



PROYECTO DE NORMA MEXICANA

PROY-NMX-AA-121/2-SCFI-2008

ANÁLISIS DE AGUA - AGUAS NATURALES EPICONTINENTALES, COSTERAS Y MARINAS – MUESTREO (TODAS LAS PARTES CANCELAN AL PROY NMX-AA-121-SCFI-2006)

**WATER ANALYSIS - NATURAL EPICONTINENTAL, MARINE AND
COASTAL WATERS - SAMPLING**

PARTE 2.

GUÍA PARA LOS ENSAYOS BIOLÓGICOS DE MUESTRAS

GUIDANCE ON BIOTESTING OF SAMPLES

P R E F A C I O

En la elaboración de la presente 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.
- CIATEC, A.C.
- CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO EN ELECTROQUÍMICA, S.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, Q.F.B. MARTHA ELENA IZAGUIRRE VILLANUEVA
- 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 PETROLEO
- INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA
- LABORATORIO DE CALIDAD QUÍMICA VERACRUZANA, S.C.
- LABORATORIO DE QUIMICA DEL MEDIO E INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO IDECA, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO FERMI, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO QUIMICO INDUSTRIAL

- LABORATORIOS ABC QUIMICA, INVESTIGACION Y ANALISIS, 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.
- CÉSAR CLEMENTE ALVARADO GARCÍA / SERVICIOS AMBIENTALES
- SERVICIOS DE AGUA Y DRENAJE DE MONTERREY, S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE INGENIERIA Y CONSULTORIA AMBIENTAL
- SISTEMA DE AGUAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO DEL GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL



- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Química
Instituto de Biología

ÍNDICE DEL CONTENIDO

Número del capítulo		Página
0	INTRODUCCIÓN	8
1	OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN	11
2	REFERENCIAS	11
3	MUESTREO	12
4	TRANSPORTE	14
5	CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO	14
6	APARATOS Y EQUIPOS	16
7	PRETRATAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	18
8	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DURANTE EL ENSAYO	33
9	LÍNEAS DIRECTRICES GENERALES PARA EL DISEÑO DEL ENSAYO	36
10	LÍNEAS DIRECTRICES ESPECIALES RELATIVAS AL FUNCIONAMIENTO DEL ENSAYO	40
11	ENSAYOS BIOLÓGICOS ESPECIALES	46
12	EVALUACIÓN	55
13	PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	62
14	INFORME DE ENSAYO	64
15	PRINCIPIOS BÁSICOS DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN ENSAYOS BIOLÓGICOS	66
16	VIGENCIA	70
17	BIBLIOGRAFÍA	70
18.	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES	75



PROYECTO DE NORMA MEXICANA

PROY-NMX-AA-121 / 2-SCFI-2008

ANÁLISIS DE AGUA - AGUAS NATURALES EPICONTINENTALES, COSTERAS Y MARINAS – MUESTREO (TODAS LAS PARTES CANCELAN AL PROY NMX-AA-121-SCFI-2006)

**WATER ANALYSIS - NATURAL EPICONTINENTAL, MARINE AND
COASTAL WATERS - SAMPLING**

PARTE 2.

GUÍA PARA LOS ENSAYOS BIOLÓGICOS DE MUESTRAS

GUIDANCE ON BIOTESTING OF SAMPLES

0 INTRODUCCIÓN

El PROY-NMX-AA-121-SCFI-2005 fue publicado el día 30 de noviembre de 2005 en el Diario Oficial de la Federación para consulta pública. En el año 2008 el Comité Técnico de Normalización Nacional de Medio Ambiente y Recursos Naturales decidió volver a publicarlo, dado que cambió sustancialmente su contenido inicial.

Este proyecto de norma mexicana está formado por varias partes.

Los ensayos biológicos resultan adecuados para la determinación del efecto de los parámetros físicos y químicos sobre los organismos de ensayo, en condiciones experimentales específicas. En principio, los métodos de análisis químico no resultan adecuados para la determinación de los efectos biológicos. Dichos efectos pueden ser potenciados o inhibidos y pueden determinarse por la reacción observada en los organismos, por ejemplo su muerte, crecimiento, proliferación, cambios morfológicos fisiológicos o histológicos. Los efectos de inhibición se desencadenan por la acción de los constituyentes tóxicos del agua o por otras influencias nocivas.

Los efectos pueden referirse a varios niveles, desde estructuras (sub)celulares o sistemas enzimáticos, hasta al organismo en su conjunto o incluso referirse a niveles superiores al organismo o relativos a toda la comunidad.

En el contexto de esta norma mexicana, la toxicidad es la capacidad de una sustancia de ejercer un efecto perjudicial sobre organismos o biocenosis debida a sus propiedades químicas y a su concentración.

El potencial efecto perjudicial de una sustancia tóxica puede contrarrestarse por la capacidad de protección del sistema biológico, por ejemplo por desintoxicación metabólica y excreción. La toxicidad aparente medible en el ensayo biológico es el resultado de la interacción entre la sustancia y el sistema biológico.

Aparte del efecto tóxico directo de uno o más constituyentes del agua, ciertos efectos perjudiciales para el sistema biológico pueden ser ejercidos por la acción combinada de todas las sustancias nocivas, por ejemplo, por sustancias que no son tóxicas en sí, pero que afectan a las propiedades físicas o químicas del medio y, en consecuencia, a las condiciones de vida de los organismos. Esto es de aplicación, por ejemplo, a las sustancias que disminuyen la concentración de oxígeno, a las sustancias coloreadas o a la materia turbia, que reducen la exposición a la luz. También están incluidos efectos no relacionados con sustancias como los daños provocados por temperaturas extremas.

Los ensayos biológicos incluyen también aquellos destinados a investigar el efecto de los organismos sobre las sustancias, como por ejemplo, los estudios de degradación microbiológica.

Los resultados de los ensayos biológicos se refieren primariamente a los organismos utilizados en el ensayo y a las condiciones estipuladas en el mismo. Un efecto nocivo, establecido a partir de ensayos normalizados puede justificar la idea de que pueden estar en peligro los organismos y biocenosis acuáticos. Sin embargo, los resultados no permiten obtener conclusiones directas o extrapolaciones sobre la aparición de efectos similares en el medio ambiente acuático. Esto es de particular aplicación para sistemas a nivel de suborganismo, ya que quedan eliminadas o desactivadas propiedades importantes y funciones fisiológicas propias de organismos intactos (por ejemplo, tegumentos protectores y mecanismos reparadores).

En principio, no hay ningún organismo o biocenosis que pueda utilizarse para comprobar todos los efectos posibles sobre el ecosistema bajo las múltiples condiciones bióticas y abióticas. Solo unas pocas especies ("modelo") representativas de funciones ecológicas relevantes pueden ser ensayadas en la práctica.

Además de estas limitaciones prácticas fundamentales en la selección de los organismos de ensayo, la muestra a investigar puede plantear también problemas experimentales en los ensayos biológicos. Las aguas, y en particular las aguas residuales, son mezclas complejas que con frecuencia, contiene sustancias poco solubles, volátiles, inestables, coloreadas y/o partículas en suspensión, algunas veces coloidales. La complejidad y heterogeneidad de los materiales dan lugar a una gama de problemas experimentales en la realización de ensayos biológicos.

Se encuentran problemas especiales relacionados con la inestabilidad del material a ensayar debidos a reacciones y procesos de tipo:

- físico (por ejemplo, separación de fases, sedimentación, volatilización);
- químico (por ejemplo, hidrólisis, fotodegradación, precipitación); y/o
- biológico (por ejemplo, biodegradación, biotransformación, asimilación biológica en organismos).

Otros problemas como la turbiedad y el color se presentan especialmente si se aplican medidas de tipo espectrométrico.

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Este PROY-NMX-AA-121/2-SCFI-2008 da una serie de directrices prácticas sobre el muestreo, pretratamiento, tratamiento y evaluación de las aguas en el contexto de los ensayos biológicos. En ella se da información sobre cómo afrontar los problemas que se presentan en los ensayos biológicos como consecuencia de la naturaleza de la muestra de agua y la idoneidad del diseño del ensayo.

Se intenta transmitir la experiencia práctica relativa a las precauciones a tomar mediante la descripción de métodos satisfactoriamente probados para resolver o evitar algunos de los problemas experimentales que se dan en los ensayos biológicos de las aguas.

En la medida de lo posible se ha hecho referencia a normas o guías generales internacionales existentes. También se ha recogido información procedente de artículos publicados o de comunicaciones orales.

En primer lugar, se tratan problemas relacionados con la sustancia a ensayar que puedan tener influencia sobre el muestreo, pretratamiento y preparación de las muestras de agua en los ensayos biológicos y el tratamiento de las muestras durante el ensayo, especialmente cuando los ensayos se efectúan sobre aguas o aguas residuales que tienen constituyentes inestables o eliminables. Se subrayan los principios básicos de aseguramiento de la calidad, evaluación y presentación de los datos.

Se hace especial énfasis en los ensayos ecotoxicológicos con organismos (ensayos biológicos con una única especie). Algunas características apuntadas en esta guía general se aplican también a los estudios de biodegradación y/o bioacumulación en lo que se refiere al muestreo y preparación de las muestras. Se aborda también la preparación de sustancias poco solubles y su ensayo por encima de su solubilidad límite en agua.

Esta norma mexicana no es aplicable al examen bacteriológico del agua. En otras normas internacionales se describen métodos apropiados.

2 REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de la presente norma mexicana, se deben consultar las siguientes normas vigentes:

ISO 5667-3, Water quality, –Sampling- Part 3: Guidance on the preservation and handling of samples , o la NMX que la adopte.

ISO 5667-10, Water quality, –Sampling- Part 10: Guidance on sampling of waste waters, o la NMX que la adopte.

3 MUESTREO

3.1 Generalidades

La elección de puntos de muestreo representativos, la frecuencia del muestreo, el tipo de muestras tomadas, etc. dependen del objetivo del estudio. En general, el planteamiento del muestreo para análisis químico es compatible para los propósitos de los ensayos biológicos.

No obstante, algunos ensayos requieren que el agua y el agua residual se manejen y conserven de una determinada manera.

Dependiendo del tipo de investigación (por ejemplo, ensayos de toxicidad o de biodegradación) y de la manera en la que se procesen las muestras, es necesario dividir una muestra en distintas fracciones que se conservan y/o almacenan de diferente manera y se procesan de distintas formas.

Si se han tomado varias muestras (por ejemplo, en distintos puntos, o en distinto momento) pueden combinarse para conseguir una mayor representatividad. Es conveniente que estas muestras se mezclen bien y, si es necesario, se dividan en submuestras. Para obtener submuestras de la misma calidad, es conveniente asegurarse de que la muestra original conjunta mantiene su homogeneidad durante el proceso de obtención de las submuestras, por ejemplo, mediante agitación o movimiento constante. Esto es de particular aplicación en el caso de mezclas con dos fases, por ejemplo, aguas que contengan partículas en suspensión o suspensiones de algas. Se recomienda usar un aparato de muestreo refrigerado cuando se vayan a combinar varias muestras tomadas en diferentes momentos.

3.2 Muestreadores / recipientes / contenedores

El volumen, la forma y el material de los recipientes depende de la naturaleza de la muestra (por ejemplo, degradabilidad, estabilidad), del número de replicados, del volumen necesario para la realización de los ensayos y de la necesidad de preservar y almacenar las muestras antes de su procesamiento.

Es conveniente minimizar el tiempo requerido para la congelación y descongelación reduciendo el volumen de muestra, es decir, el tamaño del recipiente. En general, resulta apropiado utilizar recipientes de un litro para la congelación. Para aquellos ensayos que requieran volúmenes más grandes, es conveniente que la muestra se reparta en recipientes de volumen no superior a 101.

Es conveniente que el volumen total de muestra tomado sea suficiente como para permitir ensayos adicionales o repeticiones. Es conveniente que las submuestras congeladas sobrantes, que estén almacenadas separadamente, se guarden hasta que se haya efectuado la evaluación final.

Es conveniente que el material de los recipientes sea químicamente inerte, fácil de limpiar y resistente al calentamiento y a la congelación. Se recomienda utilizar recipientes de vidrio, de polietileno o de politetrafluoretileno (PTFE).

3.3 Nivel de llenado de los recipientes

Es conveniente decidir si los recipientes han de llenarse completamente hasta el borde o sólo parcialmente, dejando un espacio de aire, siempre teniendo en cuenta el tipo de muestra, el procedimiento de conservación y los ensayos previstos.

El llenado parcial puede plantear los problemas siguientes:

- potenciar la agitación durante el transporte, lo que origina la ruptura de las partículas agregadas;
- interacción con la fase gaseosa, provocando liberación de sustancias;
- oxidación de sustancias, provocando por ejemplo, la precipitación de compuestos de metales pesados;

El llenado total puede plantear los problemas siguientes:

- disminución del oxígeno y posible descomposición, con formación de metabolitos tóxicos (por ejemplo, nitrito, sulfuro);
- homogeneización deficiente por falta de agitación o movimiento del volumen total

No es conveniente llenar completamente los recipientes de muestras cuando se va a proceder a congelación como modo de conservación, puesto que se produce un aumento de volumen.

4 TRANSPORTE

Es conveniente que las muestras tomadas se protejan frente al riesgo de ruptura, incrementos de temperatura y frente a la contaminación externa. Es conveniente evitar la posible confusión en la identificación de las muestras que se transportan en hielo semifundido utilizando marcadores o etiquetas resistentes al agua.

5 CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Tal y como se indica en la Norma ISO 5667-3 es imposible dar normas generales de conservación, por ejemplo, tiempo de conservación y eficacia de los distintos métodos, ya que depende principalmente de la naturaleza de la muestra y, en particular, de su actividad biológica.

Las aguas potables y las aguas subterráneas generalmente son menos susceptibles a las reacciones químicas y biológicas que las aguas superficiales y las aguas residuales brutas o tratadas. Si puede predecirse de antemano su composición química aproximada, es conveniente referirse a la Norma ISO 5667-3 con vistas a su ensayo biológico. De todos modos, deben considerarse algunas precauciones adicionales, que se describen a continuación.

Es conveniente que las muestras destinadas a ensayos biológicos se procesen, preferentemente, sin dilación después de su recogida, para evitar cambios en la composición original como resultado de reacciones físicas o químicas y/o procesos biológicos. La duración máxima de su conservación no debería ser

superior a 12 h a temperatura ambiente (máximo 25°C). Es conveniente conservar las muestras en la oscuridad para prevenir el crecimiento de algas.

