

# INFORME FINAL 2012

## Proyecto TC1209.1

HERRAMIENTAS BIOLÓGICAS PARA EL ANÁLISIS DE TOXICIDAD Y DETECCIÓN DE EFECTOS ASOCIADOS A CONTAMINANTES, EN SISTEMAS ACUÁTICOS EPICONTINENTALES, COSTEROS Y AGUAS DE USO ANTROPOGÉNICO (2ª Parte).

*Desarrollo, adaptación y calibración de tecnologías*

Fotos: Yolanda Pica G.

*Daphnia magna*



*Brachionus plicatilis*



*Danio rerio*



M.C. Yolanda Pica Granados  
I.I.Q. Gissel Trujillo Domínguez  
M. I. Homero Hernández Salgado  
Lic. Farmacia. Katia Rosales Espinoza



**HERRAMIENTAS BIOLÓGICAS PARA EL ANÁLISIS DE  
TOXICIDAD Y DETECCIÓN DE EFECTOS ASOCIADOS A  
CONTAMINANTES, EN SISTEMAS ACUÁTICOS  
EPICONTINENTALES, COSTEROS Y AGUAS DE USO  
ANTROPOGÉNICO. DESARROLLO, ADAPTACIÓN Y  
CALIBRACIÓN DE TECNOLOGÍAS (2ª Parte).**

**INFORME FINAL 2012**

**PROYECTO INTERNO TC 1209.1**

**Coordinación de Tratamiento y Calidad del Agua  
Subcoordinación de Hidrobiología y Evaluación Ambiental**

**JEFE DE PROYECTO: M.C. Yolanda Pica Granados**

**PARTICIPANTES: Gissel Trujillo Domínguez  
Homero Hernández Salgado  
Katia Rosales Espinoza**



## ÍNDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1-7
2. OBJETIVO	7
3. METODOLOGÍAS	
3.1 Pruebas con <i>Danio rerio</i> .	8
3.1.1 Mantenimiento de adultos reproductores	8
3.1.2 Obtención de huevos	9
3.1.3 Prueba de alteración del desarrollo embrionario (ADE) con huevos de <i>D. rerio</i>	10 -14
3.2 Optimización del cultivo del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i>	14
3.2.1 Tolerancia de las microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus</i> sp a la salinidad Montaje de Cultivo del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i>	14 -16
3.2.2 Optimización del cultivo del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> .	16 – 18
3.3 Adaptaciones metodológicas de las NMX con <i>Daphnia magna</i> y <i>V. fischeri</i> a ISO, mejoras y observaciones.	18
3.3.1 Optimización de la producción de neonatos de <i>Daphnia magna</i> , en cultivos con medio ISO ( dureza de 250 mg Ca <sup>+2</sup> /L).	18
3.3.2 Análisis para la adaptación del método de análisis de toxicidad aguda con <i>Vibrio fischeri</i> a protocolo ISO y sus repercusiones técnicas	19 - 20
4. RESULTADOS	
4.1 Prueba de efectos teratogénicos en el desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> .	21 – 26

4.2 Optimización del cultivo de <i>B. plicatilis</i>	27
4.2.1 Tolerancia a la salinidad de dos especies de Microalgas	27 – 28
4.2.2 Optimización del cultivo del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> .	29 – 30
4.3 Adaptaciones metodológicas de las NMX con <i>Daphnia magna</i> y <i>V. fischeri</i> a ISO, mejoras y observaciones.	30
4.3.1 Optimización de la producción de neonatos de <i>Daphnia magna</i> , en cultivos con medio ISO (dureza de 250 mg Ca <sup>+2</sup> /L).	30 31
4.3.2 Análisis para la adaptación del método de análisis de toxicidad aguda con <i>Vibrio fischeri</i> a protocolo ISO y sus repercusiones técnicas.	31 - 34
5. CONCLUSIONES	35 - 36
6. BIBLIOGRAFÍA	37 - 38
7. ANEXOS	39
7.1 ANEXO A Producción Científica (Publicación del libro, y artículos)	40 – 48
7.2 ANEXO B Certificados de Registro de desarrollos tecnológicos en INPI	49
ANEXO B.1 Registro de Autor 03-2012-011312264800-01	50 – 52
ANEXO B.2 Registro de Autor:03-2012-011312240300-04	53 – 54
7.3 ANEXO C. Normas Oficiales Mexicanas y Normas Mexicanas	55
ANEXO C1 Proyecto de Norma Oficial Mexicana-SEMARNAT-2012. Que establece la lista de sustancias sujetas a reporte para el Registro de Emisiones y Transferencia de Contaminantes (RETC). EN CONSULTA PUBLICA	55 – 59
ANEXO C.2 PROY-NMX-AA-112-SCFI-2009 Análisis de calidad del agua y sedimentos. Evaluación de toxicidad aguda con <i>Vibrio fischeri</i> , (Beijerinck 1889), P. Baumann <i>et al</i> , 1980 (antes <i>Photobacterium phosphoreum</i> ).	60 -90

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Etapas de desarrollo de los diversos protocolos y adaptaciones metodológicas

Tabla 2. Condiciones para la obtención de los principios activos de diversos fármacos. Recuperación de principios activos

Tabla 3.. Características físicas de los cristales obtenidos de los principios activos de fármacos.

Tabla 4. Criterios para la determinación de efectos en el desarrollo embrionario de peces, de efecto de acuerdo a la OECD (2006)

Tabla 5. Indicadores de efecto letal y subletal recomendados para la evaluación de efectos en el desarrollo de embriones de *D. rerio* expuestos a contaminantes y fármacos

Tabla 6. Estadística de los resultados obtenidos dela comparación de los diseños de ISO y el modelo propuesto modificado al 100%. Resultados al tempo de exposición de 30 minutos.

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista de huevos viables y no viables	9
Figura 2. Estadio de Gástrula ( <i>Danio rerio</i> )	13
Figura 3. Diseño experimental para el análisis de la tolerancia a la salinidad de dos especies de microalgas, <i>C. vulgaris</i> y <i>Scenedesmus sp</i>	15
Figura 4. Diseño experimental para discernir las condiciones óptimas de salinidad, dieta para el cultivo de <i>Brachionus plicatilis</i>	17
Figura 5. Diseños de pruebas ISO y modelo simplificado sugerido para la experimentación de comparación de resultados	20
Figura 6. Efectos en embriones de <i>D. rerio</i> expuestos al desinfectante acriflavina	21
Figura 7. Efectos en embriones de <i>D. rerio</i> expuestos a Bisfenol A	22
Figura 8. . Efectos en embriones de <i>D. rerio</i> expuestos a Cromo VI	22

---

Figura 9. . Efectos en embriones de <i>D. rerio</i> expuestos a Metanol	23
Figura 10 . Efectos en embriones de <i>D. rerio</i> expuestos a Estradiol y Ranitidina	23
Figura 11. Efectos en embriones de <i>D. rerio</i> expuestos a Fluoxetina y Paracetamol	24
Figura 12 Efectos en embriones de <i>D. rerio</i> expuestos a Naproxeno	25
Figura 13. Comportamiento de la densidad algal de <i>Scenedesmus sp</i> , expuesta a diferentes concentraciones de la salinidad (g/L)	27
Figura 14 . Comportamiento de la densidad algal de <i>Chlorella vulgaris</i> , expuesta a diferentes concentraciones de la salinidad (g/L)	28
Figura 15 Cambios de la densidad del cultivo del rotífero <i>B. plicatilis</i> a diferentes salinidades bajo régimen de alimentación con <i>Chlorella vulgaris</i> (131.6 x 10 <sup>6</sup> cél/mL )	29
Figura 16 . Cambios de la densidad del cultivo del rotífero <i>B. plicatilis</i> a diferentes salinidades bajo régimen de alimentación con <i>Chlorella vulgaris</i> (51.41 x 10 <sup>6</sup> cel/mL )	29
Figura 17. Cambios de la densidad del cultivo del rotífero <i>B. plicatilis</i> a diferentes salinidades bajo régimen de alimentación con <i>Scenedesmus sp</i> (74 x 10 <sup>6</sup> cél/mL )	30
Figura 18. Cambios de la densidad del cultivo del rotífero <i>B. plicatilis</i> a diferentes salinidades bajo régimen de alimentación con <i>Scenedesmus sp</i> (28.54 x 10 <sup>6</sup> cél/mL )	30
Figura 19. . Comportamiento de la reproducción de <i>D. magna</i> asociado a diverso dietas	31
Figura 20. Comportamiento de la respuesta de <i>Vibrio fischeri</i> a metales y compuestos orgánicos asociado al uso de medio de dilución de distinta composición.	32



---

## HERRAMIENTAS BIOLÓGICAS PARA EL ANÁLISIS DE TOXICIDAD Y DETECCIÓN DE EFECTOS ASOCIADOS A CONTAMINANTES, EN SISTEMAS ACUÁTICOS EPICONTINENTALES, COSTEROS Y AGUAS DE USO ANTROPOGÉNICO. DESARROLLO, ADAPTACIÓN Y CALIBRACIÓN DE TECNOLOGÍAS (2ª Etapa).

### PROYECTO INTERNO TC 1209.1

#### 1. INTRODUCCIÓN

Una causa fundamental del desarrollo tecnológico en materia de ecotoxicología es proveer herramientas biológicas que permitan evaluar e inferir en el corto y largo plazo los efectos en los organismos, (incluidos plantas, animales y microorganismos) y ecosistemas, por su exposición a contaminantes convencionales y emergentes.

El abordar la problemática desde la visión ecológica resulta compleja por lo intrincado de las interacciones, sin embargo es posible llegar a buenas aproximaciones del diagnóstico ambiental si se emplean herramientas que permitan discernir los daños a los sistemas naturales causados por contaminación o manejo así como los efectos potenciales.

El determinar los efectos en la biota requiere de procedimientos adecuadamente planteados que puedan ser empleados como elementos de medición de utilidad para lograr la integración adecuada de elementos diagnósticos en el análisis de riesgo ambiental, para ello son tres los principales grupos de elementos de utilidad; el primero corresponde a la información química que aporta datos sobre concentraciones de xenobióticos y su variabilidad en el ambiente, el segundo las pruebas ecotoxicológicas que permiten establecer el vínculo entre los contaminantes identificados y los efectos adversos y el tercero, el análisis de las comunidades preexistentes en el ambiente, respecto a las cuales los datos de los dos primeros grupos se contrastan.

Sin lograr la integración de los datos de los tres grupos mencionados, otras causas probables de la alteración ambiental, tales como alteración del hábitat por transformación y manejo, o la variabilidad natural, no podrían ser diferenciadas.

Para cada grupo de herramientas de medición, el lograr métodos de evaluación confiables, calibrados, analíticamente robustos y lo suficientemente sensibles para detectar cualquier forma de acción de los xenobióticos en los sistemas vivos, es una condición indispensable para lograr evidencias de los efectos más relevantes los cuales son de importancia para la construcción de una matriz de información que ayude en el discernimiento de las causas, relevancia y efectos ambientales, de otra manera esto no se lograría con la asertividad necesaria. (Zacharewski, 1997; Ankley *et al.*, 1998; Routledge *et al.*, 1998; Kortenkamp, 1999; Matsui, 2000; Tanaka *et al.*, 2001; Witters *et al.*, 2001; Kolpin *et al.*, 2002).

En vista de lo anterior el presente proyecto iniciado en el año 2011 con continuidad en 2012 se ha efectuado para desarrollar y/o adaptar herramientas biológicas para su aplicación en el contexto ambiental, con el fin de lograr el desarrollo o adaptación de procedimientos de análisis biológico que permitan la evaluación de los posibles efectos de la amplia gama de xenobióticos que actualmente residen en los ecosistemas, incluidos tanto los contaminantes convencionales enlistados en normas, como los compuestos emergentes, respecto a los cuales es necesario intensificar la investigación para el desarrollo de técnicas analíticas biológicas y químicas que sean de utilidad para su identificación en el ambiente y para la definición de efectos en la biota y del riesgo al ambiente.

Se incluyeron diversos desarrollos experimentales, algunos de ellos con la visión de avanzar en el establecimiento de técnicas que permitan atender problemas ambientales que son potencialmente graves en México, pero que sin embargo al carecer de la base técnica han sido poco abordados, como es el caso de los compuestos emergentes, la definición de los problemas de contaminación tóxica de la zona costera, florecimientos algales, entre otros, y así mismo de algunos otros encausados a otorgar apoyo a la autoridad para proveerla de los esquemas técnicos actualizados para el análisis de toxicidad aguda para el control de la calidad del agua, que quedaron enmarcados en protocolos de normas mexicanas de aplicación nacional y de elementos útiles para la definición de esquemas de control de la contaminación y del marco normativo requerido para la aplicación de sanciones.

Así mismo, el proyecto dio continuidad a los avances logrados por la línea de trabajo a lo largo de la última década, entre los que se cuentan las pruebas de toxicidad con *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Panagrellus redivivus*, *Hydra attenuata*, entre otros, modelos funcionales o pruebas de detección de toxicidad aguda, que en la mayoría de los casos ponen en evidencia la presencia de contaminantes que afectan de forma terminal a los organismos, ya sea por su dosis o por la cinética en que opera una vez dentro del organismo expuesto. Esta clase de pruebas han sido muy útiles en el monitoreo ambiental ya que con ellas pueden establecerse condiciones de descarga que minimicen el daño a cuerpos receptores así como la construcción de bases de datos para la evaluación inicial de sustancias químicas de uso ambiental, entre otros.

Más recientemente, y en vista de la evolución que han tenido los problemas ambientales y particularmente aquellos asociados a sustancias no convencionales clasificadas como contaminantes emergentes, a la contaminación del ambiente costero, y a la evolución del esquema regulatorio en materia de control de calidad del agua donde se incluye a las pruebas de toxicidad como parámetro de control, a partir del 2009 se inició el desarrollo de nuevos modelos funcionales, en 2010 se inició la experimentación para la creación de un protocolo que permitiera para evidenciar los efectos asociados a la presencia de contaminantes emergentes como son el análisis de letalidad con alevines de *Danio rerio*,

y en 2011 y más específicamente para este tipo de compuestos, la prueba de desarrollo larvario con embriones de ésta misma especie, año en el que se adecuó y calibró también el método de respuesta subletal con microalgas inmovilizadas *Pseudokirchneriella subcapitata*, apto para pruebas en campo (*in situ*), y la adaptación del método de evaluación de factores limitantes para el análisis de crecimientos algales. En 2012 se dio continuidad al desarrollo de la prueba con embriones de *D. rerio* y se inicio el desarrollo de método de prueba para análisis de aguas salobres y/o costeras. Para ello se eligió al rotífero *Brachionus plicatilis* por su distribución en territorio nacional, factibilidad de cultivo y probable sensibilidad de acuerdo a algunos reportes en la literatura internacional (EPA, 1985; Snell & Persoone, 1989; Alayo y Iannacone, 2002), lo cual involucró pruebas accesorias de tolerancia a la salinidad de microalgas de agua dulce, las cuales se empelarían como alimento a *B. plicatilis* y así mismo permitirían discernir cuales son aptas para el análisis de aguas salobres.

Para cada desarrollo y/o adaptación efectuados a lo largo del presente proyecto, ha sido necesario ir cubriendo las diversas fases de avance que requiere la consolidación de un procedimiento analítico para pruebas biológicas. Cada una de ellas involucra diversos diseños experimentales para los ajustes metodológicos necesarios a fin de que el protocolo final logre confianza y robustez estadística.

Para algunos procedimientos, las condiciones del mantenimiento de cultivo y los criterios de control de su calidad suele estar resueltos en la literatura, lo cual reduce significativamente el tiempo que este proceso puede llevar cuando esos mismos organismos se desean emplear en métodos modificados o nuevos protocolos, tal es el caso de la microalga *P. subcapitata* o el cladóceros *D. magna*, sin embargo en otros casos como con el pez *D. rerio* la información es parcial o imprecisa y en el caso de los rotíferos (*B. plicatilis*) insuficiente, por lo que en para ellos el establecimiento del cultivo y la búsqueda de sus indicadores de optimización del desarrollo es más amplio (tabla 1).

En dicha tabla se observa resaltado en áreas sombreadas los aspectos que fueron abordados para el año 2012, temas que constituirán el contenido de éste informe así como los productos entregables que consisten en 1 libro, 1 artículo y 1 metodología validada cuya evidencia se integrara en los Anexos de éste informe, además de otras aportaciones adicionales..

A lo largo de esos mismos años y en apoyo a la CONAGUA, se efectuó investigación para la adaptación al modelo ISO de los protocolos de prueba para la determinación de la toxicidad aguda con *Daphnia magna* y con *Vibrio fischeri* lo cual involucró cambios en el formato de cultivo del cladóceros y así mismo recalibración de los métodos de análisis y modificación de los valores que definen los criterios de calidad analíticos.

Tabla 1. Etapas de desarrollo de los diversos protocolos y adaptaciones metodológicas

	Fases de desarrollo o adaptación tecnológica				
	Optimización del cultivo	Montaje procedimiento de prueba	Calibración interna	Ámbito de sensibilidad.	Pruebas de campo
<i>Danio rerio</i> letalidad	2009	2010	2010	2011	2011
<i>Danio rerio</i> desarrollo larvario	2009	2010-2011	2010	2011	2012
<i>P. subcapitata</i> algas inmovilizadas	R	2010 - 2011	2011	2011	-
Factores limitantes para desarrollo algal , <i>P. subcapitata</i>	R	2011	2011	NA	2011
Tolerancia algal a la salinidad. <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus sp</i>	2012	2012			
. Montaje del método de prueba con <i>Brachionus plicatilis</i>	2012				
	Adaptación metodológica a ISO (apoyo a CONAGUA)				
Adaptación a ISO NMX-087-AA <i>Daphnia magna</i>	2011-2012	2011-2012	2011- 2012	NA	NA
Adaptación a ISO NMX-112-AA <i>Vibrio fischeri</i>	R	2012	2012	NA	NA

R= Resuelto previamente

### Contexto Internacional.

El creciente interés por la aplicación de pruebas biológicas se ha universalizado, y actualmente operan requerimientos regulatorios que incluyen datos relacionados a pruebas de toxicidad con peces, especialmente en toma de decisiones relacionadas a la evaluación de riesgo ambiental y clasificación de peligrosidad. Por ejemplo, en la Unión Europea, los requerimientos para nuevas sustancias son incluidas en los anexos del Concil Directorated 67/548/EEC en apego a las leyes, regulaciones y procedimientos administrativos que aplican a la clasificación de sustancias de uso ambiental que se

suponen peligrosas (EC, 1967). En estos casos, la cantidad de datos solicitados relacionados con posibles efectos biológicos o de seguridad ambiental se incrementan en función de la cantidad de la sustancia puesta en el mercado, y son sujetas de esta solicitud todas aquellas sustancias cuya producción excede de una tonelada por año (European Commission, 1992).

En estas disposiciones internacionales, creadas para regular la autorización de uso y producción de nuevas sustancias, por lo general se incluye un grupo de pruebas de evaluación de efectos biológicos como son: toxicidad aguda con dáfnidos (*Daphnia magna* CL<sub>50</sub> a 48h), crecimiento o inhibición de algas (*Pseudokirchneriella subcapitata* CE<sub>50</sub> a 96h) y mortalidad en peces (CL<sub>50</sub> a 96h). Una vez que estas evaluaciones son realizadas por parte de los productores, los datos son manejados por la European Chemical Bureau (ECB), de Italia, para estimar las dosis de seguridad aceptables, que por lo regular se basan en predicciones de riesgo que tienen por objeto establecer la dosis de efecto no observable (NOEC). Estas dosis y la clasificación de peligrosidad que se haga de la sustancia, son incorporadas a la Base de Datos de la ECB desde donde es controlada su producción y comercialización.

Las pruebas biológicas, y más específicamente las pruebas con peces, también son clave como herramientas para el control de efluentes. Tal es el caso de del programa WET (Whole Effluent Toxicity) que opera en los Estados Unidos y del WEA (Water Environmental Assessment de la; OSPAR), que es su contraparte en Europa. Ambas organizaciones, mediante estos programas han aportado datos y orientado sus pautas de regulación de efluentes mediante la evaluación de toxicidad con peces. Actualmente, la problemática en torno a las sustancias clasificadas por sus efectos en la reproducción y desarrollo como Agentes de Disfunción Endocrina (ADE) o contaminantes emergentes, ha generado la necesidad de buscar indicadores biológicos más aptos para la detección de estas sustancias. Para ello, los peces continúan siendo el nivel taxonómico más adecuado, sin embargo, principalmente en Europa, la comunidad científica se ha encausado al uso de embriones, al análisis de los estadios de desarrollo y genética del pez Medaka (*Oryzias latipes*) y del pez cebra (*Danio rerio*), los cuales son empleados como modelos biológicos que permiten discernir las formas de acción de estas sustancias y así mismo determinar su presencia en el ambiente y el riesgo potencial al hombre, toda vez que el proceso de desarrollo y su genética, son afines al ser humano.

