

Fuente: SCFI

NMX-AA-112-1995 - SCFI

**ANALISIS DE AGUA Y SEDIMENTOS - EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA CON
PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM - MÉTODO DE PRUEBA**

**WATER AND SEDIMENT ANALYSIS - ACUTE TOXICITY EVALUATION WITH
PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM - TEST METHOD**

PREFACIO

En la elaboración de la siguiente 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

CONTROL DE CONTAMINACION DEL AGUA, S.A DE C.V.

COMITE TECNICO DE NORMNLIZACION NACIONAL DE PROTECCION AL AMBIENTE

DISEÑOS HIDRAULICOS Y TECNOLOGIA AMBIENTAL, S.A. DE C.V.

EMPRESA PARA EL CONTROL DE LA CONTAMINACION NACIONAL DEL AGUA EN LA
ZONA DE CIVAC

F. J. SALCEDO Y COMPAÑÍA

INSTITUTO MEXICANO DEL PETROLEO

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACION NACIONAL

INSTITUTO TECNOLOGICO DE ZACATEPEC

JUNTA MUNICIPAL DE AGUA Y SANAMIENTO 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.

INDICE DEL CONTENIDO

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

1.- OBJETIVO

Esta Norma Mexicana establece el método para determinar la calidad del agua, Lixiviados y sedimentos mediante pruebas de toxicidad aguda utilizando a la bacteria bioluminiscente (Photobacterium phosphoreum)

2.- CAMPO DE APLICACION

Esta Norma Mexicana es aplicable para la evaluación de toxicidad aguda en cuerpos de agua dulce, salobre y/o marina, así como aguas residuales industriales, agrícolas o municipales , sustancias puras o combinadas, lixiviados y sedimentos.

3.- REFERENCIAS

Esta norma se complementa con las siguientes Normas Mexicanas y Normas Oficiales Mexicanas vigentes:

NMX-AA--003	Aguas residuales - Muestreo.
NMX-AA-007	Aguas - Determinación de la temperatura.
NMX-AA-008	Aguas - Determinación de pH.
NMX-AA-014	Cuerpos receptores - Muestreo.
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 a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.

4 DEFINICIONES

Para fines de esta Norma Mexicana, se entiende por:

4.1 Agua desionizada

Es el agua que ha sido tratada para remover los iones en solución que presenta una conductividad menor o igual a 2 μ mhos/cm.

4.2 Agua destilada

Es el agua que ha sido evaporada y condensada en un aparato de destilación de vidrio borosilicato u otro material, para remover impurezas.

4.3 Agua intersticial

Es el agua que se encuentra ocupando un espacio entre las partículas del sedimento. la cantidad de agua intersticial se expresa como un porcentaje del sedimento húmedo en relación a su masa seca.

4.4 Agua marina

Es el agua de mar u océano, donde no hay una dilución apreciable debida al agua dulce derivada de un escurrimiento terrestre.

4.5 Agua de mar artificial

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

4.6 Aguas residuales

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

4.7 Bioluminiscencia

Es el fenómeno por el cual, ciertos organismos vivos emiten luz como resultado de su actividad - bioquímica.

4.8 Contaminante

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

4.9 Concentración efectiva media (CE₅₀)

Es la concentración de sustancias puras, combinadas, cuerpos receptores, efluentes, lixiviados y sedimentos que reduce la intensidad de luz emitida por la bacteria Photobacterium Phosphoreum a un 50 %.

4.10 Cuerpos de agua

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

4.11 Descarga

Son las aguas residuales que se vierten directa ó indirectamente en algún cuerpo de agua o sistema de drenaje y alcantarillado urbano o municipal, incluyendo: se los procesos de infiltración e inyección.

4.12 Efecto agudo

Es aquél que se manifiesta como una respuesta inmediata de un organismo al tóxico o tóxicos a los que ha sido expuesto. Usualmente produce inhibición de alguna función metabólica, inmovilidad o muerte.

4.13 Efluente

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

4.14 Falso positivo

Es la reducción de la luz detectada, causada par un factor o factores diferentes de la presencia de algún tóxico.

4.15 Liofilizado

Es el producto sometido a deshidratación en condiciones de baja temperatura y alto vacío con el fin de conservarlo.

4.16 lixiviado

Es el liquido 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.

4.17 Muestra simple o instantánea

Es la que se toma ininterrumpidamente durante el periodo necesario para completar un volumen que resulte representativo de la descarga de aguas residuales, en el sitio y en el momento del muestreo.

4.18 Muestra compuesta

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

4.19 Photobacterium phosphoreum

Es la bacteria marina bioluminiscente, con forma bacilar, Gramn-negativa, anaerobia facultativa, halofílica, la cual posee un flagelo en uno de los polos.

4.20 Prueba de toxicidad (bioensayo de toxicidad)

Es la exposición controlada de organismos a sustancias o combinadas y aguas provenientes evaluar su efecto.

4.21 Reconstitución

Es la reactivación de la bacteria de agua destilada (rehidratación).

4.22 Salinidad

Es el contenido de sales disueltas por litro.

4.23 Sedimento

Es el material particulado o granular, que se deposita en el fondo de un cuerpo de agua, sistema alcantarillado urbano o municipal.

4.24 Sustancia pura

Es el elemento o conjunto de dos o más elementos combinados químicamente, que dan lugar a un compuesto con pureza no menor al 93 %, por ejemplo: dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) fenol (C_6H_5-OH), Sulfato de zinc ($ZnSO_4$).

4.25 Sustancia combinada

Es aquella que se forma por la integración de dos o más compuestos en una proporción no mayor al 98 % de cualquiera de ellos. Para fines de esta norma: aguas residuales, industriales, efluentes agrícolas, municipales, lixiviados y sedimentos.

4.26 Tiempo de exposición

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

4.27 Tiempo de reconstitución bacteriano

Es el periodo en el que se lleva a cabo la rehidratación bacteriana y que comprende desde el momento en que la solución de reconstitución es vertida al Liofilizado, hasta el instante en que es colocada en incubación a $5,5^\circ C$ y que no debe exceder de 10 s.

4.28 Toxicidad

Es el efecto que produce un tóxico.

4.29 Toxicidad aguda

Es el efecto medido por la reducción de luz de Photobacterium phosphoreum después de ser expuesta a un tóxico una sola vez durante un periodo corto no mayor a 30 min.

4.30 Tóxico

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

4.31 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 mismos ; así cómo, comparar los resultados intra e 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, agrícolas, municipales o urbanos, lixiviados y sedimentos, constituye una parte integral y fundamental de cualquier programa de evaluación de la calidad del ambiente acuático.

5.1 Muestreo en efluentes industriales agrícolas, municipales y urbanos
Se efectúan muestreos instantáneos de acuerdo a la tabla 1.