Si no es posible realizar el ensayo casi inmediatamente después del muestreo (o de la preparación de la muestra), por ejemplo cuando se preparan muestras compuestas, se recomienda enfriar o congelar.

El método más común y el más recomendado para la conservación de las muestras de agua residual es enfriar a una temperatura comprendida entre 0 °C y 5 °C. Cuando se enfría a esta temperatura y se mantiene en la oscuridad, la mayoría de las muestras son estables durante 24 horas (véase la Norma ISO 5667-10). El proceso de enfriado debe aplicarse lo más pronto posible tras el muestreo, bien sea en el campo, por ejemplo, en cajas con hielo semifundido, o en un refrigerador en el vehículo de transporte.

La congelación a temperatura inferior a -18°C de acuerdo con la Norma ISO 5667-10 permite, generalmente, un aumento en el tiempo de conservación. En términos generales, los periodos máximos de conservación están comprendidos entre unas cuantas semanas y 2 meses, dependiendo de la estabilidad de las muestras.

La experiencia ha demostrado que la calidad del agua residual puede quedar afectada tanto en su congelación así como en su descongelación.

Para ensayos biológicos ha de excluirse el empleo de conservantes de carácter biocida. Para estabilizar las muestras tampoco se recomienda la adición de ácidos o bases muy concentrados como, por ejemplo, HCl o NaOH.

Es conveniente remarcar que, en caso de duda, el analista químico y el biológico deben estar en contacto antes de decidir cuál es el método a aplicar para la manipulación y conservación de las muestras. Si las técnicas de conservación para análisis químico y para ensayo biológico no son compatibles, se debe disponer de submuestras separadas para los distintos propósitos.

6 APARATOS Y EQUIPOS

6.1 Selección de aparatos

El tipo, tamaño y material del equipamiento técnico dependen del ensayo y de la naturaleza de la muestra. Es conveniente que todos los materiales que entren en contacto con la muestra a ensayar sean tales que se reduzcan a un mínimo las interferencias causadas por sorción o difusión del material de ensayo, por elución de materias extrañas (por ejemplo, plastificantes) o por crecimiento de organismos. Resultan adecuados materiales inertes como, por ejemplo, vidrio y PTFE. Es conveniente que los tubos de conexión sean lo más cortos posible y que se cambien de vez en cuando. Es conveniente evitar la contaminación del material a ensayar, por ejemplo por la grasa que se utiliza en los tapones o conexiones. Los tubos de cobre, aleación de cobre o plásticos no inertes no resultan apropiados.

6.2 Silanización

Para minimizar la adsorción del material de ensayo pueden silanizarse los recipientes, tuberías, tubos, material de vidrio o material plástico, sumergiéndolos en o aclarándolos con una solución al 5% en peso de diclorodimetilsilano en cloroformo o heptano. A medida que se evapora el disolvente orgánico, se deposita silano sobre la superficie, que debería aclararse múltiples veces con agua o calentarse a 180°C durante 2 h antes de su utilización. Solo es conveniente utilizar la silanización si se van a ensayar sustancias o constituyentes del agua cuya adsorción sea intensa y no se disponga de un material inerte adecuado (por ejemplo, PTFE).

6.3 Limpieza de aparatos y equipos

Antes de su utilización, es conveniente limpiar los aparatos y equipos con agentes de limpieza adecuados, por ejemplo, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, detergentes, etanol, ácido sulfúrico/peróxido de hidrógeno y, si procede, esterilizar térmicamente o por vía química (por ejemplo, con solución de hipoclorito). No es conveniente utilizar mezcla crómica.

El aclarado repetido de los aparatos con agua destilada (o agua de igual grado de pureza), asegura que no quedan restos o trazas del agente de limpieza o desinfección.



Para eliminar de manera eficaz restos procedentes del uso previo del material, se recomienda lavar con ácido antes del aclarado final con agua destilada.

7 PRETRATAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

7.1 Generalidades

El siguiente diagrama (figura 1) contiene información o términos comúnmente utilizados (pero algunas veces de forma diferente) en las normas y guías generales para ensayos biológicos.

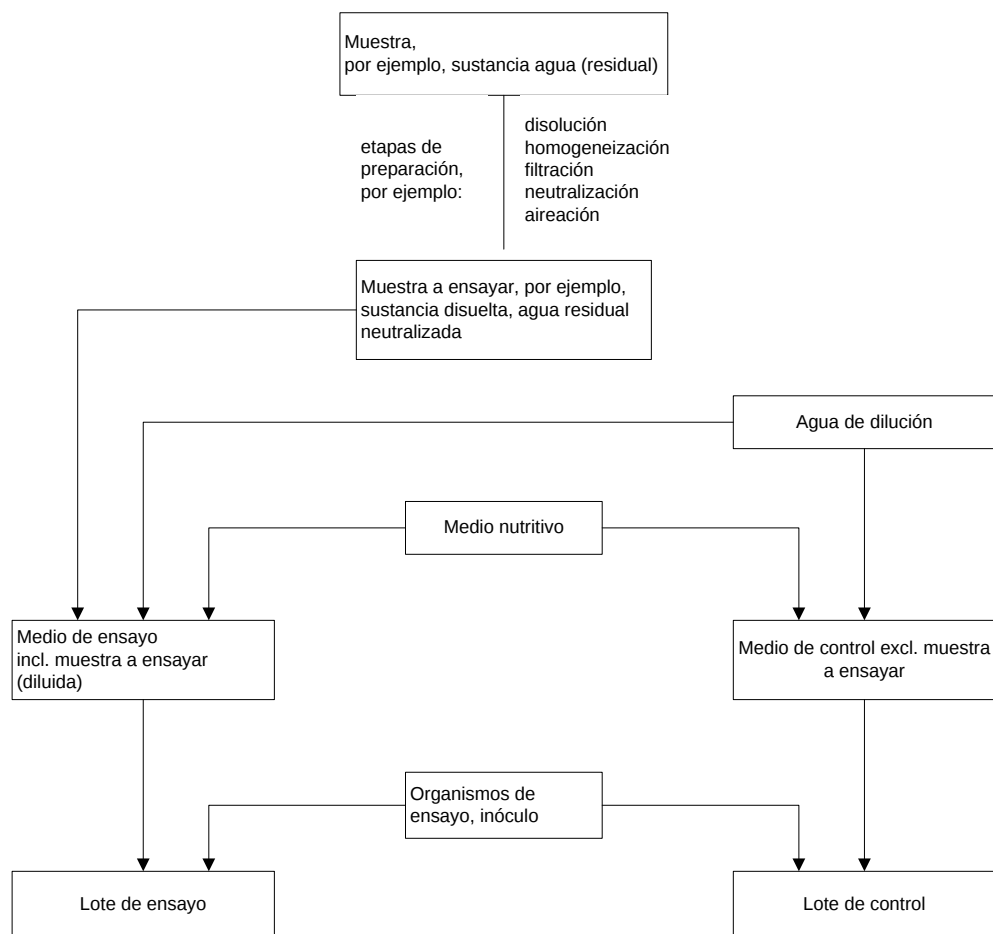


Fig. 1 – Preparación de muestras para ensayo biológico

La muestra es una preparación, en forma sólida o de disolución, de una sustancia química; una mezcla de varias sustancias; agua o agua residual. La muestra de ensayo se obtiene a partir de la muestra original tras varias etapas de preparación específicas para la muestra y el ensayo, por ejemplo, por disolución, homogeneización, sedimentación, filtración, neutralización o aireación. Se añade agua de dilución para preparar una serie de diluciones definidas. Después de añadir el medio nutritivo específico del ensayo, se obtiene el medio de ensayo (que incluye la muestra de ensayo).

El lote de ensayo final se obtiene añadiendo los organismos de ensayo - en el caso de microorganismos se denomina el inóculo. El lote de control, o varios en paralelo, se preparan con una mezcla de agua de dilución y solución nutritiva con los organismos de ensayo y sin la muestra de ensayo.

Cuando el efecto o el comportamiento de una sustancia se conoce a partir de ensayos anteriores (sustancia de referencia) y cuando esta sustancia se examina en el marco de una serie de ensayos como muestra de ensayo, se denomina el lote de referencia.

7.2 Descongelación

Es conveniente que se descongelen las muestras que se han conservado congeladas inmediatamente antes de su utilización. Se recomienda utilizar agua corriente o agua templada a una temperatura no superior a 25°C y aplicando una ligera agitación, para evitar sobrecalentamientos locales.

Es esencial una completa descongelación de las muestras antes de su utilización, ya que el proceso de congelación puede tener el efecto de concentrar algunos componentes en la parte interna de la muestra, que se congela mas tarde. El tratamiento con microondas comporta el riesgo de sobrecalentamiento.

7.3 Homogeneización

Es conveniente asegurar una distribución regular de todos los componentes solubles y en forma particulada.

Dependiendo de la naturaleza de las muestras, puede aplicarse agitación suave o vigorosa, tratamiento con ultrasonidos y dispersión mecánica a alta

velocidad. Durante esta etapa de tratamiento, es conveniente prestar atención a la pérdida potencial de componentes volátiles.

Como regla general, es conveniente tomar las precauciones adecuadas para recuperar el estado original de la muestra o, al menos, que ésta sufra la mínima alteración posible.

7.4 Separación de la materia soluble y en forma particulada

En general, los ensayos biológicos se efectúan sobre la muestra original. Sin embargo, en algunos casos, cantidades elevadas de materia en forma particulada, lodos y sedimentos, interfieren con los requerimientos de comportamiento de los organismos de ensayo (obturación de las branquias de los peces, empeoramiento de la alimentación por filtración de los dáfnidos, limitación luminosa para las algas).

Si no se pretende que los resultados de los ensayos reflejen estos efectos nocivos, tales interferencias pueden evitarse o superarse de varias maneras.

Las aguas ricas en partículas pueden ocasionar interferencias, por ejemplo, en la cuantificación con un contador de partículas. El recuento microscópico también se ve fuertemente perjudicado. La dosificación en continuo ofrece poca confianza por atascamiento o bloqueo de los tubos.

Sin embargo, la filtración, la centrifugación y otros métodos de separación implican el riesgo de que los componentes activos que están asociados a las partículas queden eliminados antes del comienzo del ensayo. Además, es preciso tener en cuenta los problemas relacionados con la filtración como, por ejemplo, la adsorción sobre los materiales filtrantes y su lixiviación. La sedimentación y la centrifugación obvian estos problemas. Cuando la realización de los ensayos en presencia de partículas cause serios problemas, se recomienda dejar sedimentar la muestra durante un período comprendido entre 30 min y 2 h o efectuar una filtración grosera ($>50\ \mu\text{m}$), lo cual eliminará únicamente las partículas gruesas. La materia particulada separada puede ser examinada independientemente.

Algunos métodos de ensayo ofrecen la posibilidad de determinar un factor de corrección para parámetros como la turbiedad.

Las aguas ricas en bacterias interfieren en los ensayos relacionados con la actividad bacteriana, por ejemplo la inhibición de la respiración. La interferencia debida a la actividad de las bacterias en la muestra puede estimarse, al menos parcialmente, realizando los controles oportunos. Al ensayar ciertas algas, huevos y freza o cultivos celulares, pueden producirse interferencias por infecciones bacterianas. Todos los métodos de esterilización disponibles, como el tratamiento térmico o con radiación UV o la filtración por membrana (0,2 μm) conllevan un alto riesgo de efectos colaterales. Cuando se precisa filtración es preferible efectuarla sobre un filtro de fibra de vidrio. En general, la centrifugación, por ejemplo, 10 min a 4 500 g $\pm$ 1500 g, es preferible a la filtración.

7.5 Preconcentración

La preconcentración de las muestras incrementa la concentración no solo de las sustancias nocivas sino también de otros constituyentes del agua, que probablemente puedan ser dañinos en concentraciones más altas.

Además, es esencial tomar en consideración que, en cualquier caso, la preconcentración es selectiva dependiendo del procedimiento aplicado. Esto altera el perfil original de composición de los constituyentes del agua, por ejemplo:

- la extracción líquido/líquido con disolventes orgánicos y la extracción en fase sólida por adsorción sobre sólidos (por ejemplo, resinas XAD) es particularmente eficiente para los componentes hidrófobos en agua. La presión osmótica y la fuerza iónica pueden verse reducidas. Los iones tóxicos, las sustancias químicas polares y otros componentes de la fase acuosa, tales como los ácidos húmicos, pueden quedar excluidos (por ejemplo, por enmascaramiento);
- la evaporación y la liofilización pueden originar una pérdida de sustancias volátiles y aumentar la fuerza iónica y la presión osmótica;
- la ultrafiltración puede originar una pérdida selectiva de moléculas pequeñas capaces de atravesar la membrana



El incremento en concentración por encima del límite de solubilidad puede originar la precipitación o la floculación de sustancias previamente disueltas.

La bioacumulación no puede simularse mediante la preconcentración de las muestras, ya que los factores de bioconcentración (FBC) no pueden relacionarse o extrapolarse.

La concentración de ciertos compuestos presentes en la muestra de agua puede originar que se produzcan reacciones químicas a mayor velocidad que en la muestra original.

Sólo pueden obtenerse valores apropiados de blanco si se dispone de muestras de referencia no contaminadas como, por ejemplo, aguas arriba de la fuente de contaminación. El incremento de salinidad puede tolerarse si se preparan blancos con igual presión osmótica y similar composición iónica (ejemplo, relación Na:K).

No es posible extrapolar, a partir de los ensayos de toxicidad aguda con muestras preconcentradas, los efectos crónicos de la muestra original.

Por lo tanto, es preferible seleccionar un sistema de ensayo más sensible o prolongar el tiempo de exposición a preconcentrar una muestra. Si no hay un método sensible disponible para ensayar la muestra original y se aplica un procedimiento de preconcentración, los resultados son tanto más discutibles cuanto mayor es el factor de concentración.

Por las razones anteriormente mencionadas, los ensayos de toxicidad aguda y de toxicidad crónica con muestras preconcentradas carecen de significado y no se recomiendan. En todos los casos conviene interpretar los resultados obtenidos en ensayos con muestras de agua preconcentradas con extrema precaución. No es posible normalizar investigaciones preliminares de este tipo y es conveniente que sean validadas por ulteriores investigaciones más completas.

7.6 Ajuste de pH

La selección del valor de pH al que se va a ajustar la muestra depende del objetivo del ensayo:

- el ajuste al pH del agua receptora produce resultados más representativos del efecto de los tóxicos una vez se encuentran en el medio ambiente;
- el ajuste a un valor definido de pH comprendido entre 6 y 9 (que usualmente es tolerable por la biota acuática) permitirá poner de manifiesto tóxicos ionizables que, de otro modo, quedarían enmascarados por condiciones de pH fuera de este rango.