En suma, las regulaciones en muchos países de Europa y en Estados Unidos, actualmente requieren de evaluaciones de toxicidad aguda y crónica con peces, tanto para la autorización de producción y comercialización internacional de sustancias puras, las cuales en su mayor parte son empleadas como materia prima en la industria, como para el control ambiental, basado en la evaluación de riesgo y en los programas de control de descargas, los cuales tienen como fin último y de largo plazo la mejora y vigilancia de la calidad de los ambientes de producción alimentaria ya que de ellos depende la sanidad de los productos de consumo que se obtienen.

Estas acciones de regulación sobre sustancias de producción antropogénica y la creación de programas internacionales de monitoreo ambiental son de gran alcance comercial y por tanto económico, ya que las disposiciones internacionales de este orden no solo se enfocan al control de la producción o de los ambientes afectados confinados a las fronteras de estos países, estas acciones apuntan al control de la comercialización de productos y alimentos provenientes de otros sitios, los cuales deberán cumplir con estándares ambientales adecuados de acuerdo a los criterios de calidad establecidas por organizaciones internacionales (Escher & Hermens, 2002), por lo que México debe responder generando la base tecnológica que permita el manejo de las herramientas analíticas basadas en pruebas biológicas y específicamente con peces, que serán de empleo común en el marco de las regulaciones internacionales mencionadas.

### **Los peces como modelo biológico para evaluación de riesgos y de sustancias contaminantes**

La selección de los peces como grupo taxonómico monitor por una amplia diversidad de grupos especializados, se fundamenta en el hecho de que son ellos la única clase de vertebrados primarios acuáticos. Tradicionalmente se han considerado como un componente indispensable del grupo de organismos necesarios en una evaluación integral de la toxicidad de una sustancia de aplicación en el ambiente o de un sistema acuático.

Además los peces se diferencian del resto de los organismos acuáticos por sus capacidades metabólicas, las cuales al ser estudiadas permiten lograr indicadores muy útiles que pueden asociarse con procesos o formas de acción de contaminantes específicos, razón por la cual los peces han sido empleados como organismos centinelas para el seguimiento de la calidad del agua, incluso de fuentes para el consumo humano.

Dada la importancia de los peces en el monitoreo de la contaminación, a nivel internacional se han implementado regulaciones y guías metodológicas para la aplicación y manejo de pruebas de toxicidad con peces como son las de la OECD, mismas que se diversifican en guías para prueba aguda (OECD 203), evaluación de toxicidad sobre estadios de desarrollo (OECD 210), prueba de toxicidad con alevines (OECD 212) y de crecimiento con juveniles (OECD 215). Estas guías se encuentran en activa transformación, en el intento de lograr con ellas métodos adecuados para abordar los problemas ambientales asociados a las sustancias químicas que actualmente aquejan a muchos países y con un enfoque cada vez mayor a la aplicación de indicadores que permita hacer un pronóstico de mas largo plazo que ponga en evidencia las formas de acción de los contaminantes emergentes y agentes de disfunción endocrina, los cuales por lo general se contienen en mezclas complejas.

Con este objetivo, los grupos de expertos de la OECD han desarrollado y modificando protocolos de prueba incorporando respuestas de evaluación (end points) cada vez más sofisticadas pero a su vez más útiles para el pronóstico y control de sustancias, tal

es el caso del uso de técnicas embrionarias y moleculares como PCR que permite la identificación de errores en la secuenciación genómica asociada a una disfunción de órganos, sistemas o incluso de una función como es la reproducción (Sumpter, 1995, Muncke, 2007;).

Con base en el escenario descrito anteriormente en el que el avance, desarrollo y adaptación de métodos biológicos más acordes con las problemáticas ambientales que imperan tanto en México con en otros países ocupan un lugar de atención debido a su potencial como herramientas analíticas de empleo en regulaciones internacionales y determinantes para la toma de decisiones dentro del contexto ambiental e incluso comercial, se consideró de gran relevancia incursionar en la instrumentación y adecuación de dos modelos funcionales con pez cebra *Danio rerio*, a fin de adaptar los protocolos y someter a prueba cada parte de su desarrollo con el fin de lograr el establecimiento del método de prueba dentro de un marco de gestión de la calidad.

Los modelos propuestos para ello son: la determinación de toxicidad aguda de alevines (mortalidad por daño fisiológico y metabólico), y alteración del desarrollo embrionario y adecuación (método DarT) (Jobling *et al.*, 1998; Nagel, 2002; Muncke & Eggen, 2006;). Estos métodos, por su sensibilidad, han sido recomendados por van der Ven y colaboradores, (2007), así como por Nagel (2002) para la detección de contaminantes emergentes, teratogénicos y/o de disfunción endocrina (estrogénica y androgénica), entre otros.

Los contaminantes emergentes causantes de disfunción endocrina (DE), se encuentran en aguas no tratadas y en aguas naturales superficiales, subterráneas, así como en descargas industriales y municipales, e incluso persisten en aguas residuales tratadas mediante procesos convencionales. Por esto también es importante vincular el uso de estas herramientas biológicas, en la evaluación de la efectividad de la remoción de plantas de tratamiento y así mismo en la investigación, desarrollo y/o adaptación de tecnologías de saneamiento (Routledge & Sumpter, 1996; Zacharewski, 1997; Ankley *et al.*, 1998; Routledge *et al.*, 1998; Ahel *et al.*, 2000; Matsui, 2000; García –Reyero, *et al.* 2001; Tanaka *et al.*, 2001; Witters *et al.*, 2001; Kolpin *et al.*, 2002) .

## 2. OBJETIVO

Desarrollar y adaptar metodologías basadas en la respuesta biológica para la detección de efectos asociados a contaminantes convencionales y emergentes, en ambientes epicontinentales, costeros y en aguas de uso antrópico, que sean de utilidad en estudios ecotoxicológicos, de evaluación de riesgo ambiental y para su vinculación con la salud humana



### 3. METODOLOGÍA

El desarrollo del proyecto abordó diferentes vertientes experimentales encausadas al refinamiento metodológico de los protocolos en creación y/ o adaptación a fin de evolucionar en sus diversas fases de avance, y así mismo brindar el apoyo técnico a al CONAGUA para la actualización y adaptación a ISO de los protocolos de norma en materia de evaluación de la toxicidad aguda. En este sentido las metodología y los diseños experimentales desarrollados, que quedan explícitos en este apartado, pueden considerarse también como resultados, toda vez que el objetivo del presente proyecto es el diseño de protocolos cuya optimización se pone a prueba a través de ensayos de evaluación de los diseños experimentales, cuyos datos se presentaran en el apartado de resultados.

La metodología específica para cada prueba tiene objetivos particulares que se explicaran y así mismo la pauta o procedimiento que se aplicó para su demostración.

#### **3.1 Pruebas con *Danio rerio*.**

De empleo, en este proyecto, para dar continuidad a pruebas de sensibilidad en el análisis de efectos en el desarrollo embrionario y en el análisis de muestras de campo y calibración con pruebas de letalidad con alevines a fin de determinar los indicadores morfológicos más relevantes para determina los efectos asociados a la exposición de contaminantes y fármacos seleccionados.

##### **3.1.1 Mantenimiento de adultos reproductores**

El cultivo se mantiene en agua dulce natural filtrada para eliminar carga orgánica o residuos de cloro y que cumple con una dureza de 80 a 100 mg/L como  $\text{CaCO}_3$ ).

Los organismos empleados fueron obtenidos a partir de cultivos de laboratorio y mantenidos en condiciones controladas a  $25 \pm 2$  °C con un fotoperíodo de 16h luz/8h oscuridad bajo una intensidad luminosa de 1000 lux.y alimentados dos veces al día con alimento en hojuela balanceado JBL Novogrand. a una proporción de 0 .3g/20 organismos

Los peces adultos reproductores se mantuvieron en acuarios de 40L, separados hembras de machos, con una densidad poblacional de no más de 20 organismos por acuario empleando agua del cárcamo filtrada mediante sistema en línea para la eliminación de residuos orgánicos, cloro, algas y bacterias, para el recambio y recuperación de los volúmenes extraídos durante la limpieza diaria.



### 3.1.2 Obtención de huevos.

Se obtienen machos y hembras de los acuarios de mantenimiento en una relación de 2:1, respectivamente, logrando un total de 9 organismos (6 machos y tres hembras). Los peces se colocan en el interior de una canasta plástica (cámara de apareamiento) que se mantiene sumergida en el acuario de 40L, suspendida a unos 10 cm del fondo. Esta operación se lleva cabo al atardecer para que las pautas de apareamiento y estimulación gonádica se desarrollen durante toda la noche y al amanecer, el estímulo lumínico promueva la expulsión de gametos masculinos y femeninos y la fecundación externa de los huevos.

Los huevos fecundados escapan de la depredación de los padres al atravesar las paredes de la canasta plástica y se depositan en el fondo del acuario o en un receptor de huevos

o refractario previamente desinfectado que ocupa el fondo. Por la mañana, los huevos fecundados se sacan del acuario de apareamiento, ya sea por sifoneo o extrayendo el recipiente receptor, para su limpieza y desinfección empleando medio E3 (Muncke y Eggen, 2006).

Posteriormente los huevos se revisan al microscopio para verificar su condición y estadio inicial empleándose solo aquellos que son viables para el montaje metodológico (figura. 1).

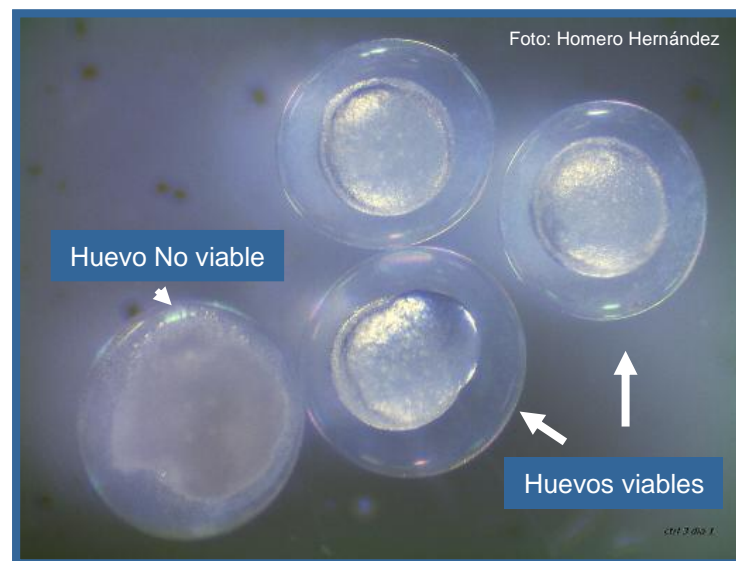


Figura 1. Vista de huevos viables y no viables

## Procedimiento de prueba

### 3.1.3 Prueba de alteración del desarrollo embrionario (ADE) con huevos de *D. rerio*

Basado en el procedimiento United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. Fish acute toxicity test, freshwater and marine. Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.1075. EPA 712-C-96-118.

Partiendo de una muestra problema, se preparó una serie de diluciones empleando agua semidura reconstituida como medio de dilución y un control negativo con el agua antes mencionada. Se empleó un factor de dilución de 1:1 para preparar la serie de concentraciones.

Las pruebas de alteración del desarrollo embrionario se destinaron a la evaluación de los efectos teratogénicos de diversos contaminantes y fármacos considerados compuestos emergentes tales como el Bisfenol A, cromo, metanol, y fármacos como el estradiol (hormona esteroidal), analgésicos como el naproxeno, diclofenaco y paracetamol, bloqueadores de estímulo vagal como la ranitidina, y antidepresivos como la fluoxetina.

Para el análisis de los diversos fármacos se emplearon productos grado farmacéutico que para la mayoría de los casos fueron de marca genérica, solo el estradiol se adquirió de laboratorio. Para la liberación de los principios activos de cada formulación se empleó el método químico de recuperación y purificación desarrollado como método paralelo a las actividades de éste proyecto en el 2011 y que consiste en la trituración, disolución con solventes específicos, filtrado o adsorción de impurezas en columnas de octadecil, rotoevaporación, cristalización y confirmación del principio activo por medio del análisis de punto de fusión. En las tablas 2 y 3 se especifican las características de cada paso metodológico para los fármacos mencionados y las características de sus cristales.

A través de los ensayos con las diversas sustancias antes mencionadas, se fueron reforzando o ampliando la lista de rasgos de alteración morfológica de utilidad para determinar los efectos posibles de los contaminantes, inicialmente basada en los indicadores propuestos por la guía de la OECD (2006) (tabla 4). Esta fase del proyecto dio continuidad a los avances logrados durante la fase anterior llevada a cabo en el 2011 (tabla 1).

Tabla 2. Condiciones para la obtención de los principios activos de diversos fármacos

Fármaco	Solubilización	Filtración	Rotaevaporación
<b>Paracetamol</b>	Metanol	Octadecyl c18	120rpm 60°
<b>Naproxeno</b>	Metanol		
<b>Ranitidina</b>	Metanol	Embudo de F.	
<b>Carbamazepina</b>	Etanol		
<b>Cetirizina</b>	Agua		
<b>Diclofenaco</b>	Metanol Carbón A.		
<b>Estradiol</b>	Metanol Carbón A.		
<b>Fluoxetina</b>	Metanol		
<b>Ibuprofeno</b>	Metanol Carbón A.		
<b>Ketorolaco</b>	Metanol		

Tabla 3. Características físicas de los cristales obtenidos de los principios activos de fármacos.

Principio Activo	Características físicas	Punto de Fusión
<b>Paracetamol</b>	Polvo blanco cristalino	170-171°C
<b>Naproxeno</b>	Polvo cristalino blanco o casi blanco	149.4-150.1°C
<b>Ranitidina</b>	Polvo blanco a amarillo	140-141
<b>Carbamazepina</b>	Polvo cristalino blanco o blanco amarillento	192.1-193°C
<b>Cetirizina</b>	Polvo cristalino blanco	113.5-114.1°C
<b>Diclofenaco</b>	Polvo o cristales blancos o amarillo claro	295 - 298 °C
<b>Estradiol</b>	Polvo blanco	175-178°C
<b>Fluoxetina</b>	Sólido blanco a blanco cristalino	156-160°C
<b>Ibuprofeno</b>	Polvo amarillo	96.5 – 97°C
<b>Ketorolaco</b>	Polvo Cristalino amarillo	130-136°C

Tabla 4. Criterios para la determinación de efectos en el desarrollo embrionario de peces, de efecto de acuerdo a la OECD (2006)

Indicador de efecto	Edad de desarrollo						
	4h	8h	12 h	16h	24 h	36 h	48 h
<b>1. Huevos coagulados</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>2. Formación de somitas</b>				+	+	+	+
<b>3. Desprendimiento de la cola</b>					+	+	+
<b>4. Presencia de latido cardiaco</b>						+	+

Nota: Si cualquiera de los criterios señalados no se cumple en el tiempo adecuado del desarrollo (2 a 4) o se presentan huevos coagulados (1), se considera que el embrión está muerto

El protocolo base consistió en emplear placas de 16 pozos con capacidad de 4 mL cada pocillo en cuyo interior se colocaron 2 mL de la muestra para evaluación o medio de desarrollo (control) por triplicado. En cada pocillo se colocaron tres huevos provenientes de un stock recién fecundado que se encontraba en etapas iniciales de desarrollo o gástrula con menos de < 6 h de desarrollo (figura 2).

La revisión de los efectos o avance del desarrollo se efectuó cada 24 horas con el fin de registrar retrasos o malformaciones y tomar los registros fotográficos y documentales necesarios.



Figura 2. Estadio de Gástrula (*Danio rerio*)

## *Montaje y lectura de experimento*

Para los experimentos se procedió al montaje de cámaras de reproducción para obtener los huevos (ver 3.1.2). Por la mañana los huevos fueron recolectados, revisados bajo el microscopio y se seleccionaron huevos viables para efectuar la experimentación. Los huevos fueron desinfectados en medio E3.

Después de la desinfección se efectuaron revisiones cada dos horas durante las primeras 6 h de la experimentación, a fin de determinar si los huevos continuaban siendo viables hasta ese momento.

Posteriormente, se llevaron a cabo revisiones al microscopio cada 24 h, para revisar la morfología del organismos a fin de determinar alteraciones del desarrollo o retraso del mismo, contrastando con las imágenes y los diagramas que documentan en la literatura el proceso normal (Kimmel *et al* 1995; Braunbeck & Lammer, 2006), así como el tiempo de eclosión el cual en condiciones controladas de temperatura a 26 °C y de ciclo de luz : oscuridad de 16 :8h, debe ser de 72 h.

## **3.2 Optimización del cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis***

### *3.2.1 Tolerancia de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* a la salinidad.*

El abordar éste aspecto, tuvo por objetivo el determinar el ámbito de tolerancia a la salinidad de dos especies de microalgas, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.*, con el fin de poder suministrarlas como alimento vivo al cultivo del rotífero de agua marina *B. plicatilis*.

Con el deseo de tener una propuesta metodológica para desarrollar pruebas de toxicidad aguda en aguas costeras o muestras salinas, empleando al rotífero *B. plicatilis*, se diseñaron para su primera etapa, de optimización del cultivo, una serie de experimentos. Los primeros encausados a elegir a la especie de alga más adecuada para su alimentación. Para ello se emplearon dos especies de algas de agua dulce con alto valor nutricional tanto para los invertebrados del zooplancton (rotíferos) como para larvas y estadios juveniles de moluscos, crustáceos y ciertos peces herbívoros (Guerra y Romero, 2009)

La salinidad es un factor abiótico importante y limitante para que en cultivo la población algal logre una densidad celular adecuada para sostener la alimentación de los cultivos de invertebrados o peces. Dependiendo de su tolerancia a la salinidad, cuando se excede el contenido óptimo de sales del medio, las microalgas responden a esos cambios regulado su tamaño o volumen celular y hacen ajustes a su membrana celular para regular la

presión osmótica que ejercen las sales del medio, a fin de evitar daños orgánicos irreparables.

Un aumento de la salinidad que excede el ámbito de tolerancia de una especie en particular, provoca que las células algales liberen iones y agua, sinteticen compuestos orgánicos que le son dañinos, que disminuyan la fijación de CO<sub>2</sub> y que afecten el metabolismo del nitrógeno (Donni, 2009).

Debido a ello, cuando se desea establecer las condiciones adecuadas para la proliferación de especies microalgales es importante reconocer su ámbito de tolerancia a diversos factores limitantes, tales como la salinidad, a fin de lograr producir cultivos saludables y suficientemente abundantes que permitan satisfacer las necesidades de alimentación de cultivos de invertebrados como cladóceros, peces y en particular de rotíferos (López, 2009).

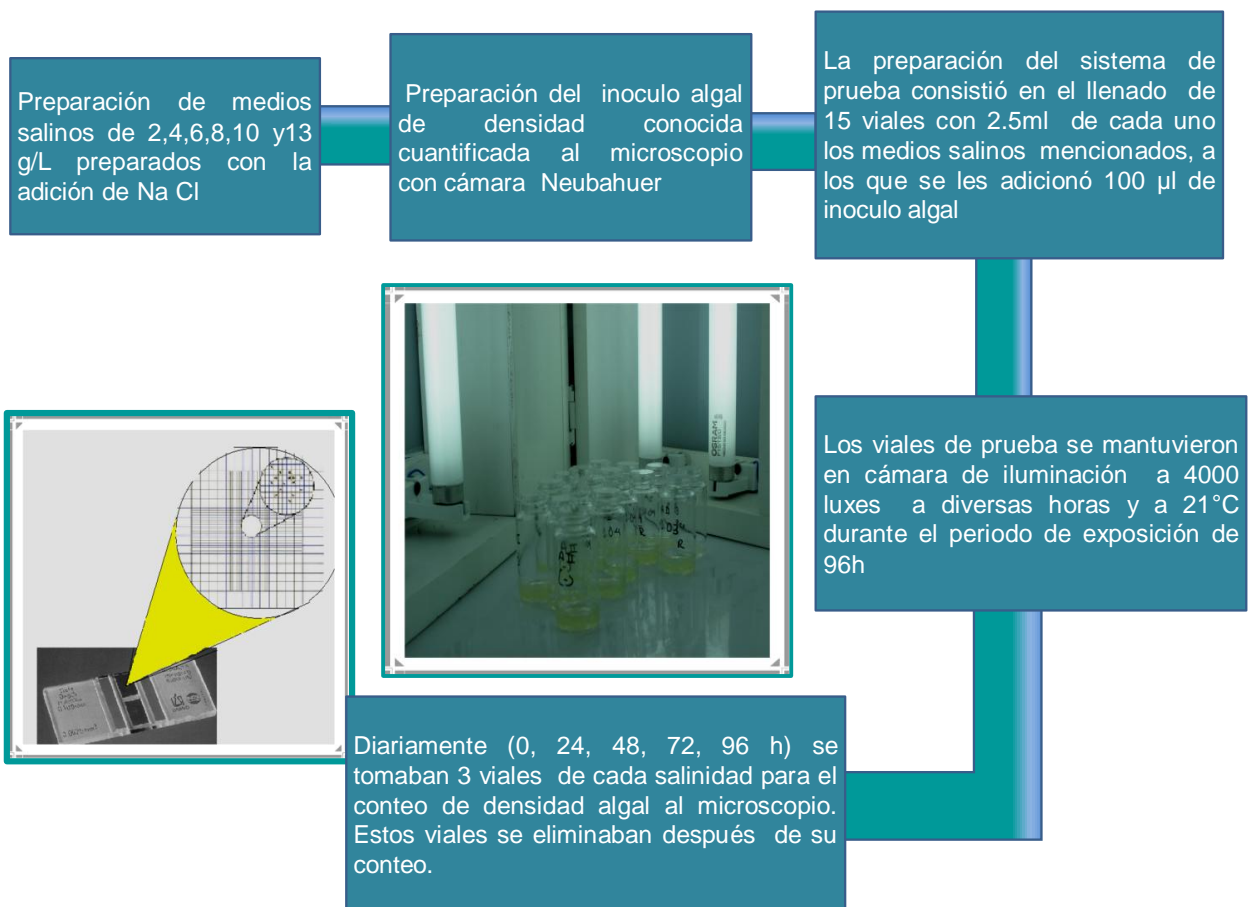


Figura 3. Diseño experimental para el análisis de la tolerancia a la salinidad de dos especies de microalgas, *C. vulgaris* y *Scenedesmus sp.*

En éste sentido, se sabe que también pueden ser empleados cultivos de algas marinas para la alimentación de *B. plicatilis*, sin embargo, al analiza la logística de un laboratorio de pruebas de toxicidad el tener especies de uso limitado a un objetivo específico y sobretodo marinas, esto requeriría atención, infraestructura tiempos y costos adicionales. En este sentido, y con el fin de simplificar el trabajo en un laboratorio, se plantea la posibilidad de suministrar algas de agua dulce que tengan tolerancia a la salinidad a fin de que puedan ser empleadas como un alimento adecuado para el cultivo de *B. plicatilis*. El diseño experimental para determinar la tolerancia de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* se efectuó tomando como base el protocolo convencional para pruebas de toxicidad aguda con *P. subcapitata*. (Pica- Granados *et al*, 2004) con modificaciones en el número de réplicas y formato de lectura, de acuerdo a la figura 3.

