el alimento de los dáfidos puede emplearse el medio de cultivo Basal de Bold o el medio AAP (EPA, 1992). Ver APÉNDICE B.

APÉNDICE B: Medios para el cultivo de algas con fines de alimentación de cultivos de *Daphnia magna*.

La calidad del alimento es uno de los aspectos determinantes para mantener un cultivo sano y cuya sobrevivencia y tasa de reproducción sean óptimas. El alimento puede estar constituido por alguna especie de microalga verde, como *Chorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Ankistrodesmus falcatus*, entre otras. Además, puede optarse por alguno de los medios de cultivo expuestos a continuación.

B.1 Medio Basal de Bold

- i. Preparar 100 mL de cada una de las soluciones stock, conforme a la siguiente tabla.

Disolución stock	Reactivo(s)	Peso (g)
1	Nitrato de sodio (NaNO_3)	25,0

2	Cloruro de calcio di hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2,5
3	Sulfato de magnesio hepta hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	7,5
4	Fosfato mono básico de potasio (KH_2PO_4)	17,5
5	Fosfato di básico de potasio (K_2HPO_4)	7,5
6	Cloruro de sodio (NaCl)	2,5
7	Sulfato ferroso hepta hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) + 1 μL H_2SO_4	0,498
8	Acido bórico (H_3BO_3)	1,142
9	EDTA	5,0
	Hidróxido de potasio (KOH)	3,1
10 *	Sulfato de zinc hepta hidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,882
	Cloruro de manganeso tetra hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,144
	Oxido de molibdeno (MoO_3)	0,071
	Sulfato de cobre penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,157
	Nitrato de cobalto hexa hidratado [$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]	0,049

* Colocar uno por uno los reactivos en el orden señalado y aforar a 100 mL.

- ii. Colocar cada disolución en envases debidamente rotulados y conservarlos en refrigeración ($4 \pm 2^\circ\text{C}$).
- iii. Para preparar 1 litro del medio Basal de Bold se agrega 1 mL de cada una de las soluciones stock a 500 mL de agua desionizada o destilada en orden del 1 al 10 y se afora a 1 L.
- iv. Esterilizar en un matraz Erlenmeyer en autoclave durante 15 minutos a 15 libras.

- v. Dejar enfriar a temperatura ambiente el medio de cultivo e inocular con un cultivo precedente de densidad conocida para alcanzar una concentración inicial aproximada de 10^6 células /mL.
- vi. Colocar el cultivo junto a una fuente de luz continua y aireación constante. El cultivo puede permanecer así de 10 a 15 días, tiempo en el cual alcanzará una densidad considerable (entre 15 y 20 millones de células/mL). Posteriormente retirar y concentrar para suministro de alimento.

B.2 Medio AAP

Todos los reactivos utilizados deben tener calidad ACS, (98-100% de pureza), con excepción del CaCl_2 cuya pureza es de 95-100%. Para su preparación se emplea agua destilada o desionizada.

El medio de cultivo se prepara a partir de una serie de cinco soluciones: la primera de ellas conteniendo micro-nutrientes y las cuatro restantes con macro-nutrientes, todas ellas proporcionan las concentraciones adecuadas para asegurar un crecimiento óptimo de las algas durante el periodo de proliferación de 5 a 9 días

B.3 Preparación de soluciones

Para la preparación de las cinco disoluciones stock, rotular cinco frascos de 500 mL (preferentemente material aforado) de la siguiente manera: disolución 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Agregar 350 mL de agua a cada uno de ellos.

Disolución 1. Micro-nutrientes

La preparación se inicia con las disoluciones de cloruro de zinc, cloruro de cobalto, molibdato de sodio y cloruro de cobre. Para ello, se emplean 5 frascos de 100 mL de capacidad, que deben ser previamente etiquetados con el nombre del compuesto. En el caso del cloruro de cobre se etiquetan dos

frascos, diferenciándolos con los números I y II. Continuar con las siguientes instrucciones:

- **Disolución de cloruro de zinc**

Verter en el frasco 70 mL de agua, agregar luego 164 mg de cloruro de zinc (ZnCl_2). Llevar a volumen final de 100 mL con agua y mezclar bien. A partir de esta disolución transferir 1 mL mediante pipeta al frasco 1.

- **Disolución de cloruro de cobalto**

Verter en el frasco 70 mL de agua, agregar 71,4 mg de cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Llevar a volumen con agua hasta completar 100 mL y mezclar bien. A partir de esta disolución, transferir 1 mL mediante pipeta al frasco 1.