Normalmente, hay que neutralizar las muestras con valores extremos de pH que exceden los límites de tolerancia de los organismos de ensayo. Es conveniente omitir la neutralización si se trata de ver en el resultado del ensayo el efecto del pH o si se observan cambios físicos o reacciones químicas (por ejemplo, precipitación) como consecuencia del ajuste de pH. Es conveniente que la concentración del ácido o de la base requerida para la neutralización sea tal que el cambio de volumen sea el mínimo posible. Es conveniente evitar sobrepasar el punto de neutralización.

Es conveniente que los agentes neutralizantes no reaccionen con los constituyentes de la muestra, ya que podrían, por ejemplo, originar precipitación o formación de complejos. Además conviene que no afecten al organismo de ensayo, ya sea por activación o por inhibición. Normalmente, se recomienda utilizar soluciones de ácido clorhídrico o de hidróxido de sodio.

7.7 Preparación de las soluciones madre y lotes de ensayo

7.7.1 Sustancias solubles en agua. Cuando se prepara la solución madre, no es conveniente que la cantidad de sustancia pesada supere la cantidad máxima que puede disolverse ($<$ que la concentración de saturación). Puede aumentarse la cinética de disolución por agitación y/o calentamiento. No es conveniente que esto provoque, sin embargo, pérdidas de sustancia o descomposición térmica de la muestra de ensayo.

7.7.2 Emulsiones y suspensiones estables en agua. En el caso de las emulsiones (por ejemplo, emulsiones de aceites de corte) y de las suspensiones (por ejemplo, leche de látex) que son estables en agua, y también para las sustancias que forman estas mezclas estables en agua, es conveniente preparar diluciones graduales.

Si no se obtiene una distribución homogénea en el licor madre, es conveniente agitar o remover la muestra durante un período de tiempo no superior a un día.

7.7.3 Preparación de las soluciones madre y lotes de ensayo

7.7.3.1 Generalidades. Es conveniente considerar como débilmente solubles aquellas sustancias cuya solubilidad en agua sea inferior a, aproximadamente, 100 mg/l. Cuando se están examinando sustancias poco solubles, hay que asegurarse de que la materia sin disolver no queda en forma de sedimento, de partículas flotantes o de dispersión. Por tanto, de cara a obtener resultados seguros y reproducibles, al utilizar estos métodos hay que asegurarse de que se obtiene una distribución lo más homogénea posible del compuesto a ensayar en el lote de ensayo.

En caso de ensayos de toxicidad, es aconsejable primero cerciorarse si la sustancia tiene efectos en el rango de su solubilidad en agua. Es conveniente tener presente que, en el caso de algunas sustancias puras, algunas veces hay superposición entre sistemas con dispersiones moleculares, micelares, coloidales e incluso con dispersiones de partículas gruesas (ejemplo: surfactantes isómeros puros). En el caso de mezclas de isómeros, por ejemplo, surfactantes, no hay un límite específico de solubilidad de la sustancia. Los métodos ópticos simples (por ejemplo, medidas de dispersión de la luz) no permiten la determinación fiable del grado de dispersión.

Es imposible recomendar un único método para generar una solución o distribución óptima de las sustancias en el medio, ya que el método seleccionado debería corresponderse con las propiedades físicas de la sustancia en cuestión. Por esta razón, la elección de un método adecuado se deja a criterio de la experiencia del investigador y/o a la información aportada por el fabricante.

Las siguientes recomendaciones generales se derivan de experiencias prácticas y proporcionan consejo sobre los modos y medios que permitirán al investigador, una vez sopesados los pros y los contras, seleccionar el método más adecuado.

7.7.3.2 Ensayos en el rango de solubilidad en agua. Con este fin, se mezcla por agitación un peso definido de sustancia (por ejemplo, 100 mg) se mezcla con 1 litro de agua destilada durante aproximadamente 24 h, preferiblemente en la oscuridad. Debe indicarse la porción pesada para la preparación del licor madre. Tras la separación de fases, la fase no disuelta se separa completamente por filtración (en caso necesario, utilizando un filtro de membrana de 0,2 μm de tamaño de poro) o por centrifugación. Las series de diluciones se preparan con la fase acuosa. Según convenga y dependiendo de las propiedades de la sustancia (por ejemplo, elevada viscosidad o descomposición en agua) es conveniente considerar tiempos más largos o más cortos de mezclado, barajando la posibilidad de utilizar agentes auxiliares.

NOTA - Dependiendo de las sustancias a ensayar, las técnicas de filtración y de centrifugación pueden conducir a la obtención de resultados diferentes.

Si la solubilidad se ve reducida por la adición de constituyentes del medio (por ejemplo, sales nutritivas), resulta ventajoso preparar una solución saturada por mezclado de la sustancia con el medio de ensayo. En algunos casos individuales es conveniente considerar la sustitución de las sales (por ejemplo, iones Ca o Mg) por otras (por ejemplo, iones Na o K), que no originen precipitados.

Puede conseguirse una distribución fina de fluidos de alta viscosidad por fragilización a bajas temperaturas (por ejemplo, utilizando nitrógeno líquido) y a continuación compresión mecánica (ejemplo en molinos de martillo).

Los filtros para recoger los constituyentes no disueltos deben ser templados (filtros inorgánicos). Los filtros orgánicos requieren un tratamiento repetido con agua destilada hirviendo para asegurarse de que no se transfieren componentes constitutivos del material del filtro a la solución de ensayo. No son recomendables los filtros de acetato de celulosa.

Dependiendo del material del filtro, la filtración puede retener no sólo los constituyentes no disueltos sino que también puede haber pérdidas por sorción de la sustancia de ensayo disuelta. A concentraciones < 1 mg/l esto puede originar una pérdida considerable de sustancia. Las pérdidas pueden reducirse descartando la primera porción de filtrado. Generalmente, el uso de materiales filtrantes inorgánicos produce menores pérdidas que si se emplean filtros de tipo orgánico.

Existe una gama de métodos mecánicos y químicos para alcanzar la concentración de saturación. Sin embargo, debería tenerse presente que es conveniente dar prioridad a los mecánicos para preparar soluciones saturadas. Sólo se debería recurrir a los métodos químicos (ácidos, bases, disolventes) en casos excepcionales.

Los medios que pueden utilizarse para alcanzar la concentración de saturación son los siguientes:

- a) *Sonicación/molino de alta velocidad* (ventaja: mayor velocidad de disolución; desventajas: mayor dificultad para la separación de fases, posible descomposición y calentamiento por aporte de energía). En la Norma ISO 10634 se dan más detalles al respecto.
- b) *Aumento de temperatura* (ventaja: usualmente mayor solubilidad y mayor velocidad de disolución; desventajas: aumenta la volatilización, riesgo de descomposición y reacciones de hidrólisis, posibilidad de sobresaturación con posterior precipitación retardada). No resulta conveniente enfriar las soluciones saturadas.
- c) *Uso de ácidos/bases con la consiguiente neutralización* (ventaja: aprovechamiento de la mayor solubilidad de la forma protonada o no protonada; desventajas: sólo es aplicable en casos excepcionales, a valores extremos de pH hay riesgo de cambios químicos en la muestra de ensayo, por ejemplo por hidrólisis y algunas veces, un establecimiento del equilibrio tras la neutralización muy lento, por ejemplo: ácidos grasos/jabones).

d) *Disolución de la sustancia en un disolvente volátil, no miscible con el agua* (por ejemplo, n-hexano o éter de petróleo) que se purga después del mezclado con agua (ventaja: distribución fina y rápida de la sustancia a ensayar; desventajas: también puede expulsarse y perderse la sustancia a ensayar, no se puede evitar que queden pequeños residuos de disolvente en el lote de ensayo).

e) *Disolución de la sustancia en un disolvente no tóxico, miscible con el agua* (por ejemplo, etanol, acetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, dimetilformamida). Es conveniente considerar, a la hora de seleccionar el disolvente, su capacidad de solubilización, toxicidad, degradabilidad y volatilidad. Los agentes de solubilización (concentración: $< 0,1 \text{ g/l}$) permanecen durante un cierto tiempo en la serie de ensayo. Es improbable que produzcan un incremento considerable en la concentración de saturación en agua; más bien producen una distribución fina y rápida de la sustancia de ensayo en el licor madre. Es necesario un lote de control adicional con la concentración máxima de disolvente utilizada en el ensayo. Incluso aunque no se observen efectos nocivos, no puede excluirse que la presencia del disolvente afecte a la acción de la sustancia de ensayo sobre los organismos de ensayo, por ejemplo contribuyendo al paso a través de la pared celular.

f) *Sorción de la sustancia en un soporte inerte*. Puede prepararse una solución acuosa saturada por aplicación de la sustancia, utilizando un disolvente volátil como n-hexano o éter de petróleo en caso necesario, sobre un soporte inerte (por ejemplo, perlas de vidrio, sílica gel, resinas cromatográficas). Esto se introduce en un sistema de flujo y se aclara con agua. Las sustancias a disolver están frecuentemente disponibles en forma de verdadera dispersión molecular.

7.7.3.3 Ensayos por encima del límite de solubilidad. En estudios de degradación, se ensayan sustancias débilmente solubles por encima de su límite de solubilidad. Es importante conseguir un alto grado de distribución para la materia no disuelta con objeto de asegurar un área de contacto amplia entre los microorganismos y la sustancia. Siempre es necesario agitar o remover los lotes de ensayo a lo largo del ensayo con objeto de garantizar una constante disolución de la sustancia. Se recomienda utilizar los siguientes métodos.

a) Dosificación directa

La sustancia se introduce directamente en el lote de ensayo. Los portaobjetos de microscopio resultan adecuados para la introducción de

sustancias sólidas o de líquidos de alta viscosidad. Con frecuencia se utilizan como solubilizantes disolventes miscibles con el agua, no tóxicos y no degradables como, por ejemplo, dimetilsulfóxido (véase 7.7.3.2). Esta técnica queda restringida a sustancias de ensayo no volátiles.

b) Tratamiento con ultrasonidos

El tratamiento con ultrasonidos (por ejemplo, 20 kHz, 30 min) con frecuencia permite conseguir una dispersión mecánica suficientemente estable, que después de 15 min a 30 min de decantación, puede distribuirse directamente a cada uno de los lotes de ensayo. Son necesarios métodos analíticos adecuados, por ejemplo, Carbono orgánico total (COT) o análisis específicos, para determinar la concentración inicial en el lote de ensayo.

c) Adsorción de la sustancia en un soporte inerte

Es conveniente que este método esté en consonancia con los procedimientos mencionados en el apartado 7.7.3.2 (adsorción de la sustancia en un soporte inerte). El soporte con la sustancia a ensayar homogéneamente aplicada es ahora un constituyente del lote de ensayo. Este método no resulta adecuado para sustancias volátiles, que se eliminan durante la aplicación y subsecuente secado del soporte.

d) Dispersión de la sustancia con un agente emulsionante

Es conveniente que los agentes emulsionantes, en la concentración utilizada (≤ 100 mg/L) sean estables y no tóxicos a lo largo del período de ensayo. Como agentes emulsionantes pueden utilizarse las siguientes sustancias:

- polietilen sorbitol monolaurato;
- polietilen sorbitol trioleato;
- nonilfenol-20 EO-acetal (muy adecuado para ensayos de degradación);
- aceite de ricino modificado (menos adecuado para ensayos de degradación);
- copolímeros de óxido de eteno/óxido de propeno (adecuados para ensayos de degradación).

Para preparar una emulsión químicamente estable, se recomienda mezclar la sustancia a ensayar con el agente emulsionante antes de su introducción en agua. En caso de utilizar un disolvente volátil adicional, no miscible con el agua (por ejemplo n-hexano o éter de petróleo) para la preparación de una emulsión, es conveniente purgar la muestra a ensayar pretratada antes de la incorporación del organismo de ensayo.

Generalmente, las sustancias sólidas poco solubles no se ensayan por encima de su límite de solubilidad. Los ensayos de toxicidad por encima del límite de solubilidad sólo son aconsejables para sustancias sólidas fácilmente dispersables y sustancias sólidas que se comercializan como dispersiones o entran en contacto con agentes emulsionantes cuando se utilizan adecuadamente.

No es recomendable efectuar estudios de bioacumulación y ensayos biológicos a largo plazo por encima del límite de solubilidad.

La propensión de una sustancia a dispersarse en el agua depende sobre todo de su densidad, de su viscosidad y de su tensión superficial. Aumentando el aporte de energía, puede obtenerse un tamaño de partícula menor y, a menudo con ello una mayor estabilidad de la dispersión. Sin embargo, existen indicios de que el efecto nocivo de una emulsión está también influenciado por

el tamaño de las gotas emulsificadas. Es probable que los mecanismos por los que se produce la asimilación por los organismos de partículas emulsionadas sean diferentes de los de asimilación de sustancias disueltas.

Frecuentemente, las dispersiones mecánicas son inestables. Algunas veces se puede evitar la separación de fases por agitación o movimiento constante u otros modos de mezclar la muestra durante el ensayo. Es conveniente tomar precauciones para evitar daños mecánicos a los organismos de ensayo.

NOTA - Las gotas de aceite y las películas superficiales pueden tener efectos perjudiciales sobre los organismos, especialmente en el caso de los dáfnidos. Es posible prevenir el contacto de los dáfnidos con películas superficiales por separación mecánica con redes/tamices o por oscurecimiento de la superficie.

Puede estimarse la estabilidad de una emulsión por observación visual, análisis químico (por ejemplo, Carbono orgánico disuelto (COD)/COT); y por medidas de la turbidez. En principio, se da prioridad a las dispersiones preparadas mecánicamente sobre las preparadas con agentes emulsionantes.

Hay dos formas de preparar una serie de diluciones de una dispersión madre con agentes emulsionantes:

- Manteniendo una concentración constante de agente emulsionante;
- manteniendo una relación constante de concentración de sustancia a ensayar frente a concentración de agente emulsionante.

Como norma, es preferible dar prioridad a mantener la misma concentración de agente emulsionante en todas las series de ensayo, para asegurar que la relación concentración-efecto depende únicamente de la concentración de la sustancia de ensayo, evitando así la ruptura de la emulsión a diluciones más elevadas. Siempre es necesario un lote de control adicional, con la concentración más elevada de agente emulsionante.