### 3.2.2 Optimización del cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*.

Los rotíferos son organismos de distribución cosmopolita, habitan principalmente en agua dulce y pocas especies se encuentran en aguas marinas. *Brachionus plicatilis* es una especie eurihalina, tolerante a un amplio ámbito de salinidades de 1 a 9.7 ppm (partes por mil), con el límite extremo de 20 ppm, y de alta sensibilidad a contaminantes químicos (Alayo & Iannacone, 2002). *Brachionus plicatilis* es un organismo noble para ser cultivado a gran escala por lo que se emplea para acuicultura y alimentación de peces, moluscos y crustáceos, sin embargo su empleo en pruebas de toxicidad aún es incipiente y se requiere sumo cuidado en el control de factores tales como el tipo de algas y densidad empleada para su alimentación, así como la temperatura, el oxígeno disuelto y la salinidad en el medio de proliferación, entre otros, a fin de lograr el crecimiento homogéneo de la población y la estandarización de su crianza, pues con ello se logra el tener individuos de una misma edad a la eclosión. Si estos organismos no se crían con condiciones definidas, la respuesta frente a las sustancias tóxicas puede variar, disminuyendo la confianza de los resultados derivados de las pruebas de toxicidad en las que se emplearía a dichos organismos (Munkittrick & Sergy, 1991).

Una de las herramientas utilizadas para evaluar el efecto de los contaminantes sobre los componentes biológicos de los sistemas acuáticos son los bioensayos o pruebas de ecotoxicidad, estos nos ayudan a conocer tempranamente, los posibles impactos sobre los organismos silvestres y eventualmente sobre las comunidades, al ser empleados para el monitoreo ambiental uo del ambiente acuático. Este tipo de pruebas biológicas de toxicidad han sido sugeridas por Agencias

Internacionales de Protección Ambiental (Iannacome *et al.*, 1998; EPA, 1985), así como en México por la SEMARNAT y CONAGUA (NMX-AA-87-SCFI-2010; NMX-AA-112-SCFI-1995)].

Uno de los organismos sugeridos por los Drs. S.S.S.S Sarma y Nandini Sarma de la UNAM, campus Ixtacala, (expertos en ecología y taxonomía del zooplankton), para la



integración de una batería de pruebas de toxicidad de utilidad en el análisis de aguas salobres y costeras son los rotíferos y en especial *B. plicatilis*. Sin embargo es necesario avanzar en el desarrollo del protocolo de cultivo y de prueba a fin de lograr un procedimiento adecuado para obtener datos analíticos de alta confiabilidad.

En vista de esta necesidad, durante el 2012, se efectuó la investigación necesaria para el refinamiento de las condiciones del cultivo, cumpliéndose así con la primera fase del montaje de un protocolo de prueba que tenía como objetivo el determinar la dieta y la salinidad óptimas para el desarrollo del cultivo del rotífero *B. plicatilis*, empleando para su alimentación las dos especies de algas de agua dulce empleadas en las pruebas de tolerancia a la salinidad, toda vez que ambas resultaron ser tolerantes a la salinidad reportada como óptima para *B. plicatilis*. (Snell & Persoon, 1989).

El método para discernir las condiciones más adecuadas de salinidad, tipo y abundancia de la alimentación, se indica en la figura 4.



Figura 4. Diseño experimental para discernir las condiciones óptimas de salinidad, dieta para el cultivo de *Brachionus plicatilis*

### 3.3 Adaptaciones metodológicas de las NMX con *Daphnia magna* y *V. fischeri* a ISO, mejoras y observaciones.

#### 3.3.1 Optimización de la producción de neonatos de *Daphnia magna*, en cultivos con medio ISO (dureza de 250 mg Ca<sup>+2</sup> /L).

A partir de la modificación de la NMX 087 Toxicidad Aguda con *Daphnia magna*, que principalmente consistió en el uso del medio ISO con dureza superior, de 250 mg Ca<sup>+2</sup> /L y el cual confiere características al agua que dificulta el que las algas que sirven de alimento al cladóceros se mantengan en suspensión por un periodo adecuado para su captación. En ocasiones como es el caso del alga *P. supcapitata*, empleada para la alimentación bajo esquemas de dureza menor (160mg Ca<sup>+2</sup> /L), y de acuerdo a EPA, esta alga se mantiene en suspensión por hasta dos días, sin embargo cuando el medio adquiere mayor dureza, las algas se precipitan al término de unas horas, haciendo imposible la captura durante el nado de las daphnias las cuales comienzan a tener deficiencia de alimento.

En vista de la problemática, se efectuó experimentación con diversas algas, adicionándolas solas o en mezcla, de tal forma que se obtuviera una suspensión algal cuya densidad permitiera mantener a las algas flotando en el medio de cultivo de las daphnias durante el mayor tiempo posible. Para ello se seleccionaron microalgas cuyo valor energético fuera el ideal para mantener la salud de los cladóceros y así mismo sus características estructurales y densidad les permitieran mayor flotación, tal es el caso de las especies *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus sp* y la propia *P. subcapitata*.

Los experimentos consistieron en generar cultivos de daphnias alimentados con las algas mencionadas con dotaciones de aproximadamente 50 000 cél/organismo. La alimentación se inició desde las 24 h de nacidos. El montaje de la prueba consistió en aislar 20 organismos en recipientes de 2 L por triplicado para cada tratamiento.

A partir del primer día se dio el seguimiento de su ciclo de vida cuantificando el número de puestas y su periodicidad, número de neonatos por puesta, edad de madurez sexual y de mortalidad. Al término de 40 días, esa información se contrastó con los valores históricos que habían sido obtenidos con la aplicación del método EPA para cultivo de cladóceros y así mismo contra aquellos obtenidos posterior al cambio con medio ISO.

### 3.3.2 *Análisis para la adaptación del método de análisis de toxicidad aguda con *Vibrio fischeri* a protocolo ISO y sus repercusiones técnicas.*

La adaptación al método de norma actualmente vigente en su versión NMX-112-AA-SCFI-1995 involucra la necesidad de su adecuación al método ISO, esto implica principalmente dos cambios radicales en los principios metodológicos de la técnica los cuales son de sumo interés debido a su posible repercusión sobre la comparatividad de los resultados entre ambos métodos y así mismo el impacto que este cambio tendrá sobre los costos de análisis.

En relación al primero aspecto, se elaboraron diseños experimentales que permitirían discernir; los posibles cambios en la sensibilidad del organismo de prueba debido a que el protocolo ISO emplea una solución de dilución que añade a la solución de NaCl de uso regular dos sales más, el Cloruro de potasio (KCl) y el Cloruro de Magnesio hexa hidratado ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ), esas dos últimas sales suelen ligarse con los metales pesados en solución contenidos en una muestra provocando que la biodisponibilidad de éstos elementos se reduzca al lentificar el transporte de los metales al interior de la célula bacteriana (Forstner, 1979). Este cambio hace también más lento el proceso de intoxicación del organismo y en consecuencia el efecto máximo en el metabolismo bacteriano también se posterga, por lo que el tiempo de exposición en pruebas de laboratorio debe ser mayor cuando se emplea la solución de tres sales, que cuando se utiliza la solución con solo NaCl, ya que solo de esta manera los datos resultarían comparables entre ambas técnicas.

Con base en esta información se planeó experimentación para demostrar dicha hipótesis empleando la prueba con *Vibrio fischeri*, como se indica en el procedimiento de prueba aún vigente (NMX-112\_AA\_SCFI-1995) y ordenando dos lotes de análisis, uno en el que se emplea la solución regular de NaCl y el otro con la solución conteniendo las tres sales. Los análisis de ambos lotes se efectuaron para la determinación de la  $CE_{50}$  para Cr VI, Zn II y Fenol

En relación al segundo aspecto, fue relevante experimentar si el formato de prueba que señala la norma ISO y que implica el uso de réplicas en su diseño de prueba, podría ser simplificado, modificándolo a un diseño sin réplica al que se le ha denominado ISO Modificado al 100% (ver fig. 5). La relevancia de esto radica en que de emplearse el modelo ISO en el afán de reducir el error metodológico en el manejo de la prueba que sucede por falta de entrenamiento y experiencia, puede en el tiempo generar información redundante que deje de ser necesaria, además de encarecer el análisis al requerir dos veces más materiales, soluciones y tiempo.

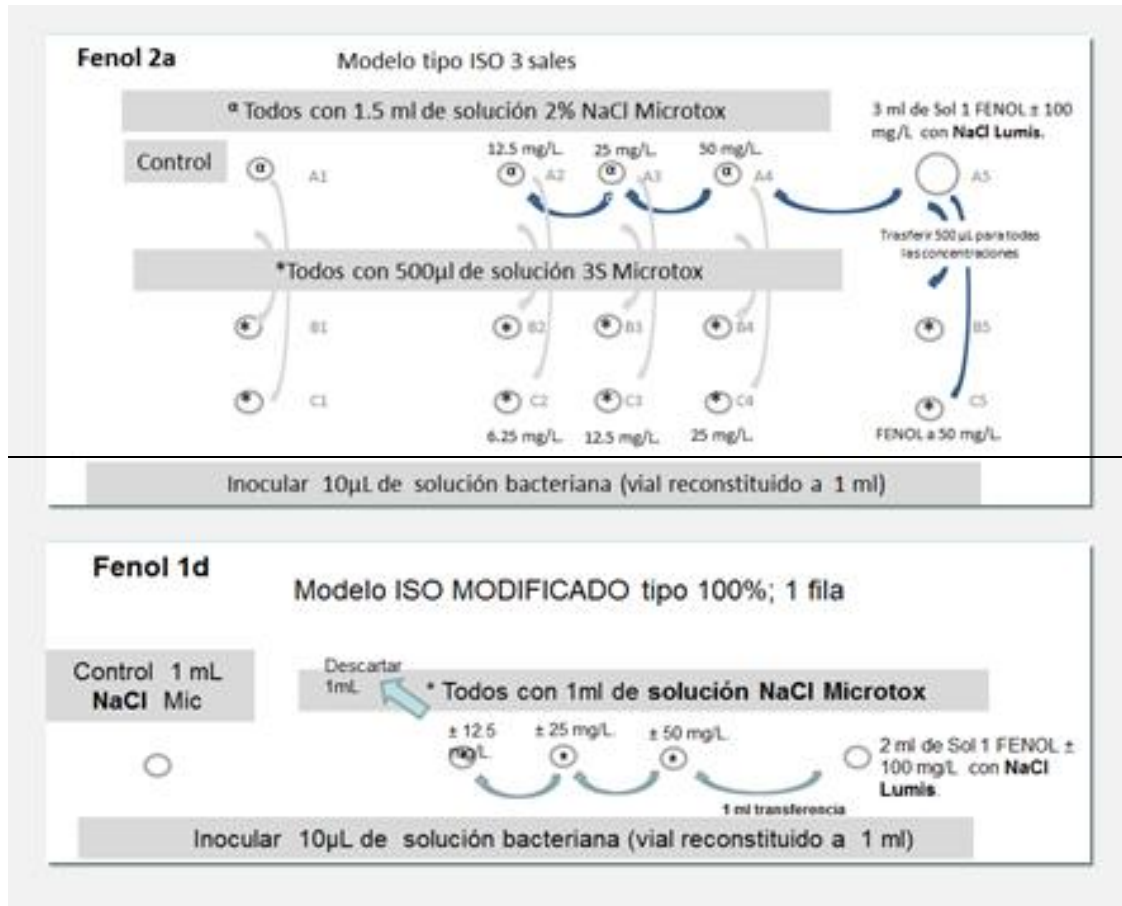


Figura 5. Diseños de pruebas ISO y modelo ISO modificado tipo 100% probados.

Para este análisis se efectuaron montajes paralelos, de prueba, uno con el modelo ISO y otro con el modelo simplificado ISO modificado al 100%, para el análisis de Cr I, Zn II y Fenol, experimentos que se repitieron 5 veces para cada sustancia. Posteriormente se efectuó una prueba de t-Student con p-valor de 0.05 para comparar los resultados de ambos modelos de prueba.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Prueba de efectos teratogénicos en el desarrollo embrionario de *Danio rerio*.

Los resultados del análisis de exposición de los embriones de *D. rerio* a contaminantes y fármacos se observan en las figuras subsiguientes (6 - 12), señalando los defectos de desarrollo o retraso en la evolución del embrión que han quedado resumidos en la tabla 5.

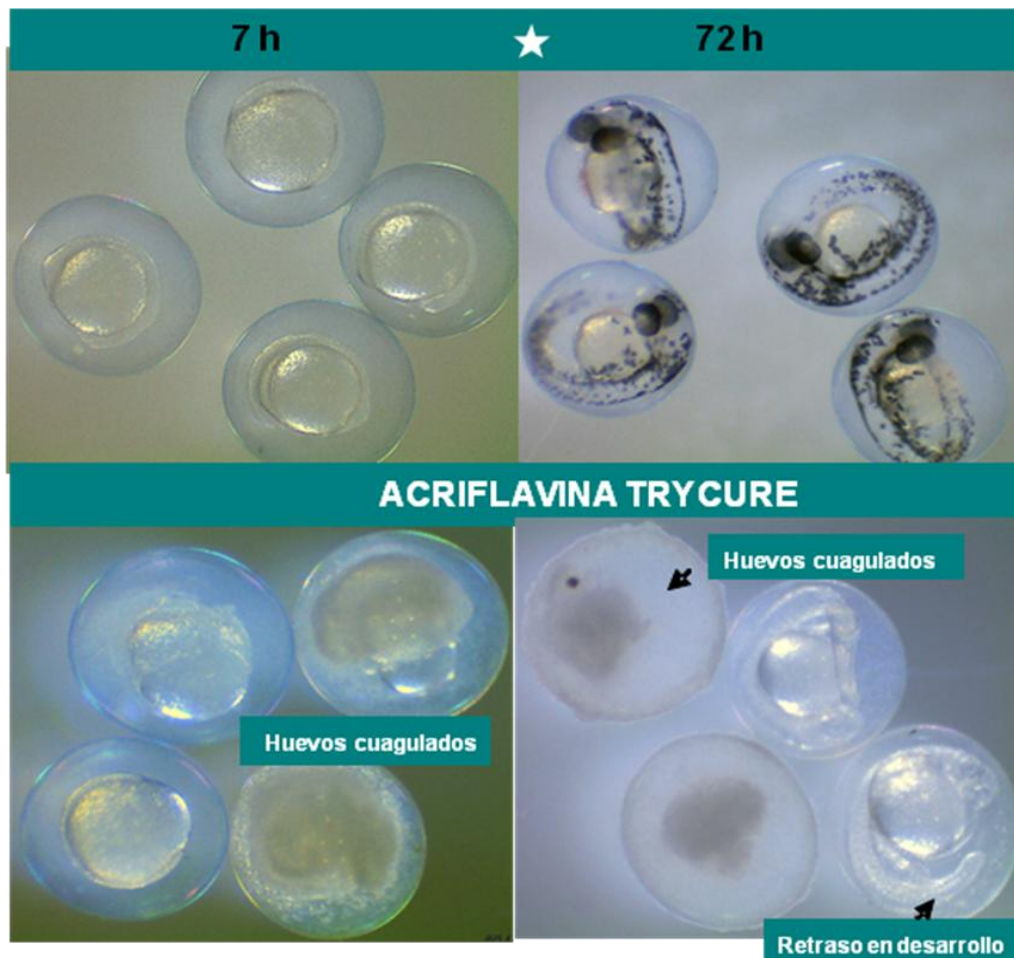


Figura 6. Efectos en embriones de *D. rerio* expuestos al desinfectante acriflavina



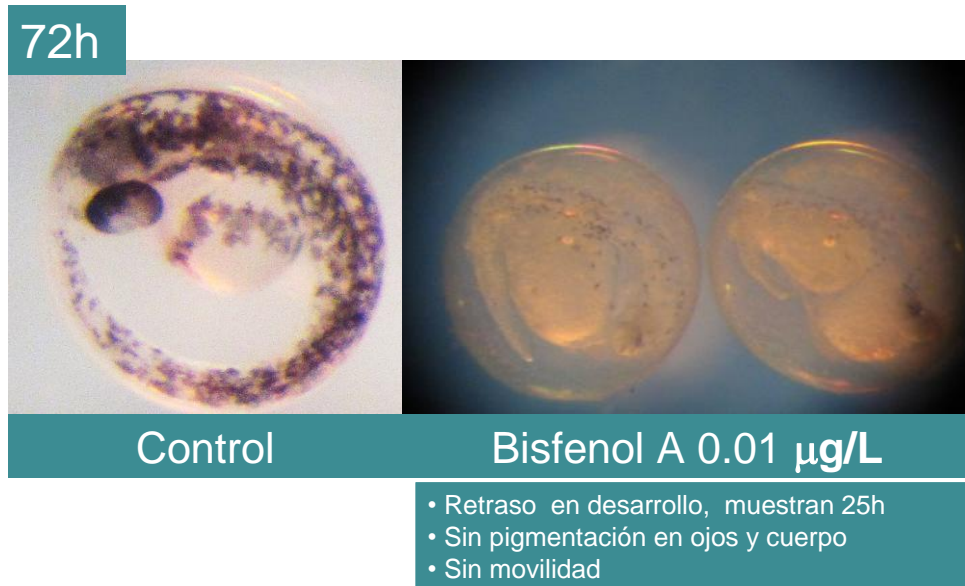


Figura 7. Efectos en embriones de *D. rerio* expuestos a Bisfenol A



Figura 8. Efectos en embriones de *D. rerio* expuestos a Cromo VI

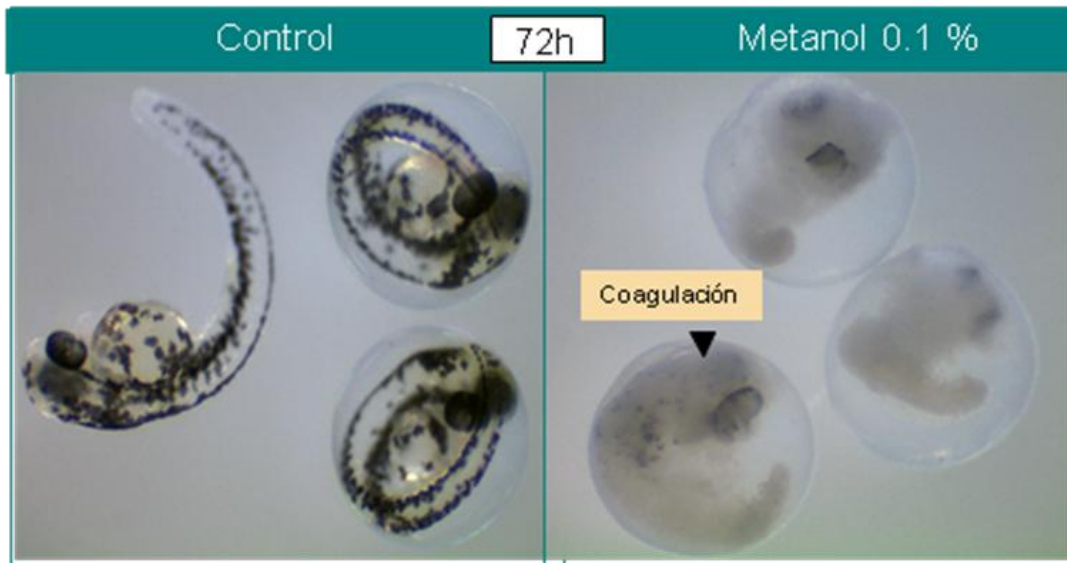


Figura 9. Efectos en embriones de *D. rerio* expuestos a Metanol

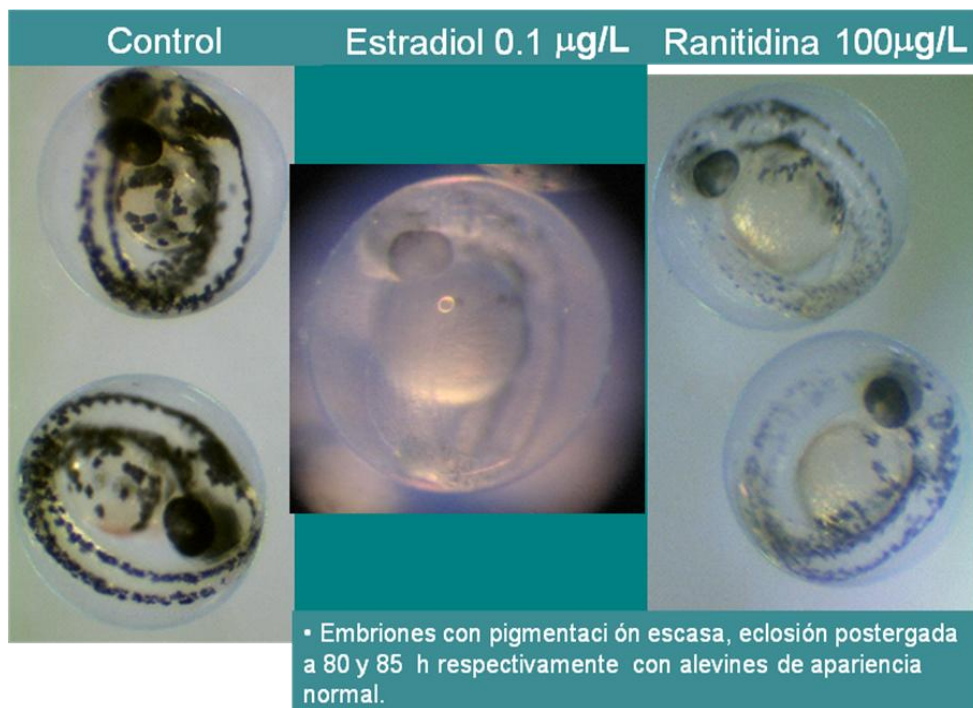


Figura 10. Efectos en embriones de *D. rerio* expuestos a Estradiol y Ranitidina



Figura 11. Efectos en embriones de *D. rerio* expuestos a Fluoxetina y Paracetamol