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

Horas por día que opera el proceso generador de la descarga	Número de muestras	Intervalo para la obtención de muestras simples	
		mínimo	Máximo
hasta 8 h	4	1.0	2
más de 8 h y hasta 12 h	4	2.0	3
más de 12 h y hasta 18 h	6	2.0	3
más de 18 h y hasta 24 h	6	3.0	4

La integración de la muestra compuesta se efectúa de acuerdo a la Norma Mexicana NMX-AA-003 (ver 2 Referencias), tomándose las precauciones necesarias en cuanto a la preservación de las muestras simples, para lo cual, cada una de éstas se debe mantener a $4^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta que sea integrada la muestra compuesta. Una vez concluido esto, dependiendo de cuando se realice el análisis, la muestra compuesta se debe almacenar y preservar de acuerdo al capítulo 9 de esta norma.

5.2 Muestreo en cuerpos de agua

El muestreo se debe realizar de acuerdo a la Norma Mexicana NMX-AA-014 (ver 2 Referencias). Además de los parámetros fisicoquímicos básicos, considerados sólo para fines del reporte (pH, oxígeno disuelto, conductividad, temperatura de agua y aire), se deben registrar las siguientes características aparentes:

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

Las muestras simples o instantáneas se integran de acuerdo al inciso 4.17 de esta norma, siguiendo los ejemplos indicados en el inciso 13.1 de la Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI, (ver 2 Referencias).

5.3 Muestreo en sedimentos

El muestreo de sedimentos se lleva a cabo utilizando una draga tipo 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, o bien, puede realizarse muestreo directo, utilizando el recipiente de almacenamiento.

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 200 g.

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 rocoso arenoso, pueden quedar atrapadas rocas pequeñas entre las mandíbulas de la draga, impidiendo el cierre total de ésta, ocasionando pérdida de sedimento cuando se recupera; por lo cual, se debe lanzar la draga tantas veces como sea necesario hasta obtener la cantidad de sedimento suficiente. De igual forma, si se utiliza un nucleador, quizá se requiera efectuar varios muestreos hasta obtener el sedimento necesario.
- Cuando el muestreo de sedimentos se realice en zonas de aguas someras (menor a 50 cm de profundidad), al utilizar la pala pequeña, 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 recipientes limpios de boca ancha de volumen mínimo de 250 ml) de polietileno de alta densidad, con tapa o contratapa del mismo material.

5.4 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 Referencias).

Para la colecta de la muestra, se deben tomar las precauciones necesarias utilizando el equipo de seguridad adecuado. Las muestras se deben colocar en recipientes limpios de 50 ml de polietileno de alta densidad contratapa.,

6 PRINCIPIO

Este método se basa en la evaluación del efecto que sustancias puras, combinadas, cuerpos receptores, efluentes, lixiviados y sedimentos puedan tener sobre la intensidad de la luz emitida por la bacteria Photobacterium Phosphoreum en condiciones controladas de exposición.

7 REACTIVOS Y MATERIALES

7.1 Reactivos y soluciones

7.1.1 Reactivos

7.1.1.1 Fenol (C_6H_5-OH)

Compuesto con una pureza superior o igual a 99 %.

7.1.1.2 Sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)

Compuesto con una pureza superior o igual a 99 %.

7.1.1.3 Metanol (CH_3OH)

Grado plaguicida, para efectuar la extracción Soxhlet en la muestra testigo.

7.1.1.4 Acetona (C_3H_6O)

7.1.1.5 Ácido nítrico concentrado (HNO_3)

7.1.1.6 Agua destilada, o en su defecto, agua con pureza equivalente.

7.1.1.7 Agua desionizada

7.1.1.8 Cloruro de sodio (NaCl)

7.1.1.9 Cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)

7.1.1.10 Cloruro de estroncio hexahidratado ($SrCl_2 \cdot 6H_2O$)

7.1.1.11 Cloruro de Potasio (KCl)

7.1.1.12 Bromuro de Potasio (KBr)

7.1.1.13 Cloruro de calcio ($CaCl_2$) anhidro

7.1.1.14 Sulfato de sodio decahidratado ($Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$)

7.1.1.15 Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$)

7.1.1.16 Fluoruro de sodio (NaF)**7.1.1.17** Acido bórico (H_3BO_3)**7.1.2** Soluciones**7.1.2.1** Medio de reconstitución

Reactivo de agua destilada o similar no tóxica a la bacteria (Photobacterium phosphoreum)

7.1.2.2 Medio de dilución para muestra de agua dulce

El mismo medio señalado en el inciso anterior agregando en una relación masa volumen (M/V) 2% de cloruro de sodio (NaCl).

7.1.2.3 Medio de dilución para muestras de agua salina o salobre.

El medio de dilución debe ser agua de mar artificial preparada según el inciso 7.1.2.6

7.1.2.4 Medio de dilución para fase sólida

Medio señalado en el inciso 7.1.2.1 con la adición de NaCl en una relación masa volumen (M/V) de 3,5%. En caso de muestras salinas o salobres, el medio de dilución es agua de mar artificial preparada como se indica en el inciso 7.1.2.6.

7.1.2.5 Solución de ajuste osmótico

Medio utilizado para el inciso 7.1.2.1 con la adición de NaCl en una relación masa volumen (M/V) de 22%.

7.1.2.6 Agua de mar artificial

Se prepara con agua destilada o desionizada de acuerdo con la tabla 2, con una salinidad aproximada de 35, (ver Capítulo 13 Bibliografía inciso 13.16).

TABLA 2.- Reactivos utilizados en la preparación de agua de mar artificial

Solución A		Solución B	
Sales	Cantidad (g)	Sales	Cantidad (g)
NaCl	23,90	NaSO ₄ - 10H ₂ O	9,06
MgCl ₂ - 6H ₂ O	18,83	NaHCO ₃	0,02
CaCl ₂ anhidro	1,15	NaF	0,0003
SrCl ₂ - 6H ₂ O	0,004	H ₃ BO ₃	0,0027
KCl	0,682	Agua destilada	100 ml
KBr	0,099		
Agua destilada	856 ml		

La solución B se adiciona lentamente a la solución R, agitando constantemente para lograr una mezcla homogénea.

Después de 24 h filtrar la mezcla utilizando un filtro de membrana de 0,45 µm.

7.1.2.7 Agua marina

Libre de tóxicos, puede emplearse en sustitución de 7.1.2.6

7.2 Materiales**7.2.1** Material biológica**7.2.1.1** Photobacterium Phosphoreum

la suspensión bacteriana debe ser utilizada a una concentración aproximada de 1×10^8 células/ml. Dado que los cultivos frescos son inherentemente variables, se debe utilizar un cultivo liofilizado con 2,0 % de NaCl, 94 % de sólidos de leche descremada y 4 % de bacterias.; Estas se deben preservar en forma

liofilizada en un congelador a una temperatura entre -18°C y -20°C (bajo estas condiciones, el tiempo de caducidad de la bacteria es de un año). Cuando se hidratan, las bacterias comienzan inmediatamente a emitir luz, y pueden ser usadas en pruebas sin ningún tratamiento posterior. La cepa liofilizada aporta valores constantes de CE_{50} para tóxicos de referencia (ver inciso 10.3.3). Si la cepa se preserva por otros métodos o se utilizan cultivos frescos, su respuesta a tóxicos de referencia puede ser no reproducible (ver Capítulo 13 Bibliografía inciso 13.2).

7.2.2. Otros materiales

7.2.2.1 Celdillas

Las celdillas de lectura deben ser compatibles con el luminómetro utilizado; tener capacidad para un volumen total de $3\,000\ \mu\text{l}$ - $5\,000\ \mu\text{l}$; de vidrio borosilicato y desechables.

7.2.2.2 Columnas filtradoras

Provistas con un filtro de fibra de vidrio de $4.5\ \mu\text{m}$. Utilizadas para extraer el sabrenadante de las muestras de sedimentos.

7.2.2.3 Micropipetas

Deben tener doble fase de aire, y capacidad para extraer volúmenes de $1000\ \mu\text{L}$, $500\ \mu\text{L}$ y $250\ \mu\text{L}$ y $10\ \mu\text{L}$.

7.2.2.4 Puntas para micropipetas

Deben ser estériles, de polipropileno y desechables.

7.2.2.5 Soporte de celdillas

Dispositivo capaz de sostener en forma estable y vertical, treinta celdillas en baño de recirculación o sistema de control de temperatura.. El soporte debe prevenir que las celdillas se sumerjan en agua (el exceso de agua en la parte externa de las celdillas puede interferir con la lectura de luz de cada celdilla), así como tener buena transferencia de calor y resistencia a la corrosión; éste es necesario cuando se utilice, un luminómetro sin pozos de celdillas con temperatura controlada.

7.2.2.6 Soporte de celdilla R

Dispositivo capaz de sostener en forma estable y vertical, una celdilla en baño de recirculación o sistema de control de temperatura a $5,5^{\circ}\text{C}$. Este soporte puede sumergir a la celdilla en agua y debe ser resistente a la corrosión. Si la celdilla no está inmersa en agua, éste debe cumplir con las especificaciones del material del soporte de celdillas, descrito en el inciso anterior. El soporte de celdillas es necesario cuando se utiliza un luminómetro sin bloque de incubación con temperatura controlada.

7.2.2.7 Soporte de tubos de ensaye

Dispositivo capaz de sostener en forma estable y vertical, al menos 30 tubos de ensaye descritas en el inciso 7.2.2.8, dentro del baño de recirculación o sistema de control de temperatura mencionado en el inciso 8.2. El material de construcción debe tener buena transferencia de calor y resistencia a la corrosión dentro del sistema de, recirculación o sistema de control de temperatura. Este soporte es necesario para la realización de la prueba en fase sólida .

7.2.2.8 Tubos de ensaye

Desechables, de vidrio borosilicato o policarbonato, con capacidad de $15\ \text{ml}$ y $20\ \text{mm}$ de diámetro, limpios. Se utilizan para la prueba en fase sólida.

7.2.2.9 Equipo de seguridad

Guantes, mascarillas, lentes de seguridad , botas de hule, etc.

7.2.2.10 Recipientes de muestreo

De polietileno de alta densidad, de 50 ml y de 250 ml (boca ancha), tapa o contratapa del mismo material.

7.2.2.1.1 Sistema de extracción (de acuerdo a lo indicado en el apéndice B)

De capacidad mínima de 250 ml.

7.2.2.12 Paraflim

7.2.3 lavado de material

Todo el material que se utilice en el muestreo y análisis (excepto celdillas y puntas de micropipeta) debe lavarse según el método descrito a continuación:

- lavar con detergentes y enjuagar dos veces con agua de la llave.
- Enjuagar con acetona (C_3H_6O) - Dejar secar completamente.
- Enjuagar con ácido nítrico el excedente. Enjuagar
- Enjuagar con ácido nítrico (HNO_3) concentrado, eliminar el excedente. Enjuagar abundantemente con agua desionizada, escurrir y dejar secar.

Una vez lavado, proteger el material del polvo y otros factores.

8 APARATOS

8.1 luminómetro

Debe ser capaz de detectar la luz emitida por Photobacterium Phosphoreum a una longitud de onda de 490 mm.

8.2 Baños de recirculación o sistemas de control de temperatura

Debe ser capaces de mantener una temperatura $15^{\circ}C \pm 0.5^{\circ}C$ y $5.5^{\circ}C \pm 0.5^{\circ}C$.

Los 3 equipos descritos pueden ser individuales o estar integrados en un sistema automatizado.

8.3 Congelador

Debe ser capaz de mantener una temperatura de $-20^{\circ}C \pm 20^{\circ}C$.

8.4 Refrigerador

Debe ser capaz de mantener una temperatura de $4^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$.

8.5 Parrilla magnética

Debe ser capaz de tener agitación continua durante 48 h.

8.6 Parrilla de calentamiento para el sistema de extracción (ver apéndice B)

Debe ser capaz de mantener una temperatura entre $70^{\circ}C$ a $80^{\circ}C$.

8.7 Centrifuga clínica o equivalente

Debe ser capaz de separar la fase sólida de la líquida.

8.8 Medidor de pH

El pH de las muestras se determina de acuerdo a la Norma Mexicana NMX-AA-008, (ver 2 Referencias).

8.9 Termómetro

La temperatura se determina de acuerdo a la Norma NMX-AA-007, (ver 2 Referencias).

8.10 Salinómetro

Utilizado para determinar la salinidad de las marinas y salobres.

8.11 Oxímetro

Para determinar el oxígeno disuelto de las muestras en campo.

8.12 Horno de secado o equivalente

Debe ser capaz de mantener una temperatura de 100°C.

8.13 Balanza analítica

Con sensibilidad mínima de 1mg.

9 PREPARACION Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS

9.1 Preparación

En general, el contenido de sales de la muestra y del medio de dilución durante el análisis, debe ser de 2.0% (M/V) como cloruro de sodio (NaCl) para muestras de agua dulce y de 3.5% (M/V) para muestras de agua salobre y marina.

9.1.1 Preparación de muestras de agua dulce

El contenido de sales de la muestra debe ajustarse a 2.0% de cloruro de sodio (NaCl) previo al análisis, lo cual es necesario para evitar la pérdida de bioluminiscencia de la bacteria debida al choque osmótico. Este ajuste se logra adicionando la cantidad adecuada de solución de ajuste osmótico descrita en el inciso 7.1.2.5 (1 parte de solución por 10 partes de muestra). Por ejemplo, supóngase que se tiene una muestra de agua dulce (0% de NaCl), se debe agregar 2.5 ml de muestra y 0.25 ml de solución de ajuste osmótico; o bien, adicionar NaCl sólido a la muestra (0.2g en 9.8 ml de muestra).

9.1.2 Preparación de muestras de agua salobre

La salinidad de las muestras debe determinarse antes de ser analizadas. Si el contenido de sales está por debajo del 2.0%, debe ajustarse a este valor adicionando NaCl. Si el contenido de sales es mayor a 2.0%, se debe adicionar NaCl al medio de dilución hasta igualar la salinidad de la muestra.

9.1.3 Preparación de muestras de agua marina

El contenido de sales de las muestras es aproximadamente de 3.5% por la tanto, no se requiere ajuste osmótico. El diluyente de prueba debe ser agua de mar artificial o agua de mar carente de contaminación (ver incisos 7.1.2.6 y 7.1.2.7).

9.1.4 Preparación de muestras de agua intersticial del sedimentos

Centrifugar el sedimento de cada muestra para separar la fase sólida de la fase líquida. Decantar cuidadosamente la fase líquida y emplearla para su preparación de acuerdo a los incisos 9.1.1, 9.1.2 y 9.1.3 según su procedencia.