A la hora de interpretar los resultados, es conveniente tener en mente que los efectos observados son efectos combinados, incluso si el emulsionante, por sí mismo, no muestra efecto en el lote de control.

7.7.3.4 Problemas especiales con mezclas de sustancias o productos técnicos. Cuando se ensayan sustancias con subingredientes tóxicos fácilmente solubles (por ejemplo, tetrabutilestaño contaminado con óxido de tributilestaño) y mezclas de sustancias poco solubles (por ejemplo, productos derivados del petróleo), el extracto acuoso puede estar enriquecido en los componentes más solubles. A menudo, esto se pone de manifiesto por un aumento en el COD con incremento en la fracción másica, en presencia de una fase existente todavía no disuelta. Para registrar efectos de este tipo, se recomienda preparar y ensayar una solución acuosa adicional saturada, con una relación de mezcla más alta (por ejemplo, 0,1 g o 1 g de sustancia por litro de agua). La comparación de los resultados obtenidos con varias relaciones de mezcla puede indicar los efectos de componentes fácilmente solubles de una mezcla heterogénea.

Como alternativa a este procedimiento es aconsejable ensayar mezclas de sustancias de ensayo que no sean fácilmente solubles y sustancias con componentes minoritarios fácilmente solubles preparando una serie de extractos acuosos en los cuales los niveles de carga disminuyen en progresión geométrica. Es conveniente ensayar los extractos acuosos en forma no diluida y el resultado referirlo a los niveles de carga, en vez de a la concentración de la fase acuosa. Es importante remarcar que no es conveniente diluir los extractos acuosos.

Como es frecuente que la composición química de la fracción disuelta de mezclas varíe considerablemente con respecto a la del producto original, es aconsejable examinar también los efectos del producto original en forma de dispersión (véase 7.7.3.3).

8 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DURANTE EL ENSAYO

8.1 Aireación

Debe satisfacerse la demanda de oxígeno de los organismos de ensayo y microorganismos heterótrofos mediante, por ejemplo, aireación continua o intermitente. En casos especiales, como por ejemplo, aguas residuales con una demanda bioquímica de oxígeno (DBO) extremadamente alta, es necesario aportar oxígeno puro en vez de aire. Debe evitarse la sobresaturación (con respecto al aire). Los problemas relacionados con la liberación de compuestos volátiles y las pérdidas de sustancias por formación de espumas pueden evitarse mediante métodos especiales (véase 10.1.3).

8.2 Suspensión

La materia particulada presente en el agua puede ponerse en suspensión durante el ensayo si no es previsible un efecto interferente (véase 7.4). Es conveniente mantener los microorganismos planctónicos en suspensión durante el ensayo mediante métodos adecuados, por ejemplo, removiendo, agitando o mediante rotación o aireación.

Deberían tomarse las medidas adecuadas par evitar el deterioro mecánico de los organismos de ensayo

8.3 Ajuste y control del pH

En determinadas circunstancias (por ejemplo, a consecuencia de la aireación) el pH variara durante el ensayo, incluso cuando la muestra haya sido previamente neutralizada. El ajuste y control del pH durante el ensayo debería decidirse en función de la causa que provoca la deriva del pH y el objetivo del ensayo. Una deriva del pH por causas abióticas puede distinguirse mediante la realización de un lote sin organismos.

Desde el punto de vista del analista y del legislador, sería deseable trabajar con una sustancia en un estado químico constante y claramente definido. Es conveniente evitar, o contrarrestar, el aumento del valor de pH debido a problemas prácticos, por ejemplo, el desprendimiento de CO₂ por aireación.

Este factor es especialmente importante en la modificación de la toxicidad, provocada por el pH, en peces según esté el amonio ionizado o no ionizado. Otros ejemplos de sustancias que muestran una toxicidad dependiente del pH son los sulfuros, cianuros, aminas, fenoles y ácidos orgánicos.

No obstante, si el cambio del valor del pH durante el ensayo se produce a consecuencia de procesos vitales fundamentales tales como la fotosíntesis en el crecimiento de las algas, que está necesariamente acompañada de un consumo de CO₂, resulta razonable no ajustar el pH.

Dejar que varíe a lo largo de un intervalo amplio no solo mejora la aplicabilidad y el valor indicativo del ensayo, sino que también ofrece la oportunidad de desencadenar el efecto de un compuesto químico que, de otro modo, podría haber permanecido sin detectar.

El aumento del valor del pH en los ensayos con algas puede reducirse por varios métodos:

- adición de tampón;
- adición de carbonato
- adición de CO₂ gas;
- aumento del intercambio de gases mediante aireación y/o agitación;
- limitación de la iluminación;
- limitación de los nutrientes;
- limitación de la temperatura;
- limitación de la duración del ensayo;
- reducción del inóculo



Todas estas opciones tienen consecuencias y efectos colaterales no deseables, por ejemplo por reacción con un compuesto de ensayo, precipitación, liberación de volátiles, complicación del diseño del ensayo, limitación del crecimiento y problemas relacionados con la medida. En general, un intercambio de gases optimizado y la realización del ensayo en los límites mínimos de luz y temperatura reducirán el problema.

EL control del valor del pH en los ensayos con peces puede lograrse por adición de dióxido de carbono o ácido clorhídrico, o bien, llevando a cabo el ensayo bajo concentraciones específicas de CO₂ atmosférico. EL ajuste del pH durante el ensayo precisa de una regulación independiente de la retroalimentación para cada recipiente de ensayo.

9 LÍNEAS DIRECTRICES GENERALES PARA EL DISEÑO DEL ENSAYO

9.1 Preparación de las diluciones

Por razones fisiológicas, los ensayos biológicos que emplean organismos acuáticos no pueden llevarse a cabo utilizando como medio agua desionizada. En función de la naturaleza de los análisis deberá utilizarse agua del grifo libre de cloro, agua dulce sintética, agua de mar (posiblemente con aditivos nutritivos), agua subterránea o agua superficial. Esta última es menos adecuada para investigaciones toxicológicas, pero está más indicada para investigaciones ecológicas, por ejemplo, para evaluar la capacidad de soporte del agua en función de la situación local (carga existente, adaptación).

Cuando se realicen ensayos de toxicidad específica frente a una sustancia, si no se utiliza un medio sintético normalizado, será necesario ajustar la dureza del agua, el pH y, posiblemente, la relación molar específica de los iones calcio y magnesio. Para algunos ensayos con organismos marinos, es esencial la utilización de agua de mar natural.

Se combinan cantidades definidas de la muestra con los correspondientes volúmenes de agua de dilución, con objeto de obtener la concentración o dilución deseada.

Como agua de dilución se utiliza el agua especificada en la norma apropiada. Habitualmente se utilizan series con niveles de concentración en progresión geométrica.

9.2 Ensayos de investigación preliminar del rango y ensayos limite

Cuando únicamente se desea averiguar si una concentración dada o un nivel de dilución presentan determinado efecto (ensayo limite), no resultan necesarias las series de dilución.

Es conveniente determinar primero, mediante un ensayo de investigación preliminar del rango con un menor número de organismos de ensayo, el rango aproximado de concentraciones efectivas y, solo entonces, llevar a cabo el ensayo principal. Las muestras inestables (por ejemplo, agua residual) pueden alterar sus propiedades durante el tiempo requerido para el ensayo preliminar.

En este caso, es conveniente que el ensayo principal se efectúe de forma inmediata, posiblemente con una distribución más amplia sobre un extenso rango de concentraciones.

9.3 Ensayos suplementarios

Cuando, en casos particulares, el rango de concentraciones efectivas no se cubra totalmente por las concentraciones elegidas, es conveniente repetir el ensayo o establecer unas series de ensayo suplementarias. En este caso, al menos dos concentraciones deberían ser idénticas a otras dos pertenecientes a las series de ensayo precedentes.

La evaluación conjunta de las dos series de ensayo sólo es posible si las concentraciones escalonadas no muestran variaciones mayores que las existentes entre los lotes en paralelo, dentro de una misma serie. Los ensayos suplementarios no son practicables en el caso de aguas o de aguas residuales que estén sujetas a alteraciones.

9.4 Lotes de control y de referencia

Es conveniente que para cada ensayo se examinen uno, o en su caso varios, lotes de control en paralelo (9.5). Los lotes de control o de referencia deberían ser idénticos a los lotes de ensayo, pero sin contener los componentes a ensayar. Con objeto de identificar posibles interferencias en el transcurso del ensayo y para excluir organismos de ensayo inapropiados, es recomendable someter a ensayo, a intervalos regulares, una sustancia de efecto conocido (sustancia de referencia). En el caso de experimentos con animales que requieran autorización, el número de lotes en paralelo y de referencia debe mantenerse al mínimo. Algunas sustancias de referencia frecuentemente empleadas en los ensayos de toxicidad son, por ejemplo, el dicromato de sodio y el 3,5-diclorofenol.

9.5 Lotes paralelos / replicados

9.5.1 Generalidades. Cuando se someten a ensayo replicados para cada nivel de concentración/dilución, es posible obtener observaciones independientes bajo condiciones por otra parte idénticas. Es conveniente que las condiciones ambientales, tales como la temperatura y la luz, se mantengan constantes e iguales en la medida de lo posible. Con objeto de compensar las restantes diferencias, es aconsejable no disponer los replicados uno al lado del otro.

NOTA 1 - Repetición de las medidas: Cuando se llevan a cabo varias medidas de un mismo lote de ensayo (por ejemplo, varios recuentos de un único lote en el ensayo de algas), estas no constituyen observaciones realmente independientes (replicados). Estas medidas sirven más bien para corregir inexactitudes en la medida. En tales casos, es posible determinar el valor medio de las repeticiones y utilizarlo como "el mejor valor individual" para las estimaciones estadísticas. En el caso del ensayo de inhibición del crecimiento de algas, los lotes paralelos pueden, por tanto, considerarse como replicados verdaderos, independientemente del número de muestras que se tomen de ellos.

NOTA 2 - Pseudoreplicados: Por ejemplo, en el ensayo de reproducción de *Daphnia*, un mismo recipiente contiene varios animales, lo que significa que el número de nacimientos que se producen puede determinarse únicamente para cada recipiente (y no para cada animal), por lo que el número de observaciones independientes (replicados) corresponded al número de recipientes y no al número de animales.

El número de lotes paralelos esta con frecuencia restringido por motivos de falta de tiempo, espacio o recursos financieros. Además, en el caso de ensayos con animales vertebrados, es imperativo mantener el número de animales de ensayo al mínimo por razones éticas.

Un requisito adicional para determinar el número de lotes en paralelo para cada nivel de concentración y para los experimentos de control es el tipo de evaluación que se pretende realizar en dicho ensayo (véase el capítulo 12).

9.5.2 Concentraciones umbral (CNOE/CMOE). Al contrario que para los ensayos límite (véase 9.2), las concentraciones umbral (CNOE/CMOE, véase 12.3.1) se determinan mediante un análisis de la varianza (ANOVA) (por ejemplo, ensayo de Dunnett) para reconocer si una concentración específica produce un efecto significativo.

El número de replicados requeridos depende de la varianza en el punto final, del número de etapas de concentración y la diferencia entre las mismas, así como de la magnitud de la diferencia entre los efectos correspondientes al lote de ensayo y al experimento de control, verificado estadísticamente para un nivel de significación determinado. Se recomienda generalmente que el número de lotes de control duplique, como mínimo, al número de replicados para cada nivel de concentración/dilución o bien que se incremente en un factor de $\sqrt{p}$, donde p es el número de concentraciones de ensayo.

9.5.3 Relación entre la concentración y la respuesta. Cuando se determina la relación entre la concentración y la respuesta, resulta de decisiva importancia para el diseño del ensayo el tipo de dato que se obtendrá en el punto final, es decir, si van a determinarse variables discretas (cualitativas) o métricas (cuantitativas).

La mortalidad (o inmovilidad) de los organismos de ensayo que se determina en el ensayo de toxicidad aguda es una variable discreta típica.

Por el contrario, las variables métricas muestran incrementos de tipo continuo, es decir un gradiente de respuestas. Algunas variables métricas típicas son, por ejemplo, la longitud corporal o la biomasa, las velocidades metabólicas, las tasas de producción o consumo de oxígeno o las velocidades de transformaciones enzimáticas. EL número de animales jóvenes producidos puede también considerarse como una variable métrica aproximada.

En el caso de variables métricas, los resultados correspondientes a cada uno de los niveles de concentración/dilución se evalúan con respecto a los de los lotes de control. Por tanto, debe prestarse especial atención para asegurarse de la fiabilidad estadística de los controles.

Cuando se determinan variables discretas, las observaciones correspondientes se incluirán directamente en la relación establecida entre la concentración y la respuesta. No es necesario, en consecuencia, que el número de replicados en el experimento de control sea mayor que en los lotes de ensayo.

Generalmente, cuando se determina la relación que existe entre la respuesta y la concentración, es aconsejable reducir el número de replicados en los lotes de ensayo y aumentar el número de niveles de concentración. Este procedimiento resulta aceptable porque los puntos de medida adyacentes en una serie de dilución escalonada en pequeños intervalos pueden servir de apoyo mutuo. El número mínimo de replicados para cada nivel de concentración es de dos.

No es conveniente establecer los distintos niveles consecutivos de concentración demasiado próximos entre sí, con objeto de evitar que las concentraciones efectivas sean virtualmente idénticas como consecuencia de la variabilidad del sistema de ensayo.

10 LÍNEAS DIRECTRICES ESPECIALES RELATIVAS AL FUNCIONAMIENTO DEL ENSAYO

10.1 Problemas y medidas preventivas para muestras que pueden sufrir pérdidas de ciertos componentes

10.1.1 Generalidades. Una muestra de agua puede perder componentes en el sistema de ensayo por diferentes razones:

- evaporación de sustancias volátiles;
- biodegradación;
- degradación abiótica (ejemplo hidrólisis, fotólisis);
- sorción sobre los materiales del recipiente, particularmente en el caso de los componentes hidrófobos;
- formación de espumas de los agentes tensoactivos;
- precipitación;
- floculación.

En estos casos, las fracciones de sustancia utilizadas en el sistema de ensayo no están disponibles para los organismos a un nivel constante durante todo el ensayo.

Un ensayo preliminar con y sin organismos puede ayudar a clarificar que vía de eliminación es responsable de la pérdida de sustancia. Medidas comparativas de concentración, por ejemplo mediante parámetros globales, pueden revelar los mecanismos de pérdida. La comparación entre

- un recipiente abierto y otro cerrado indica las pérdidas por evaporación;
- una muestra expuesta a la luz y otra sin exposición indica la extensión de la degradación fotolítica;
- un recipiente de ensayo sin tratar y otro silanizado da idea de las pérdidas por sorción;
- una muestra envenenada (por ejemplo con cloruro de mercurio (II) u otro veneno inorgánico adecuado) y otra sin envenenar, permite una estimación de la eliminación por biodegradación.

Las pérdidas de sustancia durante el ensayo biológico pueden, no obstante, estar causadas simplemente por adsorción y acumulación en los organismos de ensayo o por adsorción sobre las partículas alimenticias. En estos casos, aunque sólo pueda determinarse analíticamente en el agua una fracción del componente, los organismos continúan expuestos de forma sustancial. Para clarificar si la pérdida que se produce es real o simulada pueden realizarse análisis comparativos entre lotes con y sin organismos y con y sin alimento.

Existen indicios de que en el caso de microorganismos (por ejemplo algas o bacterias), la sensibilidad del sistema de ensayo disminuye al aumentar la densidad de organismos. Las pérdidas de sustancias pueden compensarse por dosificaciones adicionales o, preferiblemente, mediante sistemas semiestáticos o de flujo continuo que eviten la acumulación de metabolitos en el sistema de ensayo.

Sin embargo, existen limitaciones en el caso de sustancias poco solubles, de las que no pueden prepararse soluciones madre lo suficientemente concentradas.

10.1.2 Volatilización. Las sustancias volátiles se liberan de forma rápida del sistema de ensayo, particularmente en los métodos de ensayo que requieren aireación. En tales casos, debe considerarse la utilización de sistemas cerrados o de flujo continuo. Es conveniente tener presente que, por ejemplo, en el caso de ensayos de inhibición de la multiplicación celular con bacterias o algas, debería garantizarse un intercambio gaseoso suficiente.

En el caso de sustancias volátiles tóxicas, es conveniente asegurarse de que el personal que realiza el ensayo no corre ningún tipo de riesgo.

10.1.3 Formación de espumas. Las sustancias tensoactivas se acumulan en la superficie de un líquido y tienden a formar burbujas cuando se airea el lote de ensayo.

Puede asegurarse el aporte de oxígeno necesario, sin formación de espumas, aumentando la relación superficie: volumen (recipientes de ensayo aplanados) o, cuando resulte apropiado, utilizando un ventilador dirigido sobre la superficie.

El empleo de agentes antiespumantes implica una interacción impredecible con las sustancias de ensayo y, generalmente, es conveniente evitar su utilización salvo en casos especiales (por ejemplo, estudios de biodegradación).

10.1.4 Adsorción. Las sustancias hidrófobas pueden adsorberse sobre las paredes del recipiente, quedando entonces limitada su biodisponibilidad, especialmente a concentraciones bajas. Con objeto de prevenir pérdidas importantes de sustancia, es recomendable que, previamente al ensayo, se incuben los recipientes durante al menos 30 min con la muestra a la concentración prevista. A continuación se descarta la muestra y, finalmente, se rellena el recipiente con nueva muestra para preparar el lote de ensayo.

La silanización de los recipientes puede reducir la capacidad de sorción de la superficie de sus paredes. Sin embargo, sólo es recomendable si no se dispone de otro material inerte y si puede asegurarse que no lixiviará nada de silicona residual (véase 6.2).

10.1.5 Precipitación /floculación. Puede producirse la precipitación del material de ensayo durante el mismo como consecuencia de reacciones con los constituyentes del medio nutritivo (por ejemplo, iones calcio), en particular si se produce una variación del pH en el lote de ensayo. Las medidas encaminadas a mantener constante el pH (véase 8.3) pueden ayudar a evitar esta interferencia.

10.1.6 Degradación. Los constituyentes pueden experimentar durante el ensayo distintos tipos de degradación, ya sea biológica, fotolítica o por hidrólisis. Este hecho puede conducir a la formación de productos secundarios (metabolitos) cuya toxicidad sea diferente a la del producto original.

Generalmente, es difícil prevenir la biodegradación en los sistemas de ensayo estáticos, dado que los organismos de ensayo, tales como peces u otro tipo de organismos, no pueden separarse de las bacterias que los acompañan

En ciertos casos, como por ejemplo en el ensayo con peces, puede aplicarse una menor temperatura de ensayo para disminuir la biodegradación siempre que puedan cambiarse las especies de peces empleadas (por ejemplo, trucha arco iris, en vez de pez cebra).

En los ensayos con bacterias, la biodegradación es, con frecuencia, inherente al sistema y se refleja en incrementos relacionados con el criterio de evaluación del ensayo (por ejemplo, tasa de consumo de oxígeno o la proliferación celular). En ciertos casos, pueden utilizarse sistemas de flujo continuo. La utilización de trampas térmicas previene normalmente la propagación de la infección bacteriana por retroceso a través de las conducciones.

10.1.7 Hidrólisis. Algunos componentes (por ejemplo los isocianatos, los ésteres o los anhídridos) sufren hidrólisis por reacción con el agua, lo que significa que, en el transcurso del ensayo, los organismos están cada vez más expuestos a sus productos de degradación. En el caso de la hidrólisis, el valor del pH del lote de ensayo puede alterarse, produciendo en ocasiones cambios en la velocidad de dicha hidrólisis. En estas circunstancias, es conveniente ajustar el pH o aumentar la capacidad tampón. En algunos casos concretos, si se seleccionan otras especies para el ensayo, podría aplicarse una temperatura menor de ensayo y reducir, de este modo, la velocidad de hidrólisis. Cuando se utilizan sistemas de ensayo semiestáticos o de flujo continuo, puede examinarse el efecto de la muestra sin descomponer con mayor facilidad.

En el caso de ensayos de biodegradación, la hidrólisis del material de ensayo puede conducir a una deriva de los rangos de inhibición por pH durante el ensayo. Cuando no pueda controlarse el pH por ajuste o tamponado, es recomendable preparar una solución madre de agua, dejar que progrese la hidrólisis durante, por ejemplo, 24 h, neutralizar la solución e iniciar entonces el ensayo de biodegradación con la muestra hidrolizada.

10.1.8 Fotólisis. Algunos componentes (por ejemplo, el hexaclorociclopentadieno, el AEDT o el hexacianoferrato) se descomponen por exposición a la luz. En el caso de ensayo con algas, el efecto de la luz es inherente al sistema.

En otros ensayos, dichas reacciones de descomposición pueden evitarse si se trabaja en ambiente oscuro (utilizando luz roja cuando sea necesario). Al igual

que para la degradación biológica y por hidrólisis, es preferible llevar a cabo el ensayo en sistemas semiestáticos o de flujo continuo.

10.2 Problemas y medidas preventivas relativas a muestras turbias y/o coloreadas

En algunos ensayos biológicos, la determinación en el punto final se basa en medidas espectrométricas (fotometría, fluorometría). En el caso de muestras turbias o que presentan una fuerte coloración, el efecto inhibitorio producido no puede determinarse con fiabilidad. Con objeto de superar esta dificultad, podrían tomarse las siguientes medidas:

- adopción de un método diferente para la determinación en el punto final (por ejemplo, recuento celular en vez de medida de la turbidez en el ensayo de algas);
-
- medida de la turbidez causada por los organismos utilizando una o dos longitudes de onda diferentes (los colorantes tienen con frecuencia unas longitudes de onda características diferentes a la dispersión de la luz provocada por los microorganismos);
-
- combinación con otro método adecuado, por ejemplo, medida de la tasa de consumo o producción de oxígeno al final de un ensayo de inhibición de multiplicación celular; en este caso, es conveniente repetir la administración del medio nutritivo;
-
- determinación de la influencia del colorante y/o turbidez en el resultado con ayuda de recipientes combinados de ensayo/medida en los que la muestra de ensayo y los organismos se encuentran separados (por ejemplo, células de corrección del color para el ensayo con bacterias luminiscentes).

En el ensayo con algas, las sustancias coloreadas y la turbidez pueden impedir, de modo directo, el crecimiento celular como resultado de la atenuación de la luz; este hecho no debería confundirse con efectos tóxicos. Las siguientes indicaciones resultan adecuadas para diferenciar, en el ensayo con algas, la toxicidad de las interferencias físicas de las sustancias coloreadas:

- a) realización de ensayos a diferentes intensidades de luz, dado que la velocidad de crecimiento por encima de la saturación de luz es prácticamente independiente de la intensidad luminosa;
- b) disminución del paso de luz mediante la reducción de la profundidad o el volumen;
- c) medida de la reducción de la proliferación celular en el lote de control en el que la luz se filtra previamente a través de un filtro líquido de transmisión de luz, por ejemplo, un disco plano que contiene las oportunas diluciones de la muestra con su correspondiente color y espesor de capa;
- d) utilización de un filtro de transmisión de luz preparando diluciones recíprocas a la concentración de exposición, manteniendo una longitud de paso óptico común (profundidad constante) y las características de absorbancia espectral de la muestra.

11 ENSAYOS BIOLÓGICOS ESPECIALES

11.1 Ensayos de biodegradación

La determinación experimental de la degradabilidad de sustancias y agua residual, así como los estudios de bioacumulación, también son ensayos de tipo biológico. La degradación puede considerarse como la descomposición de un compuesto orgánico en constituyentes más sencillos (metabolitos) como resultado de efectos fisicoquímicos (por ejemplo, la degradación fotolítica causada por la luz) y/o la actividad biológica (por ejemplo, la degradación biológica producida por microorganismos).

Debe distinguirse entre:

a) Degradación primaria, por medio de la cual la sustancia pierde sus propiedades específicas (identidad, actividad) y se descompone en constituyentes más sencillos;

b) Degradación final, es decir, la degradación completa hasta la obtención de productos inorgánicos termodinámicamente estables, como, por ejemplo, dióxido de carbono y agua. Este proceso conduce a la creación de nueva biomasa, junto con dióxido de carbono, agua y sales minerales.

Algunos ejemplos de criterios de biodegradación son:

- la reducción de los componentes de reacción (por ejemplo, O_2) necesarios para la biodegradación;
- el aumento de los productos de reacción que se originan en la degradación total (por ejemplo, CO_2);
- la transformación de la sustancia marcada con ^{14}C en $^{14}CO_2$;
- la reducción de la sustancia inicial detectable mediante análisis específico;
- la reducción de la sustancia detectable mediante parámetros globales no específicos (por ejemplo COT, COD).

NOTA 1 - Las dos últimas consideraciones no indican si lo que se ha producido es biodegradación o eliminación fisicoquímica (por ejemplo, por paso a la fase gaseosa), ni si se han producido cambios en la estructura química (por ejemplo, a consecuencia de la degradación primaria).

Puede hacerse una distinción entre eliminación por sorción en el lodo y biodegradación cuando se utilice el lodo (potencialmente adaptado) al final de un ensayo de degradabilidad inherente (potencial) como inóculo para un ensayo de degradabilidad inmediata. También cuando se examine en paralelo un lote envenenado, en el cual no hay actividad biológica, o cuando pueda comprobarse analíticamente la presencia de metabolitos.

a) Métodos de medida de la biodegradabilidad inmediata:

Cuando se mide la biodegradabilidad inmediata, se pone en contacto la sustancia de ensayo con una pequeña cantidad de microorganismos polivalentes. Los ensayos se diseñan como ensayos discontinuos, es decir, implican una única inoculación del sustrato. El desarrollo de la biodegradación puede observarse por medio de distintos parámetros. En caso de que las sustancias no alcancen el criterio mínimo de degradabilidad en este sistema de ensayo, puede estudiarse su degradabilidad en un sistema de ensayo más extensivo.

b) Métodos para determinar la biodegradabilidad potencial (inherente):

En los métodos para determinar la biodegradabilidad potencial, se hace una distinción entre los sistemas de ensayo por lotes y los semicontinuos. Ambos tienen una densidad de inoculación relativamente alta con microorganismos polivalentes.

Los sistemas de ensayo por lotes se diseñan para trabajar con una única inoculación y administración de sustancia, mientras que en los sistemas semiestáticos, la sustancia de ensayo se administra diariamente.

NOTA 2 - Es conveniente que el empleo de los términos biodegradabilidad "inmediata" e "inherente", tal y como se definen en las guías generales de la OCDE, quede restringido a los ensayos realizados de acuerdo a dichas guías generales de la OCDE. Para más detalles, véase la Norma ISO 15462.

La biodegradación también puede determinarse mediante:

a) Ensayos de simulación

Los ensayos de simulación sirven para determinar la biodegradabilidad bajo las condiciones ambientales pertinentes.

Se requieren modelos validados para representar estas condiciones ambientales. Actualmente, los mejores modelos son los modelos de simulación de las plantas de tratamiento de aguas residuales, en los que se estudia la degradación de la sustancia de ensayo en condiciones de flujo continuo.

b) Otros métodos

Dentro de estos se incluyen, por ejemplo, los métodos de ensayo en los que el lote contiene sedimento y los métodos anaerobios, en los que se observa la conversión de la sustancia de ensayo en CO_2 y CH_4 .

c) Medidas

Básicamente, cabe hacer una distinción entre los parámetros relacionados con la mineralización de la sustancia de ensayo (medida del consumo de oxígeno, medida de la liberación de CO_2) y los parámetros que registran la desaparición de la sustancia original y/o una propiedad característica de la misma, por ejemplo, el efecto de la actividad superficial en el caso de los surfactantes. En casos concretos, por ejemplo cuando se ensaya con pesticidas, los ensayos se centran no solamente en la degradabilidad de las sustancias propiamente dichas, sino también en la de los metabolitos principales en suelo, agua y plantas. Cuando se realizan ensayos de degradabilidad de mezclas de sustancias y preparados, es conveniente tener presente que no pueden hacerse afirmaciones acerca de la degradabilidad de los constituyentes minoritarios y aditivos.

Pueden encontrarse mas detalles relativos a la ejecución y evaluación de ensayos de degradación en, por ejemplo, las Normas ISO 7827, ISO 11734, ISO 11733, ISO 10707, ISO 9408, ISO 9439, ISO 9887, ISO 9888, ISO 10634, ISO 10708, ISO 14592, ISO 14593 e ISO 15462.

11.2 Ensayos de bioacumulación

La bioacumulación puede considerarse como la acumulación de sustancias en los organismos vivos, bien porque dichas sustancias se encuentren presentes en el ambiente o porque se ingieren con la alimentación. La acumulación de sustancias en la cadena alimentaria recibe el nombre de biomagnificación. Los procesos bioacumulativos conducen a concentraciones finales de sustancias en organismos acuáticos que pueden exceder la concentración inicial en varios órdenes de magnitud.

La bioacumulación de sustancias químicas está influenciada por propiedades de la sustancia tales como lipofilidad, solubilidad en agua y tamaño/estructura molecular, por la estabilidad de las sustancias químicas en agua y por la actividad metabólica en el organismo.

El criterio utilizado para describir la bioacumulación es el factor de bioconcentración (FBC). Dicho factor describe el cociente entre la concentración en el organismo (C_1) y la concentración de la sustancia en el medio (por ejemplo en el agua) o en otra fuente (por ejemplo, el alimento) (c_2) en momentos específicos o en condiciones de estado estacionario (FBC_{st})

$$BCF = \frac{c_1}{c_2} = \frac{k_1}{k_2}$$

El estado estacionario o fase de meseta se alcanza cuando tres análisis consecutivos, con intervalos de dos días como mínima, no difieren en más de un $\pm 20\%$.

Es posible realizar una estimación preliminar de la bioacumulación potencial mediante el coeficiente de reparto n-octanol/agua, $\log_{10}P_{OA}$, que constituye una medida de las propiedades lipofílicas de una sustancia [41]. En el rango de $\log_{10}P_{OA}$ comprendido entre 3 y 6, se observa con frecuencia en peces un $FBC = 0,1 P_{OA}$.

El $\log_{10}P_{OA}$ no es adecuado para estimar la bioacumulación potencial en el caso de:

- iones (por ejemplo, metales pesados);

- surfactantes (subestimación);
- sustancias con pesos moleculares $PM > 700$ (sobreestimaciones causadas por la no disponibilidad de moléculas excesivamente grandes);
- sustancias muy lipofílicas ($\log_{10}P_{OA} > 6$) (sobrestimación, puesto que no se mantiene la relación lineal).

NOTA - Los experimentos de acumulación con sustancias muy lipofílicas pueden dar lugar a resultados erróneos o estar imposibilitados por definición, dado que aún no se han establecido las condiciones de estado estacionario y/o la determinación analítica de la sustancia disuelta en agua es incierta.

Generalmente, los resultados de los experimentos de bioacumulación son más afirmativos que las estimaciones obtenidas mediante las relaciones del $\log_{10}P_{OA}$. Es conveniente no llevar a cabo determinaciones del FBC con concentraciones de sustancia comprendidas en el rango de efectos tóxicos para los organismos. Además, no debe excederse el rango de solubilidad en agua.

En los peces, las sustancias se incorporarán generalmente por vía branquial o a través de la piel. La ingestión por vía alimenticia es, en la mayor parte de los casos, solo relevante para las sustancias altamente lipofílicas ($\log_{10}P_{OA} > 5$ y, en su mayoría, > 7).

Para una evaluación más completa de la bioacumulación potencial, no solo el FBC, sino también son factores indicativos:

- las cinéticas de depuración/eliminación
- la altura de la meseta residual, y
- la distribución en órganos específicos.

Si la eliminación sigue un modelo de un compartimento de cinética de primer orden, es posible calcular un valor de CT_{50} (tiempo necesario para conseguir una eliminación del 50%) de acuerdo a:

$$CT_{50} = \frac{\log_e 2}{k_2}$$

Con frecuencia se observa una excreción en dos fases, es decir una eliminación rápida seguida de una fase más lenta de eliminación, debido a las diferentes tasas de asimilación de los órganos específicos, a los procesos metabólicos o a las distintas vías de excreción. Para las investigaciones de este tipo, las técnicas con indicadores radioactivos resultan las más adecuadas.

Las concentraciones de un ensayo de acumulación, generalmente muy bajas, (1/100 ó 1/1 000 del CL_{50}) imponen exigencias especiales en lo que respecta a la eficacia de los métodos analíticos que acompañan al ensayo. Para algunos aspectos (como la transformación de las sustancias de ensayo) pueden utilizarse sustancias marcadas radioactivamente.

Pueden encontrarse más detalles sobre la determinación de la bioacumulación en la Guía general 305 de la OCDE.

11.3 Ensayos de genotoxicidad

Los ensayos de genotoxicidad/mutagenicidad sirven como medidas preventivas dentro del contexto de un sistema general de control de la salud pública. En la actualidad, el conocimiento fiable sobre los efectos de las sustancias mutagénicas sobre los sistemas ecológicos acuáticos es muy limitado.

La genotoxicidad puede considerarse como la alteración del genoma celular por la influencia de sustancias. En la medida que esos cambios se transmitan a la siguiente generación celular, es posible hablar de un efecto mutagénico, modificador del genotipo. Los efectos genotóxicos desempeñan un papel esencial en la etiología del cáncer. No obstante, no todas las alteraciones genotóxicas son heredadas por las células hijas, dado que las células tienen sistemas compensatorios de reparación para el ácido desoxirribonucleico (ADN), que son capaces de anular muchas alteraciones adversas. Además, los efectos drásticos conducen, con frecuencia, a la muerte celular. La inducción de los sistemas de reparación puede considerarse como una prueba de la existencia de efectos genotóxicos. Las mutaciones se dividen en tres tipos:

a) Mutaciones de genes, en las cuales la secuencia de bases de un gen se modifica a consecuencia del intercambio de una base del ADN (mutación puntual) o como consecuencia de la introducción o desaparición de una o más bases del ADN (cambios en la lectura del código, mutaciones de desplazamiento de pauta de lectura).

b) Mutaciones cromosómicas, en las cuales se modifica la estructura visible del cromosoma, por ejemplo por pérdida, translocación o inversión. Las mutaciones de cromosomas pueden conducir a pérdidas reconocibles como micronúcleos. La estructura de los cromosomas se percibe especialmente bien durante la metafase del ciclo celular.

c) Mutaciones del genoma en las que se modifica la cantidad total de cromosomas celulares. En este tipo, puede cambiar la cantidad de cromosomas de las células individuales (aneuploidía) o el juego cromosómico completo (poliploidía).

Las mutaciones de cromosomas y del genoma pueden observarse únicamente en células de organismos eucarióticos. Pueden distinguirse procedimientos de ensayo *in vivo* e *in vitro*. Los procedimientos *in vitro* son válidos para demostrar el potencial genotóxico de un lote de ensayo y resultan apropiados para minimizar los ensayos con animales. Sin embargo, dado que los procedimientos *in vitro* constituyen sistemas de ensayo al nivel de suborganismo, su valor informativo es limitado.

EL mecanismo del efecto genotóxico puede diferenciarse por medio de procedimientos *in vitro*. Como regla general, estos procedimientos se llevan a cabo con cultivos celulares de mamíferos (por ejemplo, células CHO, células V79). Su potencial metabólico para xenobióticos es relativamente bajo. Por esta razón, se añaden (activación metabólica) enzimas microsomáticos (fracción S9), por ejemplo procedentes de tejido hepático con inducción por policlorobifenilos (PCBs), como series de ensayo en paralelo. Aunque la fracción S9 puede producir una reducción de la actividad con algunas sustancias, es capaz, sin embargo, de inducir primero un efecto mutagénico con otras muchas sustancias (promutagénico) por biotransformación.

La fracción S9 se añade también en los sistemas de ensayo bacterianos (procariotas) (por ejemplo, en el procedimiento de ensayo Ames) en una serie de ensayo en paralelo. La potencialidad de alteraciones del genoma en bacterias puede identificarse fácil y rápidamente. Sin embargo, la extrapolación de los resultados a organismos superiores encierra limitaciones significativas.

Cuando se llevan a cabo ensayos bacterianos y procedimientos *in vitro* eucarióticos, lo más apropiado es trabajar en condiciones estériles. Dado que las muestras de aguas, y especialmente las de agua residual, casi siempre contienen un elevado número de bacterias, es conveniente que las muestras de este tipo sean filtradas a través de un filtro de membrana antes de su utilización en la mayoría de los sistemas de ensayo. Las concentraciones/diluciones utilizadas no deberían producir daños celulares (citotóxicas). Es conveniente preparar simultáneamente lotes de referencia (controles positivos) para verificar la reactividad de las células.

12 EVALUACIÓN

12.1 Generalidades

La evaluación de los resultados del ensayo implica primero la revisión crítica de los datos y la presentación y descripción de los resultados mediante el empleo de gráficos, tablas y parámetros estadísticos adecuados, por ejemplo valores medios y desviaciones (parámetros estadísticos descriptivos).

En muchos casos, este primer paso está seguido por un procesamiento estadístico más extenso que tiene por objeto determinar las relaciones de concentraciones o de dosis/respuesta, calcular los parámetros estadísticos apropiados para describir la magnitud de la acción y examinar el nivel de significación estadístico (parámetros estadísticos de estimación y ensayo). Esta evaluación estadística más completa es útil solamente cuando se cuenta con los suficientes datos necesarios para este fin. Esto requiere como primer paso el examen crítico de los datos.

12.2 Examen y descripción básica de los datos

Es conveniente que se inicie toda evaluación con un examen crítico de los resultados obtenidos en el ensayo. Debe verificarse la verosimilitud de todos los datos, ya sean lecturas primarias o datos transformados deducidos a partir de las medidas, especialmente en el caso de los valores considerados aberrantes.

NOTA - Es conveniente que los valores considerados aberrantes sean objeto del juicio de un experto, antes de ser descartados por el responsable de la evaluación. Los ensayos de invalidación de medidas pueden utilizarse como herramientas matemáticas.

Una representación gráfica, preferiblemente de los valores sin transformar, resulta de ayuda para las consideraciones de verosimilitud. Con frecuencia, es particularmente apropiado el empleo de gráficos semilogarítmicos de los efectos medidos. Cualquier tipo de gráfico debe mostrar de forma clara las unidades de concentración, el número de lotes paralelos y de control y los parámetros relativos al efecto.

Además, la representación grafica proporciona una información valiosa en lo que concierne al comportamiento de los compuestos de ensayo y hasta qué punto es aconsejable determinar una relación matemática de concentración/respuesta. También puede indicar el modelo estadístico que probablemente es más adecuado.

En el caso de una evaluación más avanzada, es conveniente dar prioridad, en principio, a los métodos aritméticos frente a los puramente gráficos, dado que los primeros permiten habitualmente el cálculo de varianzas e intervalos de confianza. Es conveniente presentar los datos en forma tabulada junto con los valores medios calculados, los coeficientes de variación y el número de observaciones independientes obtenidas a partir de lotes en paralelo (replicados).

En algunos casos en los que se van a reflejar en el informe del ensayo parámetros simples definidos, por ejemplo, diluciones umbral, no hay necesidad de una evaluación estadística más extensa. En estos casos, la evaluación concluye con el cálculo de los porcentajes de inhibición y con la decisión de si el efecto medido es mayor o menor que un valor límite dado.

12.3 Evaluación estadística

12.3.1 Generalidades: Los objetivos de la evaluación estadística completa son:

- a) presentar una relación matemática entre el efecto medido y la concentración utilizada (relación concentración/respuesta)
- b) calcular los parámetros estadísticos que caracterizan el efecto;
- c) y llevar a cabo tests estadísticos o dar rangos de confianza (referidos por ejemplo a la Norma ISO 8466).

Se acostumbra a dar concentraciones como parámetros estadísticos para describir el efecto de una sustancia a la cual se observa un efecto de magnitud determinada (CE: concentración efectiva, CEx; x: x % de efecto).

Por ejemplo, la CE_{50} es la concentración a la cual puede observarse el efecto en un 50% de los animales de ensayo o el 50% de efecto (por ejemplo mortalidad, inmovilidad) (concentración efectiva media, cuantil 50%). Estos parámetros de cantidad de efecto se derivan de la relación concentración/respuesta.

En algunos ensayos se determina una concentración efectiva, por encima de la cual se observa un efecto estadísticamente significativo, por ejemplo, CMOE (Concentración Mínima a la que se Observa Efecto) y CNOE (Concentración a la que No se Observa Efecto). Estos parámetros pueden determinarse por comparación de los resultados de ensayos realizados a varios niveles de concentración con los resultados de los controles, utilizando tests estadísticos para el análisis de la varianza (ANOV A) o, si no se cumplen los requisitos necesarios, mediante ensayos no paramétricos (por ejemplo, test U múltiple).

NOTA - Un dato de este tipo será, por definición, una de las concentraciones ensayadas. Por otra parte, el CMOE puede ser un punto estimado, CEx. El valor de x se determina a partir de la experiencia práctica con el método del ensayo biológico en cuestión. En muchas situaciones, una CE_{10} constituirá una estimación adecuada de la CMOE. Para ciertos métodos de ensayo con mayor variabilidad o, más generalmente, en situaciones donde los límites de confianza en torno a CE_{10} son mayores, la CE_{10} puede reemplazarse por la CE_{20} •

El factor decisivo para seleccionar una evaluación estadística adecuada o método de ensayo es si el criterio de ensayo está relacionado con las variables de tipo discreto(cualitativas) o de tipo métrico (cuantitativas) (véase 9.5.3).

12.3.2 Variables discretas (cualitativas). Los métodos aquí recogidos son adecuados para ensayos biológicos en los que se está estudiando la variable "mortalidad" o "inmovilidad" (por ejemplo, ensayos de toxicidad aguda con peces y daphnia). El método clásico de estimación para las variables discretas de este tipo se basa en el principio de máxima probabilidad. En el caso de una distribución normal, esto conduce al análisis probit [30], [31], con distribución logística al análisis logit [32] y usando la distribución Weibull al análisis Weibit [33]. En el caso de las variables discretas, las estimaciones de parámetros obtenidas utilizando el principio de máxima probabilidad tienen en cuenta la heterogeneidad de la varianza de los valores medidos. Esto constituye una importante diferencia con respecto a una regresión no ponderada seguida de linealización de las curvas concentración/respuesta (por ejemplo, utilizando papel probit). En esta situación, no se obtienen intervalos de confianza válidos.

12.3.3 Variables métricas (cuantitativas). Los métodos de análisis probit, logit o Weibit mencionados anteriormente no son apropiados para variables métricas (cuantitativas). Como regla general, se utiliza el principio de mínimos cuadrados de regresiones lineales y no lineales para los métodos de estimación. El objetivo es seleccionar una función que permita un ajuste óptimo de los datos (mínima varianza residual). Si los valores de medida revelan diferentes varianzas para las concentraciones de ensayo individuales, es conveniente que los análisis de regresión se lleven a cabo con los factores de ponderación adecuados [34].