- **Disolución de molibdato de sodio**

Verter en el frasco 70 mL de agua, luego agregar 363 mg de molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Finalmente completar el volumen hasta 100 mL con agua y mezclar bien. A partir de esta disolución, transferir 1 mL mediante pipeta al frasco 1.

- **Disolución de cloruro de cobre**

Verter 70 mL de agua en dos de los frascos de 100 mL, en el primero de ellos agregar 60,0 mg de cloruro de cobre ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), luego llevar a volumen de 100 mL con agua y mezclar bien. Una vez lista esta primera disolución de cloruro de cobre, tomar 1 mL, verter en el segundo frasco y completar el volumen a 100 mL con agua. Un mL de esta segunda disolución es la que se emplea para la preparación de la disolución No 1 de Micro-nutrientes.

Cuando estén preparadas las disoluciones anteriores, pesar el resto de los reactivos, tomar el frasco de 500 mL etiquetado como disolución 1 y agregar cada compuesto químico en el orden fijado en la Tabla 6. La secuencia no debe ser alterada, ya que se formarán precipitados difíciles de solubilizar.

Asegúrese que antes de adicionar el siguiente compuesto las sales se encuentren completamente disueltas.

TABLA 6. Preparación de la disolución No 1 de micronutrientes

	Compuesto	Fórmula	Masa en gramos (g) o Volumen (mL) de solución stock
1	Cloruro de Magnesio	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6,08
2	Cloruro de Calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,20
3	Ácido Bórico	H_3BO_3	0,0928
4	Cloruro de Manganeso	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}^*$	0,208
5	Cloruro de Zinc	ZnCl_2^*	1 mL de la solución
6	Cloruro Férrico	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}^*$	0,0799
7	Cloruro de Cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}^*$	1 mL de la solución
8	Molibdato de Sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL de la solución
9	Cloruro de Cobre	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL de la solución
10	Etilen diaminotetracético: sal disódica	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,150

* Estos compuestos pueden ser sustituidos por sulfatos. Por ejemplo, ZnCl_2 o ZnSO_4 . Si así se hiciera, recalcular estequiométricamente las masas a utilizar.

Después de haber agregado todos los componentes al frasco de la disolución 1, llevar a volumen de 500 mL con agua desionizada.

Disoluciones de Macro-nutrientes (2-5):

Adicionar en los frascos respectivos de 500 mL restantes las cantidades de las sales indicadas en la Tabla 7.

TABLA 7. Preparación de disolución de macro-nutrientes

Frasco	Compuesto	Fórmula	Masa (g)
Disolución 2	Nitrato de Sodio	NaNO_3	25,5
Disolución 3	Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14,7
Disolución	Fosfato de	K_2HPO_4	1,044

4	Potasio		
Disolución 5	Bicarbonato de Sodio	NaHCO ₃	15,0

Mezclar bien hasta disolver, y posteriormente adicionar agua hasta alcanzar el volumen de 500 mL en cada uno de los recipientes. Las disoluciones stock pueden refrigerarse (sin congelar) hasta por un año.

B.4 Inoculación y condiciones de proliferación

Por cada litro de medio de cultivo que se desee preparar, se adiciona en agua destilada 1 mL de cada una de las 5 disoluciones en forma ordenada. Así, se debe iniciar con la 1 hasta terminar con la 5, llevando a volumen al finalizar. Se sugiere no alterar el orden de adición de las disoluciones ya que se pueden formar precipitados difíciles de eliminar. Mezclar bien después de la adición de cada disolución.

Al final el pH del medio deberá ser $7,5 \pm 0,1$ por lo que es necesario ajustarlo, ya sea con NaOH o HCl 1 N. Inmediatamente después, esterilizar el medio a través de filtración bajo condiciones asépticas (mechero o campana de flujo laminar) empleando una membrana de mezcla de ésteres de $0,22 \mu\text{m}$ de abertura de poro y 47 mm de diámetro. El sistema de filtración y el matraz de captación deben estar estériles. Para la filtración se puede utilizar una bomba de vacío. El medio nutritivo esterilizado se inocula con las algas, ya sea proveniente de un cultivo previo o a partir de la cepa en medio sólido.

El medio inoculado se coloca a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ dentro de una cámara con iluminación superior a 3500 lux, manteniendo aireación por un periodo de 4 a 9 días, hasta presentar un color verde intenso que se asocia con la fase estacionaria en la que la densidad algal es superior a 2,5 millones de células/mL (cuantificado por cámara Neubauer). Cuando el cultivo logra estas características, se retira de la aireación e iluminación y se coloca en una cámara fría, a una temperatura de 2 a 6°C y por un periodo de una a dos semanas, para permitir su sedimentación.