- En muestras de sedimento de sistemas de agua dulce, se debe hacer la preparación descrita en el inciso 9.1.1.
- En muestras de sedimento de sistemas de agua salobre, se debe efectuar la preparación descrita en inciso 9.1.2.
- En muestras de sedimento de sistemas de agua marina, se debe realizar la preparación descrita en el inciso 9.1.3.

9.1.5 Preparación de extractos acuosos de sedimentos

Homogeneizar la muestra de sedimento colectada, mezclar con el tipo de agua que corresponda al origen de la muestra en una relación 1:4 (M/V) utilizando un matraz Erlenmeyer. Agitar vigorosamente durante 60 min. en una parrilla magnética. Centrifugar la mezcla a 10,000 r/min. hasta obtener una separación completa de las dos fases. Utilizar el sobrenadante para el análisis.

9.1.6 Preparación muestras de sedimento para la prueba de fase sólida

9.1.6.1 Muestra problema

Proceder a mezclar la muestra hasta homogeneizarla. Si es necesario, centrifugar a una velocidad adecuada para separar la fase sólida de la líquida. Posteriormente eliminar el sobrenadante.

9.1.6.2 Muestra testigo

Efectuar una extracción (ver Apéndice B) exhaustiva (de 4h a 5h). empleando metanol, grado plaguicida. Recuperar el sedimento y evaporar el metanol remanente a temperatura ambiente, o utilizando un horno de secado a 40°C.

Para la muestra problema/ testigo (ver incisos 9.1.8.1 y 9.1.6.2), determinar la masa de 0,3 g de sedimento o fase sólida en un tubo de ensaye, agregar 3,000 µL de medio de dilución para fase sólida, preparado según el inciso 7.1.2.4. Para efectos de cálculo, considerar únicamente la masa seca de la muestra.

9.1.7 Preparación de la bacteria y desarrollo de la prueba (ver figura 1, número 3)

Sacar un frasco de bacteria liofilizada del congelador; de inmediato, vaciar en él, el medio de reconstitución contenida en la celdilla R (mantenida a 5,5°C) y suspender. Estas acciones deben efectuarse rápidamente para evitar un efecto de choque osmótico a las bacterias. Transferir la mezcla nuevamente a la celdilla R (ahora RB), y continuar su incubación a, 5,5°C. Mezclar el contenido de dicha celdilla con una micropipeta. Esto implica la aspiración y eyección de la mezcla en la celdilla; repetir el mismo proceso 20 veces.

9.2 Acondicionamiento

Las muestras de agua, lixiviados y sedimentos se almacenan dependiendo del tiempo entre la toma y el inicio del análisis, es decir:

Si el análisis de las muestras se realiza dentro de las primeras 48 h, se deben almacenar a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, en los recipientes indicados en 7.2.2.10; deben ser llenados completamente, evitando dejar espacio entre la muestra y el tapón. Si el análisis se realiza después de 48 h y hasta 12 días posteriores a la fecha de colecta, la temperatura de conservación debe ser de -10°C .

Las muestras deben ser preservadas sin la adición de producto químico alguno.

Antes de iniciar el análisis, las muestras deben ser descongeladas a temperatura ambiente; posteriormente, agitar para lograr la homogenización, sin abrir el recipiente y dejar reposar 30 min. para alcanzar el equilibrio.

Si el análisis se realiza después de 48 h , se debe reportar el tiempo transcurrido entre la colecta y el análisis.

las muestras preservadas por más de 12 días no son validas para realizar pruebas de toxicidad.

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

El tiempo final, es el momento en el que las bacterias reconstituidas entran en contacto con la muestra.

10 PROCEDIMIENTO

La prueba de toxicidad aguda con Photobacterium Phosphoreum se realiza por duplicado utilizando cuatro diluciones (90 %, 45 %, 22,5 %, 11,25 %) y un control por réplica.

10.1 procedimiento para efectuar el análisis en muestras de agua dulce, salobre, marina, lixiviados, agua intersticial y extractos acuosos de sedimento, (ver figura 1)

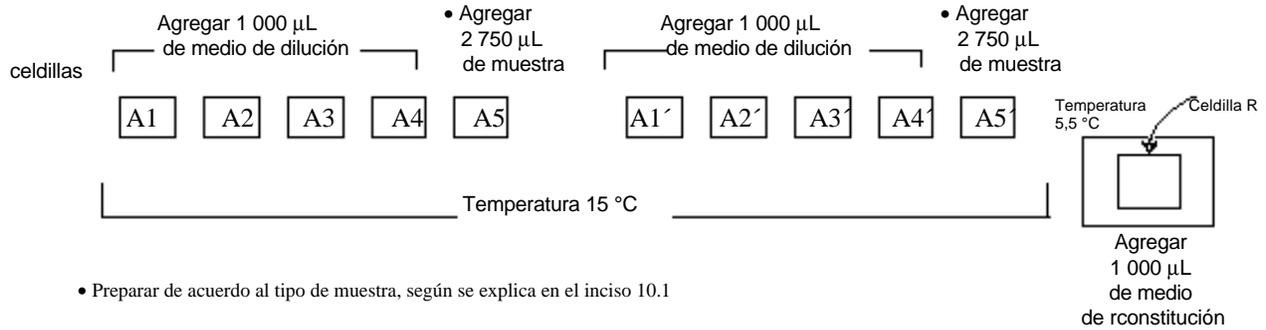
10.1.1 Estabilizar el baño de recirculación o sistema automatizado a $15^{\circ}\text{C} \pm 0,50\text{C}$ durante el análisis..

10.1.2 Colocar 5 celdillas (de la A1 a la R5) en los pozos de incubación del luminómetro o en el soporte de celdillas en el baño de recirculación o sistema de control de temperatura a $15^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

10.1.3 Colocar una celdilla (R) en el pozo de incubación del luminómetro o en el soporte de celdillas, en un baño de recirculación o sistema de control de temperatura a $5,5^{\circ}\text{C}$.

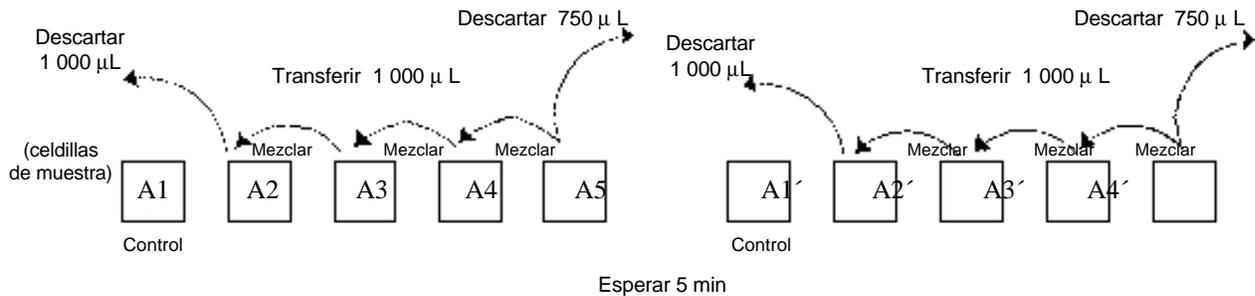
10.1.4 Agregar a la celdilla la cantidad apropiada de medio de reconstitución para alcanzar una densidad bacteriana de 1×10^8 células/ml.

1. - Preparación de muestras



• Preparar de acuerdo al tipo de muestra, según se explica en el inciso 10.1

2.- Preparar diluciones



3.- Preparación de la bacteria y de las celdillas de prueba

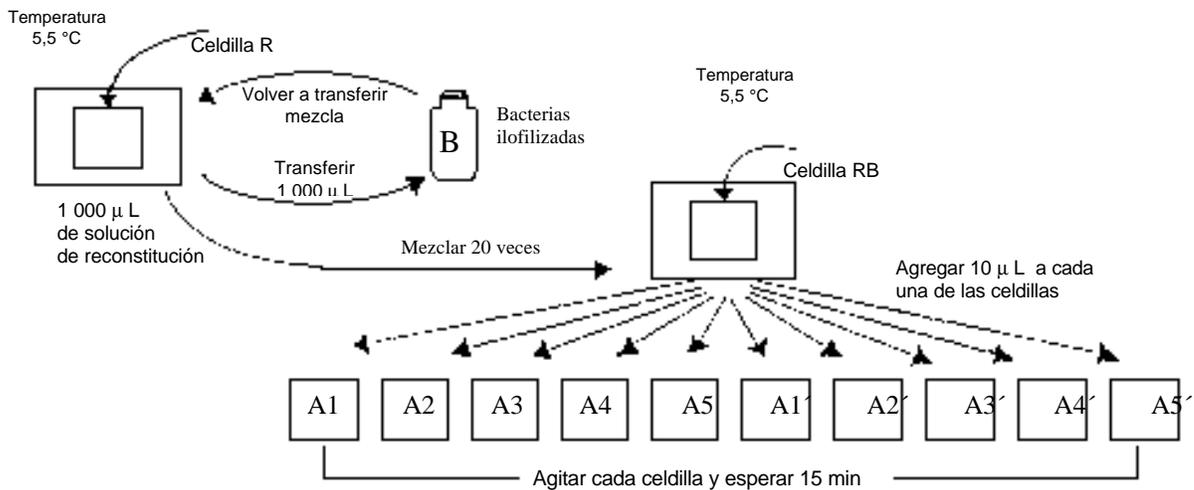


FIGURA 1.- Procedimiento para efectuar el análisis en muestras de agua dulce, salobre, marina, agua intersticial, lixiviados y extracto acuoso de sedimentos

10.1.5 Para muestras líquidas, intersticiales y extractos acuosos de sedimentos provenientes de sistemas de agua dulce y lixiviados. Agregar 1 000 μL del medio de dilución (ver inciso 9.1.1) a las celdillas A1, A2 A3 y A4 - indicadas en 10.1.2.

10.1.6 Para muestras líquidas, intersticiales y extractos acuosos de sedimentos, provenientes de sistemas de agua salobre o marinos y lixiviados. En caso de muestras salobres, adicionar 1 000 μL a las celdillas A1 A2 A3 y A4 del medio de dilución que corresponde de acuerdo al inciso 9.1.2. En caso de muestras de agua marina, utilizar como diluyente agua de mar artificial o marina.

10.1.7 Agregar 2 750 μL de la muestra preparada según los incisos 9.1.1, 9.1.2 y 9.1.3 para muestras de agua dulce, salobre y marina respectivamente, a la celdilla A5.

10.1.7.1 Efectuar una serie de 3 diluciones partiendo de la celdilla A5 y finalizando en la A2, en un patrón de dilución 1:2, obteniéndose las concentraciones al 90%, 45%, 22,5% y 11,25% que se preparan transfiriendo volúmenes de 1 000 μL a cada celdilla. Posteriormente desechar de A2 1 000 μL y 750 μL de A5 para uniformizar volúmenes. La celdilla A1 contiene sólo medio de dilución y es considerada control (ver figura 1 número 2).

10.1.8 En el caso de que los límites de confianza se localicen fuera de $\pm 15\%$ del valor de CE_{50} obtenido (considerando un 95 % de confiabilidad estadística), se debe repetir la prueba para obtener mayor precisión. Con la misma finalidad, también se puede elaborar una serie con un mayor número de diluciones utilizando factores como: 1:1,2 ó 1:1,25 ó 1:1,33

Para su elaboración se debe emplear un factor de dilución menor a 2, como puede ser: 1:1,2 ó 1:1,25 ó 1:1,33.

10.1.9 Adicionar con una micropipeta 10 μL suspensión bacteriana (celdilla RB) a cada una de las celdillas de prueba (de la A1 a la A5) y agitar ligeramente para asegurar su correcta distribución en la solución.

Inmediatamente poner en funcionamiento el cronómetro ajustado para indicar el tiempo a los 5min. y 15min.

10.1.10 Calibración del luminómetro

Al sonar la primera alarma (5 min.) , colocar la celdilla A1 (control) en el luminómetro y calibrar la lectura al 90% de la escala; posteriormente, registrar las lecturas de las celdillas A1 a la A5.

Al sonar la segunda alarma (15 min.) , leer nuevamente la respuesta de las celdillas A1 a la A5.

10.1.11 Realizar el procedimiento por duplicado de los incisos: 10.1.2 , 10.1.5 , 10.1.6, 10.1.7, 10.1.7.1, 10.1.9 y 10.1.10

10.2 Prueba de fase sólida o sedimentos.

La técnica para fase sólida permite la medición del efecto de tóxicos fuertemente adheridos a partículas sólidas en suelos y sedimentos. Este procedimiento permite el contacto de la bacteria con el complejo tóxico-partícula sólida.

Este procedimiento debe utilizarse en esta norma como una forma preliminar de evaluación de sedimentos, ya que el contacto de la partícula sólida con la bacteria siempre ocasiona reducción en la luminiscencia detectada aun cuando el sedimento no contenga tóxicos (respuesta falso positiva).

Algunos de los factores que pueden producir este efecto son:

- Adsorción de las bacterias a las partículas sólidas.

- Efecto de sombra de las partículas en suspensión sobre la detección de bioluminiscencia.
- Floculación bacteriana.

Por lo anterior, es necesario preparar una muestra testigo para cada muestra problema, de acuerdo al inciso 9.1.6.

10.2.1 Procedimiento

10.2.1.1 Preparación de la celdilla R

Proceder conforme a los incisos 10.1.3 y 10.1.4

10.2.1.2 Desarrollo de la prueba (ver figura 2)

Este procedimiento debe realizarse tanto para la muestra problema como para la muestra testigo.

Introducir 15 tubos de ensaye (denominados al a a5, b1 a b5 y c1 a c5) para fase sólida en el soporte de tubos de ensaye y colocarlos en la incubadora con baño de recirculación a 15°C; agregar, 1 500 µL de medio de dilución para fase sólida (ver inciso 7.1.2.4) en cada uno de los tubos, excepto en el tubo c5.

Colocar en el tubo c5 la muestra preparada de acuerdo al inciso 9.1.6; cubrir con parafilm y agitar hasta obtener una suspensión homogénea (ver figura 2, Paso 1).

Utilizar una pipeta de 1,000 µL a 5,000 µL para mezclar y resuspender el contenido del tubo c5 llenando y vaciando la pipeta de 5 a 6 veces; mientras los sólidos están en suspensión transferir 1,500 µL de éste al tubo c4; mezclar éste último. Transferir 1,500 µL del tubo c4 al c3, mezclar éste y repetir la operación hasta llegar al tubo a4.

Posteriormente, descartar 1,500 µL del tubo a4 para igualar volúmenes. los tubos a1, a2 y a3 son controles. Esperar 10 min. para alcanzar la uniformidad térmica (ver, figura 2, Paso 2).

Proceder conforme a lo indicado en el inciso 10.1.9

Poner en marcha un cronómetro de cuenta regresiva ajustado a 20 min., inmediatamente agregar 20 µL de la suspensión bacteriana a cada uno de los 15 tubos en dirección a1 a a5, b1 a b5 y c1 a c5. mezclar la muestra de cada tubo con una pipeta de 1 000 µl a 5 000 µL , succionando y vaciando esta de 5 a 6 veces. Tres minutos antes de que termine la cuenta regresiva, insertar las columnas filtradoras en cada uno de los tubos, cuidando de que estas no toquen el sobrenadante.

Una vez transcurridos los 20 min., empujar suavemente las columnas en la muestra, debiéndose detener antes de llegar al nivel superior de los sólidos sedimentados; posteriormente, transferir 500 µL del filtrado de la columna a la celdilla correspondiente en el soporte de celdillas, en la misma dirección indicada en el inciso anterior, ajustar el cronómetro al tiempo de prueba (5 min.).Tiempo total de exposición: 25 min. (ver figura 2, Paso 3).

Proceder según el inciso 10.1.1 con la celdilla A1 del soporte de celdillas.

Al sonar la alarma, colocar la celdilla A1 referida como control, en el luminometro y calibrar la lectura al 90 %, posteriormente registrar las lecturas de las celdillas a1 a c5.

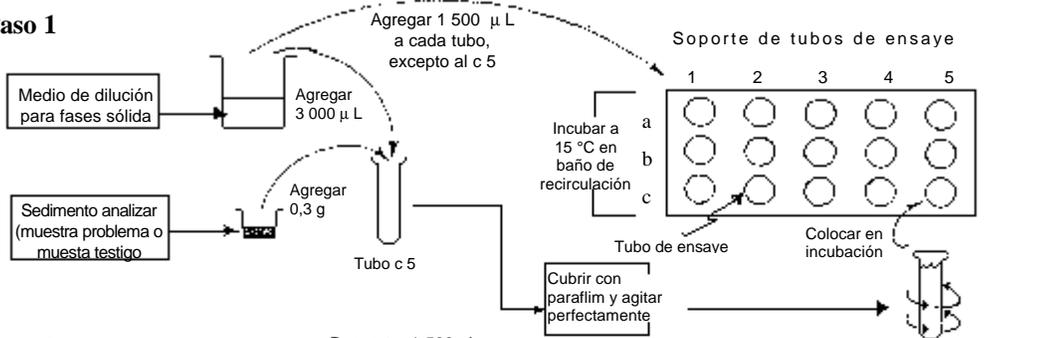
10.2.2. Para el caso de muestras extremadamente tóxicas, tanto de agua como de sedimento en las cuales no sea factible detectar bioluminiscencia, es indispensable prepara todas las diluciones necesarias, de acuerdo al inciso 10.2.3, para obtener el valor de CE₅₀ consultar el capítulo 11 de esta norma.

10.2.3 Preparación de diluciones

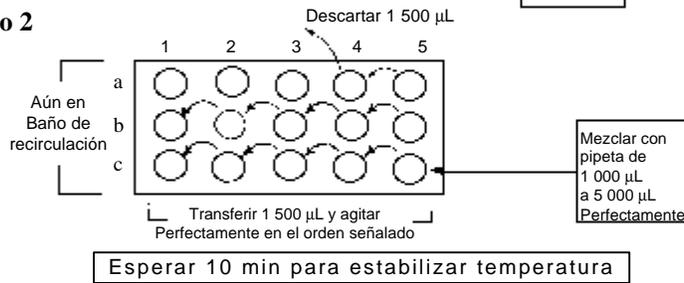
1.- Preparación de celdilla R

2.- Preparación de la muestra

Paso 1



Paso 2



Paso 3

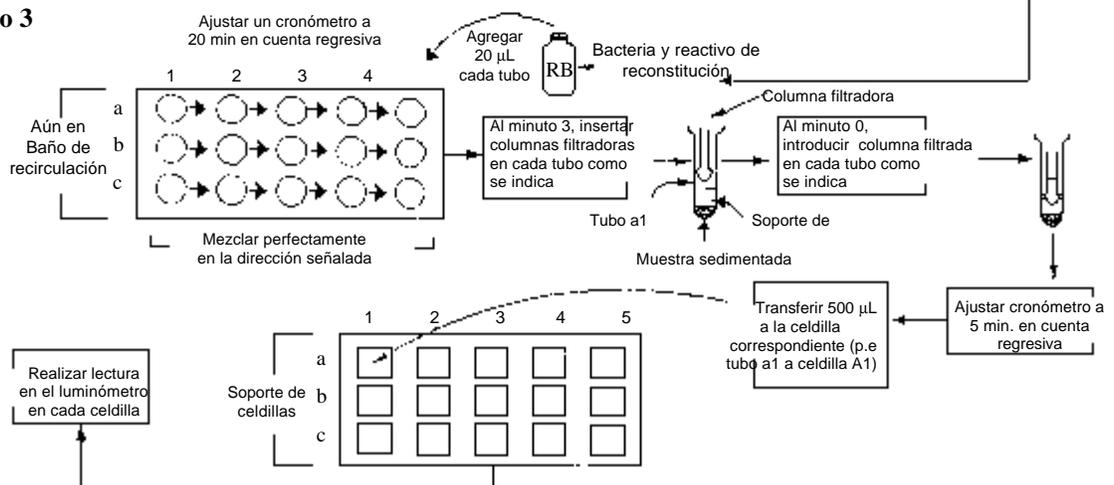


FIGURA 2.- Procedimiento para preparar muestras de fase sólida o sedimentos

Cualquier tren de diluciones puede funcionar; sin embargo, diluciones 1:10 son fáciles de efectuar. Para un volumen no mayor de las celdillas requeridas, se pueden utilizar 250 μL de muestra y 2 250 μL de medio de dilución para un volumen total de 2,5 μL . En caso de requerir diluciones mayores, preparar diluciones 1:100 y/ó 1:1 000.

Para la obtención del resultado, se debe considerar el factor de dilución utilizado.

10.3 Evaluación de sensibilidad

El laboratorio que realice pruebas de toxicidad con Photobacterium Phosphoreum debe validar la sensibilidad del organismo utilizando cualquiera de los 2 tóxicos de referencia señalado en los incisos 10.3.3.1 y 10.3.3.2 de esta norma. Esto se debe llevar a cabo en cuando se presente alguno de los siguientes casos:

- Se observen anomalías en la respuesta
- Se inicie el uso de un lote de bacterias
- Se inicie el análisis de un lote de muestras

10.3.1 los tóxicos de referencia deben tener como principales características las siguientes:

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

10.3.2 La sensibilidad de Photobacterium Phosphoreum se evalúan mediante la determinación del CE_{50} , empleando concentraciones establecidas de alguno de los tóxicos de referencia sugeridos: fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-OH}$) y sulfato de zinc (ZnSO_4). El método y las condiciones de prueba, deben ser los descritos en la presente norma, de acuerdo al inciso 10.1.

10.3.3 Tóxicos de referencia

10.3.3.1 Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-OH}$)

La CE_{50} que presenta este compuesto para Photobacterium Phosphoreum se encuentra entre 13 mg/L y 26 mg/L a un tiempo de exposición de 5 min. Este tóxico produce un efecto claro y rápido.

La solución patrón de fenol se prepara a una concentración de 100 mg/L y se conserva en un frasco ámbar a $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ de 3 meses a un meses.

Realizar el análisis con el estándar de fenol con lecturas a tiempos de 5 min. y 10 min.

10.3.3.2 Sulfato de zinc (ZnSO_4)

La CE_{50} que presenta este compuesto para Photobacterium Phosphoreum se encuentra entre 5 mg/L y 12 mg/L a un tiempo de exposición de 10 min.

La solución patrón de sulfato de zinc (ZnSO_4) se prepare a una concentración de 100 mg/L y se conserve en un frasco ámbar a $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, por un periodo máximo de 4 meses.

10.4 Los valores de CE_{50} determinados experimentalmente para los tóxicos de referencia, deben quedar dentro de los intervalos mencionados, en caso contrario, se tienen elementos para suponer cualesquiera de las siguientes posibilidades:

- Condiciones inadecuadas de almacenamiento de la bacteria liofilizada, siendo las principales, tiempo y temperatura.
- Reconstitución inadecuada de la bacteria.
- Uso de la bacteria después de 2h de haber sido reconstituida.

- Posible contaminación de alguno de los reactivos o materiales utilizados en el ensayo.
- Falta de pericia del analista .

10.5 Los tóxicos de referencia usados en esta norma pueden ser sustituidos por cualquier otro, siempre y cuando cumplan con las características señaladas en el inciso 10 . 3 . 1.

11 EXPRESION DE REULTADOS

Al término de la prueba, la CE_{50} , debe obtenerse mediante los siguientes cálculos:

11.1 Cálculo del valor de Gamma (Γ) para cada concentración:

$$\Gamma t = (I_{tc} / I_t) - 1$$

donde:

Γt es loa Gama al tiempo de incubación (t);

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

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

11.2 Graficar las Gammas contra la concentración de la muestra en papel para gráficas log-log (ver figura 3); interpolar a valor de Gamma igual a 1 para obtener la CE_{50} .

11.3 El procedimiento de fase sólida, se expresa a partir de la siguiente relación:

$$CE_{50R} = CE_{50M} - CE_{50T}$$

Siempre que: $CE_{50M} > CE_{50T}$

donde:

CE_{50R} es igual a la CE_{50} real obtenida para análisis en sedimentos;

CE_{50M} es igual a la CE_{50} de la muestra problema;

CE_{50T} es igual a la CE_{50} de la muestra testigo.

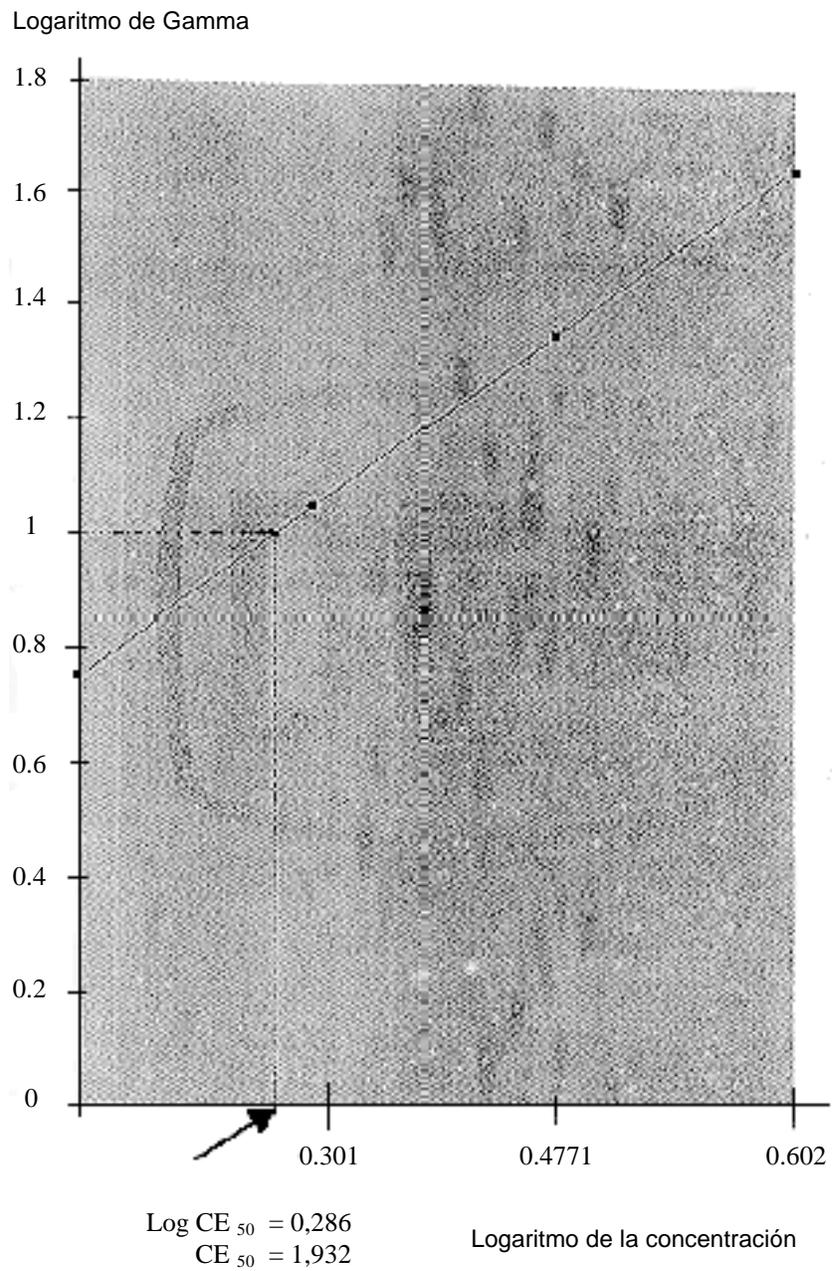


FIGURA 3.- Representación gráfica de la obtención de la concentración efectiva media (CE_{50})

12 INFORME DE LA PRUEBA

El informe de la prueba incluye especificar los siguientes puntos:

12.1 Localización de la cuenca hidrológica.

12.2 Nombre del cuerpo de agua receptor.

12.3 Datos del efluentes como sigue:

- a) Si se trata de pruebas en efluentes, indicar el nombre del responsable legal del efluente o descarga.
- b) Si es efluente industrial indicar los siguientes datos de la empresa: razón social, dirección, teléfono, que produce o fabrica, que materias primas utiliza, horario de operación.
- c) Si es efluente agrícola, indicar, lo siguiente: datos: localización, tipo(s) de cultivo(s) y en su caso, que fertilizante(s) se utiliza(n).
- d) Si es efluente urbano o municipal, indicar los siguientes datos: localización, nombre de la ciudad o municipio.