Este fármaco actúa en el sistema nervioso central del hombre reduciendo la actividad neuronal al inhibir la funcionalidad de un neurotransmisor, el ácido aminobutírico (GABA)

El sistema GABA esta también presente en peces y su inhibición produce cambios de comportamiento que afectan su alimentación y reproducción y deteriora la inmunidad del organismo. Se observan anomalías a lo largo de su desarrollo, presentándose durante la eclosión lordosis, edema pericárdico, microftalmia, desarrollo deficiente del lóbulo cerebral y motricidad afectada en *Danio rerio*.

En la tabla 5 se han incorporado los rasgos o indicadores de efecto observados para los diversos compuestos empleados en los ensayos de exposición. Dichos efectos son de naturaleza subletal los cuales no han sido considerados por la OECD como criterios para la evaluación de efectos con peces. En esta guía quedan solamente contemplados efectos de naturaleza letal las cuales se asocian escasamente con la forma de operar de los fármacos, los cuales principalmente producen cambios más sutiles, muchos de ellos



ciados a deficiencia en la pigmentación corporal que se muestra como escasa o ausente a las 48h y la cual, a su vez se relaciona con eclosión postergada a más de 72 h con alevines aparentemente normales. Esto se observa para la acriflavina, Bisfenol A, estradiol y ranitidina de acción de efectos postergados es muy propio de compuestos emergentes que actúan con agentes de disfunción endócrina como es el caso del Bisfenol A (figuras 6,7 y 8).

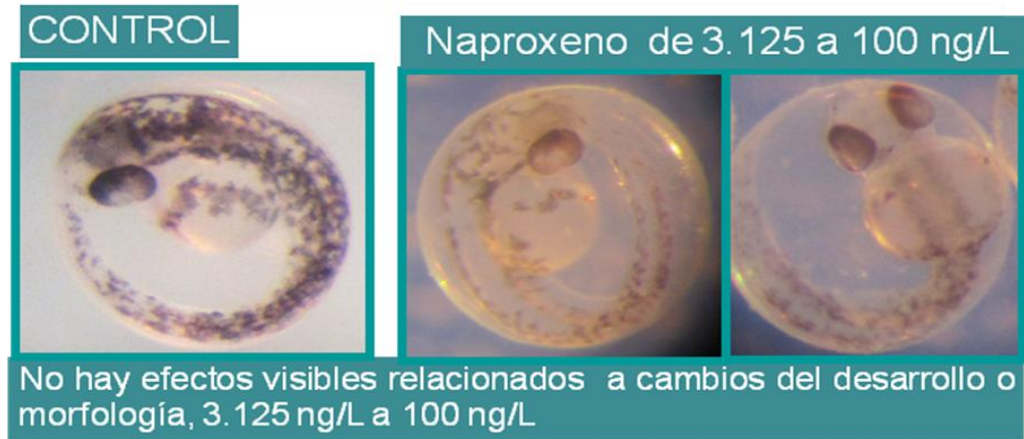


Figura 12. Efectos en embriones de *D. rerio* expuestos a Naproxeno

Algunos compuestos, como el metanol y cromo VI, en las concentraciones empleadas, inhiben la eclosión produciendo efectos letales en estadios tempranos como la coagulación, o inhibiendo el desarrollo de los ojos, lo que refiere un daño durante la evolución temprana de la formación del sistema nervioso, rasgo que se origina durante las primeras 24 h del desarrollo pero se expresa como la ausencia de ojos hasta las 24 h en que estos deben quedar adecuadamente diferenciados al igual que la cabeza (figuras 8 y 9).

Así mismo hay otros compuestos como la fluoxetina y el paracetamol que no presentan ninguno de los efectos letales señalados por la OECD, sin embargo los alevines desarrollan malformación severa de la columna vertebral o lordosis marcada lo que produce a su vez una escoliosis que afecta el desarrollo del tórax generando una hernia en dicho sector y el consecuente edema pericárdico. Esta malformación afecta el desarrollo ocular presentando microoftalmia así como una cola acortada, todo ello consecuencia de una medula acortada que afecta el desarrollo normal de la notocorda y cuyo daño se gestó durante las primeras 24 h de desarrollo. A pesar de la severa deformación, estos organismos eclosionan oportunamente a las 72 h pero con serios problemas de movilidad, letargo e incapacidad natatoria que limita la posibilidad de captar alimento y sobreviene la muerte posterior por inanición (figura 11).

Solo el naproxeno presentó un desarrollo normal, sin retraso en la eclosión y sin mostrar ningún rasgo anómalo que contrastara con la apariencia y evolución del control (figura 12).

Tabla 5. Indicadores de efecto letal y subletal recomendados para la evaluación de efectos en el desarrollo de embriones de *D. rerio* expuestos a contaminantes y fármacos

		Fármacos								
DESARROLLO ALTERADO (Indicador)	Observación	Acriflavina	Bisfenol A	Cromo	Metanol	Estradiól	Ranitidina	Fluoxetina	Paracetamol	Naproxeno
<b>Efecto Letal</b>										
1.Coagulación *	Coagulación total o parcial del embrión. Actúa en el total de los embriones (T) o en algunos(P)	24 <sub>P</sub>			48 <sub>T</sub>					
2. Cola y somitas *	Falta de somitas y no hay separación de la cola del saco vitelino (V)				48 <sub>V</sub>					
3 Latido cardíaco +	Regular ( R ) o Alterado (A)	36 <sub>R</sub>	36 <sub>R</sub>	36 <sub>R</sub>	36 <sub>R</sub>	36 <sub>R</sub>	36 <sub>R</sub>	36 <sub>R</sub>	36 <sub>R</sub>	36 <sub>R</sub>
<b>Efecto Subletal</b>										
4 Saco Vitelino	Desarrollo alterado en forma (F) o tamaño (T)			24 <sub>T</sub>	24 <sub>T</sub>					
5. Movimiento embrionario	Letargo o sin movimiento embrionario (S)	48 <sub>L</sub>	48 <sub>S</sub>		48 <sub>S</sub>		48 <sub>L</sub>		48 <sub>L</sub>	
6. Edema	Pericárdico moderado (M) o severo (S) De Saco Vitelino							48 <sub>M</sub>		48
7.Ojos	Tamaño Reducido (R) o sin ojos (S)		24 <sub>S</sub>	24 <sub>S</sub>	48 <sub>R</sub>			24 <sub>R</sub>	48 <sub>R</sub>	
	Pigmentación escasa (E) o ausente (A)	48 <sub>E</sub>	48 <sub>A</sub>	48 <sub>A</sub>						
8 Cola	Cola acortada Cola deforme							48	48	
9. Pigmentación corporal	Escasa (E) o ausente (A)	48 <sub>E</sub>	48 <sub>A</sub>	48 <sub>E</sub>		48 <sub>E</sub>	48 <sub>E</sub>			
10. Eclosión	Tiempo de eclosión o sin eclosión (SE)	SE y >72	> 72	SE	SE	>72	>72	72	72	72
11. Apariencia de Alevines	Movilidad alterada en alevines Lordosis espinal en alevines							72	72	
	Lordosis espinal en alevines							72	72	
	Sin alteraciones aparentes	X	X			X	X			X
DOSIS DE EFECTO		0.16 µg/L	0.01 µg/L	160 µg/L	0.1 %	0.1 µg/L	100 µg/L	1 µg/L	100 µg/L	100 µg/L

## 4.2 Optimización del cultivo de *B. plicatilis*

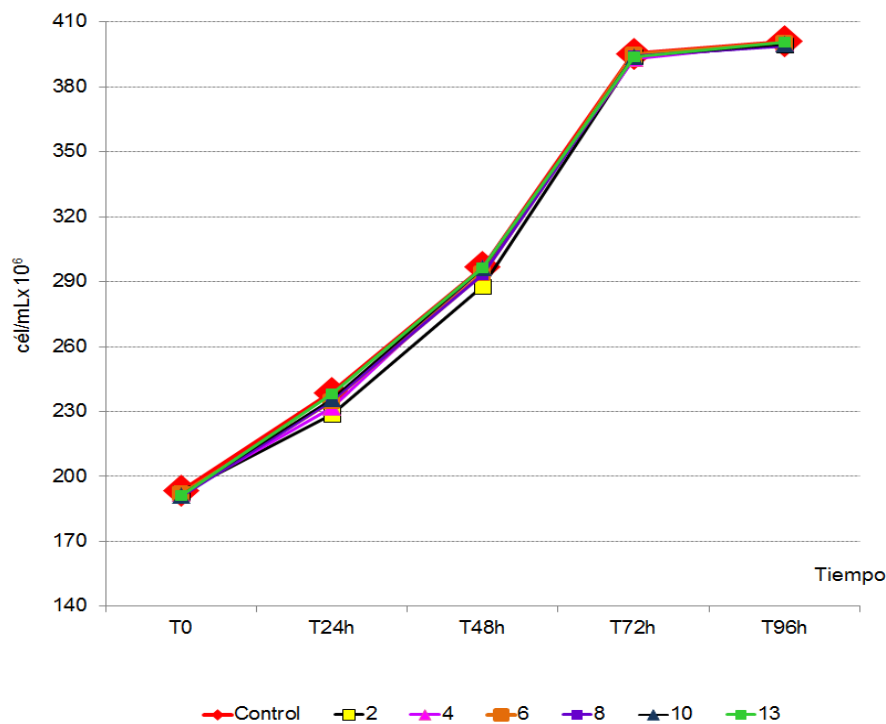
### 4.2.1 Tolerancia a la salinidad de dos especies de Microalgas

En las figuras 13 y 14 se contrasta el comportamiento de las dos algas empleadas en la experimentación, *Scenedesmus sp* y *Chlorella vulgaris*, expuestas a diferentes concentraciones del medio con sales.

Las gráficas integran también el comportamiento del sistema control, el cual nos muestra la curva de crecimiento regular que sigue cada una de las algas bajo condiciones óptimas. La curva del control se señala con el color rojo.

Para ambas algas, se observa que la acción de la salinidad no tiene efecto sobre el crecimiento toda vez que las curvas que describen la tendencia para cada concentración de sales son iguales a la del control en cual a las 48 y 72 h para *C. vulgaris* y *Scenedesmus sp*, respectivamente, se alcanza la fase estacionaria o máximo desarrollo de la población.

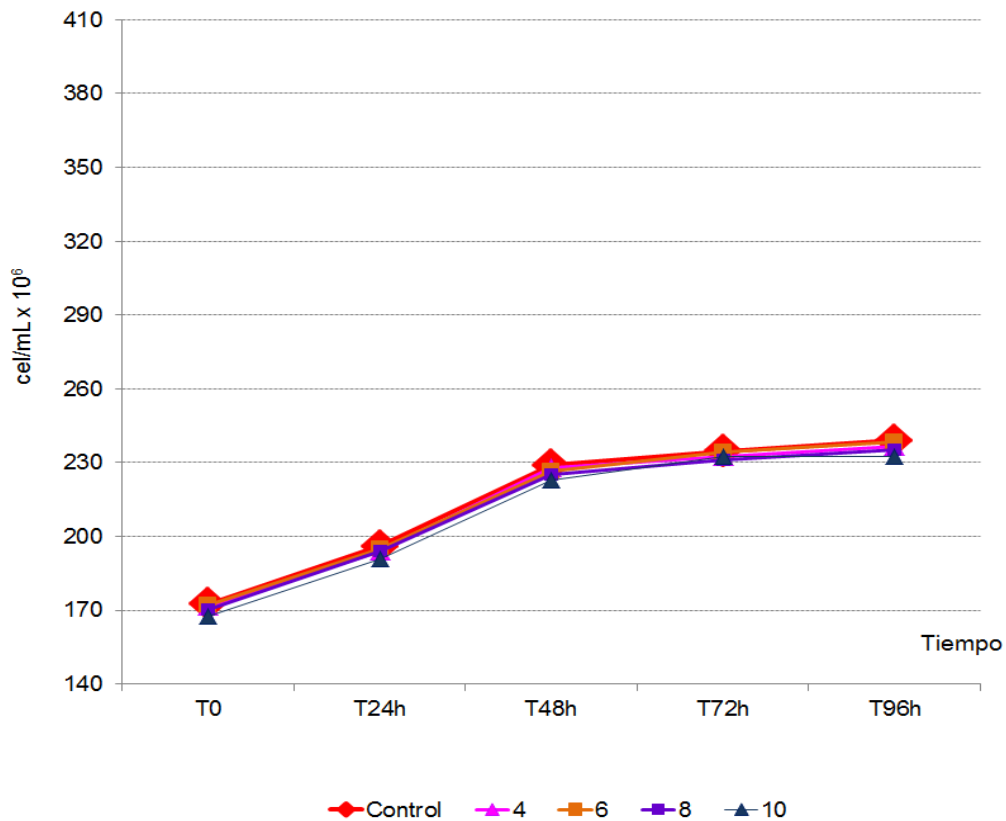
Figura 13 Comportamiento de la densidad algal de *Scenedesmus sp*, expuesta a diferentes concentraciones de la salinidad (g/L).



De acuerdo a lo anterior puede decirse que ambas algas son tolerantes a concentraciones de hasta 13 mg/L de sales en el medio sin que esta genere inhibición sobre el proceso de división celular que opera para el crecimiento o aumento de la densidad de las poblaciones algales por lo que cualquiera de ellas puede ser empleada para alimentación de invertebrados cuyo medio de vida no exceda de 13 g/L de salinidad.

La comparación entre la tendencia de crecimiento de ambas algas indica que *Scenedesmus sp* es de crecimiento más rápido que *Chlorella vulgaris* lo cual hace que ésta especie, si bien proporcionaría una mayor cantidad de alimento, es también más demandante de oxígeno y capas de acidificar el medio, características que deben ser tomadas en cuenta si se utiliza *Scenedesmus* como alimento de rotíferos u otros invertebrados ya que pueden desoxigenar el medio, acidificarlo y producir la muerte de los organismos a los que se les suministra como alimento.

Figura 14. Comportamiento de la densidad algal de *Chlorella vulgaris*, expuesta a diferentes concentraciones de la salinidad (g/L)



#### 4.2.2 Optimización del cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*.

En las siguientes graficas podemos observar el comportamiento de los organismos a las diferentes salinidades, tipo de algas y concentraciones de alimento suministrado.

En las figura 15 y 16 se presentan los resultados de los sistemas alimentados con *Chlorella vulgaris*. En ellas se observa que para la salinidad de 4mg/L los rotíferos tienden a reducir su población debido a que ésta especie es de agua salina y la carencia de suficientes sales afectan su fisiología llevándolos a la muerte.

A 6 mg/L la población de mantiene contante o con incrementos menores, sin embargo con concentraciones de 8 y 10 mg/L de salinidad la población se incrementa, lo cual indica que este es el nivel de salinidad adecuado para el desarrollo del cultivo de *B. plicatilis*, sin embargo otro factor relevante para lograr el crecimiento es la alimentación, determinada por el tipo de alga y la densidad del cultivo que se suministró. Esto se pone en evidencia

Figura 15. Cambios de la densidad del cultivo del rotífero *B. plicatilis* a diferentes salinidades bajo régimen de alimentación con *Chlorella vulgaris* ( $131.6 \times 10^6$  cél/mL)

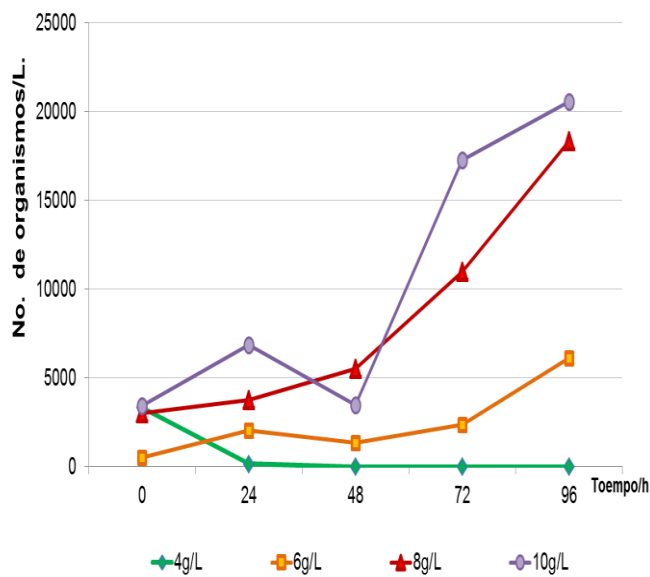


Figura 16. Cambios de la densidad del cultivo del rotífero *B. plicatilis* a diferentes salinidades bajo régimen de alimentación con *Chlorella vulgaris* ( $51.41 \times 10^6$  cel/mL)

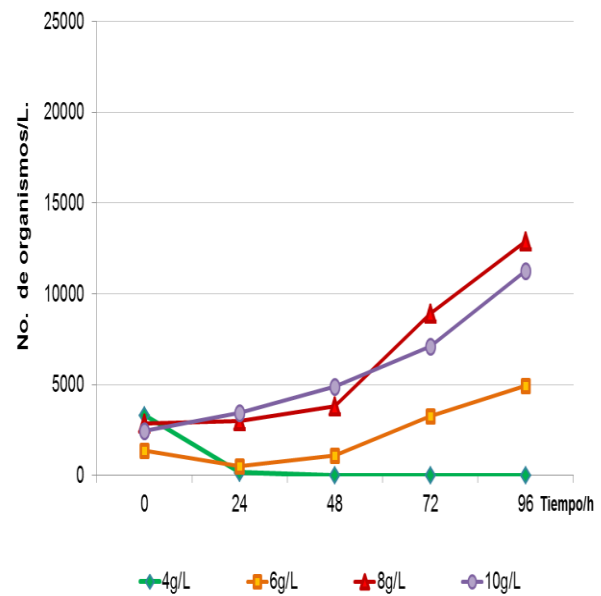


Figura 17. Cambios de la densidad del cultivo del rotífero *B. plicatilis* a diferentes salinidades bajo régimen de alimentación con *Scenedesmus sp* ( $74 \times 10^6$  cél/mL)

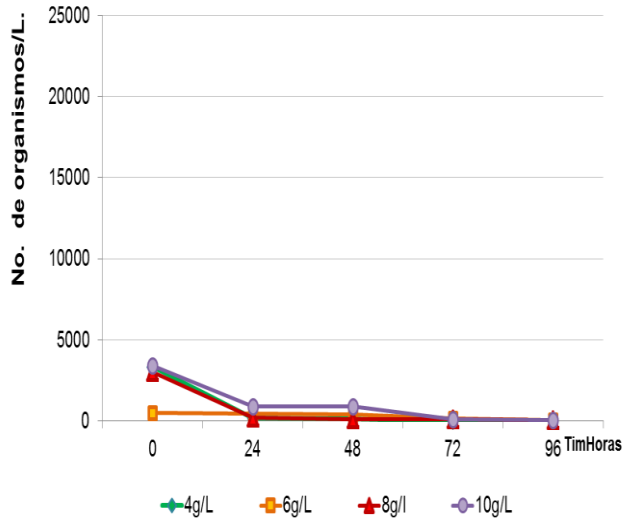
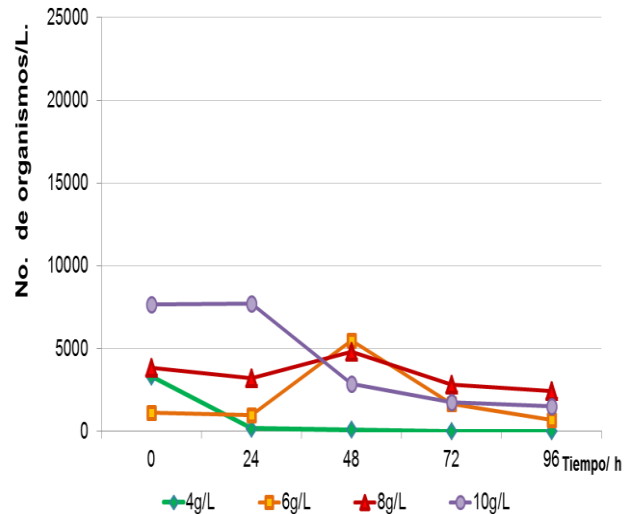


Figura 18. Cambios de la densidad del cultivo del rotífero *B. plicatilis* a diferentes salinidades bajo régimen de alimentación con *Scenedesmus sp* ( $28.54 \times 10^6$  cél/mL)



al observar que en las figuras 17 y 18, alimentadas con *Scenedesmus sp*, los organismos inoculados inicialmente mueren, aún en los sistemas donde se tiene salinidades de 8 y 10 mg/L, sin presentarse crecimiento en ellos.