APÉNDICE C: Lavado de material y cristalería

Todos los materiales y recipientes de uso rutinario en el área, deben lavarse perfectamente para evitar que contengan residuos potencialmente tóxicos a los organismos de prueba, utilizando el método que se describe a continuación:

- Lavar el material con detergente libre de fósforo y enjuagar dos veces con agua de la llave.
- Sumergir durante 24 horas el material en una disolución de ácido nítrico al 10 % para eliminar residuos metálicos. Enjuagar con agua desionizada y escurrir. Esta serie de lavado tiene que llevarse a cabo al menos de 24 horas a 48 horas antes del bioensayo, protegiendo el material de polvo y otros factores.
- Enjuagar con acetona para eliminar residuos orgánicos. Enjuagar con agua desionizada y dejar secar completamente.
- Minutos antes de iniciar el bioensayo, enjuagar los recipientes que van a contener los organismos con agua dura reconstituida.

Los recipientes utilizados para el mantenimiento de los organismos en cultivo, deberán lavarse únicamente con agua corriente, dando un último enjuague con agua dura de dilución. Este material es de uso exclusivo para los cultivos.

12 VIGENCIA

La presente norma mexicana entrara en vigor 60 días naturales después de la publicación de su declaratoria de vigencia en el Diario Oficial de la Federación.

13. BIBLIOGRAFIA

- 13.1 Anderson, B.G., 1944. The toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna*. (La toxicidad de varias sustancias encontradas en desechos industriales determinadas por el uso de *Daphnia magna*) Sewage Works J. 16: 1140-1156.
- 13.2 APHA, AWWA, WPCF, 1987. Standard Methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Port City Press, Baltimore, Maryland, E.U.A. 10 – 200.

- 13.3 Attar, E. N y E. J. Maly, 1982. Acute toxicity of cadmium, zinc and cadmium– zinc mixtures to *Daphnia magna*. (Toxicidad aguda provocada por cadmio, zinc y la mezcla de los mismos en *Daphnia magna*) Arch. Environ Contam. Toxicol. 11 (3): 291 – 296.
- 12.4 Biensinger. K.E. y G. M. Christensen, 1972. Effects of various metals on survival growth, reproduction and metabolism of *Daphnia magna*. (Efectos de varios metales en la sobrevivencia, crecimiento, reproducción y metabolismo de *Daphnia magna*) J. Fish. Res. Board Can 29: 1691 - 1700.
- 12.5 CETESB, 1991. Métodos de Avalación de Toxicidades de Polopuentes a Organismos Aquáticos. (Métodos de evaluación de toxicidad de contaminantes en organismos acuáticos) Sao Paulo, SP. Brasil. s.p.
- 12.6 CETESB, 1991 a. Procedimientos para utilizacao de testes de toxicidades no controle de efluentes líquidos. (Procedimientos para la utilización de pruebas de toxicidad en el control de efluentes líquidos) Serie Manuals. Sao Paulo, SP. Brasil, 17 p.
- 12.6.1 CETESB, 1991 b. Implementacao de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. (Implementación de pruebas de toxicidad en el control de efluentes líquidos) Serie Manuals. Sao Paulo, SP. Brasil, 7 p.
- 12.7 Díaz,-Báez, C., Pica-Granados Y., Ronco A., 2008. Ensayos Toxicológicos para la Evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México Ed. SEMARNAT pp. 17-32
- 12.8 EPS, 1990. Guidance Document on control of Toxicity Test Precision Using reference Toxicants. (Guía para el control de la precisión en la prueba de toxicidad utilizando tóxicos de referencia) Report EPS 1/RM/15 Canada.
- 12.9 U.S EPA. 1992. Short -term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms EPA-600/4-91-022. 3th Edition. Philip Lewis A, L., Klem D. J., Lazorchak J. M.