Para los casos descritos en b) c) y d), además se debe especificar lo siguiente:

- Caudal promedio ($m^3/día$); caudal promedio durante el muestreo (m^3/s) en caso de contar con sistemas de tratamiento, breve descripción del mismo; localización de punto(s) de muestreo seleccionado(s); método de colecta usado; fecha, periodo de 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 En el caso de pruebas de cuerpos receptores, se debe indicar lo siguiente:

localización de, punto(s) de muestreo; método de colecta usado; fecha, periodo 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 En el caso de pruebas en sedimento, se debe indicar

Profundidad; método utilizado para muestrear; tipo de sedimento aparente (Luminoso, rocoso, arenoso y cualquier otro); observaciones de campo; responsable(s) del muestreo.

12.6 En el caso de pruebas de lixiviados, se debe indicar Razón social de la empresa; dirección; teléfono; que tipo(s) de residuo(s) se dispone(n); horario de colecta de las muestras.

12.7 Datos a registrar durante la prueba de toxicidad:

Forma de almacenamiento y preservación de la(s) muestra (s); fecha del análisis; tipo de prueba realizada (en efluentes, cuerpos de agua, lixiviados y/o sedimentos; datos fisicoquímicos, en caso de análisis de agua, al inicio del análisis (ph, oxígeno disuelto y salinidad) y características aparentes (olor, color, turbiedad, presencia o ausencia de burbujas y espuma); registro de lectura al ajustar el luminómetro con celdilla control; lectura de emisión de luz de la bacteria en todas las celdillas de prueba a los tiempos de lectura establecidos; lectura de emisión de luz en las celdillas a los 5 min. y 15 min.; cálculo del valor de Gamma (Γ) para cada concentración; cálculo de la CE_{50} ; responsable(s) de la realización de la(s) prueba(s) de toxicidad .

Si los análisis son para fase sólida, indicar:

12.7.1 Registro de lectura al ajustar el luminómetro con celdilla ni lectura de emisión en las celdillas restantes y valores de CE_{50M} y CE_{50T} .

12.8 Análisis de resultados.

Se deben dar las tablas y gráficas derivadas de la prueba de toxicidad, proveer los valores de $CE_{50,0}$ de las pruebas de toxicidad con su respectivos limites de confianza al 95 %, así como las unidades de toxicidad obtenidas y método estadístico Utilizado; discusión de resultados.

12.9 Datos adicionales:

Indicar los tóxico de referencia utilizado en sensibilidad, CE_{50} obtenida y fecha de realización responsable(s) de la realización de la prueba.

12.10 Conclusiones y recomendaciones.

12.11 Si se contrata a una empresa consultora, laboratorio o cualquier otro, que lleve acabo los análisis indicar, razón social, representante legal, dirección teléfono.

13 BIBLIOGRAFIA

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

13.2 Bulichin. A.A. 1979.Use of luminescent Bacteria for Determining Toxicity in Aquatic Environments. (Utilización de la bacteria luminiscente para la determinación de la toxicidad en ambientes acuáticos) Aquatic Toxicology ASTM STP 667, L.L. Marking and R.A.Kimerle, Eds., American Society for Testing and Materials. 98-106 pp.

13.3 Bulich A.A.1990 , The luminescent Bacteria Toxicity Test: its Potential as an i n Vitro Alternative. (Prueba de toxicidad de la bacteria luminiscente: su potencial como una alternativa in Vitro) Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence 5:71-77.

13.10 Dezwart, D. and W. Slooff. 1983 The Microtox as an Alternative Assay in the Acute Toxicity Assessment of Water Pollutants. (El Microtox como un ensayo alternativo del análisis de toxicidad aguda de contaminantes d el agua). Aquatic toxicol 4:129-138 pp.

13.11 DIN 38 412 Parte 34 Determination of the inhibitory effect of waste water on the light emission of Photobacterium Phosphoreum. (Test using preserved luminescent bacteria) (Determinación del efecto inhibitorio de las aguas residuales sobre la emisión de luz de Photobacterium Phosphoreum.- prueba que utiliza una bacteria luminiscente Liofilizada)

13.12 Dutka, B. J., G.Bitton. 1986. Toxicity Testing Using Microorganisms. (Pruebas de toxicidad utilizando microorganismos) Vol. II. CRC Press, Inc. Florida. 202p.

13.13 EPA 1991 Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine organisms. (Métodos para medir la toxicidad aguada de efluentes y aguas receptoras con organismos marinos y dulceacuícolas) EPA/600/490/027.

13.14 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 Canada.

13.15 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. (Una comparación de tres procedimientos de ensayos microbianos para la evaluación de la toxicidad de residuos químicos). Arch. Environ. Contam, Toxicol., 14:659-667.

13.16 Kinne, O. 1971. Marine Ecology (Ecología Marina). Volume 1 Environmental Factors Part 2. Wiley Interscience. New York.

13.17 Mallak F.P. and R.L. Brunner. 1983 Determination of the Toxicity of Selected Metalworking Fluid Preservatives by Use of the Microtox System and an In-Vitro Enzyme Assay. (Determinación de la toxicidad de preservativos selectos de fluidos de acabados metálicos) In B.J.Dutka and D.Liu (ed.), Toxicity Screening Procedures Using Baterial Systems Toxicity Series, Vol. 1 Marcel Dekkar, New York. 65-76 pp.

13.18 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. (Comparación de los bioensayos microbianos para la detección de tóxicos en el agua) Water Res., 17(12):1757-1762.

13.19 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 Section, Freshwater Management Branch, Arthur Rylah Institute, Fisheries Division, Department of Conservation Forests and Lands.

13.20 Pielou, E.C .1 969. An Introduction to Mathematica l Ecology. (Introducción a la Ecología Matemática) Wiley Intersciencias John Wiley and Sons, New York.

13.21 SARH. 1992. ley de Aguas Nacionales. Publicada en el Diario Oficial de la Federación del 1 de diciembre de 1992.

13.22 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.

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 pp.

14 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma no concuerda con ninguna norma .internacional por no existir referencia alguna al momento de su elaboración, (ver Apéndice A).

APENDICE A INFORMATIVO

Cabe señalar que para la elaboración del la presente Norma Mexicana, se llevó a cabo tomando como base Investigación realizada a nivel nacional y con información consultada de normas extranjeras.

APENDICE B INFORMNTIVO

El sistema de extracción utilizado puede ser el Soxhlet o equivalente

México, D. F. a 6 Marzo de 1996

LA DIRECTORA GENERAL DE NORMAS
LIC. MARIA EUGENIA BRACHO GONZALEZ