

NMX-AA-110-1995-SCFI**ANALISIS DE AGUA- EVALUACION DE TOXICIDAD AGUDA CON ARTEMIA
FRANCISCANA KELLOGG (CRUSTACEA-ANOSTRACA) - METODO DE PREBA****PREFACIO**

En la elaboración de la presente Norma Mexicana, participaron las siguientes empresas e instituciones:

- ASESORIA Y CONSULTORIA ECOLOGICA-REMMSA
- ASOCIACION NACIONAL DE LA INDUSTRIA QUIMICA
- BECTON DICKINSON DE MEXICO
- CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE CELULOSA Y PAPEL
- EMPRESA PARA EL CONTROL DE LA CONTAMINACION DEL AGUA EN LA ZONA DE CIVAC
F. J. SALCEDO Y COMPAÑIA
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETROLEO
- INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
 - Centro de Investigación y de Estudios Avanzados;
 - Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- INSTITUTO TECNOLOGICO DE ZACATEPEC
- JUNTA MUNICIPAL DE AGUA Y SANEAMIENTO DE CIUDAD JUAREZ CHIHUAHUA
- SECRETARIA DE MARINA
 - Dirección General de Oceanografía Naval
- SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA
 - Comisión Nacional de Agua;
 - Dirección General de Acuicultura;
 - Instituto Mexicano de Tecnología del Agua;
 - Instituto Nacional de Ecología;
 - .Instituto Nacional de la Pesca.
- UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
 - Unidad Xochimilco
- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
 - Instituto de Ciencias de Mar y limnología

**NMX-AA-110-1995-SCFI
INDICE DEL CONTENIDO**

- 1** Objetivo
 - 2** Campo de aplicación
 - 3** Referencias
 - 4** Definiciones
 - 5** Muestreo
 - 6** Principio
 - 7** Reactivos y materiales
 - 8** Aparatos y/o instrumentos
 - 9** Preparación y acondicionamiento de las muestras
 - 10** Procedimiento
 - 11** Expresión de los resultados
 - 12** Informe de la prueba
 - 13** Bibliografía
 - 14** Concordancia con normas internacionales
- Apéndice (informativo)

ANALISIS DE AGUA- EVALUACION DE TOXICIDAD AGUDA CON Artemia franciscana Kellogg (Crustacea-Anostraca) - METODO DE PRUEBA

WATER ANALYSIS - ACUTE TOXICITY EVALUATION WITH Artemia franciscana Kellogg (Crustacea-Anostraca) - TEST METHOD

1 OBJETIVO

Esta Norma mexicana establece el método biológico para la evaluación de la calidad del agua mediante pruebas de toxicidad aguda utilizando Artemia Franciscana

2 CAMPO DE APLICACION

Esta Norma Mexicana es aplicable para la evaluación de toxicidad aguda en cuerpos de agua salobres y marinos, así como aguas residuales e industriales, municipales y agrícolas, lixiviados, sustancias puras o combinadas y extractos acuosos con salinidades mayores a diez.

3 REFERENCIAS

Esta norma se complementa con las siguientes Normas Mexicanas y Norma Oficial-Mexicana vigentes:

NMX-AA-007	Aguas - Determinación de la temperatura.
NMX-AA-008	Aguas - Determinación del pH.
NMX-AA-087-SCFI	Análisis de agua Evaluación de toxicidad aguda con <u>Daphnia magna</u> Straus (Crustacea-Cladocera) - Método de prueba.
NOM-053-ECOL	Que establece el procedimiento para llevar a cabo la prueba de extracción para determinar los constituyentes que hacen de un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.

4 DEFINICIONES

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

4.1 Agua de mar artificial

Es el agua preparada en laboratorio que presenta características físicoquímicas similares al agua marina.

4.2 Artemia Franciscana (Kellogg, 1906)

Organismo planctónico que en promedio mide de 8 mm a 12 mm de longitud en etapa adulta y 350 µm en la etapa naupliar. Con 42 cromosomas, de 1 a 3 cromocentros, diploides, furca con dos lóbulos, con varias setas y constricción basal. Presenta dimorfismo sexual: el macho tiene penes con espina; Su segundo par de antenas bien desarrolladas, funciona como órgano prensil para retener a la hembra; en cada antena lleva una protuberancia semiesférica; la hembra tiene un saco ovigero en la parte ventral, el cual, visto lateralmente, es puntiagudo. Generalmente habita en aguas salobres e hipersalinas, cuya concentración varía desde 5 g/l hasta 150 g/l. Es una especie originaria del continente americano, (ver figura 1)

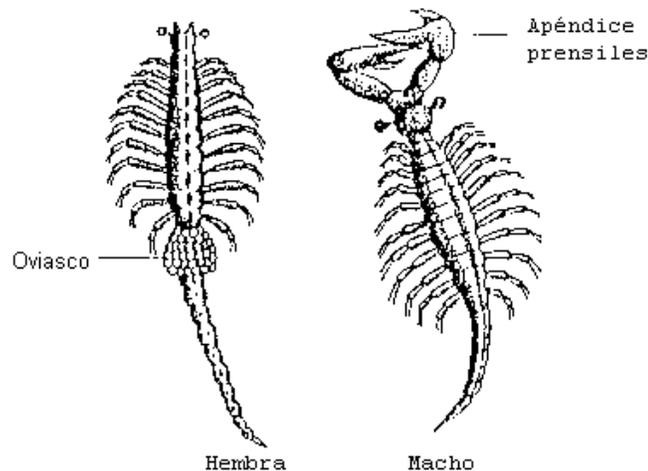


FIGURA 1.-Artemia Franciscana

4.3 Clase crustacea

Categoría taxonómica que agrupa a los organismos mandibulados, los cuales presentan exoesqueleto quitinoso con sales calcáreas, por lo que el caparazón a veces es muy duro. Tienen dos pares de apéndices prebucales que constituyen el primero y segundo par de antenas; al primer par también se le conoce como anténulas. El segundo par, aunque se encuentra antes de la boca, en su origen es postoral. Después de la boca, los crustáceos poseen numerosos pares de apéndices. Con excepción del primer par de antenas, todos los apéndices derivan de apéndices birramios. Durante su desarrollo, en general, presentan metamorfosis ;y un estado larval llamado "nauplio" (ver inciso 4.12) de tipo muy primitivo.

4.4 Concentración letal media (CL₅₀)

Es la concentración de una sustancia (pura o combinada) o efluente, que en una prueba de toxicidad agudo, provoca un efecto letal en el 50 % de los organismos expuestos durante un tiempo determinado.

4.5 Cuerpos de agua

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

4.6 Cuerpos receptores

Son todos los mencionados en el inciso 4.5 que reciban directa o indirectamente descargas.

4.7 Descarga

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

4.8 Efluente

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

4.9 Inmovilidad

Es la incapacidad de los nauplios (ver inciso 4-12) para presentar algún movimiento apendicular, después de 10 s de observación mediante la utilización de un microscopio estereoscópico. Este criterio se emplea en esta norma como un indicador de mortalidad de los organismos.

4.10 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.

4.11 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.

4.12 Nauplio

Es la primera etapa de desarrollo de un crustáceo y abarca desde que emerge del huevo hasta la primera muda. El nauplio recién nacido tiene forma ovoide, mide en promedio 350 µm de longitud; Su cuerpo muestra tres segmentos cefálicos y una región post mandibular no segmentada, un ojo naupliar y labrum amplio, debajo del cual se encuentra la boca. En el primer segmento cefálico lleva un par de antenas llamadas anténulas, colocadas una a cada lado del ojo naupliar; en el segundo segmento cefálico; se ubica el segundo par de antenas que son apéndices birramios y funcionan como las primeras estructuras de locomoción; el tercer segmento, lleva las mandíbulas que también son birramiadas, (ver figura 2).

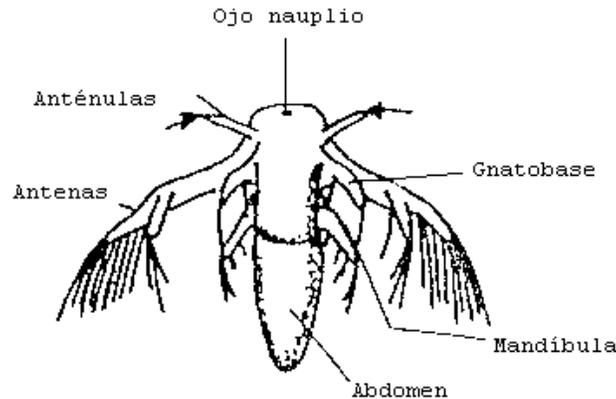


FIGURA 2.- Nauplio

4.13 orden anostraca

Categoría taxonómica que agrupa a organismos sin caparazón, ojos compuestos pedunculados, antenas prensiles bien desarrolladas en los machos y reducidas en las hembras; poseen de 11 a 19 pares de apéndices en el tronco. Sin apéndices postgenitales. Rama furcal unisegmentada. Con metamorfosis en su desarrollo. Tienen la capacidad de formar huevos resistentes llamados quistes. Las aberturas genitales de hembras y machos se localizan en un segmento que resulta de la fusión de los segmentos 12 y 13 del tronco. En la etapa de la reproducción, la hembra muestra una bolsa de huevecillos (ovisaco), en la cara ventral de los primeros segmentos postgenitales.

4.14 Prueba de toxicidad (bioensayos de toxicidad)

Es la exposición controlada de organismos a sustancias puras o combinadas, lixiviados, extractos acuosos, aguas residuales industriales, municipales, agrícolas y aguas provenientes de cuerpos de agua, para evaluar su efecto tóxico.

4.15 Quiste

Es un estado de desarrollo embrionario en etapa de gástrula, protegido por una cubierta constituida por tres estructuras: corión, membrana cuticular externa, cutícula embrionaria. Los quistes tienen una masa de 2,8 µg a 4 µg. Miden de 200 µm a 300 µm y son de color marrón claro. Cuando están deshidratados tienen la apariencia de balones desinflados y al hidratarse se tornan esféricos.

4.16 Salinidad

Es la cantidad total de materia sólida, en gramos, disuelta en 1 kg de solución acuosa después de que todos los carbonatos se han convertido en óxidos, todos los bromuros y yoduros reemplazados por cloruros y toda la materia orgánica se ha oxidado.

4.17 Sedimento

Material particulado o granular que se deposita en el fondo de un cuerpo de agua, sistema de drenaje y alcantarillado urbano o municipal.

4.18 Sustancia combinada

Es aquella que se forma por la integración de dos o más compuestos en una proporción no mayor al 93 % de cualquiera de ellos. Para fines de esta norma las sustancias combinadas pueden ser de aguas: residuales industriales, municipales y agrícolas, lixiviados y extractos acuosos con salinidades mayores a diez.

4.19 Sustancia pura

Elemento o conjunto de dos o más elementos combinados químicamente, que dan lugar a un compuesto con pureza no menor al 98 %, por ejemplo: dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), fenol (CH_6-OH), sulfato de zinc ($ZnSO_4$).

4.20 Tiempo de exposición

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

4.21 Toxicidad aguda

Es el efecto letal que se produce después de exponer a los organismos prueba, a sustancias puras o combinadas una sola vez durante un período corto.

4.22 Tóxico

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

4.23 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 o inter laboratorios. El uso de estos tóxicos, proporciona también una evaluación general de la precisión (estabilidad y reproducibilidad) del método a través del tiempo.

5. MUESTREO

El muestreo tanto de cuerpos de agua como de efluentes industriales, municipales y agrícolas, 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, municipales y agrícolas, extractos acuosos y lixiviados

Se toman muestras compuestas de dos Litros (volumen total), en recipientes de plástico inerte o de vidrio borosilicato, los cuales deben ser llenados completamente y sellados.

El número de muestras instantáneas o simples, necesarias para formar una muestra compuesta depende de las horas en que se opere el proceso generador de la descarga, como se especifica en la tabla 1.

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

Horas por día en que se opera el proceso generador de la descarga	Número de muestras	Intervalo para la de simples obtención muestras	
		mínimo	máximo
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	4,0
más de 18 h y hasta 24 h	6	3,0	3,0

Para determinar el volumen de las muestras instantáneas o simples para la preparación de una muestra compuesta, se debe seguir el ejemplo del apéndice A de la Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI, (ver 3 Referencias).

5.2 Muestreo en cuerpos de agua

Se debe establecer una red de muestreo que represente las condiciones del cuerpo receptor, las muestras deben ser simples y las muestras compuestas de 2 L, colectadas en la misma forma que en el inciso 5.1.

Deben registrarse los parámetros fisicoquímicos básicos (salinidad, pH, oxígeno disuelto y temperatura), anotando las siguientes características aparentes:

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

5.3 Muestreo de lixiviados

El muestreo de lixiviados se debe efectuar en los pozos de monitoreo de los sistemas de captación de los mismos, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-053-ECOL, (ver 3 Referencias). Toda muestra debe colectarse en

recipientes de plástico inerte o de vidrio borosilicato; éstos deben ser llenados completamente y sellados. Se deben tomar las medidas precautorias necesarias utilizando el equipo de seguridad adecuado (guantes de látex, mascarillas, lentes protectores y cualquier otro).

5.4 Muestreo de sedimentos

El muestreo de sedimentos se lleva a cabo utilizando una draga Ekman o similar, o bien un nucleador, siempre que se realice en cuerpos de agua cuya profundidad sea igual, o mayor a 50 cm. Si el muestreo se efectúa a profundidades menores a la anterior, se utiliza una pala pequeña de acero inoxidable o de plástico inerte.

En cualquiera de los dos casos mencionados, la muestra que se considera para el análisis corresponde a la lámina superior de sedimento con un espesor de 3 cm y masa húmeda aproximada de 2 kg.

Al efectuar el muestreo, se recomienda considerar lo siguiente:

- Cuando se realiza el muestreo en sedimentos limosos, se sugiere introducir lentamente la draga o el nucleador, para evitar remolinos y corrientes que suspendan el sedimento.
- Si el muestreo se realiza en un sedimento rocosoarenoso, pueden quedar atrapadas rocas pequeñas entre las mandíbulas de la draga, impidiendo el cierre adecuado de ésta, lo cual conduce a pérdidas de sedimento.

La draga o el nucleador deben lanzarse tantas veces como sea necesario hasta obtener la cantidad suficiente de sedimento.

- Cuando se utilice la pala pequeña de acero inoxidable o de plástico inerte, se debe procurar sumergirla en dirección del flujo y, al llegar al fondo, introducirla lentamente inclinando la pala en un ángulo aproximado de 45°.
- Posteriormente, arrastrar ésta paralelamente al fondo hasta obtener una cantidad suficiente. En seguida, se debe elevar la pala en forma casi horizontal (paralela al fondo) muy lentamente, para evitar pérdida de sedimento.

Para todos los casos anteriores, la muestra colectada para el análisis se coloca en bolsas de polietileno incoloras, las cuales deben quedar perfectamente cerradas, con objeto de proteger la acción de la luz solar.

6 PRINCIPIO

Este método se basa en la exposición controlada del crustáceo Artemia Franciscana, a cuerpos de agua salobre o marino, sustancias puras o combinadas, cuya salinidad sea mayor a diez, para evaluar su efecto tóxico.

7 REACTIVOS Y MATERIALES

7.1 Reactivos (grado analítico)

- Acetona (C_3H_6O)
- ácido bórico (H_3BO_3)
- Ácido nítrico (HNO_3)
- Agua destilada
- Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$)
- Bromuro de potasio (KBr)
- Cloruro de calcio anhidro ($CaCl_2$)
- Cloruro de estroncio ($SrCl_2 \cdot 6H_2O$)
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Fluoruro de sodio (NaF)
- Lauril sulfato de sodio (Dodecil sulfato de sodio)
- $(CH_3)(CH_2)_{10}CH_2OSO_3Na^*$
- Sulfato de sodio ($NaSO_4 \cdot 10H_2O$)

NOTA I- * Reactivo empleado como tóxico de referencia.

7.2 Materiales

7.2.1 De vidrio

- Cajas de petri de 60 mm de diámetro y 12 mm de alto
- Embudo de separación de 125 ml
- Matraces aforados (diferentes capacidades)
- Matraces Erlenmeyer (diferentes capacidades)

- Pipetas Pasteur con bulbo
- Pipetas volumétricas (diferentes capacidades)
- Vasos de precipitado tipo Griffin de 30 ml

7.2.2 Material biológico

7.2.2.1 Quistes de Artemia franciscana

Se deben utilizar quistes con un máximo de 10 % de humedad y garantizados por el proveedor. la condición de humedad debe mantenerse aún después de abierto el recipiente.

7.2.3 Otros materiales

- Bolsas de polietileno incoloras
- Cubrebocas
- Detergente para uso en laboratorio
- Filtro de membrana de 0,45 mm
- Guantes de látex
- lentes protectores
- Mascarillas
- Pala pequeña de acero inoxidable o de plástico inerte
- Propipetas
- Recipientes de plástico inerte o de vidrio borosilicato
- Soporte universal
- Tamiz de luz de malla de nylon de 100 mm
- Tubo o manguera de plástico

8 APARATOS Y/O INSTRUMENTOS

- Balanza analítica
- Bomba de aire
- Centrífuga refrigerada
- Congelador
- Draga tipo Ekman
- luxómetro
- Microscopio estereoscópico
- Medidor, de pH
- Nucleador
- Oxímetro
- Parrilla magnética
- Salinómetro, Refractómetro o Densímetro
- Sistema de control de temperatura
- Termómetro

9 PREPARACION Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de agua (simples o instantáneas y compuestas), de lixiviados y de sedimentos, deben ser almacenadas, cuando se requiera, en el mismo recipiente donde fueron colectadas.

Las muestras deben mantenerse a una temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ desde su colecta, y hasta 36 h. Después de 36 h y hasta 60 días posteriores a la fecha de colecta, se deben congelar a no más de -10°C para evitar cambios debidos a la actividad microbiana, transformación química y/o pérdida de sustancias volátiles. Las pruebas de toxicidad realizadas fuera de estas condiciones, no son válidas.

Las muestras deben ser preservadas sin producto químico alguno.

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

10 PROCEDIMIENTO

El área para pruebas de toxicidad debe ser exclusiva, con dimensiones mínimas de 6 m^2 y control de fotoperíodo (16 h luz/8 h oscuridad).

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:

10.1.1 Técnica de eclosión de quistes de Artemia franciscana y obtención de nauplios

A un embudo de separación de 125 ml de capacidad, agregar 100 ml de agua de rnar artificial diluida. Establecer las condiciones que se mencionan en la tabla 2. Posteriormente, adicionar 100 mg de quistes.

TABLA 2.- Condiciones para llevar a cabo la eclosión de los quistes

Parámetro	Condiciones
Temperatura	27°C ± 3°C
Luminosidad	1000 luxes*
Salinidad	10 a 12
Oxígeno disuelto	No menor al 80 % de saturación
pH **	8,5 ± 0,5

NOTA 2 * luxes se abrevia Lx.

NOTA 3 ** En caso necesario ajustar con bicarbonato de sodio.

Aplicar aireación continua , mediante el uso de una manguera conectada a una bomba de aire la que, se introduce por la boca del embudo hasta el fondo para que los quistes se mantengan en movimiento y su distribución en el agua sea homogénea (ver figura 3) , Procurar que la aireación sea moderada para no dañar los quistes.

Exponer el embudo de separación a una fuente luminosa (luxómetro) colocada a una distancia tal que asegure que la iluminación incidente sea la requerida. Mantener la iluminación por lo menos durante 7 h.

Si los quistes se mantienen durante 24 h en las condiciones descritas, se obtiene la eficiencia de eclosión máxima, Posteriormente, suspender la aireación para que los nauplios se concentren en el fondo del embudo de separación; colectarlos en un tamiz de malla de nylon de 100 µm de abertura, abriendo la llave del embudo. Transferirlos a cajas de petri de 60 mm de diámetro y 12 mm de alto, donde deben permanecer hasta el inicio de la prueba.

Con la ayuda de una pipeta Pasteur con bulbo, seleccionar los nauplios que presenten mayor movimiento. Para facilitar esta operación colocar una fuente luminosa por un lado de la caja de petri; aquellos nauplios que respondan más rápidamente al estímulo, son los indicados para utilizarse en las pruebas de toxicidad.

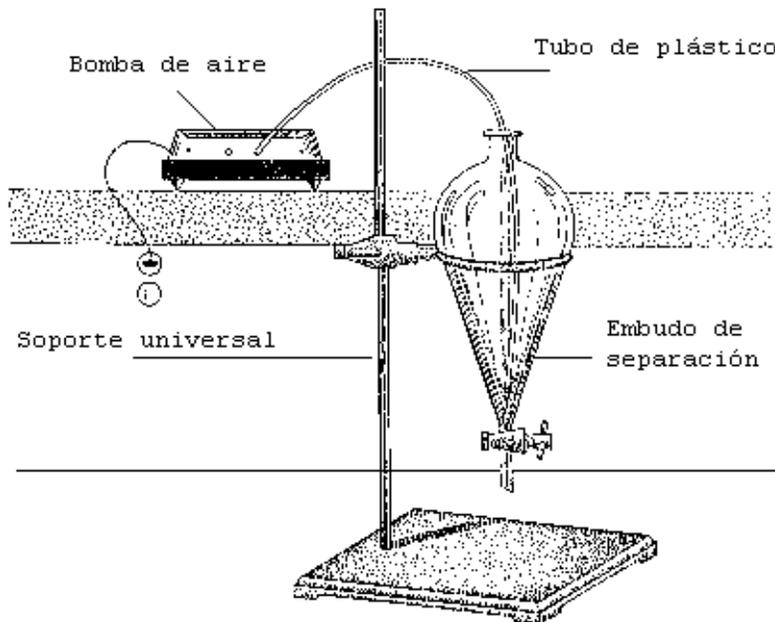


FIGURA 3.- Equipo para eclosionar los quistes de Artemia franciscana

10.2 Lavado de material

Todos los recipientes que entren en contacto con las muestras, deben lavarse perfectamente para eliminar residuos potencialmente tóxicos a los organismos de prueba, Utilizando el método siguiente:

10.2.1 lavar el material con detergente Para uso en laboratorio y enjuagar dos veces con agua de la llave.

10.2.2 Enjuagar el material con ácido nítrico (HNO₃) al 30 % para eliminar residuos metálicos. Enjuagar con agua desionizada y escurrir.

10.2.3 Enjuagar con acetona (C₃H₆O) Para eliminar residuos orgánicos. Enjuagar con agua desionizada y 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.

10.2.4 Minutos antes de iniciar el bioensayo, enjuagar con agua de mar artificial los recipientes que van a contener a los organismos.

10.2.4.1 Preparación de agua de mar artificial

El uso del agua de mar artificial es necesario para la prueba, ya que, tiene una composición química conocida y permite resultados reproducibles, su preparación debe efectuarse al menos con 72 h de anticipación, cuidando que se efectúe tal y como se indica en la tabla 3, ya que de él depende en gran parte la culminación exitosa de la prueba, (ver Capítulo 13 Bibliografía inciso 13.13).

TABLA 3.- Preparación de agua de mar artificial a una salinidad de 35

Solución A		Solución B	
Sales	Cantidad (g)		
NaCl	23,90	NaSO ₄ .10H ₂ O	9,06
MgCl ₂ .6H ₂ O	10,83	NaHCO ₃	0,02
CaCl ₂ anhidro	1,15	NaF	0,000 3
SrCl ₂ -6H ₂ O	0,004	H ₃ BO ₃	0,002 7
KCl	0,682	Agua destilada	100 ml
KBr	0,099		
Agua destilada	856 ml		

La solución B se adiciona lentamente A, agitando constantemente para lograr una mezcla homogénea. Después de 24 h, filtrar la mezcla utilizando un filtro de membrana de 0,45 µm.

Para comprobar la calidad óptima del agua de mar artificial, se deben colocar 10 nauplios en una muestra de 20 ml, durante 24 h; si al término del plazo no se registra mortalidad, el agua puede ser utilizada en la prueba.

10.3 Calibración de aparatos

Antes de cada prueba, se debe efectuar una calibración de aparatos (medidores de pH, oxígeno disuelto y de salinidad).

10.4 Preparación de extractos acuosos de sedimentos provenientes de ambientes salobres y marinos

Homogeneizar la muestra de sedimentos colectada, mezclar con agua marina artificial en una relación 1:4 (masa/volumen) utilizando un matraz Erlenmeyer. Agitar vigorosamente durante 30 min utilizando una parrilla magnética. Centrifugar la mezcla a 10 000 r/min utilizando una centrífuga refrigerada hasta obtener una separación completa de las dos fases. Utilizar el sobrenadante para el análisis.

Repetir el procedimiento las veces necesarias hasta obtener el volumen de muestra suficiente para el análisis.

10.5 Período de prueba

Cuando la muestra llegue al laboratorio, se deben medir y anotar la salinidad, temperatura y el pH. Si el análisis no va a ser efectuado inmediatamente, mantener la muestra como se indica en el inciso 9 de esta norma, 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, municipales y agrícolas, extractos acuosos y lixiviados, deben ser evaluadas a partir de una prueba exploratoria y una definitiva siempre que la salinidad sea igual o mayor que diez; en el

análisis de sustancias puras solubles en agua se debe utilizar el mismo criterio. Para cuerpos de agua con salinidades mayores o iguales a diez, se realiza únicamente una prueba definitiva.

10.5.1 Prueba exploratoria en efluentes industriales, municipales y agrícolas, extractos acuosos, lixiviados y sustancias puras

Esta prueba sirve para determinar si una muestra es tóxica o no, en su caso, permite definir el intervalo de concentraciones que se deben aplicar en una prueba definitiva. En este bioensayo se prueban cinco concentraciones de la muestra: 100 %, 50 %, 25 %, 12 % y 6 % más un testigo, siguiendo los lineamientos de la tabla 4 de esta norma.

TABLA 4.- Condiciones de la prueba exploratoria con Artemia franciscana Kellogg

Tipo de prueba	Estática, sin renovación de la solución de prueba
Duración	24 h
luminosidad	600 luxes a 1000 l uxes**
Fotoperíodo	16 h luz/8 h oscuridad
Volumen de los recipientes de prueba (vasos de precipitados)	30 ml
Volumen total de cada concentración (agua de mar artificial más muestra)	20 ml
Edad de los organismos	24 h
Número de réplicas	2
Número de organismos por réplicas	10
Aireación en los recipientes prueba	No
Agua de dilución	agua de mar artificial
Temperatura	25°C ± 2°C
Alimentación	No
Volumen total de muestra por prueba	77,5 ml
Volumen total de agua de mar artificial por prueba (incluyendo testigos)	162,5 ml
Respuesta evaluada	Inmovilidad y/o mortalidad
Criterio de aceptación la prueba	Sobrevivencia mayor o igual de la prueba a 90 % en testigos

NOTA 4- luxes se abrevia lx.

10.5.2 Prueba definitiva en efluentes industriales, municipales y agrícolas, extractos acuosos lixiviados y sustancias puras

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 CL₅₀ no necesariamente cae dentro del intervalo seleccionado. Debido a ésto, al finalizar la prueba exploratoria se debe observar a los organismos que continúan vivos para determinar, de acuerdo al estado de afectación, el intervalo de concentraciones que va a ser usado en la prueba definitiva.

Para la determinación del intervalo que debe ser usado en la prueba definitiva de estas muestras, se recomienda revisar los ejemplos del apéndice B de la Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI, (ver 3 Referencias). 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.

10.5.2.1 Condiciones para la prueba definitiva

En la tabla 5 de esta norma se agrupan las condiciones que deben observarse durante una prueba definitiva en muestras provenientes de efluentes industriales, municipales y agrícolas, extractos acuosos y lixiviados, así como en cuerpos de agua.

10.5.3 Prueba definitiva en cuerpos de agua

En esta prueba se deben preparar al menos, cinco concentraciones: 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % y 6,25 %, más el testigo, utilizando para ello pipetas volumétricas y matraces aforados de diferentes capacidades.

NOTA 5 En las pruebas definitivas para efluentes y cuerpos de agua, se deben preparar al menos tres réplicas.

TABLA 5.- Condiciones de la prueba definitiva con Artemia franciscana Kellogg

Tipo de prueba	Estática, sin renovación de la solución de prueba.
Duración	48 h
luminosidad	1 000 luxes
Fotoperiodo	16 h luz/B h bscuridad
Volumen de los recipientes de prueba (vasos de precipitados)	30 ml
Volumen total (agua de mar artificial más muestra)	20 ml
Edad de los organismos	24 h
Número de réplicas por concentración	3
Número de organismos por réplica	10
Aireación en los recipientes prueba	No
Agua de dilución	Agua de mar artificial
Temperatura	25°C ± 2°C
Alimentación	No
Respuesta evaluada	Inmovilidad a 24 h y 48 h
Criteria de aceptabilidad de la prueba	Sobrevivencia mayor o igual al 90% en los testigos

NOTA 6-luxes se abrevia lx.

10.5.4 Evaluación de sensibilidad

El laboratorio que realice pruebas de toxicidad debe validar la sensibilidad de la cepa de Artemia franciscana realizando

para ello, pruebas periódicas (se recomienda cada 2 meses), con el tóxico de referencia que se establece en el inciso 10.5.5.1 de esta norma.

La sensibilidad de Artemia franciscana 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.

10.5.5 Tóxicos de referencia

los tóxicos de referencia deben cumplir con las siguientes características:

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

10.5.5.1 El tóxico de referencia que se sugiere emplear en esta prueba es el lauril sulfato de sodio (dodecil sulfato de sodio) [(CH₃) (CH₂) 10CH₂OSO₃Na₃] 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 16,6 mg/L ± 3,3 mg/L; el valor obtenido experimentalmente debe quedar dentro de este intervalo de confianza.

En caso contrario, se recomienda no realizar más bioensayos con dicha cepa y sustituirla con una nueva para la prueba, la cual, también debe ser evaluada.

10.5.5.2 El tóxico de referencia descrito en esta norma puede ser sustituido por cualquier otro, siempre y cuando, cumpla con las características señaladas en el inciso 10.5.5 de esta norma, debiendo registrar el valor de CL₅₀ y el intervalo de confianza correspondiente.

10.6 Factores de variabilidad

Algunos de los factores de variabilidad pueden ser:

- Manejo de los nauplios
- Manejo del tóxico de referencia
- lavado de material
- Pureza de los reactivos
- Pericia y consistencia en la realización de las pruebas por parte de los analistas

11 EXPRESION DE RESULTADOS

Para la obtención de la CL_{50} se recomienda utilizar el Método de Unidades Probabilísticas "Probit" (ver capítulo 13 Bibliografía inciso 13.12), el cual evalúa la relación concentración-respuesta de un contaminante sobre un organismo, medido en términos de su CL_{50} y su precisión o intervalo de confianza de acuerdo a los lineamientos que se establecen en la Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI, (ver 3 Referencias).

11.1 Conteo de nauplios

El conteo de nauplios inmóviles debe efectuarse a las 24 h y 48 h para el cálculo de la CL_{50} . Si se tiene duda sobre la inmovilidad de los organismos, auxiliarse de un microscopio estereoscópico.

11.2 Parámetros a evaluar

Durante la prueba, los parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura, oxígeno disuelto y salinidad), se determinan al inicio y al término de la misma.

Para fines de esta norma, el oxígeno disuelto y la salinidad se determinan mediante el empleo de un oxímetro y un salinómetro, densímetro o refractómetro respectivamente.

La temperatura y el pH se determinan de acuerdo a las Normas Mexicanas NMX-AA-007 y NMX-AA-008, (ver 3 Referencias).

12 INFORME DE LA PRUEBA

El informe de la prueba incluye especificar los siguientes puntos:

12.1 Cuenca hidrológica.

12.2 Nombre del cuerpo de agua receptor.

12.3 Si se trata de pruebas en efluentes, indicar:

12.3.1 Responsable legal del efluente o descarga

12.3.2 Si es efluente industrial:

- Razón social de la empresa; dirección, teléfono; que produce; que materias primas utiliza horario operación.

12.3.3 Si es efluente agrícola:

localización, tipo(s) de cultivo(s) y, en su caso, que fertilizante(s) y/o plaguicida(s) se utiliza(n).

12.3.4 Si es efluente urbano o municipal:

Localización, nombre de la ciudad o municipio.

Para los casos descritos en los incisos 12.3.2, 12.3.3 y 12.3.4, especificar además:

Caudal promedio ($m^3/día$) caudal promedio durante el muestreo (m^3/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; 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.

12.4 Si se trata de pruebas en 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.

12.5 Datos a registrar durante la prueba de toxicidad:

- Condiciones 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, salinidad, temperatura del agua) y características aparentes (olor, color, turbiedad, presencia o ausencia de burbujas y espuma); datos fisicoquímicos en las muestras al 100 % diluciones y testigo a las 24 h y 48 h de exposición (pH,

oxígeno disuelto, salinidad y temperatura del agua); concentración(es) utilizada(s) 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.

12.6 Análisis de resultados

Tablas y gráfica(s) derivadas de la prueba de toxicidad, así como, anotaciones de las observaciones diarias efectuadas en los organismos en cada concentración, incluyendo los testigos; indicar los valores de toxicidad obtenidos expresados en CL_{50} (con sus respectivos límites de confianza al 95 %) y en unidades de toxicidad; método estadístico utilizado y discusión de resultados.

12.7 Datos adicionales:

Tóxico de referencia utilizado en la prueba sensibilidad, CL_{50} obtenida y fecha de realización; responsable(s) de la realización de la prueba.

12.8 Conclusiones y recomendaciones

12.9 Si se contrata a una empresa consultora, laboratorio, etc., para llevar a cabo los análisis, indicar razón social, representante legal, dirección y teléfono.

13 BIBLIOGRAFIA

13.1 ABREU-GROBOIS, F. A. 1987. A review of the genetics of Artemia. (Una revisión de la genética de artemia) En: Artemia Research and its applications. Vol. 1. Morphology, Genetics, Strain Characterization, Toxicology. P. Sorgeloos; D.A. Bengston; W. Decler and E. Jaspers (Eds.) Universal Press. Wetteren, Bélgica. pp. 61-99.

13.2 APHA, AWWA) WPCF) 1989. Standard Methods for, the examination of water and Wastewater. (métodos estándar 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.

13.3 BLISS, D. E. 1982. The biology of crustacean. (Biología de los Crustáceos). Vol. 1. Lawrence G. (Editor) Academic Press, USA. pp. 67-261.

13.4 BURTON Jr. G. A. Sediment Toxicity Assessment. (Evaluación de Toxicidad de Sedimentos). Ed. Lewis Publishers INC. EUA. 957 p.

13.5 CASTRO, B.T. y Gallardo, R.C. 1983. Artemia sp. Cuadernos No. 31. CBS. UAM. México, D.F. pp. 14-15.

13.6 CASTRO, M. J., De Lara A.R. 1991. Manual de Técnicas para el manejo de Quistes de Artemia sp. UNAM. México. 47 pp.

13.7 CETESB, 1991 a. Métodos de Avaliação da Toxicidade de Poluentes a Organismos Aquaticos. (Métodos de evaluación de toxicidad de contaminantes en organismos acuáticos) Sao Paulo, SP. Brasil. s.p.

13.8 CETESB, 1991 b. Procedimientos para utilización 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.

13.9 CETESB, 1991 C. implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. (Implementación de pruebas de toxicidad en el control de efluentes líquidos) Serie Manuais. San Paulo, SP. Brasil, 7 p.

13.10 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 dulceacuicolas) EPA/600/490/OZ7.

13.11 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/12 Canadá.

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

13.13 KINNE, O 1971. Marine Ecology. (Ecología Marina).Volume I Environmental Factors Part. 2. Wiley Interscience. New York.

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

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

13.16 LITCHFIELD, O.T.Jr. y F. Wilcoxon, 1949. 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.

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

13.18 PEREZ, Ch. A. 1986. Eficiencia de eclosión de quistes de Artemia salina procedentes de dos; salinas de México. Tesis de licenciatura, UNAM-Iztacala. México.

13.19 PERSOONE, G., SORGELOOS, P.1980. The structure of the shell and outer membranes in encysted Artemia salina embryos during cryptobiosis and development. (Estructura del caparazón y membranas externas en el enquistamiento de los embriones de Artemia Salina durante la criptobiosis y desarrollo). J Ultrastruct. Res. 20:244-259.

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

13.21 SAMOILOFF, M. 1984 . Toxicity Testing of Sediments: Problems, Trends, and Solutions. (Pruebas de Toxicidad en Sedimentos: Problemas, Guías y Soluciones). Bioquest International, Inc., Winnipeg, Manitoba, Canadá. pp. 143-159.

13.22 SORGELOOS, P. 1980. Life history of the brine shrimp Artemia (Ciclo de vida del camarón de salmuera de Artemia). p. XXI-XXIII. En: The brine shrimp Artemia. Vol. 1. Morphology, Genetics, Strain Characterization , Toxicology. P. Sorgeloos; D.A. Bengston; W Declair and E. jaspers (Eds.)Universal Press. Wetteren, Bélgica.

13.23 STEPHAN, C.E., 1977. Methods for calculation an LC₅₀.(Métodos para el cálculo de la CL₅₀) In: Mayer y J. L. Hamelink, (Eds.), Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation, ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania: 65-84.

13.24 VANHAECKE, P., PERSOONE, G., CLAUS, C. AND P. SORGELOOS. 1980. Research on the development of a short term standard toxicity test with Artemia nauplii. (Investigación sobre el desarrollo de una prueba de toxicidad estándar de corta duración con nauplios de Artemia). pp. 263-285. En: G. Persoone; P. Sorgeloos; O. Roels y E. Jaspers (Eds.) The Brine Shrimp Artemia vol. 1. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Universal Press. Wetteren, Bélgica. 318 p.

13.25 VAZQUEZ, G. L. 1987. Zoología del phylum Arthropoda. Bravo, A. (Editor) Editorial Interamericana. México, D.F. 174 pp.

14 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma no concuerda con ninguna norma internacional por no existir referencia alguna al momento de su elaboración.

APENDICE INFORMATIVO

La elaboración de la presente Norma Mexicana se efectuó, tomando como base investigación realizada a nivel nacional y la información consultada de normas extranjeras.

LA DIRECTORA GENERAL DE NORMAS
LIC. MARIA EUGENIA BRACHO GONZALEZ