Al contrastar esta información, se observa que la especie algal *Chlorella vulgaris* en densidades  $\geq 131 \times 10^6$  cél /mL es el alimento más adecuado para lograr crecimientos aceptables del rotífero *Brachionus plicatilis*

### 4.3 Resultados de la adaptaciones metodológicas de las NMX con *Daphnia magna* y *V. fischeri* a ISO, mejoras y observaciones.

#### 4.3.1 Optimización de la producción de neonatos de *Daphnia magna*, en cultivos con medio ISO (dureza de $250 \text{ mg Ca}^{+2}/\text{L}$ ).

Los resultados de las pruebas de alimentación evidenciaron la necesidad de modificar la alimentación del cultivo de *D. magna* empelando una mezcla algal de *P. subcapitata*-*Scenedesmus* en una proporción 1:2 respectivamente. Con ella se logró prácticamente duplicar el número de neonatos que habitualmente se obtenía con el medio EPA alimentando con *P. subcapitata* ya que paso de 150 neonatos promedio por 20 hembras a más de 400 organismos.

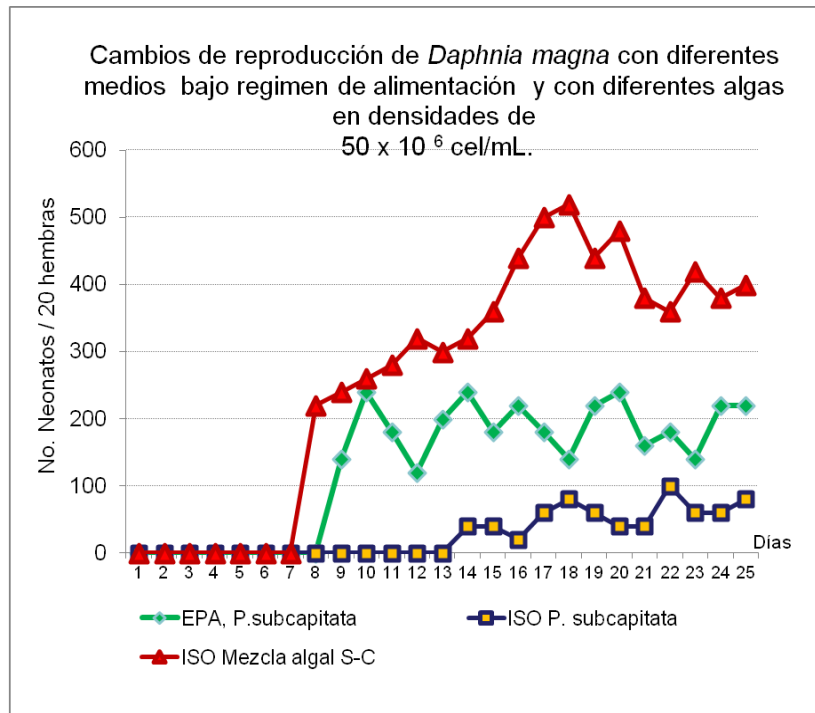


Figura 19. Comportamiento de la reproducción de *D. magna* asociado a diverso dietas

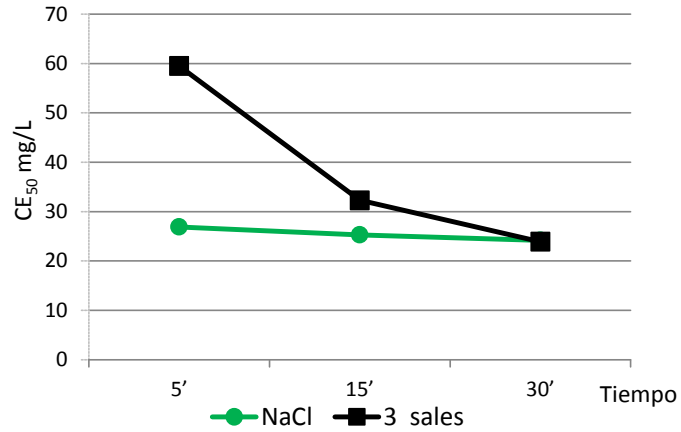
En vista de lo anterior se puede decir que el uso de *Scenedesmus* en mezcla con *P. subcapitata* permite mantener buen número de algas en suspensión, provee suficiente valor nutricional de utilidad para la reproducción del cladóceros incrementando significativamente el número de neonatos. Esta alimentación también promueve que la edad de madurez sexual se alcance un poco antes de lo que es habitual (9-11 días) y mantiene la producción de neonatos alta y constante especialmente después del dos semanas de vida de la daphnia y en consecuencia la mezcla algal resuelve el problema de la sedimentación y la escasa reproducción que aconteció durante el cambio al medio ISO dosificando solo *P. subcapitata* (figura 19)

#### 4.3.2 Resultados del análisis para la adaptación del método de análisis de toxicidad aguda con *Vibrio fischeri* a protocolo ISO y sus repercusiones técnicas.

El relación a los posibles cambios en el comportamiento de la respuesta de *Vibrio fischeri* a consecuencia de la modificación del medio de dilución que en la norma previa empleaba solo una sal (NaCl) a la mezcla indicada por el protocolo ISO (tres sales, NaCl, KCl y  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ), los resultados globales se muestran en la figura 20.

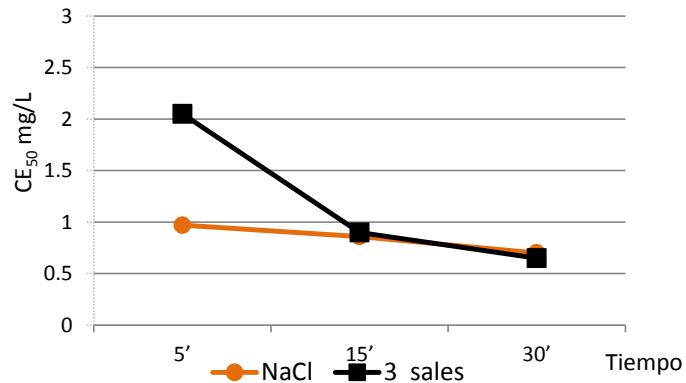
### Comportamiento de la respuesta de *Vibrio fischeri* al Cr VI

Tiempo de exposición	CE <sub>50</sub> (m,g/L)	
	NaCl	3 sales
5'	26.9	59.5
15'	25.3	32.3
30'	24.2	23.9



### Comportamiento de la respuesta de *Vibrio fischeri* a

Tiempo de exposición	CE <sub>50</sub> (m,g/L)	
	NaCl	3 sales
5'	0.97	2.05
15'	0.86	0.9
30'	0.7	0.65



### Comportamiento de la respuesta de *Vibrio fischeri* al Fenol

Tiempo de exposición	CE <sub>50</sub> (m,g/L)	
	NaCl	3 sales
5'	15.343	15.048
15'	16.22	16.437
30'	16.523	16.599

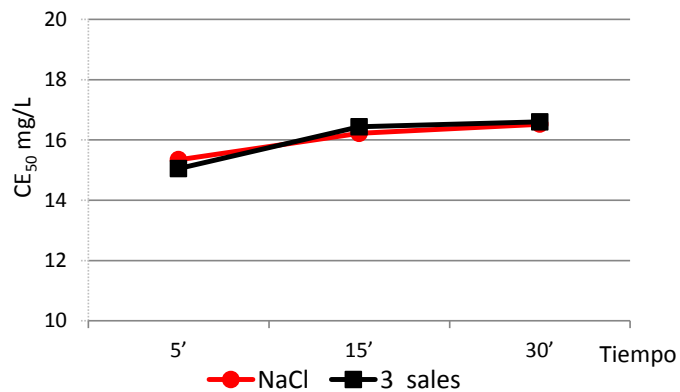


Figura 20. Comportamiento de la respuesta de *Vibrio fischeri* a metales y compuestos orgánicos asociado al uso de medio de dilución de distinta composición.



En ella se observan las tendencias que siguieron los tres tóxicos empleados para la experimentación, dos metales (Cr VI y Zn II) y un orgánico (fenol). En las primeras graficas se muestra el comportamiento de los dos metales con las curvas que contrastan el comportamiento de la respuesta tóxica obtenida para cada tratamiento. Se observa que en el caso de aquellos en los que se empleó como medio la solución de una sal (NaCl), la respuesta máxima de toxicidad ( $CE_{50}$ ) es constante desde los 5 minutos y prácticamente no cambia en el tiempo, por ello en la NMX-112-AA\_SCFI-1995 era considerado aceptable la lectura obtenida a un tiempo de exposición de 5 minutos y empelado como definitiva para el reporte de dicho parámetro toda vez que responde de forma igualmente estable para metales y compuestos orgánicos, como se puede observar en el tercer grafico de la figura 20 en la que se toma como compuesto modelo al Fenol.

Al contrastar este comportamiento de la respuesta con el obtenido cuando se emplea el medio de dilución con 3 sales o medio ISO, se observa que las curvas para los dos metales tienen cambios del valor de la  $CE_{50}$  que son estadísticamente distintos en el tiempo, en mayor medida el Cr VI. A los 5 minutos tienen una  $CE_{50}$  con valores de casi el doble de lo que se observa a los 30 minutos, que es el tiempo que lleva el que en este medio se desarrolle el máximo efecto y se establezca la respuesta. Es a los 30 minutos el tiempo en el que la respuesta alcanza los valores de  $CE_{50}$  que son equivalentes a aquellos obtenidos con la solución de solo NaCl. Para el caso de orgánicos, no se presenta la inconsistencia, solo afecta a los metales.

Lo anterior demuestra el efecto que tiene la adición de KCl y  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  en la biodisponibilidad de los metales y en el aletargamiento del proceso de intoxicación bacteriana, por lo que bajo el esquema de la adaptación que deberá hacerse al protocolo de norma vigente en apego a ISO, deberá asentarse la necesaria ampliación del tiempo de exposición a 30 minutos para que se logre consistencia de la respuesta y la correcta evaluación de toxicidad de muestras.

Por otro lado y en relación al segundo aspecto de interés relacionado a la adaptación del método de prueba con *Vibrio fischeri* al protocolo indicado por ISO, y asociado a la posibilidad de simplificar el modelo de prueba a un modelo sin réplicas al cual denominamos ISO Modificado al 100% (ver fig. 5). La experimentación a este respecto fue motivada por la necesidad de hacer converger la optimización del error metodológico y el costo, al minimizar el uso de materiales, reactivos e incluso volúmenes de residuos, que en el caso del diseño ISO se duplica en cantidad, sin mencionar el tiempo que debe ampliarse a 30 minutos.

Para ello se efectuaron pruebas con los dos diseños de prueba indicados en la figura 5 empleando 3 tóxicos y efectuando los ensayos mínimos para una comparación estadística aceptable.

Los resultados se presentan en la tabla 6. En ella se observa que para ISO tres compuestos probados (Cr VI, Zn II y Fenol), no hay diferencias significativas entre los valores de la  $CE_{50}$  obtenidas para el diseño ISO en relación al diseño que históricamente se ha manejado en la NMX-112\_AA\_SCFI-1995 vigente.

La tabla muestra los datos obtenidos para el tiempo de exposición de 30 minutos y su estadística señala que no hay diferencias significativas, condición que también se muestra al comparar los coeficientes de variación para cada grupo de datos, el cual es muy reducido  $\leq$  al 15% y los valores promedio correspondientes.

Por lo anterior se sugiere que es factible el empleo del método simplificado alternativo (ISO Modificado al 100%) siempre y cuando el analista haya logrado la capacidad técnica necesaria para reducir su error de manejo, condición que debe ser demostrada a través de las pruebas de desempeño. Una vez que esto suceda el diseño de prueba simplificado puede ser dado de alta en los laboratorios de prueba como método propio ligado como modificación de lo que será el la futura NMX-112\_AA\_SCFI adaptada a ISO., sin temor a reducir la confianza estadística de los resultados y beneficiando financieramente al laboratorio al el generar ahorro de materiales, reactivos y desechos (tabla 6).

Tabla 6. Estadística de los resultados obtenidos dela comparación de los diseños de ISO y el modelo propuesto modificado al 100%. Resultados al tiempo de exposición de 30 minutos.

Evento	Fenol		Cr VI		Zn II	
	Mod ISO	Mod 100%	Mod ISO	Mod 100%	Mod ISO	Mod 100%
1	15.49		21.7		0.86	
	15.73	16.21	26.3	23.31	0.89	0-89
2	18.63		24.6		0.88	
	17.31	18.51	24.9	24.8	0.63	0.87
3	14.7		22.8		0.76	
	13.9	15.63	23.2	24.3	0.9	0.78
4	17.3		26.6		0.89	
	16.8	16.3	25.9	26.2	0.92	0.67
5	17.01		25.2		0.84	
	17.8	17.3	24,7	25.1	0.73	0.85
Promedio	16.47	16.79	24.58	24.74	0.83	0.79
DS	1.47	1.13	1.68	1.06	0.09	0.09
CV	8.93	6.75	6.84	4.29	11.26	11.46
	NS		NS		NS	

NS= Diferencia no significativa p 0.05

## 5. CONCLUSIONES

- En relación a las pruebas de exposición de embriones de *D. rerio* a contaminantes y fármacos, se observa que sustancias como la Acrifalvina, Bisfenol A, Ranitidina y Estradiol generan retraso en la eclosión debido a que la pigmentación es deficiente a las 48h, esto se relaciona con un letargo en el desarrollo del sistema nervioso y endocrinológico así como de funciones bioquímicas asociadas a la diferenciación del mesodermo, pese a ello los alevines emergen entre las 96 y 100 h con apariencia normal, sin embargo es posible que las alteraciones de su desarrollo tengan reminiscencias en alteraciones de procesos metabólicos cuya expresión se expresara en el transcurso del ciclo de vida por lo que sería recomendable ampliar la experimentación de estas sustancias a ensayos de ciclo de vida completo .
- En lo concerniente a la optimización del cultivo del rotífero *B. plicatilis* se señala lo siguiente:
  - Las algas de agua dulce, *Scenedesmus sp* y *Chlorella vulgaris* son tolerantes a la salinidad en el ámbito experimentado, hasta una concentración de 13 g/L, en el cual tienen un crecimiento óptimo.
  - Estas dos especies pueden ser suministradas como alimento a cultivos de moluscos peces o invertebrados como los rotíferos de aguas salobres, toda vez que se mantienen viables a salinidades de entre 2 y 13 g/L, sin embargo hay que ser cuidadosos con las densidades de alimentación que se suministran ya que un exceso puede provocar que el medio se desoxigene o acidifique, especialmente en el caso de *Scenedesmus sp*
  - La salinidad para el óptimo crecimiento de *B. plicatilis* se encuentra en el ámbito de 8g/L a 10 g/L.
  - La alimentación más adecuada corresponde al uso de *Chlorella vulgaris* en concentraciones de  $130 \times 10^6$  cél/mL
  - No se recomienda el uso de *Scenedesmus sp* en densidades mayores a  $50 \times 10^6$  cél/mL para el cultivo del rotífero *B. plicatilis* debido al riesgo de acidificación y desoxigenación del medio debido al rápido crecimiento de esta alga.
- En lo referente a la *Optimización de la producción de neonatos de Daphnia magna, en cultivos con medio ISO (dureza de 250 mg Ca<sup>+2</sup> /L)*, Los resultados de las pruebas de alimentación evidenciaron la necesidad de modificar la dieta de los cladóceros empleando una mezcla algal de *P. subcapitata*- *Scenedesmus* en una proporción 1:2 respectivamente. toda vez que de esta manera se logra mantener a las algas en suspensión el periodo suficiente para ser ingeridas por las daphnia, mejorando así su reproducción la cual prácticamente duplico el número de neonatos que habitualmente se obtenía con el medio EPA alimentando con *P. subcapitata* ya que paso de 150 neonatos promedio por 20 hembras a más de 400 organismos.

- Respecto a la adaptación del método de prueba de la NMX 112 Pruebas de toxicidad Aguda con *Vibrio fischeri*, se señalan las siguientes observaciones.
  - EL empleo de tres sales como medio de disolución, en vez de solo NaCl reduce la disponibilidad de los metales y letifica su transporte hacia el interior de la célula bacteriana, de tal modo que para que se logre su efecto máximo, el tiempo de exposición debe ampliarse a 30 minutos, tiempo en el que se logra la obtención de valores de CE<sub>50</sub> consistentes con las registradas en el pasado o en relación a aquellas que se obtengan de alguna otra tecnología en el mercado.
  - En relación a los resultados de la comparación entre los formatos de prueba que involucra el modelo ISO con replica en contraste con un modelo modificado tipo 100% se observó que no hay diferencias significativas entre los valores obtenidos para ambos diseños de prueba, por lo que es factible el empleo del método alternativo simplificado siempre y cuando el analista haya logrado la capacidad técnica necesaria para minimizar su error metodológico.
  - Una vez que la capacidad técnica de los analistas se encuentre probada, el emplear el diseño de prueba simplificado será de importancia para los laboratorios de prueba, toda vez que el diseño de prueba ISO involucra el uso excesivo de materiales y gasto de tiempos innecesarios.
- La productividad derivada de éste proyecto incluye los siguientes productos; :
  - 1) Publicación del libro "Contribuciones al conocimiento de la Ecotoxicología y Química Ambiental en México".
  - 2) Dos registros de autor por los paquetes tecnológicos de pruebas con *D. magna* ISO ( Cer. 03-2012-011312264800-01) y *Vibrio fischeri* ( Cer. 03-2012-011312240300-01,
  - 3) Participación en comités de Normas Oficiales Mexicanas y técnicas,
  - 4) Dos artículos publicados en libros,
  - 5) Publicación de 4 artículos en memorias de congresos,
  - 6) Artículo aceptado para publicación en la revista Hidrobiología.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Alayo M & Iannacone J. 2002. Ensayos Ecotoxicológicos con Petróleo crudo, dieses 2 y diesel 6 con dos subespecies de *Brachinus plicatilis*, Muller 1786 (Rotífera: Monogononta). *Gayana* 66(1): 45-58, 2002 o Gayana versión On-line doi: 10.4067/S0717-65382002000100007
- Ankley G. Mihaich E. Stahi R., Tillitt D., Colborn T., McMaster S., Miller R., Bantle J., Campbell P., Denslow N., Discerson R., Folma L., Fry M., Giesy J., Earl Gray L., Guiney P., Hutchinson T., Kennedy S., Kramer V., LeBlanc G., Mayes M., Nimrod A., Patino R., Peterson R., Purdy R., Ringer R., Thomas P., Touart L, van der Kraak G. and Zachareswsski T. 1998. *Env. Toxicol & Chem.* 17(1)68-87.
- Bauchowitz, M. 2008. Zebra as models.. Fed. Inst. Fed. of Aquatic Science and Technology of Switzerland . Eawag News 64e/june 2008, pag: 4-7.
- Braunbeck T & Lammer E. 2006. Fish Embryo Toxicity Assays. German Fed. Environm. Agency UBA Contract No. 203 85 122. 298pp..
- Donni, C. P. 2000. Estudio de las especies algales bioindicadoras de contaminación en el Río Suquía (Córdoba, Argentina ). Memorias del XIX Congreso Latinoamericano de Hidráulica. Córdoba 2000
- EPA (Environmental Protection Agency). 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms 3rd edition. Peltier, W. & Weber, C. (Ed).
- Escher B. I & Hermens J. L. M. 2002 . Modes of Action in Ecotoxicology: Their Role in Body Burdens, Species Sensitivity, QSARs, and Mixture Effects *Environmental Science & Technology* 2002 36 (20), 4201-4217
- Guerra A., M. y Romero L. 2009 Evaluación del crecimiento de *Thalassiosira fluviatilis* en tres salinidades diferentes. Redvet *Revista Electrónica de Veterinaria*, 10 (4): abril, España.
- Iannacone, J., L. Alvariño & W. Dale 1998b. Pruebas ecotoxicológicas como herramientas para la evaluación del impacto ambiental. Bol. de Lima (Peru). 113: 53-68.
- Jobling S., Nolan M., Tyler C. R., Brighty G., and Sumpter J. P. 1998. *Env. Sci. Technol.* 32(17):2498-2506;
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203: 253-310.
- Kolpin W. D., Furlong E. T. Meyer M. T., Thurman E. M., Zaugg S. D., Barber B. L., Buxton T. H., 2002. *Env. Science & Tech.* 36(6): 1202-1211.
- Kortenkamp, A., Altenburger R. 1999. *Science of Total Environment* 233:131-140.
- Maldonado E. 2003. Experimentación en el Pez cebra, un modelos de biología del desarrollo. (ISSN-0188-137X). Mensaje Bioquímico. Vol XXVII. Pag: 147-155
- López E. J., A. 2009. Crecimiento de la diatomea *Thalassiosira pseudonana* en cultivos estáticos con iluminación continua y fotoperiodo a diferentes salinidades Biotecnia, XI (1): enero-abril [en línea] Disponible en internet: <http://www.biotecnia.uson.mx/revistas/articulos/2-art2.pdf>.
- Muncke J. & Eggen R. L. 2006. *Env. Toxicol. & Chem.* 25(10): 2734-2741

- Muncke J. Junghans M., Eggen R.I. L. 2007. testing estrogenicity of known and novel (xeno)-estrogens in the MolDarT using developing zebrafish (*Danio rerio*). *Env. Toxicol* 22(2):185-193
- Munkittrick, Kr., Power, E. A. & Sergy, G. A. 1991. The relative sensitivity of microtox, daphnia, rainbow trout and fathead minnow acute lethality tests. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6: 35-62.
- Nagel R. 2002. ALTEX 19:1/02:38-48;
- NMX-AA-87-SCFI-2010, Análisis de Agua–Evaluación de Toxicidad Aguda con *Daphnia magna* Straus (Crustácea-cladóceras) - Método de prueba. Diario Oficial de la Federación del día 3 de marzo del 2011.
- MX-AA-112-SCFI-1995. Análisis de calidad del agua y sedimentos. Evaluación de toxicidad aguda con *Vibrio fischeri*, (Beijerinck 1889),). Método de prueba. Diario Oficial de la Federación.
- Organization for the Economical Cooperation and Development (OECD). 1992. Fish acute toxicity test. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 203
- Routledge E. J. & Sumpter J. 1996. *Env. Toxicol & Chem.* 15(3):241-248
- Routledge E. J., Sheahan D., Desbrow C., Brigthy G., C. Waldock M. & Sumpter J. P. 1998. *Env. Science & Technol.* 32:1559-1565.
- Snell, W. & G. Persoone. 1989. Acute toxicity bioassays using rotifers. 1. A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis*. *Aqua. Toxicol.* 14: 65-80
- Sumpter, J.P. & Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination on the aquatic environment. *Health Persp.* 103: 103-178.
- Tanaka H., Yakou Y., Takahashi A, Higashitani T., & Komori K. 2001. *Water Science and Technol.* 43(2)125-132.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. Fish acute toxicity test, freshwater and marine. Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.1075. EPA 712–C–96–118.
- van der Ven L., van den Brandhof E., and Wester P. W. 2007. *Env. Toxicol & Chem.* 26(1):92-99.
- Witters H. E., van Genechten & Berckmanns P. 2001 *Water Science & Technol.* 43(2)117-123
- Zacharewski P. 1997. *Env. Science & Technol.* 31(3) :613-622

## 7. ANEXOS



## 7.1 ANEXO A

### Producción Científica

#### Publicación del libro

Pica-Granados Y. y Ramírez Romero P. 2012. **Contribuciones al conocimiento de la Ecotoxicología y Química Ambiental** en México. Ed. IMTA. ISBN Impreso: 978-607-7563-44-0, ISBN Electrónico 978-607-7563-54-9. Pp. 505

#### Artículos en Libro

- 1) Pica –Granados Y., Trujillo D. G., Hernández S. H., Ruiz L.A. 2012. Prospectiva de la ecotoxicología de la subcuenca de San Antón , en Cuernavaca Morelos. *En: Contribuciones al conocimiento de la Ecotoxicología y Química Ambiental en México* Pica-Granados Y. y Ramírez Romero P. ISBN 978-607-7563-44-0.. pag. 69-84
- 2) Pica Granados Y. 2012. Tipo y relevancia de las fuentes de compuestos emergentes y aspectos toxicológicos. En: *Contaminantes Emergentes, su Importancia, Retos y Perspectivas sobre la medición, el tratamiento y la reglamentación* Ed. G. Moeler y G. Buelda. CRIQ (Centre de Recherche Industrielle du Quebec). ISBN 978-607-7563-53-2. pag. 29 - 47

## Artículo en Revista Arbitrada

*Aceptado para Publicación*

- 1) Mendoza C. A., Ramírez-Romero P., Pica-Granados Y., Cuesta Z., I. J., Salazar C., L., Sobrino F. A. (Aceptado). Intercalibración de las pruebas con *Daphnia magna* (Strauss, 1820) y *Pseudokirshneriella subcapitata* (Hindak, 1990) en México: Herramientas potenciales para el monitoreo ambiental. **Hidrobiología.**

## Artículos en memorias con ISBN:

- 1) Pica-Granados Y., Hernández S. H., y Trujillo D. G., 2012. Indicadores de efecto en el desarrollo de *Danio rerio* para detección de fármacos. En: AMEQA- SETAC- México Memorias. ISBN: 978-607-719-002-8
- 2) Rosales E. K., Trujillo D. G., Pica- Granados Y. 2012. Metodologías para la extracción de principios activos a partir de productos farmacéuticos. En: AMEQA- SETAC- México Memorias. ISBN: 978-607-719-002-8
- 3) Pica-Granados Y., Trujillo D.G., Hernández S. H. 2012. Avances en la implementación y calibración de la prueba de toxicidad con algas inmovilizadas, *Pseudokirchneriella subcapitata* para su uso en exposición *in situ* En: AMEQA- SETAC- México Memorias. ISBN: 978-607-719-002-8
- 4) Trujillo D. G., Pica-Granados Y., y Hernández S. H., 2012. Eficacia de tres mezclas desinfectantes en la eliminación de infecciones que afectan la producción de huevos de peces *Danio rerio* y su inocuidad en el desarrollo embrionario En: AMEQA- SETAC- México Memorias. ISBN: 978-607-719-002-8

# CONTRIBUCIONES AL CONOCIMIENTO DE LA ECOTOXICOLOGÍA Y QUÍMICA AMBIENTAL EN MÉXICO

YOLANDA PICA GRANADOS  
PATRICIA RAMÍREZ ROMERO

CONTRIBUCIONES AL CONOCIMIENTO DE LA ECOTOXICOLOGÍA Y QUÍMICA AMBIENTAL EN MÉXICO





## Índice

<b>Ecotoxicología</b>	
Cianobacterias y cianotoxinas dulceacuícolas en ambientes tropicales: una revisión de la problemática. <i>S. Nandini y S.S. S. Sarma</i>	9
Evaluación de la toxicidad de extractos acuosos de cianobacterias mediante el ensayo con semillas de lechuga. <i>Galindo-Alcazar O., Martínez- Jerónimo, F., Olvera-Ramírez, R,</i>	29
Inhibición del crecimiento de microalgas y cianobacterias por metabolitos producidos por cianobacterias. <i>Águila-Maldonado I., Martínez-Jerónimo F. , Olvera-Ramírez R.</i>	38
Modificaciones en la conducta de escape de <i>Poeciliopsis gracilis</i> por efecto del zinc. <i>García Batalla N., Venegas Hernández E., Molina Arroyo H., Galicia Isasmendi S., Zumaquero Ríos J. L., Mangas-Ramírez E.</i>	47
Aplicación de la prueba de campo abierto en toxicología acuática. <i>Venegas Hernández E. , García Batalla., N , Molina Arroyo H., Galicia Isasmendi I. S., Zumaquero Ríos J. L., Mangas-Ramírez E.</i>	56
Prospectiva de la ecotoxicología de la subcuenca de San Antón, en Cuernavaca, Morelos. <i>Pica-Granados Y. Trujillo Domínguez G., Hernández Salgado H., Ruíz-López A. J.</i>	69
Sensibilidad al cadmio, cromo y niveles bajos de oxígeno de tres poblaciones mexicanas del anfípodo <i>Hyalella azteca</i> . <i>Guzmán-Martínez M. C. y P. Ramírez-Romero.</i>	85



Monitoreo Ambiental	
Evaluación ambiental del estado trófico y toxicidad en el embalse Zimapán, México. <i>Bravo-Inclán L., Saldaña-Fabela M. P., Sánchez-Chávez J. J.</i>	99
La contaminación de recursos naturales en el estado de Hidalgo, México. <i>Peña Betancourt S. D., Vidal Gaona M. G., Córdova I. A.</i>	112
Evaluación de la calidad ambiental en playas de uso recreativo (Acapulco, Gro.). <i>Flores Mejía M. A., Flores Hernández M., Ríos Miranda M. L.</i>	123
Evaluación de la contaminación puntual y difusa en la bahía de Acapulco, Guerrero. <i>Arellano Franco H. E., Saldaña-Fabela M. P., Ruiz López A. J., Izurieta Dávila J. L.</i>	133
Biomonitoreo de la contaminación metálica atmosférica con <i>Tillandsia usneoides L.</i> , en Tlaxcoapan, Hidalgo. <i>Calvario-Rivera C. I., Beltrán-Hernández R. I., Del Razo-Jiménez L. M., Vázquez-Rodríguez G. A., Lucho-Constantino C. A.</i>	146
Captación de metales en hongos del género <i>Lycoperdon</i> del Valle de México. Guerrero. <i>Gutiérrez, P., Ramos-Bello, R., Hernández-Quiroz M.</i>	158
Contaminación microbiológica en un lago urbano eutrófico del Estado de México. <i>Gómez Q. L., Salamanca Quevedo E., Torres-Alvarado M. R., Sepúlveda Jaúregui A., Calva Benítez L. G., Hoyos Santillán J., Thalasso Siret F.</i>	171
Evaluación periódica de cianobacterias toxigénicas en florecimientos de un lago urbano en la Ciudad de México. <i>Martínez-García C, Medina-Jaritz N., Pineda-Mendoza R., Olvera-Ramírez R.</i>	181
Monitoreo de microcistina en el lago de Pátzcuaro, México, por un método de Elisa. <i>Tomasini-Ortíz A. C., Sánchez-Chávez J., Bravo-Inclán L. A.</i>	191

<b>Evaluación de Riesgo</b>	
Relaciones ambiente-salud: los vínculos que nos mantienen como miembros del ecosistema. <i>Montero R., Arellano O., Belmont J., Dávila V., Serrano L.</i>	205
Salmonella spp. como bioindicador bacteriológico alternativo de la contaminación fecal en agua. <i>Basulto-Solis Y. Y., Pacheco Ávila J., Ponce-Caballero C., Quintal-Franco C.</i>	216
Evaluación del Riesgo a la Salud por la fumigación aérea con malatión en Hidalgo, Tamaulipas. <i>Heyer-Rodríguez L, Arroyo-Díaz R. N., Varela-Fuentes S., Guevara-García N., Ramos-García O. G.</i>	230
Mercurio Total en Huachinango de las Costas Mexicanas. <i>Ramírez-Romero P., Solórzano-Ochoa G., Ramírez-Islas M.E., de la Rosa-Pérez A., Ortuño-Arzate T., Padilla-Torres J. E., Trejo-Ramírez J. G.</i>	242
Genotoxicidad asociada al índice de masa corporal, evaluada mediante la prueba de micronúcleos en mucosa bucal. <i>Torres Bugarín O., Esparza- Méndez G., Torres Mendoza B. M., Zavala Aguirre J. L</i>	252
Disminución de la genotoxicidad y citotoxicidad asociada a la obesidad. <i>Basulto-Martínez M., Rosales González M. H., Serratos- Guízar A., Torres-Bugarín O.</i>	257
Genotoxicidad de la sibutramina en células de la mucosa bucal de personas con IMC mayor o igual a 27 kg/m2. <i>Torres-Bugarín O., Serratos-Guízar A., Torres-Mendoza B.</i>	262



<b>Química Ambiental</b>	
Degradación de los PCBs 101 y 138 mediante el sistema fotoelectro-Fenton. <i>Gutiérrez-Hernández R., Cruz-Ornelas R., Peralta-Hernández J., Hernández-Ramírez A., Geissen V., Malo-Rivera E., Bello-Mendoza R.</i>	273
Oxidación Anódica de residuos farmacéuticos. <i>Cruz-Ornelas R., Gutiérrez-Hernández R., F., Castro-Chan R. A., Malo-Rivera E. A., Bello-Mendoza R.</i>	284
Tratamiento de lixiviados aplicando en método Fenton. <i>Amador Cruz M., Tapia Cruz R. M., Pineda Flores G.</i>	294
Evaluación de la toxicidad por respirometría en lodos activados que procesan agua residual industrial compleja. <i>Tovar-León, F., Sánchez-Meza, J. C., Pacheco-Salazar, V. F., Pavón-Silva, T. B., Guerrero-García P., Venables B.</i>	301
Caracterización de la materia orgánica en suelos acondicionados con lodos residuales. <i>Ferniza García F., Lugo de la Fuente J, Vaca Paulín R.</i>	311
Mineralización del carbón en vermicomposta empleando lodo residual y residuos orgánicos. <i>Del Águila P., Lugo J., Vaca R., González C.</i>	325
Estabilización de vermicomposta con lodo residual mediante la determinación de CO <sub>2</sub> . <i>Téllez L. M. L., Del Águila J. P., Lugo de la Fuente, J. A., R. Vaca P. y E. García V.</i>	338
Efecto de la adición de lodos residuales en la actividad microbiana del suelo. <i>Carrasco Salero F., Lugo de la Fuente J. A., Vaca Paulin R.</i>	349
Aplicación del lodo residual sobre el crecimiento del cultivo de maíz. <i>Armenta R., Lugo J., Vaca R.</i>	359
Evaluación de coagulantes naturales para la deoloración de aguas residuales. <i>Capilla Piedras J. N., Salgado Juárez L., López Olguín J. F., Zayas Pérez M. T.</i>	374
El sistema del CO <sub>2</sub> en el sur del Golfo de México. <i>Vázquez G. F., Díaz de León H. L. M., Alexander M. V. H.</i>	384
Estimación de la salinidad del Lago de Xochimilco considerando ciertos parámetros químicos (aniones y cationes). <i>Arcos Ramos R., Cruz Martínez P., Díaz Hernández I. S.</i>	404
Índice de calidad del agua residual industrial generada en la Ciudad de México. <i>Flores-Jacinto P., Meléndez-Estrada J., Amezcua Allieri M. A.</i>	415
Evaluación de la distribución de dos plaguicidas organofosforados. <i>Herrera- Cárdenas J. A., Navarro Frómata A. E., Tamariz Flores V., Mangas Ramírez E., Bonilla y Fernández M. N.</i>	430

Biomarcadores	
Alteraciones tisulares en el hígado del bagre de Tecolutla, Veracruz. <i>Matadamas-Guzmán M., Guzmán-García X., López-Vite S., Becerra-Amezcuca M. P., González Rebollar S., Hernández-Calderas I.</i>	441
Inhibición de colinesterasa plasmática en Rana Leopardo ( <i>Lithobates berlandieri</i> ) por exposición a organofosforados. <i>Baquedano-Bustillos A., Cobos-Gasca V., Gutiérrez-Ruiz E., Aranda-Cirerol P.</i>	451
Evaluación de la contaminación genotóxica de la laguna “La Alberca” Villamar, Michoacán, mediante eritrocitos micronucleados y anomalías nucleares en peces. <i>Montes-Rosas A., Zavala-Aguirre J. L., García-Ulloa Gómez M., Buelna-Osben H. R., Torres-Bugarín O.</i>	464
Establecimiento de las condiciones adecuadas de mantenimiento del ostión <i>Crassostrea virginica</i> (Gmelin), previas a la realización de bioensayos. <i>Barrera Escorcía G. e I. Wong Chang</i>	474
Variación de biomasa bacteriana en dos estaciones en suelos contaminados por hidrocarburos. <i>Perea-Cantero R.A., Sánchez-Ríos J. L., Rodríguez-Salazar R. B., Iniesta-Mejía C., Barrera-Jiménez I.</i>	489

## 7.2 ANEXO B

Certificados de Registro de desarrollos tecnológicos en INPI

## ANEXO B.1

### **Registro de Autor**

**03-2012-011312264800-01**

*Paquete tecnológico de Métodos Analíticos. Protocolo de Prueba para el desarrollo de la prueba de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, adaptada a la norma ISO 6341 , 19996 y NMX AA-87-SCFI y adecuados al sistema de gestión de la calidad que rige en laboratorios acreditados (4 Protocolos)*

# CERTIFICADO

## Registro Público del Derecho de Autor



GOBIERNO  
FEDERAL

SEP

Para los efectos de los artículos 13, 162, 163 fracción I, 164 fracción I, 168, 169, 209 fracción III y demás relativos de la Ley Federal del Derecho de Autor, se hace constar que la **OBRA** cuyas especificaciones aparecen a continuación, ha quedado inscrita en el Registro Público del Derecho de Autor, con los siguientes datos:

**AUTORES:** HERNANDEZ SALGADO HOMERO  
PICA GRANADOS YOLANDA  
TRUJILLO DOMINGUEZ GISSEL

**TITULO:** PAQUETE TECNOLOGICO DE METODOS ANALITICOS .  
PROTOCOLOS DE PRUEBA PARA EL DESARROLLO DE LA  
PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON DAPHNIA MAGNA  
ADAPTADO A LA NORMA ISO 6341, 1996 Y NMX  
AA-87-SCFI-2010 Y ADECUADOS AL SISTEMA DE GESTION  
DE LA CALIDAD QUE RIGE EN LABORATORIOS  
ACREDITADOS

**RAMA:** LITERARIA

**TITULAR:** INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGIA DEL AGUA (CON  
FUNDAMENTO EN EL ARTICULO 83 DE LA L.F.D.A.)

Con fundamento en el artículo 3° de la Ley Federal del Derecho de Autor el presente certificado ampara única y exclusivamente la obra original Literaria.

Con fundamento en lo establecido por el artículo 14 fracciones I, II y III de la Ley Federal del Derecho de Autor, el presente certificado no ampara las ideas en sí mismas, las fórmulas, soluciones, conceptos, métodos, sistemas, principios, descubrimientos, procesos e invenciones de cualquier tipo; el aprovechamiento industrial o comercial de las ideas contenidas en las obras; los esquemas, planes o reglas para realizar actos mentales, juegos o negocios.

L.F.D.A.- Artículo 168.- Las inscripciones en el registro establecen la presunción de ser ciertos los hechos y actos que en ellas consten, salvo prueba en contrario. Toda inscripción deja a salvo los derechos de terceros. Si surge controversia, los efectos de la inscripción quedarán suspendidos en tanto se pronuncie resolución firme por autoridad competente.

---

Número de Registro: 03-2012-011312264800-01

---

03-2012-011312264800-01

Página 1 de 2





# CERTIFICADO

## Registro Público del Derecho de Autor



**GOBIERNO  
FEDERAL**

**SEP**

La presente firma ampara el registro número: 03-2012-011312264800-01

México D.F., a 31 de enero de 2012

EL SUBDIRECTOR DE REGISTRO DE OBRAS Y CONTRATOS

  
ARTURO NOE CALDERON AGUILAR



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO NACIONAL  
DEL DERECHO DE AUTOR  
REGISTRO PÚBLICO



## ANEXO B.2

**Registro de Autor:**  
**03-2012-011312240300-01**

*Paquete de Protocolos de prueba adecuados al sistema de gestión de la calidad que rige en laboratorios acreditados, para el desarrollo de la prueba de toxicidad aguda con *Vibrio fischeri* (4 Protocolos)*



# CERTIFICADO

## Registro Público del Derecho de Autor



**GOBIERNO  
FEDERAL**

**SEP**

Para los efectos de los artículos 13, 162, 163 fracción I, 164 fracción I, 168, 169, 209 fracción III y demás relativos de la Ley Federal del Derecho de Autor, se hace constar que la **OBRA** cuyas especificaciones aparecen a continuación, ha quedado inscrita en el Registro Público del Derecho de Autor, con los siguientes datos:

**AUTORES:** PICA GRANADOS YOLANDA  
TRUJILLO DOMINGUEZ GISSEL

**TITULO:** PROTOCOLOS DE PRUEBA ADECUADOS AL SISTEMA DE  
GESTION DE LA CALIDAD QUE RIGEN EN LABORATORIOS  
ACREDITADOS, PARA EL DESARROLLO DE PRUEBAS DE  
TOXICIDAD AGUDA CON VIBRIO FISCHERI

**RAMA:** LITERARIA

**TITULAR:** INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGIA DEL AGUA (CON  
FUNDAMENTO EN EL ARTICULO 83 DE LA L.F.D.A.)

Con fundamento en el artículo 3° de la Ley Federal del Derecho de Autor el presente certificado ampara única y exclusivamente la obra original Literaria.

Con fundamento en lo establecido por el artículo 14 fracciones I, II y III de la Ley Federal del Derecho de Autor, el presente certificado no ampara las ideas en sí mismas, las fórmulas, soluciones, conceptos, métodos, sistemas, principios, descubrimientos, procesos e invenciones de cualquier tipo; el aprovechamiento industrial o comercial de las ideas contenidas en las obras; los esquemas, planes o reglas para realizar actos mentales, juegos o negocios.

L.F.D.A.- Artículo 168.- Las inscripciones en el registro establecen la presunción de ser ciertos los hechos y actos que en ellas consten, salvo prueba en contrario. Toda inscripción deja a salvo los derechos de terceros. Si surge controversia, los efectos de la inscripción quedarán suspendidos en tanto se pronuncie resolución firme por autoridad competente.

---

**Número de Registro:** 03-2012-011312240300-01

---

México D.F., a 31 de enero de 2012

EL SUBDIRECTOR DE REGISTRO DE OBRAS Y CONTRATOS

  
ARTURO NOE CALDERON AGUILAR



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO NACIONAL  
DEL DERECHO DE AUTOR  
REGISTRO PÚBLICO

## **7.3 ANEXO C.**

### **Normas Oficiales Mexicanas y Normas Mexicanas**

## ANEXO C.1

Proyecto de Norma Oficial Mexicana-SEMARNAT-2012. Que establece la lista de sustancias sujetas a reporte para el Registro de Emisiones y Transferencia de Contaminantes (RETC). EN CONSULTA PUBLICA

- Generación de Criterios Químicos y Toxicológicos para la incorporación de sustancias.
- La base de sustancias para registro creció de 100 a 208 y se logró la aceptación del sector industrial de incorporación de dos criterios más de selección
- y así mismo desvincular la dependencia de la toxicidad de la Persistencia y Bioacumulación.





**APÉNDICE A. CRITERIOS TÉCNICOS PARA DETERMINAR LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS SUJETAS A REPORTE DEL REGISTRO DE EMISIONES Y TRANSFERENCIA DE CONTAMINANTES.**

Para que una sustancia química se encuentre sujeta a reporte del RETC, deberá estar en la lista de la presente Norma Oficial Mexicana y cumplir con el umbral de reporte establecido.

Para que una nueva sustancia química se pueda incluir en la mencionada lista deberá cumplir con alguno de los criterios siguientes:

**A.1 Acuerdos ambientales de carácter internacional:**

Los compuestos orgánicos persistentes, gases de efecto invernadero y sustancias agotadoras de la capa de ozono que están contempladas en acuerdos ambientales vinculatorios de carácter internacional de los que México forme parte y que requieran manejarse de manera particular.

Las sustancias químicas que se encuentren en otros acuerdos ambientales internacionales vinculatorios para México, serán incluidas siempre y cuando cumplan con los criterios establecidos en el inciso A.3.

**A.2 Normas Oficiales Mexicanas (NOM)**

Las sustancias químicas que estén en las NOM orientadas a la protección ambiental serán incluidas siempre y cuando cumplan con los criterios establecidos en el inciso A.3.

**A.3 Efectos adversos al ambiente**

Las sustancias químicas que se producen o usan en el país y que al ser emitidas o transferidas, causan efectos adversos al medio ambiente, debido a sus características de toxicidad, persistencia ambiental y bioacumulación, de acuerdo con los criterios establecidos en A.3.1 o en su caso, en A.3.2.

**A.3.1 Las sustancias químicas que cumplan al menos con uno de los siguientes criterios:**

Criterios	
Toxicidad aguda por vía oral en animales, medida como DL <sub>50</sub>	≤ 0.5 mg/kg de peso corporal
Toxicidad aguda por vía dérmica en animales, medida como DL <sub>50</sub>	≤ 0.5 mg/kg de peso corporal
Toxicidad aguda por vía inhalatoria en animales, medida como CL <sub>50</sub>	≤ 1.5 mg/m <sup>3</sup>
Toxicidad acuática aguda en animales o plantas acuáticas, medida como CL <sub>50</sub> o CE <sub>50</sub>	≤ 0.1 mg/L
Carcinogenicidad	Grupos 1 y 2A de la IARC <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (International Agency for Research on Cancer).



## ANEXO C.2

### PROY-NMX-AA-112-SCFI-2009

ANÁLISIS DE CALIDAD DEL AGUA Y SEDIMENTOS. EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA CON *Vibrio fischeri*, (Beijerinck 1889), P. Baumann *et al*, 1980 (antes *Photobacterium phosphoreum*). MÉTODO DE PRUEBA.



Documentos con los Avances a noviembre de 2012 de la Norma  
Mexicana

**PROY-NMX-AA-112-SCFI-2009**

ANÁLISIS DE CALIDAD DEL AGUA Y SEDIMENTOS. EVALUACIÓN  
DE TOXICIDAD AGUDA CON *Vibrio fischeri*, (Beijerinck 1889), P.  
Baumann *et al*, 1980 (antes *Photobacterium phosphoreum*). MÉTODO  
DE PRUEBA.

**PROYECTO DE NORMA MEXICANA  
PROY-NMX-AA-112-SCFI-2013**

**ANÁLISIS DE CALIDAD DEL AGUA Y SEDIMENTOS.  
EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA CON *Vibrio  
fischeri*, (Beijerinck 1889), P. Baumann *et al*, 1980  
(antes *Photobacterium phosphoreum*). MÉTODO DE  
PRUEBA.**

*WATER AND SEDIMENT ANALYSIS – ACUTE TOXICITY  
EVALUATION WITH *Vibrio fischeri*, (Beijerinck 1889), P.  
Baumann *et al*, 1980 (originally *Photobacterium  
phosphoreum*) – TEST METHOD.  
(CANCELA A LA NMX-AA-112-1995-SCFI)*

## PREFACIO

En la elaboración del presente proyecto de norma mexicana, participaron las siguientes empresas e instituciones:

- ANÁLISIS DE AGUA, S.A. DE C.V.
- ARVA, LABORATORIO DE ANÁLISIS INDUSTRIALES, S.A. DE C.V.
- ATLATEC, S.A. DE C.V.
- CENICA
- CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO EN ELECTROQUÍMICA, S.C.
- CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA
- CIATEC, A.C.
- COMISIÓN DEL AGUA DEL ESTADO DE MÉXICO
- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA.
- CONTROL QUÍMICO NOVAMANN INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- ECCACIV, S. A. DE C. V.
- ENTIDAD MEXICANA DE ACREDITACIÓN, A.C.
- EQUIPOS PARA DIAGNÓSTICO ANALÍTICO, S.A. DE C.V.
- FASIQ INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- GRUPO ECOTEC, S.A. DE C.V.
- HACH COMPANY
- INDEX-LAB
- INTEMA, S.A. DE C.V.

- INSTITUTO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE TAMAULIPAS, A.C.  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA EN SANEAMIENTO  
AMBIENTAL (CITSA)
- INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO
- INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA
- LABORATORIO DE CALIDAD QUÍMICA VERACRUZANA, S.C.
- LABORATORIO DE QUÍMICA DEL MEDIO E INDUSTRIAL, S.A. DE  
C.V.
- LABORATORIO IDECA, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO FERMI, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO QUÍMICO INDUSTRIAL
- LABORATORIO SERVICIOS AMBIENTALES
- LABORATORIOS ABC QUÍMICA, INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS, S.A.  
DE C.V.
- MERCURY LAB, S.A. DE C.V.
- MÓNICA OROZCO MÁRQUEZ
- PERKIN ELMER DE MEXICO, S.A.
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO CANGREJERA
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO MORELOS
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO PAJARITOS
- PROTECCIÓN AMBIENTAL Y ECOLOGÍA, S.A. DE C.V.
- PROYECTOS Y ESTUDIOS SOBRE CONTAMINACIÓN INDUSTRIAL,  
S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE AGUA Y DRENAJE DE MONTERREY, S.A. DE C.V.

- SERVICIOS DE INGENIERÍA Y CONSULTORÍA AMBIENTAL
- SISTEMA DE AGUAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO DEL GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Ciencia y Tecnología Ambiental.
- UNIVERSIDAD DEL NORESTE, A.C.  
UNELAB - Centro multidisciplinario de servicios ambientales y de alimentos
- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Facultad de Química  
Instituto de Biología  
Instituto de Ingeniería

## ÍNDICE DEL CONTENIDO

<b>Número de Capítulo</b>		<b>Página</b>
1.	OBJETIVO	
2.	CAMPO DE APLICACIÓN	
3.	PRINCIPIO	
4.	REFERENCIAS	
5.	DEFINICIONES	
6.	EQUIPO Y MATERIALES	
7.	REACTIVOS Y DISOLUCIONES	
8.	MUESTREO	
9.	PROCEDIMIENTO	
10.	EXPRESIÓN DE RESULTADOS	
11.	INFORME DE LA PRUEBA	
	APÉNDICE NORMATIVO	
	A Lavado de material y cristalería	
12.	BIBLIOGRAFÍA	
13.	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES	
	APÉNDICE INFORMATIVO	

## **PROYECTO DE NORMA MEXICANA PROY-NMX-AA-112-SCFI-2013**

**ANÁLISIS DE CALIDAD DEL AGUA Y SEDIMENTOS.  
EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA CON *Vibrio fischeri*, (Beijerinck 1889), P. Baumann *et al*, 1980 (antes *Photobacterium phosphoreum*). MÉTODO DE PRUEBA. (CANCELA A LA NMX-AA-112-1995-SCFI)**

*WATER AND SEDIMENT ANALYSIS – ACUTE TOXICITY EVALUATION WITH *Vibrio fischeri*, (Beijerinck 1889), P. Baumann *et al*, 1980 (originally *Photobacterium phosphoreum*) – TEST METHOD.*

**1 OBJETIVO.**

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

**2 CAMPO DE APLICACIÓN**

Este método es aplicable para la evaluación de toxicidad aguda en cuerpos de agua dulce, salobre y marina, aguas residuales industriales y municipales, efluentes agrícolas, sustancias puras o combinadas disolubles en agua, lixiviados, agua intersticial, extractos de solventes y la fracción disoluble de suelos y sedimentos.

**3 PRINCIPIO**

La determinación de la toxicidad con la Bacteria *Vibrio fischeri*, puede realizarse utilizando cultivo fresco, deshidratado o liofilizado. Para el caso de esta norma se utilizará la Bacteria liofilizada.

La prueba se basa en la medición de la reducción de la luminiscencia emitida por la Bacteria *V. fischeri* posterior a su exposición a una muestra problema durante un periodo de 5 a 30 minutos, en comparación con la luminiscencia observada en bacterias que permanecen en las condiciones óptimas del sistema control.



Ante la presencia de sustancias tóxicas, la luminiscencia disminuye de forma proporcional a la carga tóxica en la muestra problema. Este decaimiento sucede como resultado del daño ocasionado a los procesos metabólicos asociados con la respiración bacteriana.

#### **4 REFERENCIAS**

Esta norma se complementa con las siguientes Normas Mexicanas vigentes:

NMX-AA-050-SCFI-2001	Determinación de fenoles en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.
NMX-152-IMNC-2005	Metrología en Química. Vocabulario. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 13 de Diciembre de 2005.
NMX-AA-089/1-SCFI-2010	Protección al ambiente – calidad del agua – vocabulario – parte 1. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 03 de marzo del 2011.
NMX-AA-089/2-1992	Protección al ambiente – calidad del agua – vocabulario – parte 2. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de marzo de 1992.

#### **5 DEFINICIONES.**

Para fines de esta Norma Mexicana, se entiende por:

##### **5.1 Agua desionizada**

Agua que ha sido tratada para remover iones de la disolución.

##### **5.2 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.

##### **5.3 Agua intersticial**

Agua que llena los espacios libres entre las partículas de los sedimentos.

##### **5.4 Agua marina**

Es el agua de mar u océano, cuyo contenido de sales es > a 3% y un pH entre 7,5 y 8,4.

### **5.5 Agua de mar artificial**

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

### **5.6 Concentración efectiva media (CE50)**

Es la concentración de sustancias puras o el porcentaje de una mezcla que inhibe en un 50% la intensidad de la luz emitida por la bacteria *Vibrio fischeri*, después de un periodo exposición de 5 15 y 30 minutos.

### **5.7 Elutriado**

Es el producto del lavado con agua y agitación de materiales sólidos (sedimento y suelo) en el que quedan contenidas las sustancias disolubles.

### **5.8 Extracto**

Es el producto que resulta de la acción de solventes orgánicos sobre un material sólido, a fin de lograr la desorción de sustancias ligadas químicamente al material de origen.

### **5.9 Liofilizado**

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

### **5.10 Toxicidad aguda**

Es el efecto que se manifiesta en los organismos de prueba, luego de exponerlos a las muestras problema por una sola vez, durante un período de 5 , 15 ó 30 min.

### **5.11 Toxicología acuática**

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

### **5.12 Unidades de Toxicidad**

Forma de expresar el grado de toxicidad de una muestra de la cual no se conoce la concentración de las sustancias que contiene. Es aplicable solo a descargas y mezclas complejas Se calcula:  $UT = 100 / CE_{50}$ . En donde 100 es la concentración inicial de la muestra referida en porciento.

### **5.13 *Vibrio fischeri* (antes *Photobacterium phosphoreum*).**

Es una bacteria marina, bioluminiscente, no patógena con forma bacilar, Gram-negativa, anaerobia facultativa, halofílica, posee un flagelo en uno de los polos.

## **6 EQUIPO Y MATERIAL**

### **6.1 Equipo**

- Luminómetro.- Debe detectar la luz emitida en un rango de longitud de onda de 485 a 490 nm.
- Baños de recirculación o sistemas de control de temperatura que deben mantenerse a  $15^{\circ} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  y  $5,5^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ .  
Los equipos descritos pueden ser individuales o estar integrados en un sistema automatizado.
- Congelador ( $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ )
- Refrigerador ( $4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ )
- Parrilla magnética con capacidad de agitación continua durante 48 horas o baño sonicador.
- Parrilla de calentamiento para sistema de extracción. Debe mantener una temperatura entre  $70^{\circ}\text{C}$  y  $80^{\circ}\text{C}$ .
- Centrífuga
- Potenciómetro
- Conductímetro
- Oxímetro
- Horno de secado o estufa.- Con capacidad para mantener una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ .
- Balanza analítica. Con rango de precisión de 0,0001 g.
- Cronómetro
- Sistema de extracción con capacidad mínima de 250 mL.

### **6.2 Material**

- Celdillas de vidrio borosilicato, desechables, compatibles con el luminómetro utilizado.
- Celdillas de vidrio para corrección de color
- Micropipetas automáticas de 1 a 1000  $\mu\text{L}$  de capacidad (volumen fijo o ajustable)
- Puntas para micropipetas de polipropileno y desechables.
- Cubre boca
- Guantes de látex desechables
- Lentes de seguridad
- Matraces volumétricos de 100 mL
- Pipetas volumétricas de 10 mL
- Espátula

- Papel parafilm
- Recipientes de muestreo de vidrio ámbar de borosilicato o de polietileno de alta densidad con capacidad mínima de 20 mL, para muestras de agua, y
- Recipientes de muestreo de vidrio claro o ámbar de borosilicato de boca ancha con capacidad mínima de 500 mL para muestras sólidas (suelos y sedimentos).

## **7 REACTIVOS Y DISOLUCIONES**

### **7.1 Reactivos**

#### 7.1.1 Reactivos biológicos

- Bacteria liofilizada *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177).  
La bacteriana liofilizada debe ser almacenada a una temperatura de -18 °C a -20 °C.

#### 7.1.2 Reactivos con pureza $\geq 99.5\%$

##### 7.1.2.1 Tóxicos de referencia

- Fenol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-OH), con certificado de calidad o certificado por la entidad correspondiente, para ser utilizado como tóxico de referencia.
- Sulfato de zinc hepta hidratado (ZnSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O), con certificado de calidad o certificado por la entidad correspondiente, para ser utilizado como tóxico de referencia.

##### 7.1.2.2 Otros reactivos

- Cloruro de sodio (NaCl).
- Cloruro de potasio (KCl).
- Cloruro de magnesio hexa hidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O).

#### 7.1.3 Reactivos grado Analítico (RA).

- Ácido nítrico concentrado (HNO<sub>3</sub>).
- Cloruro de sodio (NaCl), grado RA.
- Cloruro de magnesio hexa hidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O).
- Sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
- Cloruro de calcio anhidro (CaCl<sub>2</sub>).
- Cloruro de potasio (KCl).
- Bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>).
- Ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>).

#### 7.1.4 Solventes

- Metanol (CH<sub>3</sub>OH), grado HPLC o mayor.
- Acetona (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O), grado HPLC o mayor.
- Agua destilada, o desionizada.

## 7.2 Disoluciones

**7.2.1 De reconstitución.** Agua ultrapura libre de tóxicos, utilizada para rehidratar la bacteria liofilizada.

**7.2.2 Medio de dilución de cloruro de sodio (NaCl).** El mismo medio señalado en el inciso 7.2.1., agregado en una relación masa volumen (m/v): 2% de cloruro de sodio (NaCl).

**7.2.3 Medio de dilución de tres sales.** El mismo medio señalado en el inciso 7.2.1., agregado en una relación masa volumen: 2% de cloruro de sodio; 0,2035% de cloruro de magnesio hexa hidratado ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) y 0,003% de cloruro de potasio (KCl).

**7.2.4 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 a la Tabla 1, eligiendo la preparación adecuada para equilibrar la salinidad de la muestra, o agua marina o salobre natural filtrada no tóxica para *V. fischeri*.

**7.2.5 Disolución de ajuste osmótico.** Agua ultrapura libre de tóxicos (inciso 7.2.1), adicionada con NaCl en una relación masa volumen (m/v) del 22%. O en caso alternativo, adicionar a la muestra NaCl en cristales con pureza  $\geq$  al 99.5%, libre de metales y sulfuros, en una relación de 20g/100mL o cualquiera otra que permita obtener una concentración de 2% de NaCl (m/v).

- **TABLA 1.- Reactivos utilizados en la preparación de agua de mar artificial.**

Sal (g/L)	Agua marina artificial (AMA)	Agua salobre artificial (ASA)
NaCl	22,0	14,19
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	9,7	6,26
$Na_2SO_4$ anhidro	3,7	2,39
$CaCl_2$ anhidro	1,0	0,65
KCl	0,65	0,42
$NaHCO_3$	0,20	0,13
$H_3BO_3$	0,023	0,015
Conductividad ( $\mu S/cm$ ) (20°C)	47,000 $\pm$ 1,000	31,000 $\pm$ 1,000
Salinidad (20°C)	31 $\pm$ 1	20 $\pm$ 1
pH	7,5 $\pm$ 0,2	7,5 $\pm$ 0,2

Se prepara con agua destilada o desionizada.

## 8 MUESTREO

Las muestras de agua se colectan y almacenan en recipientes nuevos y lavados (Anexo Normativo A), de vidrio ámbar o polipropileno, de boca angosta de capacidad

mínima de 20 mL. Deben ser llenados totalmente y cerrados perfectamente. Los envases no deben volver a utilizarse para muestras de toxicidad. Los recipientes deberán 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, a partir de las cuales se obtienen extractos, lixiviados o agua intersticial, se sugiere emplear recipientes de vidrio nuevos y lavados (Anexo Normativo A), de boca ancha con capacidad mínima de 500 mL, ámbar o claro cubierto 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 y cuerda del frasco antes de cerrar. El llenado del frasco debe ser al 75% de su capacidad, eliminando en lo posible el excedente de líquido.

Las muestras deben mantenerse cerradas y mantenidas en frío a una temperatura menor a 6 °C hasta el momento de su análisis, sin la adición de preservadores.

El análisis de toxicidad de las muestras de agua o líquidos deberá iniciarse dentro de los primeros 5 días posteriores a su colecta.

Para muestras de sedimentos y suelos se recomienda mantenerlas en refrigeración de -8 °C a 2 °C e iniciar su análisis dentro de las dos semanas posteriores a su colecta.

Si se obtienen extractos de sedimentos con disolventes, el análisis debe efectuarse durante las seis semanas posteriores a su producción.

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 deberá iniciarse dentro de los periodos señalados en los párrafos anteriores y, al término del pretratamiento efectuar a la brevedad 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, deberá hacerse con base en muestras simples, excepto en los casos en que la autoridad permita el uso de muestras compuestas.

