



**Norma Mexicana
NMX-AA-112-SCFI-2017**

**Análisis de Agua y Sedimentos - Evaluación de Toxicidad Aguda con
Vibrio fischeri - Método de Prueba (Cancela a la NMX-AA-112-1995-
SCFI).**

*Water and Sediment Analysis – Acute Toxicity Evaluation with Vibrio fischeri
– Test Method*



Prefacio

El Comité Técnico de Normalización Nacional de Medio Ambiente y Recursos Naturales (COTEMARNAT) es el responsable de la elaboración de la presente Norma Mexicana; una vez que se publique la Declaratoria de Vigencia, cancelará a la NMX-AA-112-1995-SCFI.

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

- Análisis de agua, S.A. de C.V.
- Arva, laboratorio de análisis industriales, S.A. de C.V.
- Centro de Servicios Químicos
- Centro Nacional de Metrología
- Cesar Clemente Alvarado García
- Comisión del Agua del Estado de México
- Comisión Nacional del Agua
- Control Químico Novamann Internacional, S.A. de C.V.
- ECCACIV, S.A. de C.V.
- Entidad Mexicana de Acreditación, A.C.
- Equipos para Diagnóstico Analítico, S.A. de C.V.
- Hach Company
- IDECA, S.A. de C.V.
- Index-Lab
- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua
- Instituto Mexicano del Petróleo
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático
- Laboratorio de Calidad Química Veracruzana, S.C.



- Laboratorio de Química del Medio e Industrial, S.A. de C.V.
- Laboratorio de Servicios Clínicos y Análisis Toxicológicos, S.A. de C.V.
- Laboratorios ABC Química, Investigación y Análisis, S.A. de C.V.
- Laboratorio y Asesoría en Control de la Contaminación, S.A. de C.V.
- MAS Instrumentos, S.A. de C.V.
- Mercury Lab, S.A. de C.V.
- Mónica Orozco Márquez
- Organismo Público Descentralizado para la Prestación de Servicios de Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento del Municipio de Tlalnepantla
- Pemex Petroquímica Complejo Petroquímico Cangrejera
- Pemex Petroquímica Complejo Petroquímico Morelos
- Perkin Elmer de México, S.A.
- Protección Ambiental y Ecología, S.A. de C.V.
- Proyectos y Estudios sobre Contaminación Industrial, S.A. de C.V.
- Servicios de Agua y Drenaje de Monterrey, I.P.D.
Laboratorio Central de Calidad de Aguas
- Sistema de Agua Potable y Alcantarillado de León (SAPAL)
- Sistema de Aguas de la Ciudad de México
- Sistemas de Ingeniería Ambiental, S.A. de C.V.
- Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Azcapotzalco
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Depto. de Ciencias Básicas
Área de Química
- Universidad del Noreste, A.C.



UNELAB - Centro multidisciplinario de servicios ambientales y de alimentos

- Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química
Instituto de Ingeniería

ÍNDICE DEL CONTENIDO

0. Introducción.....	1
1. Objetivo y campo de aplicación	1
2. Principio	1
3. Referencias normativas.....	2
4. Términos y definiciones	2
5. Equipo y material	3
6. Reactivos y disoluciones.....	5
7. Recolección, preservación y almacenamiento de muestras	7
8. Procedimiento	9
9. Resultados	24
10. Informe de la prueba.....	29
11. Vigencia	30
12. Concordancia con Normas Internacionales	30
Apéndice A (normativo) Lavado de material y cristalería	32
Apéndice B (normativo) Método para la corrección de la CE50 en muestras con interferencias de color o turbiedad.....	33
Apéndice C (informativo) Preparación de agua de mar artificial (AMA) y agua salobre artificial (ASA)	37
Figuras	
Figura 1- Modelo Metodológico para la prueba presuntiva o exploratoria.....	16
Figura 2 – Modelo Metodológico para la prueba definitiva con concentración inicial al 100% ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 3 - Modelo Metodológico para la prueba definitiva con concentración inicial al 50 % ¡Error! Marcador no definido.	
Tablas	
Tabla 1.- Relación de la luz emitida en siete muestras y su % E a los 5 min.....	16
13 Bibliografía	37



NMX-AA-112-SCFI-2017



Norma Mexicana NMX-AA-112-SCFI-2017

Análisis de Agua y Sedimentos - Evaluación de Toxicidad Aguda con *Vibrio fischeri* - Método de Prueba. (Cancela a la NMX-AA-112-1995- SCFI).

*Water and Sediment Analysis – Acute Toxicity Evaluation with *Vibrio fischeri* – Test Method*

0. Introducción

La bioluminiscencia, es la capacidad de ciertos organismos de producir luz, entre ellos, los más abundantes son las bacterias de origen marino las cuales pueden ser de vida libre o estar asociadas al intestino de algunos animales marinos.

Entre las bacterias marinas más estudiadas esta *Vibrio fischeri*, la cual es una bacteria marina, bioluminiscente no patógena con forma bacilar, Gram-negativa, anaerobia facultativa, halofílica, con dos flagelos en uno de los polos, que vive de forma libre en las aguas marinas o como simbiote en las estructuras productoras de luz de algunos peces y calamares entre otros.

Desde hace más de 20 años las bacterias bioluminiscentes se han empleado en el desarrollo de bioensayos para la detección de compuestos tóxicos en el ambiente y en la actualidad su aplicación ha cobrado gran interés por ser una herramienta útil para la evaluación de fuentes potencialmente contaminantes y dañinas al ambiente (Sáenz *et al*, 2010).

1. Objetivo y campo de aplicación

La presente Norma Mexicana, establece el método para la evaluación de toxicidad aguda, utilizando a la bacteria bioluminiscente marina *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177).

Este método es aplicable en la evaluación de toxicidad aguda en agua dulce, salina, residual industrial y municipal, de proceso, residual tratada, intersticial, efluentes agrícolas, lixiviados, elutriados, extractos de sedimentos y soluciones de compuestos puros, combinados o particulados.

2. Principio



La prueba se basa en la medición de la luminiscencia emitida por la bacteria *Vibrio fischeri*, la cual se reduce cuando la bacteria se expone, por un periodo de 5 min a 30 min, a muestras que contienen compuestos tóxicos. La luminiscencia tiende a disminuir en relación con la carga tóxica de la muestra problema. Este decaimiento sucede como resultado de la afectación a los procesos metabólicos asociados con la respiración bacteriana.

3. Referencias normativas

Para la correcta aplicación de esta Norma Mexicana se deben consultar las siguientes Normas Mexicanas vigentes o las que las sustituyan:

3.1 NMX-AA-014-1980

Cuerpos receptores - Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación en 1980-09-05.

3.2 NMX-AA-089/1-SCFI-2010

Protección al ambiente – Calidad del agua - Vocabulario – Parte 1. (Cancela a la NMX-AA-089/1-1986). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación en 2011-03-03.

3.3 NMX-AA-089/2-SCFI-2010

Protección al ambiente – Calidad del agua - Vocabulario – Parte 2. (Cancela a la NMX-AA-089/2-1992). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación en 2013-08-29.

4. Términos y definiciones

Para los propósitos de esta Norma Mexicana, aplican los términos y definiciones contenidos en las Normas Mexicanas NMX-AA-089/1-SCFI-2010 y NMX-AA-089/2-SCFI-2010 (ver 3.2 y 3.3 Referencias normativas), y se establecen las siguientes:

4.1

agua intersticial

agua que ocupa el espacio existente entre las partículas de los sedimentos.

4.2

concentración efectiva

es la concentración de un compuesto puro o en mezcla, así como de muestras complejas, que causa un determinado efecto biológico en los organismos de prueba.

4.3

concentración efectiva media (CE₅₀)

es la concentración de compuestos puros o combinados contenidos en muestras diversas que produce un cambio del 50 % en el parámetro seleccionado para evaluar el efecto tóxico en los organismos de prueba.

4.4

control

es una sustancia o mezcla conocida que se utiliza como referencia o testigo en las determinaciones cualitativas y cuantitativas, para detectar interferencias o errores analíticos.

4.5

elutriado

es el líquido extraído por elución de un sedimento, empleando agua dulce, salobre o de mar, natural o sintética

4.6

extracto

es el producto que resulta de la acción de disolventes orgánicos sobre un material sólido, a fin de lograr la desorción de sustancias adsorbidas al material de origen.

4.7

liofilizado

es el producto que resulta de la deshidratación de un material en condiciones de baja temperatura y alto vacío, con el fin de conservarlo.

4.8

luminiscente

propiedad de materiales y seres vivos de emitir luz.

4.9

muestra compleja

muestra que resulta de la mezcla de aguas, productos y efluentes, constituida de innumerables compuestos cuya identidad, derivados y concentración no es conocida.

4.10

porcentaje de Efecto (% E)

proporción de la disminución de la luminiscencia bacteriana, respecto al control, definida en porcentaje.

4.11

salinidad

valor adimensional, que con el propósito de controlar la calidad del agua, puede considerarse como una estimación de la concentración, en gramos por kilogramo, de las sales disueltas en el agua de mar. Se define algorítmicamente en términos de la relación (K_{15}) de la conductividad eléctrica de la muestra a 15 °C y 1 atm, con respecto a una disolución de cloruro de potasio (32,4366 g/kg de muestra) en las mismas condiciones de temperatura y presión.

4.12

toxicidad aguda

es el efecto adverso que se manifiesta en los organismos de prueba, después de la exposición a una muestra, en un corto plazo de tiempo.

4.13

unidades de luminiscencia relativa

lectura emitida por el luminómetro.

4.14

unidades de Toxicidad (UT)

forma de expresar el grado de toxicidad de una mezcla o muestra compleja de la cual no se conoce la concentración de las sustancias que contiene. Se calcula: $UT=100 / CE_{50}$. En donde 100 es la concentración inicial de la muestra referida en por ciento.

4.15

Vibrio fischeri

es una bacteria marina luminiscente no patógena con forma bacilar, Gram-negativa, anaerobia facultativa, halofílica, con dos flagelos en uno de los polos.

5. Equipo y material

5.1 Equipo

- a) luminómetro.- Con capacidad de medir la luminiscencia bacteriana y con control de temperatura, ajustada a $15,0\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$;
- b) sistema de control de temperatura o bloque térmico termostatzado, ajustado a $15,0\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$, para los tubos de prueba;
- c) sistema de control de temperatura o bloque térmico termostatzado, ajustado a $4,0\text{ °C} \pm 3,0\text{ °C}$, idealmente de $5,5\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$, para conservar la disolución bacteriana;
- d) congelador ($-18,0\text{ °C}$ o menor a ésta);
- e) refrigerador ($4,0\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$);

- f) parrilla magnética con capacidad de agitación continua durante 48 h o sonicador;
- g) parrilla de calentamiento para sistema de extracción. Debe mantener una temperatura entre 70,0 °C y 80,0 °C;
- h) centrífuga;
- i) potenciómetro;
- j) conductímetro;
- k) oxímetro;
- l) horno de secado o estufa con capacidad para mantener una temperatura de 40,0 °C;
- m) balanza analítica con rango de precisión de 0,0001 g;
- n) cronómetro; y
- o) sistema de extracción con capacidad mínima de 250 mL.

Los equipos descritos en a), b) y c), pueden ser individuales o estar integrados en un sistema automatizado.

5.2 Material

- a) tubos de vidrio de borosilicato desechables, compatibles con el luminómetro;
- b) tubo de vidrio borosilicato de doble compartimento para corrección de color, compatible con el luminómetro, cuando sea requerido;
- c) micropipetas automáticas de 1 a 1 000 µL de capacidad (volumen fijo o ajustable);
- d) puntas para micropipetas de polipropileno y desechables;
- e) cubreboca;
- f) guantes de nitrilo;
- g) lentes de seguridad;
- h) matraces volumétricos de 100 mL;
- i) pipetas volumétricas de 10 mL;

- j) espátula;
- k) papel parafina;
- l) recipientes de vidrio ámbar de borosilicato o de politetrafluoroetileno (PTFE) exclusivamente, con capacidad mínima de 20 mL, para la recolección de las muestras de agua (emplear sólo una vez); y
- m) recipientes de vidrio claro o ámbar de borosilicato de boca ancha con capacidad mínima de 500 mL, para la recolección de muestras de sedimento (emplear sólo una vez).