- 12.10 Environment Canada, 1990. Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to *Daphnia magna*. (Método de referencia para determinar la letalidad aguda de efluentes con *Daphnia magna*) EPS 1/RM/14. 18 pp.
- 12.11 EPA, 1991. Methods for Measuring the Acute Toxicity of effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organism. (Métodos para medir la toxicidad aguda de efluentes y aguas receptoras con organismos marinos y dulceacuícolas) EPA/600/4-90/DZ7
- 12.12 EPS, 1990. Guidance Document on control of Toxicity Test Precision Using reference Toxicants. (Guía para el control de la precisión en la prueba de toxicidad utilizando tóxicos de referencia) Report EPS 1/RM/15 Canada.
- 12.13 Finney, D. J., 1971. Probit analysis. (Análisis Probit) 3ª. Ed. Cambridge University Press, Londres. 333 pp.
- 12.14 Goulden, C.E. Y L .L. Henry, 1987. Instrucciones para el cultivo de *Daphnia* para Pruebas de Toxicidad. Guía de Trabajo. Academy of Natural Sciences. Filadelfia, Pensilvania, E.U.A. 13 pp.
- 12.15 ISO.80000-1:2009. Quantities and Units-Part 9: Physical Chemistry and Molecular Physics, 1st Edition; Geneva, Switzerland.
- 12.16 IUPAC, 2007, Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry-The Green Book, 3rd Ed.; RSC Publishing, Cambridge [ISBN 978-0-85404-433-7]. Page 48, Sec. 2.10.
- 12.17 Lewis, P. A. y W. B. Horning, 1988. "A Short – Term Chronic Toxicity Test Using *Daphnia magna*" (Pruebas de toxicidad crónica a corto plazo utilizando *Daphnia magna*). Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 10 th Volume, ASTM, STP 1971 – w .J .Adams, G. A. Chapman, and W. G. Landis, Eds., American Society for Testing and Materials, Filadelfia: 508 – 555.
- 12.18 Litchfield, J. T. Jr. Y F. Wilcoxon, 1949. A amplified method of evaluating dose effect experiments. (Método simplificado para evaluar los efectos de la dosis en los experimentos) J. Pharm. Exp. Ther. 96: -113.

- 12.19 Needham, J. G., P. S. Galtsoff, F. E. Lutz y P. S. Welch, 1937. Culture Methods for Invertebrate Animals. (Métodos de cultivo en invertebrados) Cumstock Publ. Co. Reprinted by Dover Publ., Inc., Nueva York.
- 12.20 Pennak, R. W., 1978. Fresh Water Invertebrates of the United States. Invertebrados dulceacuícolas de los Estados Unidos de América) 2ª ed., John Wiley and Sons, Nueva York, 365 – 367 pp.
- 12.21 Pielou, E. C. 1969. An Introduction to Mathematical Ecology. (Introducción a la Ecología Matemática) Wiley Interscices John Wiley and Sons, Nueva York.
- 12.22 Porcella, D.B, (1983). Protocol for Bioassessment of Hazardous Waste Sites, Environmental Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR, EPA 60072-83/054, NTIS Publ. No. PB83-241737. Citado por: Burton, G.A. y Pitt E. R. (2002). Stormwater effect handbook: a toolbox for watershed managers, scientist, and engineers. Lewis Publishers. A CRC Press Company. 911 p.
- 12.23 Stephan, C. E., 1977. Methods for calculating an LC₅₀. (Métodos para el cálculo de la CL₅₀) In: Mayer y J. L. Hamelink, (Eds.), Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation, ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania: 65 – 84.

14 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta Norma coincide básicamente con la Norma Internacional ISO 6341:1996, Water quality—Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna*, Straus (Cladocera, Crustacea) Acute toxicity test.

Difiere en la inclusión de los Apéndices Normativos A (Condiciones ambientales para el cultivo y mantenimiento de organismos de *Daphnia magna*) y B (Medios para el cultivo de algas con fines de alimentación de cultivos de *Daphnia magna*), en los que se detalla el manejo de los cultivos y lotes reproductores de *Daphnia magna*, así como el tipo y cantidad de alimentos que debe proporcionarse. Asimismo, se incluye el Apéndice C (Lavado de material y cristalería) para el cuidado y lavado del material utilizado para las pruebas de toxicidad en general (véase APÉNDICE INFORMATIVO D.1).



PROY-NMX-AA-087-SCFI-2009
37/38

México D.F., a

DR. FRANCISCO RAMOS GÓMEZ
DIRECTOR GENERAL DE NORMAS



APENDICE INFORMATIVO D

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PARA ESTA NORMA

- D.1 Cabe mencionar que la presente norma ha sido complementada con investigación realizada a nivel nacional e internacional.
- D.2 Se recomienda el uso del programa elaborado por la EPA, junto con las actualizaciones al mismo. Dicho programa puede obtenerse en la siguiente dirección electrónica: <http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm>