

Fuente: SCFI

NORMA MEXICANA NMX-AA-087-1995-SCFI

**ANALISIS DE AGUA-EVALUACION DE TOXICIDAD AGUDA CON DAPHNIA MAGNA STRAUS
(Crustacea-Cladocera)- METODO DE PRUEBA.**

WATER ANALYSIS - ACUTE TOXICITY EVALUATION WITH Daphnia magna Straus (Crustacea-Cladocera) -
TEST METHOD.

SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL
DIRECCION GENERAL DE NORMAS

PREFACIO

En la elaboración de esta Norma Mexicana, participaron las siguientes instituciones y empresas.

- ASOCIACION NACIONAL DE LA INDUSTRIA QUIMICA
- BECTON DICKINSON DE MEXICO
- CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE LA CELULOSA Y PAPEL
- CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA HULERA
- COMITÉ TECNICO DE NORMALIZACION NACIONAL DE PROTECCION AL AMBIENTE.
- CONFEDERACION NACIONAL GANADERA
- CONFEDERACION NACIONAL GANADERA
- EMPRESA PARA EL CONTROL DE LA CONTAMINACION DEL AGUA EN LA ZONA DE CIVAC.
- F. J. SALCEDO Y COMPAÑÍA
- INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
Escuela Nacional de Ciencias Biológica
- INSTITUTO TECNOLOGICO DE ZACATEPEC
- JUNTA MUNICIPAL DE AGUA Y SANEAMIENTO DE CIUDAD JUAREZ, CHIHUAHUA
- PETROLEOS MEXICANOS
Gerencia de Protección Ambiental
- SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL
Dirección General de Promoción y Operación Minera
- SECRETARIA DE MARINA
Dirección General de Oceanografía Naval
- SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE. RECURSOS NATURALES Y PESCA
Comisión nacional de Aguas;
Dirección General de Acuicultura;
Instituto Mexicano de Tecnología del Agua;
Instituto Nacional de Ecología;
Instituto Nacional de la Pesca:
- UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
Facultad de Medicina
- UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa
- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlan

INDICE DEL CONTENIDO

- 1.- Objetivo
- 2.- Campo de aplicación
- 3.- Referencia
- 4.- Definiciones
- 5.- Muestreo
- 6.- Principio
- 7.- Reactivos y materiales
- 8.- Aparatos

- 9.- Preparación y acondicionamiento de la muestra
 - 10.- Procedimiento
 - 11.- Expresión de los resultados
 - 12.- Informe de la prueba
 - 13.- Apéndices
 - A.- Como formar una muestra compuesta-Ejemplo
 - B.- Determinación del intervalo de concentraciones-Ejemplo
 - C.- Determinación de la CL₅₀ por el método de Probit-Ejemplo
 - 14.- Bibliografía
 - 15.- Concordancia con normas internacionales
- Apéndice (informativo)

ANALISIS DE AGUA - EVALUACION DE TOXICIDAD AGUDA CON *Daphnia magna* Straus (Crustacea-Cladocera) - METODO DE PRUEBA.

WATER ANALYSIS - ACUTE TOXICITY EVALUATION WITH *Daphnia magna* Straus (Crustacea-Cladocera) - TEST METHOD.

1.- OBJETIVO

La presente Norma Mexicana establece el método para el análisis biológico de calidad del agua mediante pruebas de toxicidad aguda utilizando al organismo dulceacuícola *Daphnia magna* Straus 1820 (Crustacea-Cladocera).

2.- CAMPO DE APLICACIÓN

Este método es aplicable para la evaluación de toxicidad aguda en cuerpos de agua dulce, así como aguas residuales industriales, efluentes agrícolas, municipales y sustancias puras, combinadas o lixiviados.

3.- REFERENCIAS

- NMX-AA-003 Aguas residuales - Muestreo.
- NMX-AA-007 Aguas - Determinación de la temperatura.
- NMX-AA-008 Aguas - Determinación del pH.
- NMX-AA-014 Cuerpos receptores - Muestreo.
- NMX-AA-072 Análisis de agua - Determinación de la dureza -Método del E.D.T.A.(Acido etilen diamino tetra-acético).
- NMX-AA-093 Protección del ambiente - Contaminación del agua - Determinación de la conductividad eléctrica.

4.- DEFINICIONES

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

4.1 Aclimatación

Es la adaptación fisiológica a un nivel particular de una o más variables ambientales. El término es generalmente referido al control en condiciones de laboratorio.

4.2 Agua desionizada

Es el agua que ha sido tratada para remover los iones de la solución para obtener una conductividad menor o igual a 2 µmhos/cm.

4.3 Agua de dilución

El agua natural o reconstituida que por las características óptimas que presenta para la sobrevivencia y reproducción de los organismos usados en pruebas de toxicidad, es utilizada para preparar las diferentes diluciones o concentraciones efectuadas durante una prueba, sea ésta exploratoria o definitiva.

4.4 Agua reconstituida

Es el agua desionizada o destilada con reactivos químicos adicionales. El resultado es agua dulce sintética libre de contaminantes y con características deseables de pH y dureza. Se prepara con sales inorgánicas que se adicionana en la cantidad requerida por el organismo prueba.

4.5 Aguas residuales

Son las aguas de composición variada provenientes de las descargas municipales, industriales, comerciales, agrícolas, pecuarias, domésticas y en general de cualquier otra.

4.6 Cladocera

Es el orden taxonómico al que pertenecen las comunmente lladas "pulgas de agua". Las valvas de caparazón de los organismos cubren solamente el tronco y los apéndices.

4.7 Concentración letal (CL)

Es la concentración de una sustancia (pura o combinada), o efluente que produce la muerte del organismo.

4.8 Concentración letal media (Clso)

Es la concentración de una sustancia (pura o combinada), o efluente que origina un efecto letal en el 50% de los organismos expuestos.

4.9 Contaminante

Es toda materia o energía en cualesquiera de sus estados físicos y formas que al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural, altere o modifique su composición y condición natural.

4.10 Cuerpos de agua

Son los lagos, lagunas costeras, estuarios, acuíferos, redes colectoras, con excepción de los sistemas de drenaje y alcantarillado urbano y municipal, ríos y sus afluentes directos o indirectos, permanentes o intermitentes, presas, cuencas, cauces, canales, embalses, cenotes, manantiales y demás depósitos o corrientes de agua.

4.11 Dáfnido

Es el nombre castellanizado que reciben los organismos del género Daphnia conocidos como "pulga de agua".

4.12 Daphnia magna

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

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

4.13 Descarga

Aguas residuales que se vierten directa o indirectamente en algún cuerpo de agua o sistema de drenaje y alcantarillado urbano y municipal, incluyéndose los procesos de infiltración e inyección.

4.14 Ecosistema acuático

Es la unidad funcional básica de interacción de los organismos vivos entre sí de éstos con el ambiente acuático en un espacio y tiempo determinado.

4.15 Efecto agudo

Es aquel que se manifiesta en una respuesta inmediata (en invertebrados acuáticos se habla comúnmente de 24 h a 48 h) del organismo al tóxico o tóxicos a los que ha sido expuesto. Usualmente produce inmovilidad o muerte.

4.16 Efecto crónico

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

4.17 Efluente

Es el agua u otro líquido que procede de un embalse, cuenca, proceso o planta de tratamiento.

4.18 Fotoperíodo

Es la duración de iluminación y oscuridad en un lapso de 24 h.

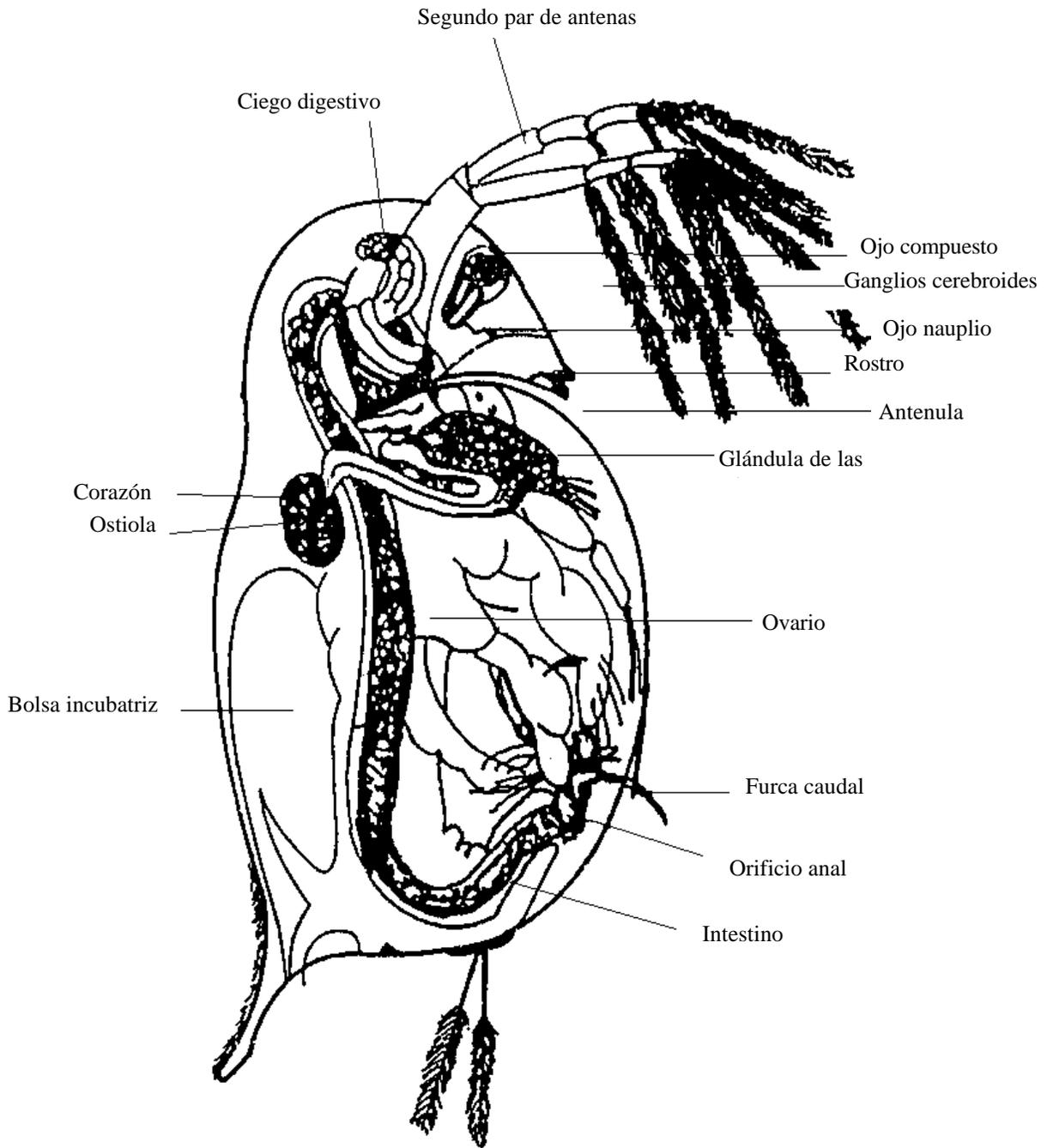


FIGURA 1.- Hembra adulta *Daphnia magna* Straus

4.19 Inmovilidad

Es la incapacidad de los dáfidos para mover sus antenas náatorias (ver figura 1), después de 10 s de haberlos separado con una pipeta Pasteur de punta recortada y expuesto a la luz blanca de una lámpara de 60 W a una distancia de 10 cm. Este criterio se emplea en esta Norma Mexicana en caso de que se tenga duda de la muerte de los organismos.

4.20 Lixiviado

Es el líquido proveniente de los residuos, el cual se forma por reacción, arrastre o percolación y que contiene, disueltos o en suspensión, componentes que se encuentran en los mismos residuos.

4.21 Muestra simple o instantánea

Es la que se toma ininterrumpidamente durante el período necesario para completar un volumen proporcional al caudal, de manera que éste resulte representativo de la descarga de aguas residuales, medido en el sitio y en el momento del muestreo.

4.22 Muestra compuesta.

Es aquella que se forma con la mezcla de muestras simples o instantáneas tomadas en un efluente industrial, agrícola o municipal. El número de muestras simples depende de las horas por día que opere el proceso generador de la descarga.

4.23 Neonatos

Son los dáfidos de 1 mm a 1.5 mm de longitud y edad menor a 24 h utilizados en pruebas de toxicidad.

4.24 Prueba de toxicidad (bioensayos de toxicidad)

Es la exposición controlada de organismos a sustancias puras, combinadas y aguas provenientes de cuerpos de agua, para evaluar su efecto.

4.25 Tiempo de exposición

Es el período al que se someten los organismos a las soluciones de prueba en un bioensayo de toxicidad.

4.26 Toxicidad

Es el efecto adverso que produce un tóxico.

4.27 Toxicidad aguda

Es el efecto letal que se produce después de exponer a los organismos prueba a sustancias (puras o combinadas) o efluentes una sola vez, durante un período corto. Para Daphnia magna es de 48 h.

4.28 Tóxico

Es cualquier sustancia (pura o combinada) o efluente que al entrar en contacto con el organismo produzca daños estructurales, alteraciones bioquímicas o fisiológicas o incluso la muerte, dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición.

4.29 Tóxico de referencia

Es una sustancia química utilizada en bioensayos de toxicidad, cuyo efecto en los organismos a determinadas concentraciones es conocido, y por lo tanto, permite establecer el estado de respuesta de los organismos de prueba empleados, así como comparar los resultados intra e inter laboratorios. El uso de estos tóxicos, proporciona también una evaluación general de la precisión (estabilidad y repetibilidad) del método a través del tiempo.

4.30 Toxicología acuática

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

5 MUESTREO

El muestreo tanto de cuerpos de aguas como de efluentes industriales, agrícolas, municipales y/o urbanos y lixiviados, constituye una parte integral y fundamental de cualquier programa de monitoreo de la calidad del agua, pues proporciona bases para la evaluación de propiedades y efectos potenciales del agua, sobre los organismos del ecosistema.

5.1 Muestreo en efluentes industriales, agrícolas, municipales y urbanos.

Se toman muestras compuestas de dos litros, (volumen total) en recipientes de polipropileno o de vidrio borosilicato, de acuerdo como se especifica en la tabla 1.

TABLA 1.-Muestras instantáneas requeridas para formar una muestra compuesta.

Horas por día que opera el proceso generador de la descarga.	Número de muestras	Intervalo para la obtención de muestras simple.	
		Mínimo (h)	Máximo (h)
Hasta 8 h	4	1,0	2,0
Más de 8 h y hasta 12 h	4	2,0	3,0
Más de 12 h y hasta 18 h	6	2,0	3,0
Mas de 18 h y hasta 24 h	6	3,0	4,0

Con el fin de hacer explícito qué volumen de las muestras simples provenientes de efluentes es necesario para la preparación de una muestra compuesta, se presenta un ejemplo en el Apéndice A.

5.2 Muestreo en cuerpos de agua.

El muestreo se debe llevar a cabo tomando una muestra instantánea o simple de dos litros, siguiendo los lineamientos descritos en la NMX-AA-014 (ver 3 Referencias).

Además deben tomarse en consideración los parámetros fisicoquímicos básicos (pH, oxígeno disuelto, conductividad y temperatura de agua y aire), registrando las siguientes características aparentes:

- Olor
- Color
- Turbiedad
- Presencia o ausencia de burbujas y espuma

6. PRINCIPIO

Este método se basa en la exposición controlada del crustáceo del orden Cladocera (Daphnia magna) a cuerpos de agua, sustancias puras, combinadas o efluentes y lixiviados para evaluar el efecto que producen en dicho organismo.

7. REACTIVOS Y MATERIALES

7.1 Reactivos (grado analítico)

- Acido bórico (H_3BO_3)
- Acido etilen diamino tetra-acético (E D T A) *
- Acido nítrico (HNO_3) al 30%
- Acido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)
- Acetona (C_3H_6O)
- Agua destilado o desionizada (H_2O)
- Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$)
- Cloruro de Calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)
- Cloruro de manganeso ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) **
- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)
- Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)
- Hidróxido de potasio (KOH)
- Nitrato de cobalto $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$
- Nitrato de sodio $NaNO_3$
- Oxido de molibdeno (MoO_3)
- Selenito de sodio (Na_2SeO_3)
- Sulfato de calcio ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$)
- Sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)
- Sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)
- Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- Sulfato de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)

7.2 Materiales

- Cajas petri
- Cubrebocas
- Detergente
- Frascos ámbar con tapón de plástico
- Frascos de boca ancha de 1 000 ml
- Garrafón de vidrio de 20 L
- Guantes de látex desechables
- Matraces. Erlenmeyer de 1,000 ml.
- Matraces volumétricos de diferentes capacidades
- Pipetas graduadas de 1 ml, 5 ml y 10 ml
- Pipetas Pasteur con punta recortada
- Pipetas volumétricas de diferentes capacidades
- Probetas graduadas de 100 ml
- Propipetas
- Recipientes de polietileno, polipropileno o de vidrio borosilicato de 2 L
- Vasos de precipitados tipo Griffin de 150 ml.

NOTA 1.- * El E.D.T.A. debe ser valorado.

NOTA 2.- ** Reactivo utilizado como tóxico de referencia.

8. APARATOS

- Agitador magnético
- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de Neubauer
- Centrífuga
- Conductímetro
- Congelador (-28°C)
- Controlador de fotoperíodo "Timer"
- Luxómetro
- Microscopio óptico
- Oxímetro
- Potenciómetro
- Refrigerador (de 0° C a 4° C)
- Termómetro

9. REPARACION Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

Las muestras, tanto simples o instantáneas como compuestas deben ser almacenadas en recipientes limpios de polietileno, polipropileno o de vidrio borosilicato; éstos deben ser llenados totalmente y sellados. Los envases no deben ser reutilizados.

Las muestras deben mantenerse a una temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta su llegada al laboratorio. A menos que las pruebas de toxicidad se efectúen 6 h posteriores a la colecta, y hasta 36 h, se deben mantener a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Después de 36 h y hasta 40 días posteriores a la fecha de colecta, se deben congelar a -28°C (utilizando un congelador) para evitar cambios debidos a la actividad microbiana, transformación química y/o pérdida de sustancias volátiles.

Las muestras no deben de ser preservadas con ningún producto químico.

El tiempo que se considera válido para el inicio del bioensayo depende de la forma en la que se preserve la muestra, es decir:

- Hasta 6 h, las muestras mantenidas a temperatura ambiente.
- Hasta 36 h, las muestras mantenidas a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Hasta 60 días, las muestras que sean congeladas a -28°C .

Las muestras preservadas por más de 60 días no deben ser usadas para realizar pruebas de toxicidad.

El tiempo cero, en una muestra compuesta, es el tiempo de la toma de la última colecta simple o instantánea.

El tiempo final, considerado para la validez de la prueba, es el momento en el que los dáfidos se introduzcan en todos los recipientes de prueba.

10. PROCEDIMIENTO

10.1 Actividades previas en el laboratorio

Una vez que se conoce la fecha exacta en la que se debe llevar a cabo el bioensayo, se deben realizar las siguientes actividades, con la finalidad de iniciar la prueba en el preciso momento en que la muestra arribe al laboratorio.

10.2 Condiciones ambientales para el cultivo de Daphnia magna.

Para la instalación de un cultivo de Daphnia magna, se debe contar con un área mínima de 6 m², que debe estar libre de sustancias tóxicas (gases, vapores, cualquier otra). Que puedan entrar en contacto directo con los cultivos. Esta debe tener los aditamentos necesarios para mantener una temperatura entre 18°C y 22°C, y un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad, utilizando un termómetro y un controlador de fotoperíodo "Timer" respectivamente.

A continuación se establecen las condiciones que deben contemplarse para tener en óptimo estado al cladóceros Daphnia magna:

10.2.1 Iluminación

Es necesarios mantener constante la intensidad de luz en el área donde se encuentren los organismos, ya que los cambios en la intensidad provocan que naden hacia la superficie y queden atrapadas al no poder romper la tensión superficial del agua.

Para la iluminación del cultivo deben utilizarse lámparas fluorescentes "luz de día" que proporcionen una luminosidad a los cultivos de 600 luxes* a 1,000 luxes, medida con un luxómetro; asimismo, mantener un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

* luxes se abrevia lx.

10.2.2 Temperatura

Mantener la temperatura del agua de los cultivos a 20°C ± 2°C.

10.2.3 Oxígeno disuelto

Los niveles del oxígeno disuelto se deben mantener por arriba de 3 mg/L, esto se logra renovando completamente el medio de cultivo una vez por semana.

10.2.4 pH

Es necesario que los valores de pH se manengan en un intervalo de 7,5 a 8,5.

10.2.5 Conductividad

Es indispensable que sea mantenida entre 250 µmhos/cm y 600 µmhos/cm.

10.2.6 Dureza total

Es necesario que se encuentre entre 160 mg/L y 180 mg/L de carbonato de calcio (CaCO₃)

10.3 Condiciones para el cultivo y mantenimiento de los organismos.

El cuidado que se debe tener con los organismos en cultivo, es una de las tareas que van a conducir a que se tenga un lote controlado de dáfidos cuya densidad no debe ser mayor de 15 organismos/L de agua reconstituida. Cada lote debe ser iniciado con neonatos de menos de 24 h de nacidos en estado óptimo, colocándolos en recipientes de boca ancha de 1 L. Una vez transcurridos 7 días se ha alcanzado la madurez sexual; del séptimo al noveno día, se presenta la primera progenie o descendencia; una vez que se ha dado ésta, cada 2 días o 3 días se obtienen descendencias sucesivas a partir del mismo adulto.

El cuidado del cultivo, conlleva los siguientes aspectos:

10.3.1 Recambio de agua

El agua de cultivo, después de un tiempo determinado, va a perder sus características iniciales debido a la materia orgánica acumulada, producto de los desechos de los organismos y de residuos alimenticios; por ende, debe ser renovada completamente una vez por semana.

10.3.2 Limpieza

Todos los recipientes usados en los cultivos, deben ser limpiados al menos dos veces por semana para evitar problemas de acumulación excesiva de microorganismos (los dáfidos, dentro de su dieta toleran cierto número de bacterias, sin embargo, una cantidad excesiva puede ocasionarles problemas serios).

Los días de limpieza se seleccionan de acuerdo a la carga de trabajo que se tenga en el laboratorio, siendo factible que uno de esos dos días se ocupe par realizar el recambio de agua mencionado con anterioridad.

10.3.3 Alimentación

La calidad de la dieta alimenticia es uno de los aspectos considerados como importantes dentro del cultivo de los organismos, ya que de ello depende la sobrevivencia y tasa reproductiva óptima de los dáfidos.

El alimento está constituido por cualquiera de las siguientes tres especies de microalgas verdes: Chlorella vulgaris, Onkistrodesmus falcatus y Scenedesmus incrassatulus.

La alimentación se realiza hasta 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes, por ejemplo). La cantidad de alimento suministrada a la Daphnia cada tercer día debe ser de 0,4 células/mL, 1,3 células /mL y 2,5 x 10⁴ células/mL de Ankistrodesmus vulgaris, Scenedesmus incrassatulus y Chlorella vulgaris, respectivamente, utilizando pipetas graduadas de 1 mL, 5 mL ó 10 mL. El conteo de las células algales se efectua con al ayuda de una cámara de Neubauer o hematocitómetro (ver Capítulo 14 inciso 14.2).

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

Las microalgas concentradas se conservan en obscuridad y refrigeración a 4°C ± 2°C en frascos ámbar, utilizándose como alimento inmediatamente y hasta por un período máximo de 2 semanas, después del cual debe desecharse cualquier remanente y emplear un nuevo concentrado.

Para el cultivo de las microalgas verdes se emplea el medio de cultivo Bold Basal descrito en la tabla 2.

TABLA 2.-Medio de cultivo Bold Basal

Reactivo	Concentración (mg/L)*
NaNO ₃	250
CaCl ₂ . 2H ₂ O	25
MgSO ₄ . 7H ₂ O	75
K ₂ HPO ₄	75
KH ₂ PO ₄	175
NaCl	25
FeSO ₄ . 7H ₂ O	4,98
H ₂ SO ₄ conc.	0,001**
H ₃ BO ₃	11,42
E.D.T.A.	50
KOH	31
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,82
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,44
MoO ₃	0,71
CuSO ₄ . 5H ₂ O	1,57
Co (NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,49

NOTA 3- * En agua destilada o desionizada.

NOTA 4.- ** mL/L.

Una vez preparado el medio, se esteriliza en autoclave durante 15 min a 1,01 kg/cm².

10.4 Selección de organismos de prueba

Veinticuatro horas antes de iniciar la prueba, deben ser seleccionadas las hembras grávidas que se espera tengas sus neonatos en ese lapso; deben ser colocadas en agua reconstituida sin alimento, a una densidad de 15 hembras/L; esta agua reconstituida se elabora de acuerdo a al técnica descrita en el inciso 10.5.5.1. Aproximadamente 1 h antes de iniciar la prueba, se deben separar los neonatos de los recipientes que contienen a las madres, utilizando una pipeta Pasteur con la punta recortada. De esta manera se garantiza que los neonatos utilizados en las pruebas de toxicidad tengas menos de 24 h de edad.

Los organismos capturados deben ser colocados en pequeñas cajas petri antes de ser finalmente transferidos a las diluciones correspondientes.

Este criterio de selección es válido sólo para neonatos de la segunda a la octava progenie.

10.5. Lavado de material y cristalería

Todos los recipientes que entren en contacto con las muestras que van a ser usadas en el muestreo, deben lavarse perfectamente para evitar que contengan residuos potencialmente tóxicos a los organismos de prueba, utilizando el método que se describe a continuación:

10.5.1 Lavar el material con detergente y enjuagar dos veces con agua de la llave.

10.5.2 Enjuagar el material con ácido nítrico (HNO_3) al 30% para eliminar residuos metálicos. Enjuagar con agua desionizada, escurrir.

10.5.3 Enjuagar con acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) para eliminar residuos orgánicos. Enjuagar con agua desionizada. Dejar secar completamente.

Esta serie de lavados tienen que llevarse a cabo de 24 h a 48 h antes del bioensayo, protegiendo el material del polvo y otros factores.

10.5.4 Enjuagar perfectamente con agua reconstituida.

10.5.5 Minutos antes de iniciar el bioensayo, enjuagar los recipientes que van a contener a los organismos con agua reconstituida.

El uso del agua reconstituida es necesario porque:

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

Para *Daphnia magna* se utiliza agua reconstituida cuya dureza sea de 160 mg/L a 180 mg/L y el pH entre 7,5 y 8,5. Su preparación debe efectuarse al menos con 72 h de anticipación, cuidando que se efectúe tal y como se indica en el punto siguiente, ya que de ello depende en gran parte tanto el cultivo óptimo de los organismos como la culminación exitosa de la prueba.

10.5.5.1 Preparación

Colocar 19 L de agua destilada o desionizada en un garrafón de vidrio de 20 L perfectamente limpio. Cualquiera que sea el tipo de agua seleccionado, debe utilizarse durante todo el proceso y cada vez que se realice la prueba. Asimismo, es necesario indicarlo en los resultados.

Agregar 2,4 g de sulfato de magnesio (MgSO_4); 3,48 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y 0,16 g de cloruro de potasio (KCl) al recipiente en el orden respectivo.

Agregar 2,4 g de sulfato de calcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) esté completamente disuelto. Adicionar a los 19 L preparados con anterioridad y mezclar perfectamente.

Adicionar 20 μg de selenito de sodio (Na_2SeO_3).

Airar por lo menos durante 24 h.

Para detectar la calidad óptima del agua reconstituida, se debe colocar durante 24 h a 10 neonatos en una muestra de 100 ml; si al término del plazo no se registra mortalidad, el agua puede ser utilizada en el cultivo y/o en la prueba.

10.6 Calibración de aparatos, preparación y valoración de reactivos utilizados en análisis químicos.

Se debe efectuar una calibración de aparatos (potenciómetro, oxímetro y conductímetro) y la preparación y valoración del E.D.T.A (Ácido etilén diamino tetra-acético) 0,01 M en base a la NMX-AA-072 (ver 3 referencias).

10.7 Período de prueba

Cuando la muestra llegue al laboratorio, se debe medir y anotar la temperatura, el pH y conductividad. Si el análisis no va a ser efectuado inmediatamente, mantener la muestra de acuerdo al inciso 9 de esta Norma Mexicana hasta que sea procesada. En caso de que la muestra llegue congelada al laboratorio, estos parámetros se determinan al inicio del bioensayo. La muestra debe descongelarse a temperatura ambiente.

Las aguas provenientes de efluentes industriales, agrícolas, municipales y urbanos, deben ser evaluadas a partir de una prueba exploratoria y una definitiva. Para cuerpos de agua únicamente se realiza una prueba definitiva.

10.7.1 Prueba exploratoria en efluentes industriales, agrícolas, municipales y urbanos.

Esta prueba sirve para determinar si un efluente es tóxico o no, y en su caso, permite definir al intervalo de concentraciones que se deben aplicar en una prueba definitiva. En este bioensayo se prueban cinco concentraciones del efluente: 100%, 50%, 25%, 12% y 6%, más un testigo, siguiéndose los lineamientos de la tabla 3 de esta Norma Mexicana.

TABLA 3.-Condiciones de la prueba exploratoria con *Daphnia magna*.

	Condiciones
Tipo de prueba	Estática sin renovación de la solución de prueba
Duración	24 h
Luminosidad	600 luxes* - 1,000 luxes
Fotoperíodo	16 h luz/8 h oscuridad
Volumen de los recipientes de prueba (vasos de precipitado tipo Griffin)	150 mL
Volumen de agua reconstituida	50 mL
Edad de los organismos	Menos de 24 h
Número de réplicas	2
Número de organismos por réplica	10
Aireación de los recipientes de prueba	No
Agua de dilución	Reconstituida dura
Temperatura	20°C ± 2°C
Alimentación	No
Volumen total de muestra por prueba	100 mL.
Respuesta evaluada	Inmovilidad
Criterio de aceptación de la prueba	Sobrevivencia mayor o igual a 90% en testigos

NOTA 5- Para la preparación de las muestras al 100% y de los testigos, se pueden utilizar probetas graduadas de 100 ml.

* luxes se abrevia lx

10.7.2 Prueba definitiva en efluentes industriales, agrícolas, municipales y urbanos

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

El tiempo de exposición en la prueba definitiva es mayor que en la exploratoria; por lo tanto, la mortalidad puede incrementarse al final de la prueba y entonces la CL_{50} no cae dentro del intervalo seleccionado.

Al finalizar la prueba exploratoria, se deben efectuar observaciones a los organismos que continúan vivos para determinar de acuerdo al estado de afectación, si es adecuado o no modificar el intervalo seleccionado en la prueba definitiva (ver Capítulo 13 inciso 13.2)

10.7.3 Prueba definitiva en cuerpos de agua.

El número mínimo de diluciones que debe realizarse en esta prueba es de 4 y la muestra al 100%. Estas se efectúan considerando un factor de dilución de 0,5, utilizando para ello probetas graduadas de 50 mL y 100 mL, y pipetas graduadas de 1 mL, 5 mL y 10 mL de acuerdo a las diluciones, de tal forma que se obtenga la siguiente serie de concentraciones: 100%, 50%, 25%, 12,5% y 6,25%; además, por supuesto, el testigo.

En las pruebas definitivas para efluentes y cuerpos de agua, se deben preparar al menos 3 réplicas.

El conteo de inmovilidad debe efectuarse cada 24 h para calcular la Cl_{50} a 24 h y 48 h (ver Capítulo 4 inciso 4.19).

10.8 Parámetros a evaluar durante la prueba.

Los parámetros fisicoquímicos que comúnmente se evalúan en un bioensayo, están contenidos en las normas indicadas en el punto 3 de esta Norma Mexicana. Durante la prueba, los parámetros fisicoquímicos se determinan al inicio y al término de la prueba en una serie de las réplicas (diluciones y muestra al 100%) y un testigo.

Para fines de esta Norma Mexicana, el oxígeno disuelto se determina mediante el empleo de un oxímetro.

En la tabla 4 de esta Norma Mexicana se agrupan las condiciones que deben observarse durante una prueba definitiva en muestras provenientes de efluentes industriales, agrícolas, municipales y urbanos, así como en cuerpos de agua.

10.9 Evaluación de sensibilidad

Se debe elaborar un programa de control de calidad en el laboratorio que realice pruebas de toxicidad, para garantizar que se puedan realizar comparaciones de resultados entre e inter laboratorios. Para evaluar la sensibilidad del organismo de prueba (*Daphnia magna*), se utiliza el tóxico de referencia que se establece en el inciso 10.9.3 de esta Norma Mexicana.

10.9.1 Los tóxicos de referencia tienen como principales características las siguientes:

- Amplio espectro tóxico
- Facilidad de obtención en forma pura.
- Alta solubilidad en agua.
- Persistencia y estabilidad en solución
- Estabilidad en almacenamiento
- Facilidad de cuantificación

10.9.2 La sensibilidad de *Daphnia magna* se evalúa mediante la determinación de la CL₅₀ en un bioensayo de 48 h aplicando concentraciones establecidas del tóxico de referencia. El método y las condiciones de prueba deben ser los descritos en la presente Norma Mexicana.

10.9.3 El tóxico de referencia que se debe emplear en esta prueba es el dodecil sulfato de sodio (SDS), en las siguientes concentraciones: 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/l, 16 mg/L y 32 mg/L. La CL₅₀ de referencia para este tóxico es de 14,5 mg/L ± 4,5 mg/L. La CL₅₀ determinada experimentalmente debe quedar dentro de este intervalo de confianza, ya que en caso contrario se tienen elementos fundados para suponer que los organismos empleados son hipo o hipersensibles, según sea el caso de que la CL₅₀ sea mayor o menor que dicho intervalo. Siendo necesario revisar los posibles factores de variabilidad, tales como:

TABLA 4.-Condiciones de la prueba definitiva con *Daphnia magna*.

Tipo de prueba	Condiciones
	Estática sin renovación de la solución de prueba
Duración	48 h
Luminosidad	600 luxes* - 1,000 luxes
Fotoperíodo	16 h luz/ 8 h oscuridad
Volumen de los recipientes de prueba (vasos de precipitado tipo Griffin)	150 mL
Volumen total (agua reconstituida más muestra)	100 mL
Edad de los organismos	Menos de 24 h
Número de réplicas por concentración	3
Número de organismos por réplica	10
Aireación de los recipientes de prueba	No
Agua de dilución	Reconstituida dura
Temperatura	20°C ± 2°C
Alimentación	No
Respuesta evaluada	Inmovilidad a 24 h y 48 h
Criterio de aceptación de la prueba	Sobrevivencia mayor o igual al 90% en los testigos

NOTA 6.-Las diferentes concentraciones que se preparen en las pruebas exploratorias y formales deben realizarse utilizando pipetas y/o matraces volumétricos de diferentes capacidades, excluyendo sólo a las muestras al 100% y a los testigos.

* luxes se abrevia lx.

10.9.3.1 Método de cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba.

10.9.3.2 Edad y estado de salud de los organismos

10.9.3.3 Manejo de los neonatos.

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

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

10.9.5 El tóxico de referencia descrito en esta Norma Mexicana puede ser sustituido por cualquier otro, siempre y cuando cumpla con las características señaladas en el inciso 10.9.1 de esta norma.

11.- EXPRESION DE RESULTADOS

Para la obtención de la CL₅₀ (concentración letal media) se recomienda utilizar el "Método pH inciso 14.12), el cual evalúa la relación concentración respuesta de un contaminante sobre un organismo, medido en términos de su CL₅₀ y su precisión o intervalo de confianza de acuerdo a los lineamientos que se establecen a continuación:

11.1 Método Probit

El método Probit, también conocido como Método de Unidades probabilísticas" es utilizado para evaluar la relación dosis respuesta de un contaminante sobre un organismo, medida en términos de la concentración letal media (CL₅₀) y su precisión o intervalo de confianza.

11.1.1 Determinación de la concentración letal media (CL₅₀)

La obtención de la CL₅₀ se realiza por el Método Probit, cuya secuencia se explica a continuación, y en el Apéndice C se desarrolla un ejemplo:

11.2 Paso 1

Preparar una tabla con los siguientes datos:

11.2.1 Concentración del efluente usado en la prueba (%)

11.2.2 Log₁₀ de la concentración del efluente (%)

11.2.3 Número de organismos por concentración (N)

11.2.4 Mortalidad observada por concentración (p)

11.2.5 Porcentaje de mortalidad por concentración (P)

11.2.6 Probit empírico (EP)

11.2.7 Probit calculado (CP)

11.3 Paso 2

Los incisos 11.2.1 al 11.2.5 del paso 1, son obtenidos directamente de los resultados del bioensayo.

11.4 Paso 3

El valor de Probit empírico se obtiene de la tabla 5, a partir del % de mortalidad por concentración.

11.5 Paso 4

Graficar en papel el Log₁₀ de las concentraciones en el eje "X" y los Probit empíricos en el eje "Y" (ver Capítulo 13 inciso 13.3)

11.6 Paso 5

Efectuar el ajuste de la recta por el "método de mínimos cuadrados", utilizando la ecuación de la recta que se describe a continuación:

$$Y = mX + b$$

TABLA 5.-Relación de % de mortalidad / Probit empírico

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0		2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,08	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99a	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09

NOTA 7 - a Valores entre 99 y 99.9

Una vez finalizado esto, trazar una recta perpendicular al eje "Y" exactamente en el valor de Probit igual a 5. En el punto de intersección con la recta ajustada, proyectar hacia el eje "X" para obtener el Log₁₀ de la CL₅₀.

Una vez obtenido el valor del Log₁₀ de la CL₅₀, determinar la CL₅₀ mediante la siguiente relación:

$$CL_{50} = \text{Antilog}_{10} X \text{ (en } Y = 5 \text{)}$$

11.7 Paso 6

Pasas a seguir en la determinación del error patrón

11.7.1 Determinar "S", que está definido como el intervalo de incremento del Log₁₀ de la concentración (X) por unidad de incremento en el Probit Empírico (EP) y tiene la siguiente relación

$$S = \frac{X_2 - X_1}{CP_2 - CP_1}$$

Donde:

X₂ y X₁ son los valores más bajos y más altos respectivamente obtenidos a partir de la concentración en Log₁₀ (X):

CP₁ y CP₂ son los valores más bajos y más altos respectivamente obtenidos a partir del Probit calculado (CP).

11.7.2 Paso 7

Determinar el error patrón del Log₁₀ CL₅₀, preparando una table con los siguientes datos:

11.7.2.1 Logaritmo de la concentración (X)

11.7.2.2 Número de organismos en cada concentración (N)

11.7.2.3 Probit calculado (CP)

11.7.2.4 Factor ponderado (w), obtenido a partir de la tabla 6 considerando los valores de Probit calculado (CP)

11.7.2.5 Productos: Nw, NwX y NwX²

11.7.2.6 Sumatorias: Nw, NwX y NwX²

TABLA 6.-Factor ponderado (w) para el cálculo de Probit (CP)

	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
1	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	0,005	0,006	0,008	0,01
2	0,015	0,019	0,025	0,031	0,040	0,050	0,062	0,076	0,092	0,11
3	0,131	0,154	0,180	0,208	0,238	0,269	0,302	0,336	0,370	0,40
4	0,439	0,471	0,503	0,532	0,558	0,581	0,601	0,616	0,627	0,63
5	0,637	0,634	0,627	0,616	0,601	0,581	0,558	0,532	0,503	0,47
6	0,439	0,405	0,370	0,336	0,302	0,269	0,238	0,208	0,180	0,15
7	0,131	0,110	0,092	0,076	0,062	0,050	0,040	0,031	0,025	0,01
8	0,015	0,011	0,008	0,006	0,005	0,003	0,002	0,002	0,001	0,00

Una vez obtenido el factor ponderado (w) y calculado los productos: Nw, NwX, NwX² y sumatorias, obtener el error patrón (Eslog₁₀) de CL₅₀ utilizando la siguiente relación:

$$Eslog_{10} CL_{50} = S^2 \left[\left(\frac{1}{\sum Nw} + \frac{\sum Nw(m - z)^2}{\sum Nw(\sum NwX)^2} \right) \right] 0,5$$

Donde:

Eslog₁₀ es el error patrón de la CL₅₀

S es el intervalo de incremento:

m es la pendiente obtenida por mínimos cuadrado:

z es igual a $\frac{NwX}{Nw}$

11.8 El intervalo de confianza de la CL₅₀ esta dando por la siguiente relación:

$$IC CL_{50} = (CL_{50}) (Eslog_{10} CL_{50}) (\log_{10})$$

11.9 Las unidades de toxicidad aguda se obtienen a partir de la siguiente relación:

$$U.T.a = \frac{1}{CL_{50}} \times 100$$

Donde:

U.T.a es la unidad de toxicidad aguda:

CL₅₀ es la concentración teórica que origina el 50% de mortalidad de organismos expuestos con la muestra evaluada.

12 INFORME DE LA PRUEBA

El informe de la prueba incluye especificar los siguientes puntos:

- Cuenca hidrológica
- Nombre del cuerpo de agua receptor
- Si se trata de pruebas en efluentes indicar:
 - 1) Responsable legal del efluente
 - 2) Si es efluente industria:
Razón social de la empresa; dirección; teléfono; que produce; que materias primas utiliza; horario de operación.
 - 3) Si es efluente agrícola:
Localización, tipo(s) de cultivo (s) y en su caso que fertilizantes (s) se utiliza (n)
 - 4) Si es efluente urbano o municipal:
Localización, nombre de la ciudad o municipio.

Para los casos descritos en 2), 3) y 4), especificar además:

Caudal promedio (m³/día): caudal promedio durante el muestreo (m³/s): en caso de contar con sistema de tratamiento, breve descripción del mismo; localización de punto (s) de muestreo seleccionado (s); método de colecta usado; fecha, período y horario de colecta usado; tiempo transcurrido entre la última toma de muestra (s) y el inicio del análisis; temperatura de la (s) muestra (s) al recibirse en el laboratorio; datos fisicoquímicos y observaciones en campo: responsable (s) del muestreo.

- Si se trata de prueba de cuerpos receptores, indicar:

Localización de punto (s) de muestreo; método de colecta usado; fecha, período y horario de colecta; tiempo transcurrido entre la última toma de muestra (s) al recibirse en el laboratorio; datos fisicoquímicos y observaciones en campo; responsable (s) del muestreo.

- Datos a registrar durante la prueba de toxicidad:

Forma de almacenamiento y preservación de la (s) muestra(s); fecha de inicio y término del análisis; tipo de prueba realizada (exploratoria y o definitiva); datos fisicoquímicos al inicio del análisis (pH, oxígeno disuelto, conductividad, temperatura de agua y aire) y características aparentes (olor, color, turbiedad, presencia o ausencia de burbujas y espuma); datos fisicoquímicos en las muestras al 100%, diluciones y testigos a las 24 h y 48 h de tiempo de exposición (pH, oxígeno disuelto, conductividad, dureza total en la (s) prueba (s) exploratoria (s) y/o definitiva (s) y la mortalidad o inmovilidad de los organismos prueba; responsable (s) de la realización de la (s) prueba (s) de toxicidad.

- Análisis de resultados

Tablas y gráficas derivadas de la prueba de toxicidad, así como las anotaciones de las observaciones diarias efectuadas en los organismos en cada concentración, incluyendo los testigos; proveer los valores de CL₅₀ de las pruebas de toxicidad con sus respectivos límites de confianza al 95%, así como las unidades de toxicidad obtenidas y método estadístico utilizado; discusión de resultados.

- Datos adicionales

Tóxico de referencia utilizado en la prueba de sensibilidad, Cl₅₀ obtenida y fecha de realización; responsable (s) de la realización de la prueba.

- Conclusiones y recomendaciones

- Si se contrata una empresa consultora, laboratorio, o cualquier otro, que lleve a cabo el análisis, indicar razón social, representante legal, dirección y teléfono.

13 APENDICES

13.1 Apéndice A

Como formar una muestra compuesta - Ejemplo

Si el proceso generador de la descarga "X" funciona por 15 h; entonces, de acuerdo a la tabla 1 se tienen que tomar cuatro muestras simples par formar una compuesta.

Se deben tomar precauciones cuando se lleve a cabo el muestreo, utilizando cubrebocas y guantes de látex desechables.

Suponer que la hora de toma de la muestra simple y el caudal correspondiente se lleva a cabo de acuerdo a la tabla 7.

TABLA 7.-Horario y caudal hipotético del muestreo simple o instantáneo.

Número de muestra simple o instantánea.	Hora de la toma de la muestra simple (h)	Caudal de la descarga (m ³)
1	9	32
2	12	13
3	15	8
4	18	3
	TOTAL	56

La proporción de muestra que debe ser tomada del caudal para cada tiempo se obtiene a partir de la siguiente relación:

$$\% Mt_x = \frac{(Ct_x)(100)}{C_T}$$

donde:

%Mt_x es el por ciento (%) de muestra al tiempo "x";

Ct_x es el caudal al tiempo "x" en metros cúbicos (m³);

C_T es el caudal total en metros cúbicos (m³)

Sustituyendo:

Si Ct₁ = 32 m³

$$\%Mt_1 = \frac{(32m^3)(100)}{56m^3} = 57,14\%$$

Si Ct₂ = 13 m³

$$\%Mt_2 = \frac{(13m^3)(100)}{56m^3} = 23,21\%$$

Si Ct₃ = 8 m³

$$\%Mt_3 = \frac{(8m^3)(100)}{56m^3} = 14,28\%$$

Si Ct₄ = 3 m³

$$\%Mt_4 = \frac{(3m^3)(100)}{56m^3} = 5,35\%$$

Por lo tanto, el volumen que corresponde a cada muestra simple considerando que el volumen total es de dos litros, se calcula a partir de la siguiente relación:

Donde: V_{t_x} = (20) (%Mt_x)

V_{t_x} es el volumen de muestra al tiempo "x" en mililitros (mL).

Sustituyendo:

Si %Mt₁ = 57,14 %

V_{t₁} = 20(57,14 %) = 1 143 mL

Si %Mt₂ = 23,21 %

V_{t₂} = 20 (23,21 %) = 464 mL

Si %Mt₃ = 14,28 %

V_{t₃} = 20 (14,28 %) = 286 mL

Si %Mt₄ = 5,35 %

V_{t₄} = 20 (5,35 %) = 107 mL

Entonces:

$$\Sigma V_t \text{ 02,000mL}$$

13.2 Apéndice B

Determinación del intervalo de concentraciones - Ejemplos

Ejemplo 1:

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

TABLA 8.-Relación hipotética de concentración/ % de mortalidad.

Concentración (%)	Mortalidad (%)
6,25	0,00
12,50	5,00
25,00	10,00
50,00	30,00
100,00	70,00

NOTA 8.-
$$\frac{\% \text{ Mortalidad}}{\% \text{ inmovilizada}} = \frac{A}{B} \times 100$$

Donde:

A es el número de organismos muertos por concentración:

B es el número de organismos expuestos por concentración:

En este caso, la CL₅₀ teórica a 24 h (tiempo de exposición que dura la prueba exploratoria) está entre la concentración al 50 % y 100 % por lo cual, es factible seleccionar para la prueba formal, cinco concentraciones entre 50 % y 100 % sin embargo, aquí es importante considerar lo siguiente:

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

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

Por otro lado, en caso de que los organismos a la concentración 6,25 % de este ejemplo, presenten una movilidad similar a la del testigo, es adecuado utilizar ésta, como concentración mínima.

Ejemplo 2:

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

TABLA 9.-Relación hipotética de concentración /% de mortalidad.

Concentración (%)	Mortalidad (%)
6,25	0,00
12,50	80,00
25,00	100,00
50,00	100,00
100,00	100,00

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

En este sentido, y al igual que en el ejemplo 1 de este apartado, teóricamente se tiene que seleccionar para la prueba definitiva a 6,25 % y 12,5 % como las concentraciones mínima y máxima respectivamente (ya que la finalidad de la prueba es obtener la CL₅₀, la cual está definida como la concentración en este caso de un efluente, que origina un efecto letal en el 50% de los organismos expuestos) sin embargo, y para el caso de este ejemplo, si los organismos en la concentración al 6,25% presentan un movimiento similar al de los testigos, es adecuado considerar a éste como el valor mínimo durante la prueba definitiva; en caso contrario dos concentraciones menores a ésta (tal vez 1,0 % y 0,5 %) pueden ser utilizadas en la prueba definitiva.

Del mismo modo, se tiene que observar detenidamente a los organismos que quedan vivos en la concentración al 12,5%, ya que si se encuentran muy afectados esto es, en el fondo y con movimientos apenas perceptibles, es adecuado que en la prueba definitiva se consideren concentraciones todavía menores a esta (por ejemplo 5 % y 10 %).

Ejemplo 3:

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

TABLA 10.-Relación hipotética de concentración/ % de mortalidad.

Concentración (%)	Mortalidad (%)
6,25	0,00
12,50	0,00
25,00	0,00
50,00	0,00
100,00	0,00

En este ejemplo, el efluente presenta un efecto agudo no detectado después de 24 h de exposición de los organismos de prueba.

En este caso, siempre y cuando el estado de los organismos sea similar al del testigo, se debe extender la prueba a un tiempo de 48 h.

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

NOTA 9.-Para la preparación de las diferentes diluciones, se debe contar con medidas de seguridad para evitar entrar en contacto directo con las muestras de aguas residuales. Se recomienda utilizar propipetas, guantes de látex desechables y cubrebocas.

13.3 Apéndice C

Determinación de la CL₅₀ por el método de Probit - Ejemplo

Suponer que al finalizar una prueba de toxicidad, se obtienen los siguientes datos:

TABLA 11.-Resultados de toxicidad

% Concentración en volumen	No. Organismos expuestos por concentración	No. Organismos muertos por concentración	% Mortalidad por concentración
100	30	24	80
50	30	18	60
25	30	12	40
12,5	30	6	20
6,25	30	3	10

NOTA 10.-En caso de que la muestra sea una sustancia tóxica específica (por ejemplo, dicromato de potasio K₂Cr₂O₇), en vez de anotar el por ciento (%) de la concentración en volumen del agua del efluente, se debe registrar la concentración de la sustancia en mg/L o mL/L, en el caso de tóxicos sólidos o líquidos respectivamente.

NOTA 11.-Número total de organismos por dilución es igual a 30 (3 réplicas con 10 organismos en cada uno).

Realizando los pasos 1, 2 y 3 (ver Capítulo 11 inciso 11.2, 11.3, 11.4), se construye la siguiente tabla.

TABLA 12.-Datos de toxicidad para el Método Probit

Conc. %	Log ₁₀ Conc. (X)	No. de Org. (N)	Mortalidad observada (r)	% Mortalidad (P)	Probit empírico (EP)	Probit calculado (Y)
100	2,0	30	24	80	5,84	5,81
50	1,698	30	18	60	5,25	5,27
25	1,397	30	12	40	4,75	4,74
12,5	1,096	30	6	20	4,16	4,21
6,25	0,795	30	3	10	3,72	3,67

- Paso 4

Se construye la gráfica (ver figura 2)

- Paso 5

Se realiza el ajuste de la recta y se obtiene para el ejemplo, que. El Log de la CL₅₀ es de 1,54, por medio del siguiente procedimiento:

$$CL_{50} = \text{Antilog}_{10} X \text{ (en } Y = 5)$$

Simplificando:

$$\text{Log } CL_{50} = 1,54$$

Por lo tanto:
 $CL_{50} = \text{Antilog } 1,54$
 $CL_{50} = 34,67 \%$

El valor de 34,67 % representa la concentración teórica a la cual se detecta el 50% de mortalidad en los organismos expuestos.

- Paso 6
 Intervalo de incremento

$$S = \frac{2 - 0,795}{5,81 - 3,67} = 0,563,0$$

- Paso 7
 Determinación del error patrón.
 Se construye la siguiente tabla con los datos señalados en el inciso 11.7.2.

TABLA 13.-Error patrón del Log CL_{50}

Log ₁₀ Conc. (X)	No. Org. (N)	Probit Calc. (CP)	Fact. Pond. (w)	Producto (Nw)	Producto (NwX)	Producto (NwX ²)
2,0	30	5,81	0,0503	15,09	30,18	60,36
1,698	30	5,27	0,616	18,48	31,37	53,28
1,397	30	4,74	0,616	18,48	25,82	36,06
1,096	30	4,21	0,503	15,09	16,54	18,12
0,795	30	3,67	0,336	10,08	8,02	6,37
Sumatorias				SUM (nw) = 77,2	SUM (NwX) = 111,93	SUM(NwX ²) = 174,20

El error patrón se determina por la siguiente fórmula:

$$ESLog_{10} CL_{50} = S^2 \left[\frac{1}{\sum Nw} + \frac{\sum Nw(m - z)^2}{\sum Nw(\sum NwX^2) - (\sum NwX)^2} \right] o.s$$

donde:

S = 0,563 0
 m = 1,769
 Nw = 77,22
 NwX = 111,93
 NwX₂ = 174,20

$$z = \frac{NwX}{Nw} = \frac{111,93}{77,22} = 1,450$$

Sustituyendo:

$$\begin{aligned} ESlog_{10} CL_{50} &= 0,317 - 0 \left[\frac{1}{77,22} \right] + \left(\frac{77,22(1,769 - 1,450)^2}{77,22(174,20) - 15,528,32} \right) o.s \\ &= 0,317 \text{ O } \left[0,317 \text{ O } + \frac{7,857 - 984 - 42}{923,404} \right] o.s \\ &= 0,317 \text{ O } [(0,021 459 8)] o.s \\ &= 0,317 \text{ O } (0,146 491 6) o.s \\ &= 0,046 437 8 \end{aligned}$$

Para determinar el intervalo de confianza se sustituyen los valores correspondientes en la siguiente relación:

$$IC CL_{50} = (CL_{50}) (Eslog_{10} CL_{50}) (\log_{10})$$

Sustituyendo:

$$IC CL_{50} = (34,67\%) (0,046 437 8) (2,302 5) = 3,707 0\%$$

Por lo tanto la CL_{50} obtenida para el ejemplo, con el intervalo (95% de confiabilidad estadística) correspondiente es:

$$CL_{50} = 34,67 \% \pm 3,707 0$$

Las unidades de toxicidad son:

Sustituyendo: (ver Capítulo 11 inciso 11.9)

$$U.T.a. = \frac{1}{34,67} \times 100 = 2,88$$

Por lo tanto, en este ejemplo se obtuvieron 2,88 unidades de toxicidad aguda.