No es recomendable relacionar los efectos medidos en los lotes de ensayo con los controles sin tratar y relacionarlos con los logaritmos de concentración. Esta transformación puede conducir a una heterogeneidad de las varianzas y, por tanto, implica mayores desventajas con respecto a la evaluación estadística. Por esta razón, la evaluación debería realizarse siempre con datos sin transformar.

Las concentraciones efectivas se calculan, cuando sea posible, a partir de las funciones concentración/respuesta. En el caso de las variables discretas (por ejemplo, las del ensayo de toxicidad aguda con peces o daphnia), es costumbre dar las concentraciones CE0, CE50 y CE100, que también pueden ser denominadas como CL0, CL50 y CL100 (CL: concentración letal).

Estas concentraciones representan:

CE0 la máxima concentración ensayada a la cual no se observa efecto, de acuerdo al criterio de ensayo (CL0: todos los organismos sobreviven);

CE50 la concentración a la cual existe efecto sobre el 50 % de los organismos, de acuerdo al criterio de ensayo (CL50: muere el 50 % de los organismos);

CE100 la mínima concentración a la cual existe efecto sobre el 100 % de los organismos, de acuerdo al criterio de ensayo (CL100: muere el 100 % de los organismos).

La CE0 y CE100 son parámetros derivados directamente del experimento y no concentraciones umbral determinadas estadísticamente. La CNE (Concentración para la que No hay Efecto) se deriva de la relación concentración/efecto extrapolada para el valor cero.

En el caso de las variables métricas se calcula habitualmente la CE50, y, a veces, también la CE100 (por ejemplo en el ensayo de inhibición del crecimiento de algas). Es conveniente tener presente que, por ejemplo, la CE50 no corresponde a la concentración efectiva media, como ocurría en el caso de las variables discretas, sino que representa la concentración a la cual la variable métrica es, como promedio, un 50% menor que en el control.

NOTA - CI (concentración inhibitoria correspondiente a un x % de efecto). La designación CE_{50} se utiliza a veces también para los casos en que se produce un 50% de inhibición de una variable con respecto al control (por ejemplo el número de animales jóvenes en el ensayo de reproducción de daphnia o la tasa de crecimiento y producción de biomasa en el ensayo de inhibición de algas). Con objeto de distinguir estas concentraciones efectivas determinadas a partir de variables métricas de aquellas mencionadas anteriormente, algunos autores han sugerido que sería conveniente denominarlas como CI_x (concentración inhibitoria correspondiente a un x % de efecto).

Los intervalos de confianza pueden calcularse utilizando el método de Fieller [30], [36], [38].

Si la situación de los datos es tal que no puede aplicarse ninguno de los métodos citados anteriormente, puede obtenerse una aproximación de la CE_{50} y de su intervalo de confianza utilizando métodos alternativos (por ejemplo, Moving Average Method, Trimmed Sperman Kärber Method [30, 31]) o por interpolación simple (si fuera necesario, a partir de la CE_0 y la CE_{100}). Si no se obtiene una CE_{100} con muestras sin diluir, es conveniente incluir en el informe la máxima CE obtenida.

En muchos ensayos de biodegradación, el número de valores de degradación medidos en la fase de meseta no es suficiente como para permitir su tratamiento estadístico. Con frecuencia, el último resultado correspondiente a la fase de meseta no es representativo de esta fase. En estos casos es recomendable indicar el resultado del ensayo en un rango del 10%, por ejemplo nivel de degradación correspondiente a una eliminación del 70% al 80% del COD.

12.3.4 Confirmación estadística de los resultados

12.3.4.1 Generalidades. Los tests estadísticos aquí mencionados se utilizan para determinar si, en general, la sustancia sometida a ensayo tiene un efecto significativo y/o a partir de que concentración se observa un efecto significativo. Esta concentración se describe como $PCOE/CMOE$ (Primera/Mínima Concentración para la que se Observa Efecto), y la concentración menor más próxima (que no produce efecto significativo) como $CNOE$ (Concentración para la que No se Observa Efecto).

Estos parámetros dependen de:

- la varianza del parámetro medido;
- el número de lotes en paralelo para las concentraciones de ensayo y controles (replicados);
- el número de concentraciones ensayadas;
- los incrementos de los niveles de concentración.

Por tanto, el diseño del ensayo influye notablemente en el resultado. También aquí la elección de un procedimiento estadístico apropiado depende de si van a examinarse variables discretas o cuantitativas (métricas).

12.3.4.2 Variables discretas. Los métodos aquí mencionados son adecuados para los ensayos en los que se examina la variable "mortalidad" o "inmovilidad" (por ejemplo, el ensayo de toxicidad aguda con peces o daphnia). Con objeto de confirmar estadísticamente el efecto observado resultan adecuados los tests para series nominales de datos. El test binomial de Fisher es adecuado para determinar la *CMOE/CNOE*.

12.3.4.3 Variable métricas. La elección de un método de ensayo apropiado depende de si el criterio de ensayo (por ejemplo, biomasa, tasas de crecimiento, producción de animales jóvenes y velocidades metabólicas) sigue aproximadamente una distribución normal y de si la varianza es homogénea. Entonces, pueden utilizarse los métodos estadísticos paramétricos al resultar más fiables.

En el caso de una distribución normal y de homogeneidad de la varianza, la confirmación estadística del efecto específico producido por la sustancia se lleva a cabo utilizando un análisis de la varianza simple (ANOVA). La *CNOE* y *CMOE* se determinan empleando los tests de Dunnett o Williams [35].

Si no se satisfacen estas condiciones iniciales, puede confirmarse el efecto utilizando el test de Kruskal-Wallis. En este caso, para determinar la *CMOE/CNOE* son adecuados los tests *U* múltiple (por ejemplo, según Bonferroni-Holm [39]).

NOTA 1 - La CE_0 no puede identificarse con la *CNOE*. La primera se determina directamente a partir de los datos, sin utilizar ningún método estadístico. No obstante, ambas están condicionadas en gran medida por el diseño del ensayo (por ejemplo, el número y la magnitud de los incrementos de concentración).

NOTA 2 - Actualmente se cuestiona la determinación del *CNOE* utilizando los tests estadísticos anteriormente mencionados [40]. Alternativamente, se ha propuesto determinar la concentración umbral efectiva *CNE* a partir de la relación concentración/respuesta [71].

13 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

13.1 Ensayos de toxicidad

Los ensayos de toxicidad proporcionan, según el caso, principalmente las concentraciones umbral o las concentraciones efectivas, por ejemplo CNOE/CMOE, CE_{10} , CE_{50} y CE_{90} o CL (concentración letal). Es conveniente que los datos de concentración indiquen claramente si están basados en el compuesto, o ion efectivo o, por ejemplo, etapa de dilución.

Cuando sea posible, es conveniente presentar la curva de respuesta/concentración junto con los resultados del ensayo, en forma gráfica, por ejemplo tal y como se muestra en la figura 2, en la que se presentan los resultados del ensayo y los valores de CEx . En ella se presenta una imagen clara del carácter de la relación entre la concentración y la respuesta observada y la conformidad de los resultados con respecto al modelo.

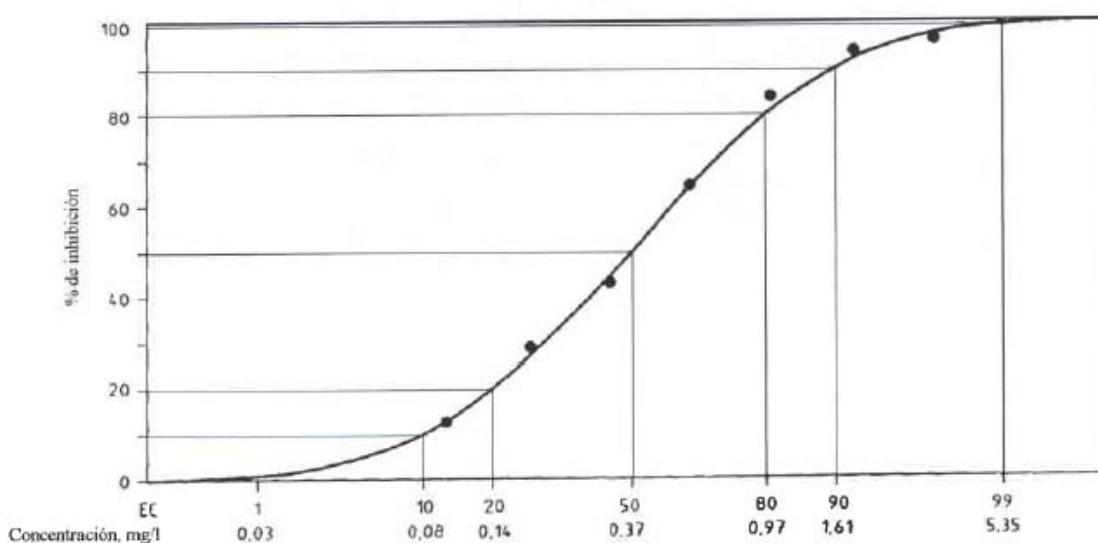


Fig. 2 Ejemplo de la curva de respuesta/concentración adaptada a la distribución normal para inhibición

Es conveniente indicar también el criterio de ensayo ('punto finar'), el organismo de ensayo, el tiempo de exposición y, cuando sea posible, los intervalos de confianza, por ejemplo para la CE_{50} (véase 12.3.4).



NOTA - Cuando se ensayen aguas residuales por medio de diluciones escalonadas, debe indicarse la mínima dilución inefectiva (véase el anexo A).

13.2 Ensayos de degradación

La magnitud de la degradación viene dada por la disminución porcentual de la concentración de uno (o varios) parámetros, tal y como se indicó en 11.1.

Es conveniente describir la cinética de degradación (fase de aclimatación para la adaptación, tiempo de vida media, "ventana de 10 días").

13.3 Ensayos de bioacumulación

Es conveniente describir por medio de gráficos o tablas la evolución en el tiempo de la concentración de sustancia, en todo el cuerpo o en tejidos determinados, para demostrar que se ha alcanzado un estado estacionario. Es conveniente dar el FBC un valor adimensional con no más de tres cifras significativas.

Es conveniente mencionar expresamente en que se basa el FBC (por ejemplo, en todo el cuerpo, en un órgano en materia seca o materia húmeda) y su diseño experimental (estático, semiestáticos, dinámico).

13.4 Ensayos de genotoxicidad

En general, el número de incidencias observadas (por ejemplo, aberraciones cromosómicas) o capacidades metabólicas adquiridas (por ejemplo, inducción de enzimas reparadores) se indican en relación a concentraciones dadas de una sustancia o diluciones de una muestra de agua. Este valor está relacionado con un valor correspondiente del lote de control. El valor puede normalizarse en relación con el número de células al final del ensayo. La relación concentración/efecto puede evaluarse conforme a lo indicado en el capítulo 12. Si se ensayan sustancias, el resultado, normalmente, se indica en forma cualitativa (positivo/negativo).

NOTA - Si se ensayan aguas, el resultado puede expresarse como lamínima dilución que no produce efecto.

14 INFORME DE ENSAYO

Es conveniente que el informe de ensayo indique los siguientes datos:

- a) nombre del laboratorio que realizó el ensayo;
- b) fecha y período de ensayo;
- c) referencia al método de ensayo utilizado (número de la Norma Internacional);



- d) organismo de ensayo (por ejemplo, nombre científico, cepa, fuente); pretratamiento de aclimatación o terapéutico (si se ha utilizado alguno);
- e) designación del material de ensayo (número de lote, origen, fecha y período de muestreo);
- f) pretratamiento de la muestra (por ejemplo, preservación, preconcentración, homogeneización, ajuste de pH, tipo de agente de neutralización, preaireación);
- g) datos derivados, condensados o transformados incluyendo, cuando proceda, resultados de controles positivos (lote de referencia);
- h) datos físicos y químicos determinados durante el ensayo (por ejemplo, temperatura, contenido en CO₂, pH, turbidez, precipitación, posible cambio en la concentración de la sustancia, etc.);
- i) cualquier desviación del protocolo del ensayo (naturaleza del agua de dilución, solución nutritiva, aireación, temperatura, etc., número de organismos o densidad de inóculo, número de lotes paralelos y controles);
- j) método de evaluación(logit, probit, gráfico, computarizado);
- k) detalles de los resultados del ensayo;
- l) comentario sobre los resultados del ensayo, en caso necesario;
- m) firma del investigador responsable;
- n) firma del responsable de control de calidad, si procede.

15 PRINCIPIOS BÁSICOS DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN ENSAYOS BIOLÓGICOS

15.1 Generalidades

El término "aseguramiento de la calidad" incluye todas las medidas tomadas para establecer e indicar la calidad y los errores potenciales en los resultados del ensayo. La mayoría de las medidas contempladas en una serie de Normas Internacionales (Normas ISO 9000, etc.) introducidas bajo el término "aseguramiento de la calidad analítica" pueden aplicarse también a los métodos biológicos de ensayo.

El aseguramiento de la calidad de un ensayo incluye la planificación del muestreo, medidas y evaluación, la documentación, valoración y registro de resultados.

En función de la importancia del aseguramiento de la calidad en el procedimiento, es conveniente incorporar el programa adecuado correspondiente en la estructura de la organización en su conjunto, considerando que, algunas veces, dependiendo del método de ensayo utilizado, es preciso dedicar hasta un 30% del tiempo de trabajo del laboratorio a conseguir un apropiado aseguramiento de la calidad.

Las medidas encaminadas al aseguramiento de la calidad se pueden dividir en cuatro grupos:

- fase preparatoria;
- fase de control de calidad interno;
- auditoría externas de control de calidad;
- evaluación y documentación

15.2 Fase preparatoria

15.2.1 Organización y personal del laboratorio de ensayo. Es conveniente que los usuarios de esta guía intenten asegurarse de los siguientes aspectos:

El laboratorio de ensayo está organizado de tal forma que cuenta con personal suficiente y que éste tiene la experiencia y formación inicial y suplementaria que le permite llevar a cabo las tareas asignadas.

Normalmente, el director general del laboratorio de ensayo es responsable de los aspectos de organización y administración y, entre otras cosas, de asegurar que se cumplen los requerimientos relativos al personal y equipamiento necesarios para realizar los ensayos.

El trabajo y funcionamiento está supervisado por un supervisor de ensayos biológicos, que es responsable de vigilar que el ensayo se lleva a cabo de forma correcta y apropiada y que queda documentado en un informe de ensayo.

Las tareas de aseguramiento de la calidad implican la verificación de que el ensayo cumple con los métodos y criterios expuestos por la Norma Internacional y si los datos han sido correctamente registrados y se corresponden con los resultados dados en el informe.

En laboratorios más grandes puede ser aconsejable designar una persona suficientemente cualificada para verificar el aseguramiento de la calidad a tiempo completo o a tiempo parcial. Las tareas pueden ser asumidas por una unidad organizativa independiente.

Se proporciona formación continuada y adecuada tanto al director como a los restantes miembros del personal del laboratorio.

15.2.2 Equipamiento del laboratorio. Es conveniente que los usuarios de esta guía se aseguren de los siguientes aspectos:

El laboratorio de ensayo dispone del equipamiento adecuado para la realización de los ensayos. Además del equipamiento técnico, es conveniente que el laboratorio disponga de unas instalaciones adecuadas, de una disposición de las habitaciones y suministros generales (por ejemplo, electricidad, gas, agua potable, filtro de emisiones, ventilación, aire acondicionado) que permitan cumplir con los requerimientos de los ensayos a efectuar. La eliminación de los residuos debe cumplir con las normas de seguridad que sean de aplicación.

Es conveniente que la distribución del espacio dentro del área del laboratorio sea tal que evite la contaminación de la instalación, del equipamiento, del personal y de los sistemas de ensayo, por ejemplo, por mezclado de sustancias y medios de ensayo. En particular, es conveniente que la zona de cultivo y

mantenimiento de los organismos de ensayo esté separada del lugar donde se hagan las preparaciones y ensayos.

Para los métodos de ensayo biológicos, deben respetarse los correspondientes permisos legales (por ejemplo, requerimientos de la legislación protectora de los animales y normas para la protección contra las epidemias) además de las normas relativas al equipamiento técnico y de laboratorio.

15.3 Establecimiento de los objetivos de calidad

Los objetivos de calidad se establecen como base de decisión en la selección del método y de las etapas incluidas en el aseguramiento de la calidad. Los objetivos de calidad incluyen tanto los parámetros estadísticos como declaraciones sobre la selectividad o especificidad del método de ensayo.

15.4 Descripción del método de ensayo

Es esencial que estén descritas todas las partes del método de ensayo utilizado tal y como realmente se efectúan, qué equipos e instrumentos se utilizan y qué medidas se toman para el aseguramiento de la calidad. Aquellas partes que se repitan con frecuencia y que formen parte de todos los ensayos de rutina o de un método de ensayo determinado pueden estar escritas como descripciones estándar [procedimientos normalizados de trabajo (PNTs)], lo que quiere decir que no es necesario mencionarlas específicamente en cada plan de ensayo. Ejemplos típicos de estos procedimientos son el tratamiento de las muestras, el mantenimiento y calibrado de los instrumentos de medida, la limpieza de equipos e instrumentos, la cría y cultivo de los organismos de ensayo, los dispositivos de emergencia y seguridad, etc.

Todas las personas implicadas en el ensayo deben estar informadas con antelación del objeto, campo de aplicación, contenido y programación de tiempo del ensayo. La hoja de trabajo tiene que contener información clara sobre las personas responsables, los objetivos del ensayo, la realización del mismo, los métodos de ensayo utilizados y el tiempo y tipo de medidas a realizar.

15.5 Determinación de parámetros de ensayo

Antes de la aplicación práctica de un método de ensayo, han de establecerse los parámetros de ensayo relevantes (por ejemplo, desviaciones estándar y coeficientes de variación). También es preciso definir los criterios de validación.

En caso de métodos normalizados, generalmente, los parámetros estadísticos y los criterios de validación vienen dados por dicho procedimiento normalizado.

Además, la fase preparatoria incluye la selección de una estrategia adecuada de calibrado de los equipos instrumentales, la verificación de la idoneidad de los materiales y el examen de la adecuación del método al objetivo propuesto.

15.6 Control de calidad interno.

15.6.1 Control de calidad interno. El control de calidad interno es una parte integral del método de ensayo en su conjunto. Normalmente, se aplica en aquellas medidas biológicas que se realizan en rutina. Incluye medidas para identificar, prevenir y solucionar errores y es conveniente que conste de las siguientes etapas: verificación de las condiciones previas reales relativas al personal, muestreo, laboratorio, equipamiento, organismos de ensayo, instrumentos y métodos analíticos;

Todas las medidas y resultados del control de calidad interno deben estar cuidadosamente documentadas, presentadas de manera clara y ser actualizadas con frecuencia.

15.6.2 Control de calidad externo (auditoria). Una comparación de resultados de los ensayos y medidas con los de otros laboratorios puede constituir una parte importante del control de calidad externo. La participación en ensayos interlaboratorios que incluyan un amplio número de participantes sirve para dar una mayor autoridad a los resultados y permitirá también corregir faltas menores. La intención de las auditorias externas es confirmar (o no) que está funcionando el control de calidad interno.

15.6.3 Evaluación. Es conveniente que la evaluación de los datos obtenidos en las etapas individuales del método de examen se realice conforme al método de evaluación documentado. El funcionamiento del ensayo debería tener en cuenta los resultados intermedios y finales y ser controlado regularmente mediante controles selectivos de verosimilitud.

15.6.4 Documentación. Es conveniente disponer de una documentación completa que incluya los registros de todos los documentos, todos los datos relevantes e información sobre el curso de los ensayos, los resultados y las medidas para el control de calidad analítico y estadístico.

16 VIGENCIA

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

17 BIBLIOGRAFÍA

- [1] ISO 6341:1996 - Calidad del agua. Determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).
- [2] ISO 7346-1: 1996 - Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias frente a un pez de agua dulce (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan [Teleostei, Cyprinidae]). Parte 1: Método estático.
- [3] ISO 7346-2: 1996 - Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias frente a un pez de agua dulce (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan [Teleostei, Cyprinidae]). Parte 2: Método semiestáticos.
- [4] ISO 7346-3: 1996 - Calidad del agua - Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias frente a un pez de agua dulce (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan [Teleostei, Cyprinidae]). Parte 3: Método de flujo continuo.
- [5] ISO 7827: 1994 - Calidad del agua. Evaluación en medio acuoso de la biodegradabilidad aerobia "final" de los compuestos orgánicos. Método por análisis del Carbono orgánico disuelto (COD).
- [6] ISO 8192:1986, Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la consommation d'oxygène par des boues activées.
- [7] ISO 8466-1: 1990 - Calidad del agua. Calibración y evaluación de métodos analíticos y estimación de las características de funcionamiento. Parte 1: Funciones lineales.
- [8] ISO 8466-2: 1993 - Calidad del agua. Calibración y evaluación de métodos analíticos y estimación de las características de funcionamiento - Parte 2: Funciones no lineales.

- [9] ISO 8692: 1989 - Calidad del agua. Ensayo de inhibición del crecimiento de algas de agua dulce con *Scenedesmus subspicatus* y *Selenastrum capricornutum*.
- [10] ISO 9000: 1987 - Normas para la gestión de la calidad y el aseguramiento de la calidad. Directrices para su selección y utilización.
- [11] ISO 9408: 1991 - Calidad del agua. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia "final" de los compuestos orgánicos en medio acuoso. Método mediante la determinación de la demanda de oxígeno en un espirómetro cerrado.
- [12] ISO 9439: 1990 - Calidad del agua. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia "final" de los compuestos orgánicos en medio acuoso. Método por valoración del dióxido de carbono producido.
- [13] ISO 9509: 1989 - Calidad del agua. Método de evaluación de la inhibición de la nitrificación por los microorganismos presentes en lodos activados debido a sustancias químicas y aguas residuales.
- [14] ISO 9887: 1992 - Calidad del agua. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia de los compuestos orgánicos en medio acuoso. Método semicontinuo con lodos activados (SCAS).
- [15] ISO 9888: 1991 - Calidad del agua. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia de los compuestos orgánicos en medio acuoso. Ensayo estático (Método de Zahn-Wellens).
- [16] ISO 10229: 1994 - Calidad del agua. Determinación de la toxicidad prolongada de sustancias para un pez de agua dulce. Método para la evaluación de los efectos de las sustancias sobre el crecimiento de la trucha arco iris [*Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Teleostei, Salmonidae)).
- [17] ISO 10253:1995 - Calidad del agua. Ensayo de inhibición del crecimiento de algas marinas con *Skeletonema costatum* y *Phaeodactylum tricornutum*.
- [18] ISO 10260:1992 - Calidad del agua. Medida de parámetros bioquímicos. Determinación espectrométrica de la concentración de clorofila-a.

- [19] ISO 10634:1995 - Calidad del agua. Líneas directrices para la preparación y tratamiento de los compuestos orgánicos poco solubles en agua para la subsecuente evaluación de su biodegradabilidad en medio acuoso.
- [20] ISO 10707:1994 - Calidad del agua. Evaluación en medio acuoso de la biodegradabilidad aerobia "final" de compuestos orgánicos. Método por análisis de la Demanda bioquímica de oxígeno (ensayo en recipientes cerrados).
- [21] ISO 10708:1995 - Calidad del agua. Evaluación en medio acuoso de la biodegradabilidad aerobia final de compuestos orgánicos. Método por determinación de la Demanda bioquímica de oxígeno (ensayo en recipientes cerrados en dos fases).
- [22] ISO 10712:1995 - Calidad del agua. Ensayo de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas putida* (Ensayo de inhibición de la multiplicación celular en *Pseudomonas*).
- [23] ISO 11733:1995 - Calidad del agua. Evaluación de la eliminación y de la biodegradabilidad de los compuestos orgánicos en medio acuoso. Ensayo de simulación de lodos activados.
- [24] ISO 11734:1995 - Calidad del agua. Evaluación de la eliminación y de la biodegradabilidad de los compuestos orgánicos en medio acuoso. Método por medida de la producción de biogás
- [25] ISO 13829:2000 - Water quality - Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test.
- [26] ISO/CD 14442: 1997 - Calidad del agua - Guía general para los ensayos de inhibición del crecimiento de algas con materiales poco solubles, compuestos volátiles, metales y agua residual.
- [27] ISO/DIS 14593 - Calidad del agua - Evaluación en medio acuoso de la biodegradabilidad aerobia final de los compuestos orgánicos - Método por análisis del carbono inorgánico liberado en recipientes cerrados.
- [28] ISO/TR 15462:2006 - Water quality - Selection of tests for biodegradability

- [29] ISO 14592-1:2002 - Water quality -- Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations -- Part 1: Shake-flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions
- [30] ISO 14592-2:2002 - Water quality -- Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations -- Part 2: Continuous flow river model with attached biomass
- [31] Weber. E. (1980): Grundriß der biologischen Statistik, Fischer Verlag, Stuttgart.
- [32] Ashton, W. D. (1972) - The logit transformation with special reference to its uses in bioassay. Griffin, London.
- [33] Christensen, E. R. (1984) - Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Res. 18, pp. 213-221.
- [34] Carrol, R. 1. and Ruppert, D. (1988) - Transformation and weighting in regression. Chapman and Hall, London.
- [35] Dunnett, C. W. (1955) - A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statis. Ass. J., 50: pp. 1096-1121.
- [36] Fieller, E.L: (1944) - A fundamental formula in the statistics of biological assay and some applications. Quart. J. Pharm. Pharmacol., 17, pp. 117-123.
- [37] Girling, A. E., Whale, G. F., Adema D. M. M. (1994) - A guideline supplement for determining the aquatic toxicity of poorly water-soluble complex mixtures using water-accommodated fractions. Chemosphere, 29 (12): pp. 2645-2649.
- [38] Morgan, B. J. T. (1992): Analysis of quantal response data, Chapman & Hall, London
- [39] Holm. S. (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6: pp. 65-70
- [40] Hoekstra, J. A. Yvan Ewijk, P. H. (1993) - Alternatives for the no-observed-effect level. Environm. Toxicol. Chem. 12; pp. 187-194.

- [41] OCDE 107, Coefficient de partage (n-octanol/eau)
- [42] OCDE (1997) - Informe de la OCDE Workshop on Statistical Analysis of Aquatic Toxicity Data Braunschweig, Germany, Oct. 15-17 1996, Paris March 1997.
- [43] OCDE 305 A, Bio-accumulation: Essai statique séquentiel chez le poisson - 12 mai 1981.
- [44] OCDE 479 - Genetic Toxicology: In vitro Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells – 23 October 1986.
- [45] OCDE 481 - Genetic Toxicology: *Saccharomyces cerevisiae*, Mitotic Recombination Assay - 23 October 1986.
- [46] OCDE 482 - Genetic Toxicology: DNA Damage and Repair/Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells in vitro - 23 October 1986.
- [47] OCDE (1995) - Guidance Document for Aquatic Effects Assessment OECD Environment Monographs No. 92 OCDE/GD(95) I 8, Paris 1995.
- [48] American Society for Testing and Materials (1991) - Standard guide for collection, storage, characterization and manipulation of sediments for toxicological testing, ASTM E 1391-90, Philadelphia PA.
- [49] American Society for Testing and Materials (1993) - Standard guide for conducting sediment toxicity tests with freshwater invertebrates, ASTM E 1383-93, Philadelphia PA.
- [50] American Society for Testing and Materials (1980) - Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macro invertebrates and amphibians, ASTM E 729-80, Philadelphia PA.²
- [51] ECETOC (1996) - Aquatic toxicity testing of sparingly soluble, volatile and unstable substances, Monograph No. 26, pp. 1-67, Brussels.

² Puede obtenerse más información bibliográfica sobre ensayos biológicos (pretratamiento de muestras, funcionamiento y evaluación) y sobre legislación internacional relativa a ensayos biológicos dentro del contexto de la evaluación y reducción de la contaminación del agua en ISO/TC 147/SC6.



18. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma mexicana coincide totalmente con la norma internacional ISO 5667-16:1998.- Water quality, Sampling. Part 16: Guidance on biotesting of samples.

México D.F., a

**DR. FRANCISCO RAMOS GÓMEZ
DIRECTOR GENERAL DE NORMAS**



APÉNDICE INFORMATIVO

MÍNIMA DILUCIÓN INEFECTIVA (MDI)

En los ensayos de toxicidad del agua residual por medio de diluciones definidas (D), la mínima dilución inefectiva (MDI) expresa el lote de ensayo más concentrado para el que no se produce inhibición, o para el que únicamente se han observado efectos que no exceden la variabilidad específica del ensayo. D se expresa como el valor recíproco de la fracción de volumen de agua residual en el lote de ensayo.

EJEMPLO: $\frac{1}{4}$ de agua residual (fracción de volumen 25%) es el nivel de dilución $D = 4$.