6. Reactivos y disoluciones

6.1 Reactivos

6.1.1 Reactivo biológico

- bacteria liofilizada *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177). La bacteria liofilizada debe ser almacenada a una temperatura de -18,0 °C o menor a ésta.

6.1.2 Tóxicos de referencia

- fenol (C_6H_5-OH). Pureza $\geq 99,5 \%$;
- sulfato de zinc hepta hidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). Pureza $\geq 99,99 \%$;
- 3,5 diclorofenol ($C_6H_4OCl_2$). Pureza $> 99 \%$; y
- dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$). Pureza $\geq 99,95 \%$.

6.1.3 Otros reactivos con pureza $\geq 99,5 \%$

- cloruro de sodio en cristales (NaCl). Libre de metales y sulfuros;
- cloruro de potasio (KCl); y
- cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$).

6.1.4 Reactivos Grado Analítico (RA)

- ácido nítrico concentrado (HNO_3);

- ácido clorhídrico (HCl 1,0 mol/L);
- hidróxido de sodio (NaOH 1,0 mol/L);
- sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄);
- cloruro de calcio anhidro (CaCl₂);
- bicarbonato de sodio (NaHCO₃); y
- ácido bórico (H₃BO₃).

6.1.5 Disolventes

- metanol (CH₃OH), grado HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento, por sus siglas en inglés);
- acetona (C₃H₆O), grado HPLC; y
- agua destilada.

6.2 Disoluciones

- 6.2.1** De reconstitución. Agua destilada utilizada para rehidratar la bacteria liofilizada.
- 6.2.2** Medio de dilución. Disolución de cloruro de sodio (NaCl) al 2 % (20,0 g/L), preparada con agua destilada.
- 6.2.3** Medio de dilución de tres sales. Disolución preparada en agua destilada con 2 % de cloruro de sodio (NaCl); 0,204 % de cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂·6H₂O) y 0,030 % de cloruro de potasio (KCl), concentraciones equivalentes a: 20,0 g/L de NaCl, 2,04 g/L de MgCl₂·6H₂O y 0,3 g/L de KCl.
- 6.2.4** Medio de dilución para muestras de agua marina o salobre. El medio de dilución puede ser agua de mar o salobre artificial preparada de acuerdo al (ver Apéndice C), eligiendo la preparación adecuada para equilibrar la salinidad de la muestra, o agua marina o salobre natural filtrada no tóxica para *Vibrio fischeri*.
- 6.2.5** Disolución de ajuste osmótico. Preparada al 22 % (220,0 g/L) de cloruro de sodio (NaCl) con agua destilada.
- 6.2.6** Cloruro de sodio (NaCl) en cristales. Puede emplearse también para ajustar al 2 % la salinidad de la concentración inicial de la muestra. Para ello, adicionar NaCl en cristales con pureza ≥99,5 %, libre de metales y sulfuros.

7. Recolección, preservación y almacenamiento de muestras

Las muestras de agua se colectan y almacenan en recipientes nuevos y lavados previamente de acuerdo al Apéndice A. Los frascos deben ser de vidrio ámbar de borosilicato de boca angosta con capacidad mínima de 20 mL. Los recipientes deben ser llenados totalmente y cerrados perfectamente de tal manera que no quede ningún espacio de aire en el interior ya que es importante evitar la agitación y la pérdida de compuestos volátiles durante el transporte.

Está prohibido reutilizar los envases para muestras de toxicidad. Los recipientes deben tener tapa de teflón, polipropileno de alta densidad o baquelita, en caso contrario, puede emplearse un cuadro de papel aluminio colocado en la boca y cuerda del frasco para evitar el contacto con los plásticos, esta última alternativa puede aplicarse solo en muestras con pH de 6 a 8.

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

Para muestras sólidas, emplear recipientes de vidrio nuevos lavados de acuerdo al Apéndice A, de boca ancha con capacidad mínima de 500 mL ámbar, o si es transparente, cubrirlo con papel aluminio, tapa de baquelita o plástica con contratapa de teflón, de no ser posible el empleo de esta última, sustituir por un cuadro de papel aluminio colocado en la boca antes de cerrar. Se recomienda que los envases no vuelvan a utilizarse para muestras de toxicidad. El llenado del frasco debe ser al 75 % de su capacidad, eliminando la mayor cantidad de agua posible.

Los frascos que contienen las muestras de agua deben mantenerse cerradas, en oscuridad y en frío a una temperatura de $4,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, desde su recolección, sin la adición de preservadores, hasta su análisis, el cual debe iniciarse antes de las 120 h posteriores a su recolecta.

Si dentro de la planeación del muestreo se prevé que debe ser necesario extender el tiempo para iniciar el análisis de toxicidad, deben considerarse los siguientes aspectos:

- 1) Las muestras deben contenerse exclusivamente en frascos de politetrafluoroetileno (PTFE).
- 2) Deben llenarse al 90 % para permitir la expansión del líquido durante la congelación.
- 3) Las muestras deben ser congeladas en campo, inmediatamente después de su recolección y previo a su traslado al laboratorio, a una temperatura de $-18,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menor a ésta.
- 4) Para lograr la temperatura de congelación antes señalada, se debe contar en campo, con refrigeradores, hieleros o cajas refrigeradas conteniendo hielo seco u otro, que permita lograr una temperatura de $-18,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menor a ésta.

La congelación en campo, efectuada de manera inmediata y de acuerdo a lo previamente señalado, tiene por objeto evitar la pérdida de compuestos a la fase gaseosa, por agitación durante el traslado, o alteración de los componentes químicos de la muestra. Una vez congelada la muestra a una temperatura de $-18,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menor a ésta, el análisis debe llevarse a cabo dentro de los 15 días posteriores a su muestreo.

La congelación no es un procedimiento aceptable para muestras en las que se sospecha la presencia de compuestos volátiles, surfactantes, o cuando se desee evaluar la toxicidad asociada con material particulado suspendido y coloides.

En caso de muestras congeladas, debe ser necesario controlar su descongelación, con el fin de devolver a la muestra su equilibrio inicial. Para ello, las muestras deben descongelarse inmediatamente antes de su análisis a una temperatura $<25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, ya sea a chorro de agua o emplear un baño maría ajustado a la temperatura indicada y evitar sobrecalentamiento. Es importante la descongelación completa de la muestra antes de su uso para pruebas.

Las muestras de sedimento deben mantenerse cerradas, en oscuridad y a una temperatura de $4,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, desde su recolección hasta antes de su análisis, sin la adición de preservadores. Su análisis debe iniciarse dentro de los 15 días subsiguientes a su recolección. No es recomendable la congelación de sedimentos, debido a los posibles cambios de su composición.

Si se obtienen extractos de sedimentos con disolventes, su análisis debe efectuarse dentro de las seis semanas posteriores a su preparación. Los extractos deben mantenerse en refrigeración ($4,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$).

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

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

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

7.1 Muestreo en cuerpos de agua

El muestreo en corrientes, lagos, lagunas, presas y otros cuerpos de agua debe llevarse a cabo tomando una muestra instantánea o simple del volumen requerido, siguiendo los lineamientos descritos en la NMX-AA-014-1980 (ver 3.1 Referencias normativas), así como en las consideraciones relacionadas en el capítulo 7 del presente documento.

Las características inmediatas que deben medirse de la muestra en el sitio de colecta son: pH, conductividad o salinidad, oxígeno disuelto y temperatura. Asimismo, anotar las características aparentes como olor, color y presencia o ausencia de espumas o burbujas. Es importante considerar esta información al momento del análisis de toxicidad en laboratorio.

7.2 Muestreo de sedimentos

Para la obtención de muestras de sedimentos se deben seguir las consideraciones relacionadas en el capítulo 7 del presente documento.

Las características inmediatas que deben anotarse en el sitio de colecta para este tipo de muestras son: color, olor y textura aparente.

8. Procedimiento

8.1 Requerimientos previos

El material desechable y el de muestreo, que hayan tenido contacto con las muestras problema deben emplearse solo una vez. Está prohibida su reutilización.

Proveer un ambiente aclimatado (18,0 °C a 25,0 °C) y un espacio mínimo de 15 cm alrededor de los instrumentos (incubadoras o luminómetro) para evitar calentamiento.

En caso de que los equipos señalen falla en la lectura de la luminiscencia o en el control de las temperaturas, se recomienda que no se efectúen las pruebas.

Evitar derramar líquidos dentro de los pozos de incubación.

Las bacterias liofilizadas deben permanecer almacenadas a temperatura de congelación (-18,0 °C o menor a ésta) de manera continua hasta el momento de su rehidratación. Si no se mantienen las condiciones de temperatura mencionadas, después de un período de 12 h, las bacterias deben desecharse.

Durante la preparación de la suspensión bacteriana (ver 8.3) deben tenerse los siguientes cuidados.

- En su traslado, del congelador al sitio de trabajo, cuidar que el liofilizado bacteriano se mantenga a temperatura de refrigeración (de 4,0 °C $\pm$ 3,0 °C), mediante el uso de geles o hielo;
- Cuidar que la disolución de reconstitución esté atemperada a 4,0 °C $\pm$ 3,0 °C, idealmente a 5,5 °C $\pm$ 1,0 °C, antes de su adición al liofilizado;

- Evitar que el liofilizado entre en contacto con materiales o superficies de una temperatura distinta de $4,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3,0\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- Rehidratar el liofilizado con la disolución de reconstitución de forma rápida y ágil, evitando la pérdida de volúmenes.
- Antes de iniciar el análisis de muestras, debe verificarse la sensibilidad de la bacteria, mediante el análisis del tóxico de referencia seleccionado (ver 8.4), y cumplir las especificaciones de control de calidad señaladas en 8.7.1.1 a 8.7.1.4.

8.1.1 Precauciones

8.1.1.1 Durante el muestreo, si se sospecha la presencia de compuestos volátiles en las muestras, debe evitarse la congelación de las mismas, ya que no es un procedimiento adecuado para la conservación de estos compuestos.

8.1.1.2 Las sustancias insolubles, débilmente solubles o volátiles, así como las sustancias que reaccionen con el agua de dilución o con la suspensión de ensayo, o que alteren su estado durante el período de ensayo, pueden afectar al resultado, o a la reproducibilidad de los resultados del mismo.

8.1.1.3 Pueden producirse pérdidas de luminiscencia provocadas por la absorción o la dispersión de la luz en caso de aguas fuertemente coloreadas principalmente en el rango rojo – marrón o turbias. Esta interferencia puede compensarse utilizando un tubo de doble compartimento para la corrección de la absorción o color, o por lectura espectrofotométrica para obtener la absorbancia de la muestra y corregir el valor de la CE_{50} (ver Apéndice B).

Para el caso de muestras con alta turbiedad, deben dejarse reposar por al menos una hora. No se recomienda centrifugar ni filtrar la muestra, toda vez que pueden alterar la toxicidad de la muestra.

8.1.1.4 Dado que la luminiscencia requiere de oxígeno, cuando las muestras presentan una demanda alta o una concentración baja de oxígeno, puede inhibirse la luminiscencia.

8.1.1.5 La contaminación orgánica de una muestra por nutrientes de rápida biodegradación, es susceptible de provocar una reducción de la bioluminiscencia independientemente del contenido tóxico de la muestra.

8.1.1.6 Las concentraciones de sal en la muestra inicial superiores a 30,0 g/L de cloruro de sodio (NaCl), o el contenido de otros compuestos que produzcan una osmolaridad equivalente, junto con la sal que tiene que adicionarse durante el ensayo, puede generar efectos hiperosmóticos. Para evitar estos efectos, la concentración de sal en la muestra se requiere

que no exceda de 35 g/L de disolución de cloruro de sodio (NaCl). Si la muestra contiene entre 20 g/L y 50 g/L de NaCl equivalentes, se recomienda que no se añada más sal.