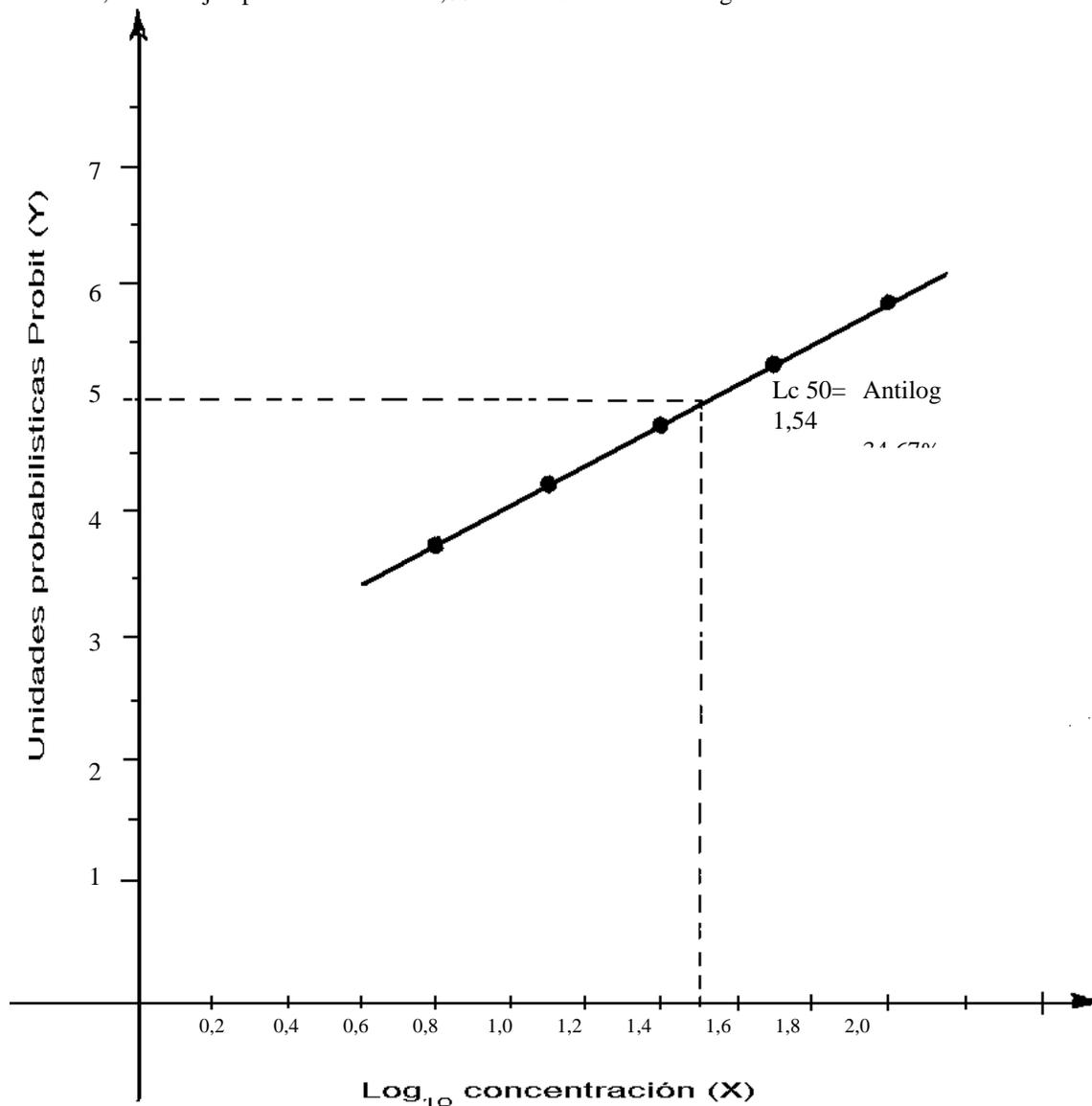


FIGURA 2.- Representación gráfica del Método Probit

14 BIBLIOGRAFIA

14.1 Anderson, B.G., 1944. The toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna*. (La toxicidad e varias sustancias encontradas en desechos industriales determinadas por el uso de *Daphnia magna*) Sewage Works J. 16:1140-1156.

14.2 APHA, AWWA, WPCF, 1989. Standard Methods for the examination of water and Wastewater. (Métodos para el análisis del agua y de aguas residuales). American Public Health Association, Port City Press, Baltimore, Maryland. E.U.A. 10-200 p. + láminas.

14.3 Attar, E.N. y E.J. Maly, 1982. Acute toxicity of cadmium, zinc and cadmium-zinc mixtures to Daphnia magna. (Toxicidad aguda provocada por cadmio, zinc y la mezcla de los mismos en Daphnia magna) Arch. Environ Contam. Toxicol. 11 (3): 291 - 296

14.4 Biesinger, K.E. y G.M. Christensen, 1972. Effects of various metals on survival, growth, reproduction and metabolism of Daphnia magna. (Efectos de varios metales en la sobrevivencia, crecimiento, reproducción y metabolismo de Daphnia magna.) J. Fish. Res. Board Can 29: 1691-1700.

14.5 CETESB, 1991. Métodos de Avaliação de Toxicidades de Poluentes a Organismos Aquáticos. (Métodos de evaluación de toxicidad de contaminantes en organismos acuáticos) Sao Paulo, SP. Brasil. S.p.

14.6 CETESB, 1991 a. Procedimientos para utilizacao de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. (Procedimientos para la utilización de pruebas de toxicidad en el control de efluentes líquidos) Serie Manuais. Sao Paulo, SP. Brasil, 17 p.

14.7 CETESB, 1991 b. Implementacao de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. (Implementación de pruebas de toxicidad en el control de efluentes líquidos) Serie Manuais. Sao Paulo, SP. Brasil, 7p.

14.8 Environment Canada, 1990. Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to Daphnia magna. (Método de prueba biológico: Método de referencia para determinar la letalidad aguda de efluentes con Daphnia magna. EPS 1/RM/14. 18 pp.

14.9 EPA, 1991. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Métodos para medir la toxicidad aguda de efluentes y aguas receptoras con organismos marinos y dulceacuícolas) EPA/600/4-90/027.

14.10 EPS, 1990. Guidance Document on Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants. (Guía para el control de la precisión en la prueba de toxicidad utilizando tóxicos de referencia) Report EPS 1/RM/15 Canada.

14.11 Finney, D.J., 1971. Probit analysis. (Análisis Probit) 3ª. ed. Cambridge University Press, Londres. 333pp.

14.12 Goulden, C.E. y L.L. Henry, 1987. Instrucciones para el cultivo de Daphnia para pruebas de Toxicidad. Guía de Trabajo. Academy of Natural Sciences. Filadelfia, Pensilvania E.U.A. 13 PP.

14.13 ISO 6341, 1982 a. Water quality- Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna. Straus (Crustácea-Cladocera). (Calidad del agua - Determinación de la inhibición de la movilidad de Daphnia magna. Straus) ISO/6341-1982 (E).

14.14 Lewis, P.A. y W. B. Horning, 1988. "A" Short-Term Chronic Toxicity Test Using Daphnia magna." (Pruebas de toxicidad crónica a corto plazo utilizando Daphnia magna.) Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 10th Volume, ASTM, STP 1971. W.J. Adams, G.A. Chapman, and W.G. Landis, Eds., American Society for Testing and Materials, Filadelfia: 508-555.

14.15 Litchfield, J.T.Jr. y F. Wilcoxon, 1949. A simplified method of evaluating dose effect experiments. (Método simplificado para evaluar los efectos de las dosis en los experimentos) J. Pharm. Exp. Ther. 96: 99-113.

14.16 Needham, J.G., P.S.A. Galtsoff, F.E. Lutz y P.S. Welch, 1937. Culture Methods for Invertebrate Animals. (Métodos de cultivo en invertebrados) Comstock Pub). Co. Reprinted by Dover Publ., Inc., Nueva York.

14.17 Pennak, R.W. 1978. Fresh Water Invertebrates of the United States. (Invertebrados dulceacuícolas de los Estados Unidos de América) 2ª. Ed. , John Wiley and Sons, Nueva York 365-367 pp.

14.18 Pielou, E.C. 1969. An Introduction to Mathematical Ecology. (Introducción a la Ecología Matemática) Wiley Intersciencias John Wiley and Sons, Nueva York.

14.19 Ley de Aguas Nacionales. Publicada en el Diario Oficial de la Federación del 1 de diciembre de 1992.

14.20 Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. Publicada en el Diario Oficial de la Federación del 28 de enero de 1988.

14.21 Stephan, C.E., 1977. Methods for calculating an CL₅₀ (Métodos para el cálculo de la CL₅₀) In: Mayer y J.L. Hamelink, (Eds.), Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation, ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania: 65-84

14.22 NOM-008-SCFI-1993 Sistema General de Unidades de Medida.

15 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma concuerda parcialmente con la norma internacional ISO 6341, ver apéndice informativo.

APENDICE INFORMATIVO

Cabe mencionar que la presente norma ha sido complementada con normas de otros países e investigación realizada a nivel nacional.

LA DIRECTORA GENERAL DE NORMAS

LIC. MARIA EUGENIA BRACHO GONZALEZ