- 8.1.1.7** El cloro residual contenido en agua potable o de proceso, produce efecto tóxico en el organismo de prueba, para evitar la interferencia del cloro debe recolectarse la muestra antes de la cloración en el tren de tratamiento.
- 8.1.1.8** El ámbito de tolerancia de *Vibrio fischeri* para pH es de 6 a 8,5. En caso de muestras con pH fuera de dicho ámbito, se produce daño estructural en la bacteria y la emisión luminosa decae generándose falsos positivos. Para evitar dicha interferencia, se debe ajustar el pH de la muestra, al intervalo de tolerancia, sin embargo se debe tener presente que esto altera la naturaleza misma de la muestra. En estos casos se debe efectuar el análisis en la condición original de la muestra y así mismo, también realizarlo una vez ajustado el pH.

8.2 Preparación y acondicionamiento de las muestras

8.2.1 Preparación de muestras de agua dulce

Las muestras de agua dulce deben ajustarse a una salinidad del 2 %, para evitar la pérdida de bioluminiscencia de la bacteria debida al choque osmótico. Este se logra adicionando la cantidad adecuada de disolución de ajuste osmótico descrita en el inciso 6.2.5 (1 parte de la disolución más 10 partes de la muestra), o adicionando a la muestra cristales de NaCl, con pureza $\geq$ al 99,5 % (ej. 0,2 g en 10 mL de muestra).

8.2.2 Preparación de muestras de agua salobre

La salinidad de las muestras de agua salobre se encuentra en el ámbito de 0,5 % a < 3 % (equivalente a 5,0 g/L y 30,0 g/L). Si está por arriba del 2 % no se requiere ajustar la salinidad de la muestra. En el caso de este tipo de muestras debe emplearse como disolución diluyente agua salobre artificial (ver 6.2.4 y Apéndice C) o agua salobre natural que no presente toxicidad. Si la salinidad es de 0,5 % a < 2 %, la muestra debe ajustarse al 2 % utilizando NaCl en cristales (ver 6.1.3) y emplear como medio de dilución, el especificado en 6.2.2.

8.2.3 Preparación de muestras de agua marina

La salinidad de las muestras de agua marina se encuentra alrededor de 3,0 % a 3,5 % por lo que no se requiere ajustar la salinidad de la muestra. En el caso de este tipo de muestras debe emplearse como disolución diluyente, agua de mar artificial (ver 6.2.4 y Apéndice C) o agua de mar natural que no presente toxicidad.

8.2.4 Preparación de muestras de agua intersticial de sedimentos

Homogeneizar la muestra de sedimento y centrifugar a 10 000 *g*, durante 30 min, preferentemente a 4,0 °C. Obtener el sobrenadante por succión o decantación. La fase líquida se debe utilizar para el análisis, preparándola de acuerdo con 8.2.1, 8.2.2 y 8.2.3, según su procedencia.

8.2.5 Preparación de elutriados de sedimentos

Homogeneizar la muestra de sedimento, mezclar con el tipo de agua que corresponda al origen de la muestra o agua de disolución en una relación 1:4 (m/v), utilizando un matraz Erlenmeyer. Agitar vigorosamente durante 60 min en una placa magnética, para alcanzar una profundidad del vórtice del 50 % del nivel del líquido mientras se agita. También puede emplearse la sonicación durante 4 h, en este caso, cuidar que la temperatura no se incremente por la acción del ultrasonido. Centrifugar la mezcla en un intervalo de 2 500 rpm a 3 000 rpm, o bien ajustar con base en el valor *g* (fuerza relativa de centrifugación), dependiendo de las características de la centrífuga con que se cuente, durante un periodo de 5 min a 8 min, o hasta obtener una separación completa de las dos fases. Utilizar el sobrenadante para el análisis. Proceder a su acondicionamiento, de acuerdo a 8.2.1, 8.2.2 y 8.2.3.

8.2.6 Extractos de fase sólida con disolventes

En el caso de analizar muestras que hayan sido sometidas a un proceso de extracción empleando disolventes químicos, debe realizarse como testigo un ensayo paralelo del disolvente a las concentraciones de la muestra de prueba. También en estos casos el acondicionamiento de las muestras y el testigo debe efectuarse de acuerdo a 8.2.1, 8.2.2 y 8.2.3.

8.3 Preparación de la suspensión bacteriana

8.3.1 Sacar del congelador la bacteria liofilizada.

8.3.2 Rehidratar la bacteria con 1,0 mL de la disolución de reconstitución (ver 6.2.1), atemperada aproximadamente a 4,0 °C ± 3,0 °C y mezclar la suspensión por absorción y eyección con una pipeta o por agitación del recipiente bajo las mismas condiciones de temperatura. De esta manera se debe obtener una disolución bacteriana con una densidad estimada de 1×10^8 células/mL. La suspensión bacteriana debe mantenerse a una temperatura de 4,0 °C ± 3,0 °C, idealmente a 5,5 °C ± 1,0 °C (ver 5.1 c).

8.3.3 Esperar al menos 15 min antes de iniciar las pruebas. Este tiempo es necesario para que la sensibilidad bacteriana se estabilice. Después de 3 h de hecha la reconstitución, el volumen remanente de la suspensión bacteriana debe ser desechado, o en su caso, debe hacerse una evaluación de sensibilidad para verificar que la suspensión bacteriana aún se encuentre en condiciones óptimas, con base en 8.7.1.1 y 8.7.1.2.

8.3.4 La prueba con el tóxico de referencia se realiza con base en los procedimientos establecidos en 8.6.2 o en 8.6.3. Para los cuales se pueden emplear un número mayor de diluciones si se considera necesario.

8.4 Evaluación de la sensibilidad bacteriana.

8.4.1 El laboratorio que realice pruebas de toxicidad con *Vibrio fischeri* debe verificar la sensibilidad del organismo mediante la preparación de una curva concentración-efecto en la que se determine la CE_{50} de alguno de los tóxicos de referencia señalados en 6.1.2. Esto se debe llevar a cabo en cuanto se presente alguno de los siguientes casos:

- a) Al inicio de la sesión de trabajo y para la primera suspensión bacteriana preparada de acuerdo a 8.3.
- b) Cuando se cambia el lote del liofilizado bacteriano.
- c) Cuando se observen anomalías en la respuesta del control y de los tóxicos de referencia. Si persiste la anomalía, debe revisarse el buen estado de los reactivos, disoluciones y tóxicos de referencia. Si aún con ello no se identifica la causa de la anomalía, el lote de bacterias debe ser descartado y sustituido por uno nuevo.
- d) Cuando la suspensión bacteriana tenga más de 3 h de haber sido reconstituida (ver 8.3).

8.4.2 Cuando se prepare una nueva solución bacteriana del mismo lote y durante una misma sesión de trabajo en la que se empleen varias unidades del liofilizado bacteriano, la sensibilidad puede verificarse mediante el uso de disoluciones de los tóxicos de referencia señalados en 6.1.2, en concentraciones de 19,5 mg/L para el fenol, para zinc II (Zn II) de 2,2 mg/L, para 3,5 Diclorofenol de 3,4 mg/L y de 18,7 mg/L para cromo hexavalente (Cr VI), y que corresponden al valor de la CE_{50} esperada para cada uno de ellos, en vez de preparar una curva concentración-efecto del tóxico de referencia elegido. Las concentraciones anteriores pueden obtenerse a partir de las disoluciones patrón (ver 8.5) diluyéndolas en una relación 1:2 con agua destilada. Esta opción no aplica en caso de que el liofilizado bacteriano pertenezca a distintos lotes.

8.5 Preparación de los tóxicos de referencia

8.5.1 Fenol

La disolución patrón se prepara pesando aproximadamente, 100 mg de fenol, disolverlos y llevar al aforo a 1 L con agua destilada. La disolución se conserva en un frasco ámbar a una temperatura de $4,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; debe ser valorada cada 3 meses y puede ser empleada hasta por un año. Si en la valoración se obtiene una pérdida de la concentración $> 10\%$, debe descartarse y preparar una nueva.

8.5.2 Zinc II

La disolución patrón de aproximadamente 8,8 mg/L de Zn II, se prepara pesando 38,68 mg de sulfato de zinc heptahidratado que se disuelven y llevan al aforo de 1 L con agua destilada. La disolución se conserva en un frasco ámbar a una temperatura de $4,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; debe ser verificada cada 6 meses y puede ser empleada hasta por un año. Si en la verificación se obtiene una pérdida de la concentración $> 10,0\%$, debe descartarse y preparar una nueva.

8.5.3 3,5, Diclorofenol

La disolución patrón de 13,6 mg/L se prepara pesando aproximadamente 13,6 mg de 3,5 Diclorofenol, disolverlos y llevar al aforo a 1 L con agua destilada. La disolución se conserva en un frasco ámbar a una temperatura de $4,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; debe ser verificada cada 6 meses y puede ser empleada hasta por un año. Si en la verificación se obtiene una pérdida de la concentración $> 10,0\%$, debe descartarse y preparar una nueva.

8.5.4 Cromo VI

La disolución patrón de aproximadamente 74,8 mg/L de Cr VI se prepara pesando aproximadamente 211,6 mg de dicromato de potasio que se disuelven y llevan al aforo de 1 L con agua destilada. La disolución se conserva en un frasco ámbar a una temperatura de $4,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; debe ser verificada cada 6 meses y puede ser empleada hasta por un año. Si en la verificación se obtiene una pérdida de la concentración $> 10,0\%$, debe descartarse y preparar una nueva.

NOTA: También pueden ser empleadas disoluciones preparadas comercialmente, que cumplan con las concentraciones señaladas y cuyo solvente de preparación sea agua.

Los valores de CE50 determinados experimentalmente para los tóxicos de referencia, deben encontrarse dentro de los intervalos de concentración especificados en 8.7.1.1 y 8.7.1.2, en caso contrario, se tienen elementos para suponer cualquiera de las siguientes posibilidades:

- a) Condiciones inadecuadas de almacenamiento de la bacteria liofilizada, siendo las principales, tiempo y temperatura;
- b) Reconstitución inadecuada de la bacteria;
- c) Uso de la bacteria por más de 3 h a partir de su reconstitución;
- d) Posible contaminación de alguno de los reactivos o materiales utilizados en el ensayo, y
- e) Falta de pericia del analista.

8.6 Desarrollo de la prueba

8.6.1 Prueba presuntiva o exploratoria

La prueba presuntiva se realiza con la muestra en su estado original, sin diluciones, por lo que no proporciona datos para calcular la CE_{50} , solamente se obtiene la magnitud del efecto de la muestra expresada en % (% E), Figura 1. Esta prueba es de utilidad para discriminar entre muestras tóxicas y no tóxicas, entendiendo como muestra tóxica aquella que presente una inhibición de la luminiscencia mayor al 10,0 % respecto al control. Asimismo, en el caso de muestras que resulten tóxicas, permite determinar el ámbito de concentraciones en el que debe llevarse a cabo la prueba definitiva para determinar la CE_{50} .

8.6.1.1 De acuerdo al origen de cada muestra, lleve a cabo su preparación conforme a 8.2.1 a 8.2.6. En el caso de muestras de agua dulce, para conservar su concentración al 100 %, debe emplearse NaCl en cristales para el ajuste osmótico o en su caso puede emplearse la disolución de Ajuste Osmótico de NaCl al 22,0 % (ver 6.2.5), en éste caso la muestra debe tener una concentración inicial del 90,0 %. En la Figura 1 se ejemplifica el caso de la muestra al 100,0 % cuando el ajuste se realiza con cloruro de sodio (NaCl) en cristales.

8.6.1.2 Colocar un tubo por cada muestra a analizar, en los pozos de incubación del sistema automatizado o en el soporte de tubos en el sistema con control de temperatura a $15,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.6.1.3 El tubo inicial debe corresponder al control que contiene medio de dilución (ver de 6.2.2 a 6.2.4).

8.6.1.4 Colocar en cada tubo el volumen de muestra necesario, acorde a las características del luminómetro o de los sistemas automatizados (generalmente de 0,50 mL a 1,0 mL).

8.6.1.5 Dejar atemperar las muestras de 5 min a 15 min dentro de los pozos de incubación.

8.6.1.6 Adicionar 0,01 mL de la suspensión bacteriana (ver 8.3.2) en cada uno de los tubos, incluyendo el control. Evite adicionar en las paredes del tubo.

8.6.1.7 Cronometrar el tiempo, a partir de la adición de la suspensión bacteriana en el primer tubo. Al terminar la adición distribuya la bacteria en el medio con movimientos suaves de vaivén, tomando cada tubo por la parte superior. Efectúe esta acción rápidamente. Evite derramar y tocar su contenido, así como formar gotas en las paredes.

8.6.1.8 Realizar las lecturas de luminiscencia en cada tubo a los 5 min, 15 min y 30 min de exposición, iniciando con el control.

8.6.1.9 Anotar el valor de la emisión de luz que arroja el luminómetro para cada tubo en los distintos tiempos de exposición (5 min, 15 min y 30 min).

8.6.1.10 Determinar el porcentaje de reducción de la luz emitida (% E), para cada muestra, respecto a la observada en la luz del control (LC), de acuerdo al cálculo sugerido en el superíndice (a) de la Tabla 1. Una vez registradas las lecturas de cada una de las muestras y del control en la prueba presuntiva o exploratoria, se calcula el porcentaje de efecto para establecer el criterio para la

selección del modelo de prueba definitiva de cada muestra. En la Tabla 1 está el ejemplo de siete muestras, para las que se obtuvo la luz emitida y el % E correspondiente a los 5 min, en función de la luz emitida por el control.

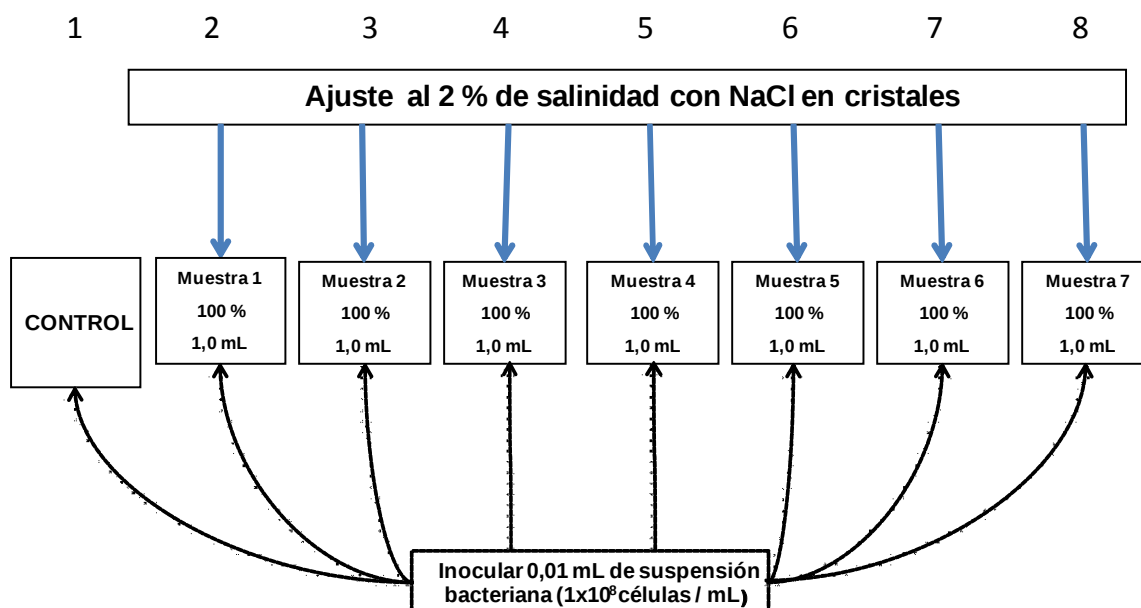


Figura 1- Modelo Metodológico para la prueba presuntiva o exploratoria

Tabla 1.- Relación de la luz emitida en siete muestras y su % E a los 5 min.

MUESTRA	LC ₅	LM ₅	% E ^(a) ₅
Control	98	-	-
M1	-	90	8
M2	-	80	18
M3	-	48	51
M4	-	57	42
M5	-	17	83
M6	-	2	98
M7	-	0	100

^(a) Se calcula:

$$\% E = 100 - [LM (100) / LC]$$

En donde:

LC_{5, 15, 30} luz emitida en el control, a los tiempos de 5 min, 15 min y 30 min.



LM_{5, 15, 30} luz emitida en la muestra, a los tiempos de 5 min, 15 min y 30 min.

Con los resultados de la Tabla 1, se establece que la muestra 1 (M1) no es tóxica a los 5 min, considerando que una muestra tóxica es aquella que presente una inhibición de la luminiscencia mayor al 10,0 % respecto al control. En éste caso la muestra se debe reportar como No Tóxica.

El resto de las muestras sí presentan efectos o inhibición de la luminiscencia $> 10,0$ % respecto al control, por lo que debe llevarse a cabo una prueba definitiva (ver 8.6.2, 8.6.3), para determinar la concentración efectiva (CE_{50}). La concentración inicial en dicha prueba, se debe definir a partir de los porcentajes de efecto (% E) observados en la prueba presuntiva y debe permitir elegir el método más adecuado para el análisis y determinación de la CE_{50} , de acuerdo a los siguientes criterios:

8.6.1.11 SI: % E > 10 y % E ≤ 50

Entonces, se debe aplicar un protocolo de prueba definitiva donde la concentración inicial de la muestra debe ser del 100,0 %, valor que representa la condición inicial de la muestra sin diluir. Puede aplicarse el factor de dilución más conveniente, con un mínimo de tres diluciones para calcular la CE_{50} (ver 8.6.2).

En caso de que no sea posible obtener la CE_{50} , se debe reportar: CE_{50} = No detectable y el % E de inhibición de luz obtenido para la concentración de la muestra al 100,0 % (% $E_{100} = n$) en los tiempos de exposición probados. Ver su cálculo en 8.6.1.10.

8.6.1.12 SI: % E > 50 y % E ≤ 100 %

Entonces, puede trabajarse con una concentración inicial del 45,0 % o 50,0 %, o inclusive concentraciones menores a estas, conforme a lo establecido en la Figura 3 (ver 8.6.3), o utilizar una concentración inicial al 100,0 % y proceder de acuerdo a 8.6.2.

8.6.2 Prueba definitiva con concentración inicial del 100,0 %

8.6.2.1 De acuerdo al origen de cada muestra, preparar su acondicionamiento conforme a 8.2.1 a 8.2.6.

8.6.2.2 En la Figura 2 se ejemplifica el Modelo Metodológico para el análisis de una muestra, iniciando con una concentración del 100,0 %, con 3 diluciones, aplicando un factor de dilución de 2.

8.6.2.3 Colocar 2 mL de la muestra acondicionada (ver 8.6.2.1) en la celda A5.

8.6.2.4 En A1 coloque un tubo para el control.

8.6.2.5 En los tubos de incubación A2 a A4 coloque 0,5 mL de medio de dilución de cloruro de sodio al 2 % (ver 6.2.2) y 0,5 mL de medio de dilución de tres sales (ver 6.2.3).

- 8.6.2.6** Realice la transferencia de 1 mL de la muestra, de A5 a A4; de A4 a A3; de A3 a A2 y de aquí, descartar 1 mL, de acuerdo con la Figura 2.
- 8.6.2.7** Adicionar 0,01 mL de la suspensión bacteriana (ver 8.3.2) a cada tubo, iniciando de A1 a A5.
- 8.6.2.8** Una vez que se termine la adición de la suspensión bacteriana, realice las lecturas de luminiscencia en cada tubo a los 5 min, 15 min y 30 min de exposición, en el mismo orden en que se adicionó la suspensión bacteriana (de menor a mayor concentración).
- 8.6.2.9** Al término de las lecturas, realice el ajuste de las luminiscencias para obtener los valores de efecto (Γ = Gamma) los cuales se emplean para el cálculo de la CE₅₀, esto se realiza mediante el uso de herramientas probabilísticas (p. ej. función probit), programas adaptados a los sistemas automatizados o mediante cálculos manuales para la determinación de los valores de Gamma y posteriormente de los % E y del desarrollo del modelo gráfico para obtención de la CE₅₀ (ver 9.1 y 9.2).
- 8.6.2.10** En el caso de que los límites de confianza sean mayores al 30,0 % del valor de la CE₅₀ obtenido (considerando un 95,0 % de confiabilidad estadística), debe repetirse la prueba para obtener mayor precisión. Con la misma finalidad, también se puede elaborar una serie con un mayor número de diluciones, o bien emplear un factor de dilución menor a 2, como puede ser: 1:1,2 ó 1:1,25 ó 1:1,33 o el que se requiera.

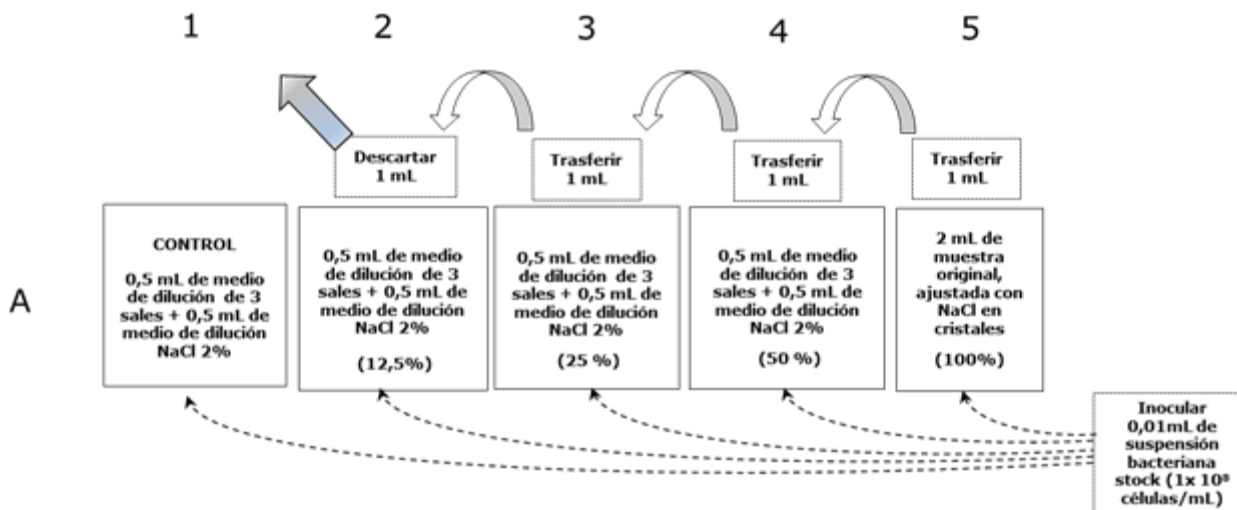


Figura 2 – Modelo Metodológico para la prueba definitiva con concentración inicial al 100%

8.6.3 Prueba definitiva con concentración inicial del 45,0 % o 50,0 %

8.6.3.1 De acuerdo al origen de cada muestra, preparar su acondicionamiento conforme a 8.2.1 a 8.2.6.

8.6.3.2 En la Figura 3 se ejemplifica el Modelo Metodológico de análisis que emplea 3 diluciones con un factor de dilución de 2 que se preparan a partir de una muestra con una concentración original del 100,0 % (A5), si para el ajuste de la salinidad se emplea NaCl en cristales. Si se utiliza la disolución de ajuste osmótico adicionada en una proporción 1:10 del volumen de la muestra, la concentración original debe ser del 90,0 %. Con base en lo anterior, la concentración inicial en B5 y C5 debe ser del 50,0 % o del 45,0 %, respectivamente.

En este protocolo el análisis por replicado es opcional, para ello colocar para cada concentración un tubo más en la Fila C, como se ejemplifica en la Figura 3.

8.6.3.3 La serie de diluciones puede prepararse dentro de un sistema automatizado, o por separado y poner a una temperatura de $15,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.6.3.4 Colocar 3,0 mL de la muestra original (ver 8.6.3.1) en la celda A5.

8.6.3.5 Colocar en cada tubo de A1 a A4, 1,5 mL de disolución diluyente de cloruro de sodio al 2 % (ver 6.2.2).

8.6.3.6 Realizar la dilución de la muestra sobre la Fila A (de la A5 a la A2), como se indica en la Figura 3. La celda A1, debe permanecer sin muestra, para ser utilizada como control.

8.6.3.7 Los tubos de las filas B y C deben prepararse con el llenado del medio de dilución de tres sales y la suspensión bacteriana, siguiendo cualquiera de las siguientes dos alternativas:

- a) Adicionar 0,5 mL de la disolución de tres sales en cada tubo y posteriormente 0,01 mL de la suspensión bacteriana (ver 8.3.2), o,
- b) En un tubo de ensayo o matraz Erlenmeyer, colocar un volumen de la suspensión bacteriana (ver 8.3.2) en 50 volúmenes de medio de dilución de 3 sales (ver 6.2.3). Homogenizar y mantener a una temperatura de $4,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se debe adicionar a cada tubo 0,5 mL de esta mezcla.

8.6.3.8 Esperar 5 min para atemperar todos los tubos a $15,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.6.3.9 Tomar la lectura inicial (I_0), de los tubos sobre las Filas B y C. Al terminar, inmediatamente hacer la transferencia de la muestra, pasando 0,5 mL de A1 a B1 y 0,5 mL de A1 a C1. Hacer lo mismo de forma sucesiva con A2, A3, A4 y A5, es decir, de menor a mayor concentración.

8.6.3.10 A partir de la transferencia de A1 a B1 y C1, cronometrar y tomar la lectura a los 5 min, 15 min y 30 min, en el mismo orden en que se transfirió la muestra, de menor a mayor concentración.

8.6.3.11 Al término de las lecturas, realice el ajuste de las luminiscencias para obtener los valores de efecto (Γ =Gamma) los cuales se emplean para el cálculo de la CE_{50} , esto se realiza mediante el uso de herramientas probabilísticas (p. ej. función probit), programas adaptados a los sistemas automatizados o mediante cálculos manuales para la determinación de los valores de Gamma y posteriormente de los % E y del desarrollo del modelo gráfico para obtención de la CE_{50} (ver 9.1 y 9.2).

8.6.3.12 En el caso de que los límites de confianza sean mayores al 30,0 % del valor de la CE_{50} obtenido (considerando un 95,0 % de confiabilidad estadística), debe repetirse la prueba para obtener mayor precisión. Con la misma finalidad, también se puede preparar una muestra inicial con mayor concentración, cuando aplique, elaborar una serie con un mayor número de diluciones, o bien emplear un factor de dilución menor a 2, como puede ser: 1:1,2 ó 1:1,25 ó 1:1,33 o el que se requiera.

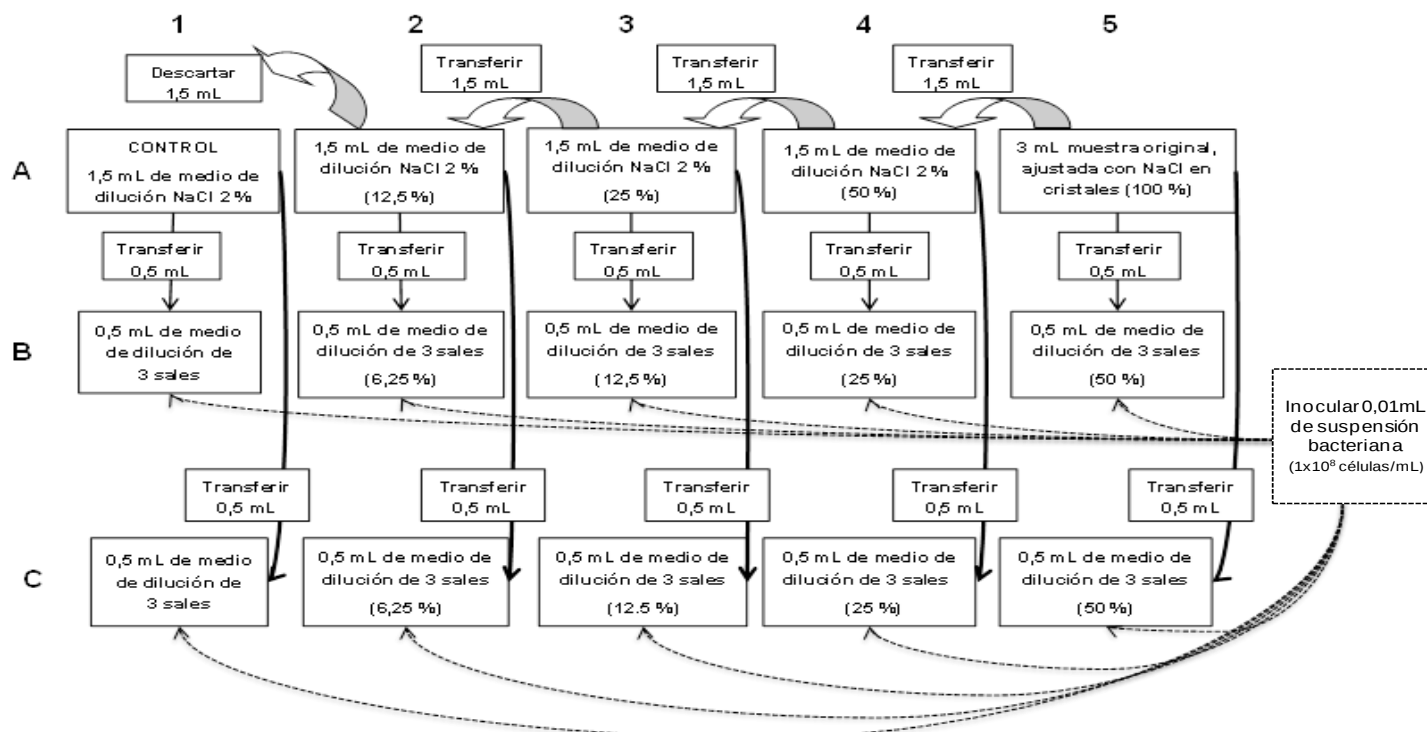


Figura 3 - Modelo Metodológico para la prueba definitiva con concentración inicial al 50 %

NOTA: La muestra original en el ejemplo, tiene una concentración del 100%, que se logra al emplear NaCl en cristales para el ajuste de la salinidad al 2%, pero puede ser del 90% si para este ejemplo el ajuste de la salinidad se hubiera efectuado adicionando la disolución de ajuste osmótico en relación de 1 volumen por 10 de la muestra.

8.7 Control de calidad analítico

Cada laboratorio que realice pruebas de toxicidad debe contar con un programa de control de calidad que incluya el seguimiento de la respuesta para por lo menos uno de los tóxicos de referencia indicados en 6.1.2 y 8.5, a través de una carta control y del análisis de muestras duplicadas.

8.7.1 Carta control para los tóxicos de referencia

Es muy importante que la concentración de los tóxicos de referencia sea verificada, a fin de conocer la variabilidad de la CE50 en las cartas control, ya que con base en dicha carta se establece el intervalo de variación de la respuesta de los organismos de prueba y se robustece el control analítico. Los intervalos de respuesta a los tóxicos de referencia, así como los tiempos de su lectura deben cumplirse de forma estricta de acuerdo a las especificaciones señaladas en los incisos siguientes para ambos compuestos.

- 8.7.1.1** La carta control del fenol se debe elaborar utilizando los valores de las CE50 obtenidas de manera experimental (ver 8.3.4). El ámbito de respuesta de la bacteria *Vibrio fischeri* a este compuesto se encuentra entre 13 mg/L y 26 mg/L a un tiempo de exposición de 5 min. El coeficiente de variación debe ser $\leq 17,0 \%$.
- 8.7.1.2** La carta control para el zinc II se debe elaborar utilizando los valores de las CE50 obtenidas de manera experimental (ver 8.3.4). La CE50 del zinc II, a partir de sulfato de zinc, para *Vibrio fischeri* se encuentra entre 0,7 mg/L y 3,7 mg/L para un tiempo de exposición de 30 min. El coeficiente de variación debe ser $\leq 34,0 \%$.
- 8.7.1.3** La carta control para el 3,5 Diclorofenol se debe elaborar utilizando los valores de las CE50 obtenidas de manera experimental (ver 8.3.4). La CE50 del 3,5 Diclorofenol, para *Vibrio fischeri* se encuentra entre 2,7 mg/L y 4,1 mg/L para un tiempo de exposición de 30 min. El coeficiente de variación debe ser $\leq 10,0 \%$.
- 8.7.1.4** La carta control para el cromo VI se debe elaborar utilizando los valores de las CE50 obtenidas de manera experimental (ver 8.3.4). La CE50 del cromo VI, a partir de dicromato de potasio, para *Vibrio fischeri* se encuentra entre 6,4 mg/L y 31 mg/L para un tiempo de exposición de 30 min. El coeficiente de variación debe ser $\leq 33,0 \%$.

8.7.1.5 El coeficiente de variación (CV) es la relación entre la desviación estándar de una serie de datos y su media. Se calcula de acuerdo a:

$$CV = (DS \text{ CE}_{50_{n1-n20}} / \bar{X} \text{ CE}_{50_{n1-n20}}) 100$$

En donde:

DS desviación estándar;

$n_1 - n_{20}$ son los eventos en que se ha determinado la concentración efectiva media del tóxico de referencia (mínimo 20 eventos), y que constituyen la carta control;

$\bar{X}$ promedio.

8.7.1.6 En caso de emplear las disoluciones señaladas en 8.4.2, para dar seguimiento a la sensibilidad bacteriana con disoluciones en concentraciones de los tóxicos de referencia, cercanas a las CE_{50} de cada uno de ellos, el criterio de aceptación es que el valor de inhibición de la luminiscencia que cause el tóxico de referencia elegido se encuentre entre el 20 % y el 80 %, a los 30 min de exposición.

8.7.1.7 El valor del factor $\bar{f}_{kt}$ para 15 min o 30 minutos debe estar entre 0,6 y 1,8 (ver fórmula (3) en 9.1.2).

8.7.1.8 Cuando en el análisis se emplean réplicas (ver 8.6.3 y Figura 3), la diferencia de los valores de cada uno de los controles, respecto al promedio obtenido de ellos, se recomienda que no se desvie en más de un 3 %.

8.7.2 Análisis de muestras duplicadas

Cada laboratorio debe efectuar como mínimo, el análisis de una réplica, seleccionando aleatoriamente una muestra, dentro de la misma sesión de trabajo y bajo condiciones idénticas de manejo del resto de las muestras.

8.7.2.1 Análisis de significancia estadística en muestras duplicadas.

El resultado de la prueba de significancia estadística para el análisis de las diferencias de la CE_{50} entre muestras duplicadas, es empleado para poder evidenciar la precisión del análisis y respaldar la confianza analítica de la medición, por lo que la aceptación de los resultados debe estar sujeta también a la diferencia numérica, significativa o no, de los análisis de muestras duplicadas. La prueba puede ser efectuada de la siguiente manera:

- 1) Cálculo de factores.- Con base en los valores obtenidos de CE_{50} para las muestras duplicadas, calcular para cada réplica:

Para la réplica 1:

$$F_1 = \frac{CE_{50\ 1}}{\text{Min IC}_1}$$

Para réplica 2:

$$F_2 = \frac{CE_{50\ 2}}{\text{Min IC}_2}$$

En donde:

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

CE50_{1,2} Concentración Efectiva Media reportada en el informe de la prueba, para la réplica 1 y réplica 2, y

Min IC_{1,2} Límite inferior del intervalo de confianza en réplica 1 y en réplica 2

2) La relación de factores

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

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

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

4) Significancia

A partir de los cálculos anteriores, si la resultante de CE50_{max} / CE50_{min} excede el valor obtenido para F_{1,2}, entonces la diferencia entre las CE50 de la muestra duplicada, es significativa, mientras que en el caso de ser menor o igual, la diferencia debe ser no significativa.

8.7.3 Interpretación de los resultados de control de calidad analíticos.

Cuando los valores de la CE50 excedan el ámbito aceptable para el tóxico de referencia, o se detecten problemas en la reproducibilidad, evidenciada mediante el análisis de pruebas duplicadas, el laboratorio debe revisar los posibles factores de variabilidad, entre los cuales se considera a los siguientes:

8.7.3.1 Organismo de prueba: almacenamiento óptimo de la bacteria liofilizada (ver 6.1.1).

8.7.3.2 Caducidad de la bacteria liofilizada.

8.7.3.3 Manejo de la bacteria, durante su reconstitución (ver 8.3).

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

8.7.3.5 Una vez que se han revisado minuciosamente los factores mencionados se deben documentar y se deben aplicar las acciones necesarias para la corrección en el manejo de este procedimiento.

9. Resultados

9.1 Cálculo de resultados

Al término de la prueba, deben obtenerse los % E y posteriormente calcular la CE₅₀ para los tiempos de exposición de 5 min, 15 min y 30 min, con un método estadístico disponible comercialmente, que sea de utilidad para dicho fin o software asociado a los sistemas automatizados, en cualquier caso deben también determinarse los intervalos de confianza al 95 %. También pueden emplearse las ecuaciones (1) y (2) en 9.1.1 y (3) a (9) en 9.1.2 para el cálculo manual de los % E de cada uno de los dos modelos metodológicos (ver 8.6.2 y 8.6.3) y la determinación de la CE₅₀ mediante el modelo gráfico (ver 9.2).

9.1.1 Cálculos para el Modelo Metodológico para la prueba definitiva con concentración inicial del 100,0 % (ver 8.6.2)

El cálculo del valor de Gamma (Γ) para cada dilución y tiempo 5 min, 15 min o 30 min, permite obtener los valores de % E. Estos valores se obtienen empleando las siguientes ecuaciones:

Para Gamma (Γ)

$$\Gamma_t = (I_{tc}/I_t) - 1 \quad (1)$$

En donde:

Γ_t es la Gamma al tiempo de incubación (t);

I_{tc} es el nivel de luz (I) al tiempo de incubación (t) del control (c), y

I_t es el nivel de luz (I) al tiempo de incubación (t) para cada concentración de la muestra.

Para el % E a partir de Gamma:

$$\% E = \Gamma_t(100) \quad (2)$$

En donde:

% E porcentaje de efecto de inhibición de luz;

Γ_t es la Gamma al tiempo de incubación (t);

9.1.2 Cálculos para el Modelo Metodológico para la prueba definitiva con concentración inicial del 45,0 % o 50,0 % (ver 8.6.3), debe seguirse la secuencia de las ecuaciones (3) a (9).

$$f_{kt} = I_{kt}/I_0 \quad (3)$$

En donde:

f_{kt} : Factor de corrección al tiempo de contacto de 5 min, 15 min o 30 min;

I_{kt} : luminiscencia en el control tras un tiempo de contacto de 5 min, 15 min y 30 min, expresada en unidades de luminiscencia relativa;

I_0 : luminiscencia al tiempo cero (t_0) en las celdillas B1 y C1 (expresada en unidades de luminiscencia relativa); y

t: tiempo

$$[(\bar{f}_{kt} \pm f_{kti})/\bar{f}_{kt}] 100 \quad (4)$$

En donde:

f_{kti} : uno de los dos valores individuales del factor de corrección; y

$\bar{f}_{kt}$: valor medio.

$$I_{ct} = I_0 * \bar{f}_{kt} \quad (5)$$

En donde:

$\bar{f}_{kt}$: es la media de los valores de f_{kt} referido en la ecuación (3) para los valores de 5 min, 15 min y 30 min;

- I_0 : luminiscencia de la lectura inicial de cada una de las celdas en B y C, referidas en 8.6.3.7, antes de la adición de la muestra, preparada en la fila A; y
- I_{ct} : Valor corregido de I_0 para cada una de las celdillas de la muestra, antes de la adición de la misma.

$$H = [(I_{ct} - I_t) / I_{ct} * 100] \quad (6)$$

En donde:

- H : la proporción de luz perdida para cada una de las celdillas de la muestra, después de un tiempo de contacto de 5 min, 15 min y 30 min, expresado en porcentaje;
- I_{ct} : definido en ecuación (5); y
- I_t : intensidad de luminiscencia de las celdillas de la muestra después de un tiempo de contacto de 5 min, 15 min y 30 min, expresada en unidades de luminiscencia relativa

Calcular el efecto inhibitorio medio de H_t para cada dilución en porcentaje y calcular la diferencia aritmética entre las determinaciones en paralelo de H_{ti} y su respectiva media $\bar{H}_t$ en unidades porcentuales:

$$\bar{H}_t(\%) - H_{ti}(\%) \quad (7)$$

En donde:

- H_{ti} : es el valor individual del efecto inhibitorio de la dilución de una muestra de ensayo; y
- $\bar{H}_t$: es el valor medio de cada dilución (p.ej. $H_{tB2} + H_{tC2}/2$, etcétera).

$$\Gamma_t = [\bar{H}_t / (100 - \bar{H}_t)] \quad (8)$$

Esta fórmula se emplea para evaluar las relaciones concentración/efecto. Para ello, se evalúan para cada dilución, el valor Γ .

En donde:

- Γ_t : es el valor Gamma de la muestra de ensayo, tras un tiempo de contacto de 5 min, 15 min y 30 min; y
- $\bar{H}_t$: Es la media de H_t , ver la ecuación (6)



Para el cálculo de la CE_{50}

1. Se calcula la relación concentración/efecto para cada tiempo de exposición y para cada dilución utilizando un análisis por regresión lineal o no lineal según resulte adecuado.
2. Para la evaluación de las relaciones concentración/efecto utilizando una técnica de regresión lineal se calcula para cada nivel de dilución el valor Gamma

$$\log C_t = b \log \Gamma_t + \log a \quad (9)$$

Es la ecuación de la recta que describe la relación concentración/efecto para un tiempo de exposición dado.

En donde:

C_t : Es la concentración de la muestra, expresada en porcentaje;

Γ_t : ver ecuación (8);

b : es la pendiente de la recta; y

$\log a$: valor de la ordenada al origen.

La ecuación (9) describe una recta con pendiente b y una intercepción de $\log a$, en la cual se representa la concentración y la Gamma (Γ) correspondiente. Los logaritmos de cualquier base se pueden utilizar, mientras sean utilizados consistentemente. La (9) denota el logaritmo base 10. La estadística de regresión de $\log C$ en $\log \Gamma$ se utiliza para estimar la concentración que debe dar un efecto nominal, por ejemplo una CE_{50} .

Para los análisis de una regresión no lineal hay diversos modelos disponibles en programas informáticos y estadísticos o gráficos estándar. Generalmente se basan en funciones de la distribución normal (p. ej. función probit), de la distribución logística (análisis Logit) o distribución Weibull (análisis Weibull). Los efectos inhibidores calculados (H_t) pueden usarse directamente para estimar los parámetros de la relación no lineal concentración/efecto, a partir de la cual pueden deducirse posteriormente los valores de la CE para todos los niveles. Si el conjunto de pares de valores no puede ajustarse a la recta, pueden estimarse gráficamente los valores de concentración efectiva utilizando un sistema con doubles coordenadas logarítmicas.

9.2 Modelo Gráfico para la determinación de la CE_{50}

Para el cálculo de la CE_{50} mediante este modelo, deben graficarse las Gammas (eje Y) contra la concentración de las diluciones de la muestra (eje X). La construcción de la curva debe hacerse obteniéndose el logaritmo en X y Y o en su caso, emplear papel log-log e interpolar a valor de



Gamma igual a 1, la concentración que corresponda en el eje X. Este valor de concentración debe ser la CE₅₀.

9.3 Expresión de resultados

9.3.1 Cuando se trabaja con muestras de concentración conocida el resultado debe expresarse como CE₅₀ en unidades de concentración, ya sean masa volumen (m/v), o volumen-volumen (v/v), ya que se conoce la concentración de la sustancia que inhibe en un 50,0 % la intensidad de la luz emitida por la bacteria *Vibrio fischeri*. En este caso se requiere que no se reporte el resultado en Unidades de Toxicidad.

9.3.2 Cuando se trabaja con mezclas de agua, como son aguas naturales, descargas de aguas residuales, sedimentos, lixiviados, elutriados, extractos, o una muestra compleja de la cual no se conoce la concentración de las sustancias que contiene, la CE₅₀ se debe expresar en porcentaje (%), porque no se tiene idea de su composición específica y puede acompañarse por el valor de Unidades de Toxicidad que corresponda (ver 4.14).

9.3.3 La expresión de los resultados como CE₅₀ (ver 4.4) o UT (ver 4.14) debe ser como sigue:

9.3.3.1 Cuando en una prueba presuntiva o exploratoria ocurra que $LM \geq LC$ o que la LM presente una reducción de la luminiscencia de hasta 10,0 % respecto al control, la muestra se debe reportar como No Tóxica. No es necesario llevar a cabo una prueba definitiva para determinar la CE₅₀.

9.3.3.2 Cuando en una prueba definitiva, con una concentración inicial del 100,0 %, en donde el % E > 10,0 y % E ≤ 50,0 no sea posible obtener la CE₅₀, se debe reportar: CE₅₀ = No detectable y el % E de inhibición de luz obtenido para la concentración de la muestra al 100,0 % (% E₁₀₀ = n), de acuerdo a 8.6.1.11. Se debe expresar como:

$$CE_{50} > 100,0 \% \text{ con } \% E_{100} = n$$

9.3.3.3 Cuando en una prueba definitiva, con una concentración inicial del 100,0 %, en donde el % E > 10,0 y % E ≤ 50,0 sea posible obtener la CE₅₀, el resultado se debe expresar de acuerdo a 9.3.2:

$$CE_{50} = X \% \text{ y } UT = n$$

9.3.3.4 Cuando en una prueba definitiva, con una concentración inicial del 45,0 % o 50,0 %, en donde el % E > 50,0 y % E ≤ 100,0 de acuerdo a 8.6.3, los resultados se deben expresar como:

$$CE_{50} = X \% \text{ y } UT = n$$



9.3.3.5 Si en una prueba definitiva se obtiene que la $CE_{50} = 100,0 \%$ de la concentración inicial de la muestra. Entonces se tiene:

$$CE_{50} = 100,0 \%$$

Esto significa que la muestra naturalmente genera el 50,0 % de efecto en la población. Por lo tanto en Unidades de Toxicidad se obtiene lo siguiente:

$$UT = 100/100,0 \% = 1,0$$

Por lo tanto se debe expresar como:

$$CE_{50} = 100,0 \% \text{ y } UT = 1,0$$

Siempre que la CE_{50} sea menor a 100,0 % ($CE_{50} < 100,0 \%$), el valor de UT debe ser mayor a 1,0 ($UT > 1,0$). El valor debe reportarse con 3 decimales, para ambas expresiones.

10. Informe de la prueba

Información que debe estar contenida en la bitácora del analista o en registros de laboratorio.

- a) Cadena de Custodia.
- b) Referencia del método de prueba aplicado.
- c) Tipo de muestra (ver 8.2.1 a 8.2.6).
- d) Forma de almacenamiento y preservación de la muestra.
- e) Datos fisicoquímicos al inicio del análisis: pH, oxígeno disuelto, conductividad, salinidad, temperatura de la muestra, así como sus características aparentes de la muestra: olor, color, presencia o ausencia de burbujas y espuma.
- f) En el caso de muestras de sedimento, indicar tipo de sedimento aparente (limoso, rocoso, arenoso o cualquier otro).
- g) Fecha de inicio y término del análisis.
- h) Registrar los números de lote, caducidad y marca del reactivo biológico (ver 6.1.1), así como la preparación de las disoluciones señaladas en 6.2.
- i) Tipo de prueba realizada (presuntiva o definitiva).

- j) Tratamiento aplicado a la muestra, cuando proceda.
- k) Indicar cuando se haya realizado corrección por interferencia de color
- l) Porcentaje de efecto (% E) de la prueba presuntiva o exploratoria.
- m) Concentraciones utilizadas en las pruebas definitivas.
- n) Respuesta obtenida en las muestras, expresada de acuerdo a 9.3, señalando además los límites de confianza al 95,0 %.
- o) Firma del responsable de la realización de las pruebas de toxicidad.
- p) Observaciones sobre cualquier detalle de operación no especificado en esta norma e incidentes que puedan afectar el resultado.
- q) Registrar el tóxico de referencia utilizado en la prueba de sensibilidad y la CE50 obtenida para el lote del reactivo biológico (ver 6.1.2).
- r) Cuando el laboratorio, genere archivos electrónicos asociados al desarrollo o resultados de las pruebas, el analista los debe archivar.

11. Vigencia

La presente Norma Mexicana, entrará en vigor a los 120 días naturales después de la publicación de su declaratoria de vigencia en el Diario Oficial de la Federación.

12. Concordancia con Normas Internacionales

Esta Norma Mexicana es modificada (MOD) con respecto a la Norma Internacional ISO 11348-3:2007 (E), Water quality–Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminiscent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried bacteria, y difiere en los siguientes puntos:

Capítulo/Inciso	Modificaciones
Capítulo 7	La ISO considera congelación por dos meses a -18 °C o menor a ésta. Sin embargo, el cambio se acotó a congelación hasta por 15 días posteriores a su colecta, ya que se considera un tiempo perentorio para desarrollo de análisis y entrega de resultados.
Explicación:	

Para lograr una mayor certeza sobre la no alteración física, química y toxicológica de las muestras, por un almacenaje prolongado.	
8.2.4 Preparación de muestras de agua intersticial de sedimentos	Se incluyó el inciso
Explicación: Porque en la norma ISO 11348-3:2007 (E), no se explica el procedimiento y puede haber métodos alternativos para su obtención, que generen variación de la toxicidad.	
8.2.5 Preparación de elutriados y de sedimentos	Se incluyó el inciso
Explicación: En consistencia con lo anterior, porque en la norma ISO 11348-3:2007 (E), no se explica el procedimiento y puede haber métodos alternativos para su obtención, que generen variación de la toxicidad.	
8.2.6 Extractos de fase sólida con disolventes	Se incluyó el inciso
Explicación: Porque el análisis toxicológico de sedimentos no se hace por exposición directa de la muestra, sino sobre la solubilización de compuestos que pudieran estar contenidos en la muestra.	
8.6.1 Prueba presuntiva o exploratoria;	Se incluyó el inciso
Explicación: Porque permite la discriminación de muestras tóxicas de las no tóxicas y la decisión sobre la concentración inicial de análisis para la prueba definitiva.	
8.6.2 Prueba definitiva con una concentración inicial al 100,0 %	Se incluyó el inciso
Explicación: Porque la máxima concentración posible de análisis inicial de una muestra en la ISO 11348-3:2007 (E), es del 50% y máximo del 80%. Para los fines de los controles en México, es necesario poder realizar el análisis en su condición natural (100 %).	
Apéndice A (Normativo) Lavado de material y cristalería	Se incluyó el apéndice
Explicación: Porque es necesario que para poder reutilizar el material de vidrio no desechable y de uso continuo en el laboratorio, se requiere un lavado que remueva compuestos orgánicos e inorgánicos. Las sugerencias de lavado sólo consideran la remoción de alguno de estos grupos.	

Apéndice A
(Normativo)
Lavado de material y cristalería

Todos los materiales y recipientes de uso rutinario en el área, no desechables, deben lavarse perfectamente antes de su uso en cualquier actividad relacionada con este método de prueba, para evitar que contengan residuos potencialmente tóxicos a los organismos. El método se describe a continuación:

- A.1** Lavar el material con detergente libre de fosfatos y enjuagar dos veces con agua de la llave.
- A.2** Sumergir por lo menos, durante 24 h el material en una disolución de ácido nítrico aproximadamente al 10 %, para eliminar residuos metálicos, o si se requiere su uso inmediato, puede optarse por la aplicación de ácido nítrico concentrado.
- A.3** Enjuagar con agua destilada o desionizada hasta eliminar los residuos ácidos y escurrir.
- A.4** Enjuagar con acetona de grado reactivo analítico o superior, para eliminar residuos orgánicos. Dejar que se volatilice la acetona
- A.5** Enjuagar con agua desionizada y dejar secar completamente a temperatura ambiente o en horno.
- A.6** Si el secado se realiza por el secado en horno, se sugiere un tiempo mínimo de 3 h a aproximadamente 100 °C para asegurar la eliminación total de los productos de lavado.
- A.7** Guardar el material protegiéndolo del polvo y sustancias contaminantes.

Apéndice B

(Normativo)

Método para la corrección de la CE₅₀ en muestras con interferencias de color o turbiedad.

B.1 Aplicación

Cuando una muestra presenta coloración visible, especialmente en la gama de colores del rojo al marrón, puede producirse la interferencia en la detección de la emisión de luz y alterar el valor de luminosidad en las diversas diluciones de prueba y por consecuencia también el valor de la CE₅₀. Si esto sucede en la dilución más cercana a la CE₅₀, debe determinarse si hay interferencia mediante la obtención del valor de absorbancia. Para ello, puede emplearse cualquier procedimiento espectrofotométrico que permita su obtención, así como corregir el valor de la CE₅₀ si resulta procedente.

Un método que puede ser empleado es el descrito en B.2.

B.2 Equipamiento complementario

- a) Tubos de vidrio para corrección del color (ver 5.2 b)

Tubo de vidrio borosilicato de doble compartimento para corrección de color, compatible con el luminómetro.

- b) Pipetas Pasteur.

B.3 Procedimiento operativo

El procedimiento de corrección de color se realiza a una temperatura de $15,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un incubador termostatzado.

Se prepara una dilución de la muestra de ensayo de concentración próxima al valor de CE₅₀. Si difieren mucho los valores de la CE₅₀ para los distintos tiempos de lectura elegir la concentración más baja para preparar una concentración similar o cercana a esta, llamada Ck.

NOTA 1: Se transfieren 2,0 mL del medio de dilución de cloruro de sodio al 2 % al compartimento exterior del tubo para corrección de color.

Se prepara la solución bacteriana de acuerdo a los numerales 8.3.1 a 8.3.3.

NOTA 2: Después de mezclar la disolución bacteriana esperar 15 min y posteriormente transferir un volumen de ésta al compartimento interior del tubo para corrección de color hasta que se iguale el nivel del líquido que se encuentra en el compartimento exterior.

Marcar el tubo para corrección de color en algún punto de forma que siempre tenga la misma posición dentro del luminómetro.

Medir la intensidad luminosa (B_0) y poner en marcha el cronómetro.

NOTA 3: Extraer del tubo de corrección de color el medio de dilución de cloruro de sodio colocado en el compartimiento exterior y reemplazar por 2,0 mL de la dilución de la muestra de ensayo (C_k) preparada y enfriada a $15,0\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$.

Se mide la intensidad luminosa (I_5) a los 5 min después de la primera medida.

Se extrae la muestra diluida del compartimiento exterior y se reemplaza nuevamente por 2,0 mL de dilución de cloruro de sodio.

Se mide nuevamente la intensidad luminosa (B_{10}) a los 10 min después de la primera medida.

NOTA 4: El procedimiento puede simplificarse utilizando dos cubetas idénticas para corrección de color. El compartimiento exterior de la primera cubeta se rellena con agua de dilución; el compartimiento exterior de la segunda se rellena con la muestra diluida. Después de 15 min pueden medirse las intensidades luminosas B_0 e I_0 . Estos valores reemplazan los de B_5 e I_5 en los cálculos siguientes.

B.4 Cálculo

En los siguientes cálculos se asume que la muestra coloreada se comporta según la ley de Lambert-Beer, caso que generalmente se da.

Se calcula B_5 a partir de la ecuación B.1:

$$B_5 = B_0 = \frac{B_0 - B_{10}}{2} \quad (\text{B.1})$$

Se calcula para un tiempo de exposición dado (t) la absorción (A_t) de la concentración $CE_{50,t}$, no corregida, a partir de la ecuación B.2:

$$A_t = \frac{CE_{50,t}}{C_k} \cdot k \cdot \ln \frac{B_5}{I_5} \quad (\text{B.2})$$

En donde:

C_k

es la concentración de la muestra o sustancia química sometida a ensayo (en lo que respecta al color);

es una constante del sistema, de carácter empírico;

k

$\ln \frac{B_5}{I_5}$

Se calcula la transmisión correspondiente (T_t) a partir de la ecuación B.3

$$T_t = \frac{1 - e^{-A_t}}{A_t} \quad (\text{B.3})$$

Se calculan los valores corregidos de gamma (Γ_c) a partir de las ecuaciones B.4 y B.5

$$c\Gamma_t = (5 T_t) - 4 \quad (\text{B.4})$$

y

$$\Gamma_c = c\Gamma_t \cdot \Gamma_o \quad (\text{B.5})$$

En donde:

$c\Gamma_t$ es el factor de corrección para los valores de gamma a un tiempo de exposición dado (t);

Γ_o es el valor original de gamma.

Se efectúa un nuevo cálculo de los resultados del ensayo con los valores corregidos de gamma.

NOTA: Para un tiempo de exposición dado, puede calcularse la absorción (A_t) y la transmisión (T_t) para cada concentración de ensayo, así como el valor de gamma no corregido, con ayuda de la ecuación B.6:

$$\Gamma_c = T_t (1 + \Gamma_o) - 1 \quad (\text{B.6})$$

El factor de corrección es el mismo para todos los valores de gamma, suponiendo que la pendiente de la recta original es correcta. Por tanto, es suficiente con calcular solamente el factor de corrección de un valor de gamma. En este cálculo se utiliza el valor de gamma correspondiente a la concentración $CE_{50,t}$, no corregida ($\Gamma_c = 0,25$). La fórmula para el cálculo del factor de corrección se obtiene por deducción, de la ecuación B.7:

$$c\Gamma_t = \frac{\Gamma_c}{\Gamma_o} = \frac{T_t(1+\Gamma_o)-1}{\Gamma_o} = \frac{T_t(1+0,25)-1}{0,25} = (5T_t)-4 \quad (B.7)$$

En donde:

C es la concentración de la muestra;

I_t es el valor de bioluminiscencia, medido a un tiempo de exposición dado (t);

$c\Gamma_t$ es el factor de corrección para los valores gamma, a un tiempo de exposición (t) dado;

Γ_o es el valor de gamma original;

Γ_c es el valor de gamma corregido.

B.5 Ejemplo

Datos de corrección del color										
$C_k = 10,0\%$ en fracción de volumen		$B_5 = 81$			$I_5 = 78$			$k = 3,1$		
Cálculos de corrección del color										
$C = \%$ en fracción de volumen		5 min			15 min			30 min		
$c_{\square 5} = 0,708$ $c_{\square 15} = 0,670$ $c_{\square 30} = 0,657$										
	I_0	I_5	$\square o$	$\square c$	I_{15}	$\square o$	$\square c$	I_{30}	$\square o$	$\square c$
blanco	100	90	0,076	0,054	80	0,059	0,040	70	0,055	0,036
5,625	98	82	0,343	0,243	74	0,253	0,170	65	0,242	0,159
11,250	94	63	0,920	0,651	60	0,829	0,556	53	0,768	0,505
22,500	96	45	4,82	3,412	42	3,565	2,389	38	2,994	1,967
45,000	97	15			17			17		
ecuación inicial:		$\ln \square\square = 1,96 \times \ln C - 5,96$			$\ln \square\square = 1,95 \times \ln C - 6,16$			$\ln \square\square = 1,90 \times \ln C - 6,12$		
ecuación corregida:		$\ln \square\square = 1,96 \times \ln C - 6,30$			$\ln \square\square = 1,95 \times \ln C - 6,56$			$\ln \square\square = 1,90 \times \ln C - 6,53$		
CE _{50,t} inicial		10,3			11,6			12,1		
CE _{50,t} corregida		12,3			14,3			15,1		

Apéndice C
(Informativo)
Preparación de agua de mar artificial (AMA) y
agua salobre artificial (ASA)

El agua de mar no es sólo una solución de cloruro de sodio y agua, sino es más bien una mezcla compleja de diferentes sales, las cuales satisfacen el requerimiento osmótico en los organismos marinos y salobres, para mantener la homeostasis en el metabolismo.

Para asegurar un medio de dilución óptimo osmóticamente y libre de tóxicos, que pudieran interferir en la respuesta de sensibilidad de los organismos que son utilizados en pruebas de toxicidad, es indispensable preparar un medio artificial que asegure ambas condiciones. Adicionalmente, debe asegurarse la condición salina inicial de la muestra al ser diluida.

Derivado de lo anterior se sugiere utilizar las siguientes formulaciones, en función del tipo de muestra que se vaya a trabajar (ver 8.2.2 y 8.2.3).

Tabla C.1 - Preparación de agua de mar artificial (AMA) y agua salobre artificial (ASA)

Sal (g/L)	Agua marina artificial (AMA)	Agua salobre artificial (ASA)
NaCl	22,0	14,19
MgCl ₂ .6H ₂ O	9,7	6,26
Na ₂ SO ₄ anhidro	3,7	2,39
CaCl ₂ anhidro	1,0	0,65
KCl	0,65	0,42
NaHCO ₃	0,20	0,13
H ₃ BO ₃	0,023	0,015
Conductividad (µS/cm; 20,0 °C)	47 000 ± 1 000	31 000 ± 1 000
Salinidad (20,0 °C)	31,0 ± 1,0	20,0 ± 1,0
pH	7,5 ± 0,2	7,5 ± 0,2

Se preparan con agua destilada (ver 6.1.5).

13 Bibliografía

- Ley Federal sobre Metrología y Normalización, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 1 de julio de 1992 y sus reformas.
- Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 14 de enero de 1999 y sus reformas.

- NOM-008-SCFI-2002, Sistema General de Unidades de Medida. Publicada en el Diario Oficial de la Federación en 2002-11-27.
- NMX-AA-003-1980, Aguas residuales - Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación en 1980-03-25.
- NMX-AA-008-SCFI-2016, Análisis de agua - Medición del pH en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba (Cancela a la NMX-AA-008-SCFI-2011). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación en 2016-09-09.
- NMX-AA-044-SCFI-2014, Análisis de agua – Medición de cromo hexavalente en aguas naturales, salinas, residuales y residuales tratadas – Método de prueba. (Cancela a la NMX-AA-044-SCFI-2001). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación en 2015-01-13.
- NMX-AA-050-SCFI-2001, Análisis de agua - Determinación de fenoles totales en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas.- Método de prueba (Cancela a la NMX-AA-050-1981). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación en 2001-08-01.
- NMX-AA-051-SCFI-2016, Análisis de agua - Medición de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas-Método de prueba (Cancela a la NMX-AA-051-SCFI-2001). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación en 2016-12-07.
- NMX-AA-093-SCFI-2000, Análisis de agua - Determinación de la conductividad electrolítica.- Método de prueba (Cancela a la NMX-AA-093-1984). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación en 2000-12-18. .
- ISO 80000-9:2009 Quantities and Units-Part 9: Physical chemistry and molecular physics, 1st Edition; Geneva, Switzerland.
- ISO 5667-3:2003 Water quality – Sampling – Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples. Qualité de l’eau – Échantillonnage – Partie 3: Lignes directrices pour la conservation et la manipulation des échantillons d’eau
- ISO 5667-16:1998 Water quality – Sampling – Part 16: Guidance of biotesting of samples. Qualité de l’eau – Échantillonnage – Partie 16: Lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons.

- Abernethy, S.G. and G.F. Westlake. Aquatic Toxicity Unit Water Resources Branch in: Guidelines for pH adjustment of effluent samples for toxicity identification and reduction evaluations. 1991. Ontario Ministry of the Environment. ISBN 0-7729-5947-1.
- APHA, AWWA, WPCF, 1989. Standard Methods for the examination of water and Wastewater. American Public health Association, Port City Press, Baltimore, Maryland, E.U.A. 10-200 p.
- Bertoletti, E., Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos No estado de São Paulo. 2a. Edicao ampliada e revisada Revisao tecnica de Rosalina Pereira de Almeida Araujo. CETESB Companhia Ambiental do Estado de Sao Paulo, 2013 p 43.
- Bulich, A.A. 1979. Use of luminescent Bacteria for Determining Toxicity in Aquatic Evironments. Aquatic toxicology. ASTM STP 667, L.L. Marking and R.A. Kimerle, Eds., American Society for Testing and Materials. 98-106 pp.
- Bulich, A.A. 1990. The Luminescent Bacteria Toxicity Test: its Potential as an in Vitro Alternative. Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence 5: 71-71.
- Burton, S. A. and R. Dabbah. 1989 The Bacterial Bioluminescence Test: An Alternative Test to Compendial in Vitro Biological Reactivity Tests and a Potential Test for Comparative Biological Reactivity of Bulk Pharmaceutical Chemicals. Pharmacop. Forum, 15(1): 4812-4814.
- CETESB, 1987. Bioensaio de Toxicidade Aguda com *Photobacterium phosphoreum*. Sistema Microtox. Método de ensayo. (Bioensayo de toxicidad aguda con *Photobacterium phosphoreum*. Sistema Microtox. Método de ensayo) Sao Paulo, SP. Brasil, sp.
- CETESB, 1991. 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, 17p.
- Danilov, V.S., A. D. Ismailov and N. A. Baranova. 1985. The inhibition of bacterial bioluminescence by xenobiotics. (Inhibición de la bioluminiscencia bacteriana por xenobióticos). Xenobiotica. Vol. 15 (4):271-276.
- Dezwart, D. And W. Slooff. 1983 The Microtox as an Alternative Assay in the Acute Tocity Assessment of Water Pollutants. (el Micotox como un ensayo alternativo del análisis de toxicidad aguda de contmainantes de agua). Aquatic. Toxicol. 4:129-138 pp.
- Dezwart, D. And W. Slooff. 1983 The Microtox as an Alternative Assay in the Acute Tocity Assessment of Water Pollutants. (el Micotox como un ensayo alternativo del análisis de toxicidad aguda de contmainantes de agua). Aquatic. Toxicol. 4:129-138 pp.

- DIN 38 412 Parte 34: Determination of the inhibitory effect of waste water on the light emission of *Photobacterium phosphoreum*. (Test using preserved luminiscent bacteria) (Determinación del efecto inhibitorio de las aguas residuales sobre la emisión de luz de *Photobacterium phosphoreum*.-Prueba que utiliza una bacteria Luminiscente liofilizada)
- DIN 38 412 Parte 34: Determination of the inhibitory effect of waste water on the light emission of *Photobacterium phosphoreum*. (Test using preserved luminiscent bacteria) (Determinación del efecto inhibitorio de las aguas residuales sobre la emisión de luz de *Photobacterium phosphoreum*.-Prueba que utiliza una bacteria Luminiscente liofilizada)
- Dutka, B. J., G. Bitton. 1986. Toxicity Testing Using Microorganisms. (Pruebas de toxicidad utilizando microorganismos) Vol. II. CRC Press, Inc. Florida. 202 p.
- Environmental Protection Agency (EPA), 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. EPA-821-R-02-012.
- Environmental Protection Agency (EPA). Method 8041A. 2007. Phenols by gas chromatography, disponible en:(www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8041a.pdf).
- Environmental Protection Series (EPS), 1992. Biological Test Method: Toxicity Test Using Luminescent Bacteria *Photobacterium phosphoreum*. EPS 1/RM/24. 61p.
- Environmental Protection Series (EPS), 1990. Guidance Document on Control of Toxicity Tests Precision Using Reference Toxicants. Report EPS 1/RM/12 Canadá.
- Greene, J.C., W.E. Miller, M.K. Debacon, M. A. Long and C. L. Bartels, 1985. A Comparison of Three Microbial Assay Procedures for Measuring Toxicity of Chemical Residues. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 14:659-667.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2007. Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry-The Green Book, 3rd Ed.; RSC Publishing, Cambridge [ISBN 978-0-85404-433-7]. Page 48, Sec. 2.10.
- Isenberg, D.L. Chapter 1. The Microtox Toxicity Test A Developer's commentary. pp. 3-15. In: Richardson, M. 1993. Ecotoxicology Monitoring. VCH Ed. Germany. pp 384.
- Kinne, O. 1971 Marine Ecology. (Ecología Marina). Volumen 1 Environmental Factores Part. 2. Wiley Interscience. New York.

- Mallak, F.P. and R. L. Bruner. 1983 Determination of the Toxicity of Selected Metalworking Fluid Preservatives by Use of the Microtox System and an *in vitro* Enzyme Assay. In: B. J. Dutka and D. Liu (ed.), Toxicity screening procedures using bacterial systems. Toxicity Series, Vol. 1. Marcel Dekkar, New York. 65-76 pp.
- Martin, A., Serrano, S., Santos, A., Martina, D. y Vázquez, C. 2010. Bioluminiscencia bacteriana. Reduca. Serie Microbiología. 3(5):75-86. ISSN:1989-3620.
- McFeters, G.A., P. J. Bond, S. B. Olson and Y. T. Tchan, 1983. A Comparison of Microbial Bioassays for the Detection of Aquatic Toxicants. Water Res., 17 (12): 1757-1762.
- O'Brien, T.A. and G.J. Bacher. 1990. Toxicity of Industrial and Domestic Complex Effluents to three Australian Freshwater Organisms and the Microtox Bacteria. Aquatic Biology Sectio, Freshwater Fisheries Management Branch, Arthur Rylah Institute, Fisheries Division, department of Conservation Forests and Lands.
- Organización Panamericana de la Salud. Biblioteca virtual de desarrollo sostenible y salud ambiental. Washington, D.C. U.S.A. (www.bvsde.paho.org).
- Pielou, E.C. 1969. An Introduction to Mathematical ecology. Wiley Intersciencias. John Wiley and Sons, New York.
- Sáenz, M. C.I. y Nevárez, M.G.V. 2010. La bioluminiscencia de microorganismos marinos y su potencial biotecnológico. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. Volumen 2. No. 3.
- SARH. 1992. Ley de Aguas Nacionales. Publicada en el Diario Oficial de la Federación del 1 de diciembre de 1992.
- SEDUE. 1988. Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. Publicada en el Diario Oficial de la Federación del 28 de enero de 1988.
- Stephan, C.E., 1977 Methods for calculation an LC₅₀. In: Mayer y J.L. Hamelind, (Eds.), Aquatic Toxicology and hazard Evaluation, ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania: 65-84 pp.

Ciudad de México, a 19 de octubre de 2017

EL DIRECTOR GENERAL DE NORMAS

ALBERTO ULISES ESTEBAN MARINA