### **8.1 Muestreo en cuerpos de agua**

El muestreo en corrientes, lagos, lagunas, presas y otros cuerpos de agua debe llevarse a cabo tomando debe llevarse a cabo tomando muestras instantáneas o simples del volumen requerido, siguiendo los lineamientos descritos en las Normas Mexicanas aplicables al muestreo y en las consideraciones relacionadas en el capítulo 8 del presente documento.

Las características inmediatas que deben medirse de la muestra en el sitio de colecta son: pH, conductividad, 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.

## **9 PROCEDIMIENTO**

### **9.1 Medidas de seguridad**

El material de muestreo así como todo aquel material desechable, como celdillas de vidrio, pipetas Pasteur, puntas de pipeta, viales de vidrio, y otros recipientes de ésta misma naturaleza, que hayan tenido contacto con las muestras problema, no debe bajo ningún motivo reutilizarse en nuevas determinaciones.

Proveer un ambiente climatizado y un espacio mínimo de 15 cm alrededor de los instrumentos (incubadoras o luminómetro) para evitar calentamiento.

Verificar que los equipos empleados para incubación y reactivación bacteriana cumplan con temperaturas de  $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $5,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$  respectivamente. En caso de emplear sistemas automatizados para la prueba, verificar que no señalen falla en el control de las temperaturas. En caso de detectar alguna anomalía en las temperaturas no deben ser efectuadas pruebas. Vigilar que la temperatura de  $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el sistema de prueba, no se altere durante la sesión de análisis.

Evitar derramar líquidos dentro de los pozos de incubación del luminómetro. En su caso, apagar el aparato, extraer con una pipeta el exceso de líquido y secar con un cotonete.

Las bacterias liofilizadas deberán permanecer almacenadas a temperatura de congelación (de  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) de manera continua hasta el momento de su uso. Solo en caso de su traslado, del congelador al sitio de trabajo o por periodos breves (<12 h), es aceptable su mantenimiento a temperaturas de refrigeración (de  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Si por un periodo igual o mayor a 12 horas las bacterias no fueron adecuadamente preservadas (de  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) las bacterias liofilizadas deberán desecharse.

Antes de iniciar el análisis de muestras, debe efectuarse para cada sesión de trabajo, la determinación de toxicidad de los tóxicos de referencia (9.4). Si se observa cualquier irregularidad de la respuesta bacteriana a éstos, deberá correrse nuevamente dicho análisis. Si persiste la anomalía, deberá verificarse 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 deberá ser descartado y sustituido por uno nuevo.

## 9.2 Preparación y acondicionamiento de las muestras

### 9.2.1 Preparación de muestras de agua dulce

Las muestras de agua dulce deberán 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 7.2.5 (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).

### 9.2.2 Preparación de muestras de agua salobre

La salinidad de las muestras de agua salobre se encuentra en el ámbito de 0,5 a < del 3%. 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 solución diluyente, agua salobre artificial (7.2.4, Tabla 1) o agua salobre natural que no presente toxicidad. Si la salinidad es de 0,5 a < del 2%, la muestra deberá ajustarse al 2% utilizando NaCl en cristales (7.1.2) y emplear como solución diluyente la especificada en 7.2.2.

### 9.2.3 Preparación de muestras de agua marina

La salinidad de las muestras de agua marina se encuentra de 3 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 solución diluyente, agua de mar artificial (7.2., Tabla 1) o agua de mar natural que no presente toxicidad.

### 9.2.4 Preparación de muestras de agua intersticial de sedimentos

Centrifugar el sedimento o succionar el agua intersticial de cada muestra para separar la fase sólida de la fase líquida. Decantar cuidadosamente para recuperar la fase líquida y proceder de acuerdo a los incisos 9.2.1, 9.2.2 o 9.2.3, según sea su procedencia.

### 9.2.5 Preparación de elutriados de sedimentos

Homogeneizar la muestra de sedimento colectada, mezclar con el tipo de agua que corresponda al origen de la muestra o agua de disolución en una proporción 1:4 (m/v), empleando matraces Erlenmeyer de vidrio. Agitar vigorosamente durante 60 minutos, ya sea en una parrilla magnética o cualquier otro equipo de agitación. Centrifugar la mezcla a aproximadamente 3 000 rpm hasta obtener una separación completa de las dos fases. Decantar y recuperar el sobrenadante para el análisis.

#### 9.2.6 Preparación de extractos orgánicos de sedimentos fase sólida con solventes

En el caso de analizar muestras que hayan sido sometidas a un proceso de extracción empleando solventes químicos, ya sea empleando sistema soxhlet o alguno otro disponible, deberá prepararse en paralelo un blanco de extracción. El blanco de extracción se prepara sin adicionar muestra y montando el sistema de extracción, del mismo modo que el empleado para la obtención de los extractos orgánicos de las muestras.

El análisis de toxicidad del extracto orgánico debe efectuarse adicionando un volumen <1%, del volumen total en el sistema de prueba (ej. 25 µL del extracto orgánico en 2500 µL del medio de dilución). Los solventes son tóxicos para *Vibrio fischeri*, en proporciones de <0.1 a 1%, por lo que la proporción exacta adecuada para el desarrollo de pruebas debe previamente experimentarse efectuando análisis de verificación al blanco de extracción, de tal modo que la proporción del extracto orgánico empleado en el sistema de prueba, no produzca inhibición de la emisión luminosa, de otra manera se obtendrán respuestas falsas-positivas sobre la toxicidad de las muestras debido a la interferencia de la toxicidad del solvente y/o del proceso de elaboración de extractos.

### 9.3 Preparación de la suspensión bacteriana

#### Preparación de la suspensión bacteriana

9.3.1 Retirar el cultivo o el liofilizado de la bacteria del congelador, ya sea que la bacteria se mantenga en cultivo o se tenga en condición liofilizada. (APÉNDICE INFORMATIVO X, el cual hará referencia al cultivo y manejo de la Bacteria).

9.3.2 Independientemente de la condición de cultivo o preservación en que se encuentre la bacteria, tiene que Preparar una suspensión bacteria, con la adición de disolución de reconstitución a una densidad aproximada de  $1 \times 10^8$  células por mililitro. Mantenerla a una temperatura de 4°C a 7°C, idealmente de  $5,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

9.3.3 Esperar 15 minutos para que la suspensión bacteriana se estabilice e iniciar de inmediato el desarrollo de pruebas

9.3.4. Si después de 3 horas se tiene volumen remanente de la solución bacteriana, ésta deberá ser desechada.

Adición de la suspensión bacteriana a las soluciones de prueba

9.3.4 A partir de dicha suspensión bacteriana preparar las soluciones de prueba, de acuerdo a las siguientes dos alternativas.

- A. Adicionar 10 µL de la suspensión stock en las celdillas de prueba (de 14°C a 16°C) que contienen 500 µL de solución de dilución (7.2.2) y agitar ligeramente con la mano.
- B. Preparar una suspensión bacteriana de prueba, a partir de la suspensión stock, adicionando a 1 parte de la solución bacteriana, 50 partes de solución de dilución (7.2.2).

Colocar 500 µL de esta suspensión preparada en las celdillas de prueba (de 14°C a 16°C).

#### 9.4 Evaluación de sensibilidad

El laboratorio que realice pruebas de toxicidad con *Vibrio fischeri* tendrá que validar la sensibilidad del organismo, utilizando cualquiera de los tóxicos de referencia señalados en el inciso 7.1.2.1 de esta Norma Mexicana. Esto se debe llevar a cabo en cuanto se presente alguno de los siguientes casos:

- Cuando se prepare una nueva suspensión bacteriana stock (9.3).
- Se inicie el análisis de un lote de muestras.
- Se observen anomalías en la respuesta del control negativo y tóxicos de referencia.

#### 9.5 Tóxicos de referencia

Es muy importante que la concentración del tóxico de referencia pueda ser valorada o verificada, a fin de lograr el control de la variabilidad de la carta control, ya que con base en ella se afinan los límites de confianza y se robustece el control analítico. PONER EN CONTROL DE CALIDAD O PROCEDIMIENTO.

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 y estabilidad en solución.

- Estabilidad en almacenamiento, y
- Facilidad de cuantificación

9.5.1 Fenol.- La CE50 que presenta este compuesto para *Vibrio fischeri* se encuentra entre 13 y 26 mg/L a un tiempo de exposición de 5 minutos. 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 de 2°C a 6°C, de 3 meses a 4 meses.

9.5.2 Sulfato de zinc.- La CE50 de este compuesto para *Vibrio fischeri* se encuentra entre 5 y 12 mg/L a un tiempo de exposición de 10 minutos. La solución patrón se prepara a una concentración de 100 mg/L y se conserva en un frasco ámbar de 2°C a 6°C de 3 meses a 4 meses.

9.5.3 3,5 Diclorofenol.- La CE50 para *Vibrio fischeri* se encuentra entre xx y xx mg/L a un tiempo de exposición de 5 minutos.

**Los valores de CE50 determinados experimentalmente para los tóxicos de referencia, deben quedar dentro de los intervalos mencionados, en caso contrario, se tienen elementos para suponer cualquiera 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 máximo de 4 horas de haber sido reconstituida.**
- **Posible contaminación de alguno de los reactivos o materiales utilizados en el ensayo.**
- **Falta de pericia del analista.**

**Los tóxicos de referencia usados en esta Norma pueden ser sustituidos por cualquier otro, siempre y cuando sea conocida su respuesta en concentración y tiempo de exposición.**

## **9.6 Desarrollo de la prueba CONTINUAR AQUÍ**

Antes de dar inicio al análisis de muestras, hay que cerciorarse del buen estado de los reactivos que se utilizarán, primordialmente del organismo de prueba, presentado para esta Norma Mexicana como la bacteria liofilizada.

### **9.5.1 Prueba presuntiva o exploratoria**

- 9.6.1.1 De acuerdo a las características de cada muestra, lleve a cabo su preparación conforme a los incisos 9.1.1 a 9.1.5.
- 9.6.1.2 Colocar una serie de celdillas (una por cada muestra a analizar) 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  $15^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Registre para su perfecta identificación, qué celdilla corresponde a cada muestra.
- 9.6.1.3 La celdilla inicial debe corresponder al control o testigo, de acuerdo al medio de dilución utilizado para el acondicionamiento de las muestras (incisos 7.2.2 a 7.2.4).
  - 9.5.1.4 Coloque en cada celdilla el volumen de muestra necesario, acorde a las características del luminómetro (generalmente 500 o 1 000  $\mu\text{L}$ )
  - 9.6.1.5 Deje estabilizar las muestras por aproximadamente 5 minutos para que alcancen la temperatura de  $15^{\circ}\text{C}$ .
  - 9.6.1.6 Adicione el volumen necesario de 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana acorde con el equipo utilizado(ver inciso 9.2) en cada una de las celdilla, incluyendo el (los) control(es).
  - 9.6.1.7 Con un cronómetro, tome como tiempo de inicio de la prueba a partir de la adición de la suspensión bacteriana a la primera celdilla.(o utilice el cronometro incluido en el equipo) Al terminar la adición, agite manualmente (homogenice la suspensión) y de forma suave cada celdilla y espere a que transcurran los 5 minutos.
  - 9.6.1.8 Transcurridos los 5 minutos, realice la lectura de cada celdilla, iniciando con la(s) celdilla(s) que contiene el (los) control(es). Para los controles, deberán registrarse valores entre 80 y 100. (o los valores descritos en el procedimiento del proveedor)
  - 9.6.1.9 Realice la lectura de los 15 minutos de exposición para cada celdilla.
  - 9.6.1.10 Para cada celdilla, se anotará el valor de la emisión de luz que arroja el luminómetro.
  - 9.6.1.11 Determinar el porcentaje de efecto (%E) para cada muestra, con base en la luz emitida por el control (LC) y la luz emitida por cada muestra (LM). Ver ejemplo 1.

#### Ejemplo 1:

Una vez registradas las lecturas de cada una de las muestras y el control obtenidas en la prueba presuntiva o exploratoria, se determina el porcentaje de efecto para determinar las diluciones con las que se llevará a cabo la prueba definitiva del análisis.

Suponer que al final de la prueba presuntiva o exploratoria, se obtienen las siguientes lecturas en el luminómetro para un lote de muestras:

TABLA 2. Relación de la luz emitida en la muestra y % de efecto a los 5 minutos



<b>MUESTRA</b>	<b>LC</b>	<b>LM</b>	<b>%E<sup>1</sup></b>
Control*	95	-	-
M1	-	17	82
M2	-	80	16
M3	-	2	98
M4	-	95	0
M5	-	56	41

\* Seleccionar control conforme al tipo de muestra (agua dulce, agua marina o salobre, intersticial, etcétera).

<sup>1</sup> Dado por:

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

Donde:

LC Luz emitida por el control

LM Luz emitida por la muestra

Con los resultados de la Tabla 2, establecemos que la muestra 4 (M4) no es tóxica, por lo que no es necesario llevar a cabo un análisis con diluciones de la misma, en tanto que el resto del lote analítico hay que someterlo a un análisis más, llevando a cabo diluciones.

### **9.6.2 Prueba definitiva**

9.6.2.1 Efectuar una serie de 3 diluciones en un patrón de dilución 1:2, obteniéndose las concentraciones al 90%, 45%, 22,5% y 11,25%, que se preparan transfiriendo volúmenes de 1000 µL a cada celdilla, partiendo de la concentración al 90%. La última celdilla debe contener el control, es decir, únicamente medio de dilución, de acuerdo al tipo de muestra de que se trate. Ver Figura 1, parte 2.

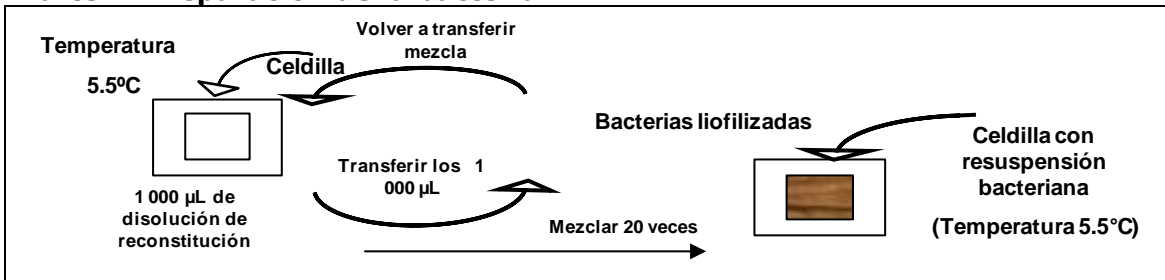
9.6.2.2 En el caso de que los límites de confianza se localicen fuera de  $\pm 15\%$  del valor de la CE<sub>50</sub> obtenido (considerando un 95% de confiabilidad estadística), se debe repetir la prueba para obtener mayor precisión. Con la misma finalidad, también se puede elaborar una serie con un mayor número de diluciones, 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 la que se requiera

9.6.2.3 Adicione el volumen necesario de de la suspensión bacteriana acorde con el equipo utilizado adicionar con una micropipeta 10 µL de suspensión bacteriana a cada una de las celdillas de prueba y agitar ligeramente para asegurar su correcta distribución en la disolución.

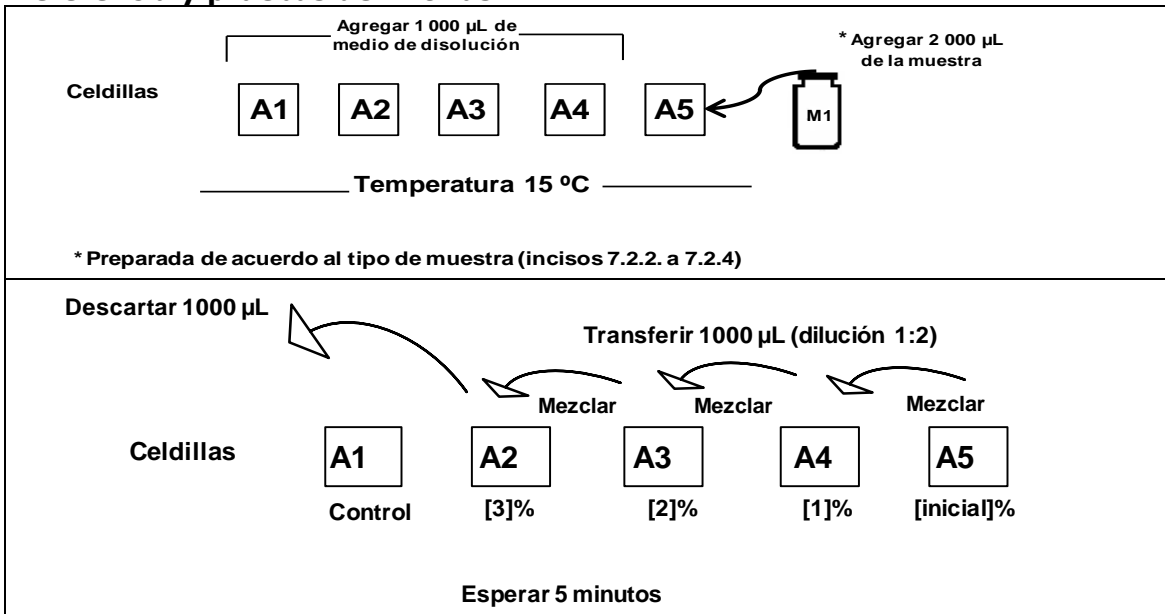
- 9.6.2.4 Inmediatamente poner en funcionamiento el cronómetro ajustado para indicar el tiempo a los 5 y 15 minutos. (o utilice el cronometro incluido en el equipo)
- 9.6.2.5 Al sonar la primera alarma (5 minutos), colocar la celdilla que contiene el control en el luminómetro y calibrar la lectura al 90% de la escala, registrando el valor. Posteriormente, registrar las lecturas del resto de las celdillas A2 a la A5.

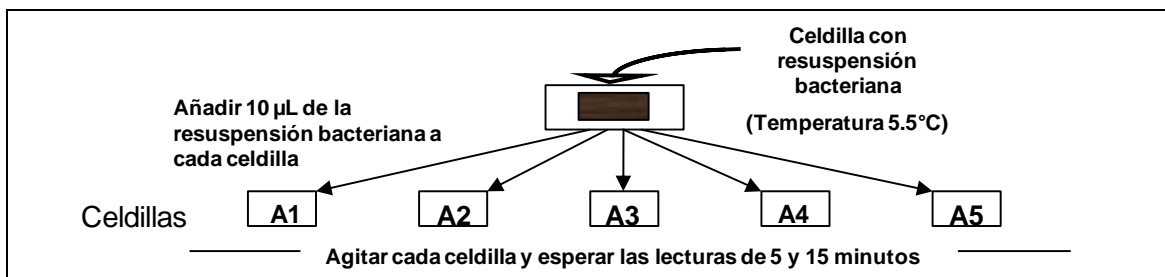
**FIGURA1. Procedimiento para efectuar el análisis de muestras de agua dulce, salobre, marina, intersticial, lixiviados y extracto acuoso de sedimentos. Revisar**

**Parte 1. Preparación de la bacteria**



**Parte 2. Preparación de diluciones. Procedimiento para tóxico de referencia y pruebas definitivas**





## 9.7 Control de calidad analítico

El control de calidad analítico del método de prueba con *V. fischeri* se evalúa mediante la determinación de la CE<sub>50</sub> en un bioensayo de 5 y 15 minutos. El método y las condiciones de prueba deben ser los descritos en la presente Norma Mexicana.

El laboratorio deberá efectuar el análisis del tóxico de referencia, de acuerdo a los incisos 9.3 y 9.4, con el fin de verificar la sensibilidad de los organismos respecto a los valores de CE<sub>50</sub> de la carta control y de sus límites de confianza.

Cada laboratorio que realice pruebas de toxicidad debe contar con un programa de control de calidad que incluya el seguimiento de la respuesta para el tóxico de referencia, controles positivos y negativos, así como el análisis de muestras replicadas, cuyos resultados sean contrastados con los criterios de calidad analíticos siguientes.

### 9.7.1 Control positivo

Provee evidencia de que para cada lote de muestras analizadas, los organismos de prueba contaban con la sensibilidad necesaria. El control positivo es una disolución de fenol (Anexar los otros tóxicos de referencia descritos en ISO), cuya concentración es conocida y de la cual históricamente se conoce su respuesta.

### 9.7.2 Control Negativo

De acuerdo al tipo de muestra analizada, el control negativo estará dado por el medio de dilución que se utilice para acondicionamiento de las muestras, de acuerdo a los incisos 7.2.2, 7.2.3 y 7.2.4.

Este control es de utilidad para dar seguimiento del estado óptimo de salud de los organismos de prueba.

### 9.7.3 Pruebas replicadas

Por cada grupo de muestras analizadas, el laboratorio deberá efectuar como mínimo, un duplicado, seleccionando aleatoriamente una muestra del lote analítico. Los análisis duplicados deberán realizarse a lo largo de la misma sesión de trabajo y bajo condiciones idénticas de manejo.

### 9.7.3.1 Análisis de significancia estadística en pruebas replicadas

El resultado de la prueba de significancia estadística para el análisis de las diferencias de la CE50 de los análisis replicados 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 estará sujeta también a que las diferencias numéricas de los análisis replicados de la muestra seleccionada, sean o no significativas. La prueba puede ser efectuada de la siguiente manera:

1) Cálculo de factores:

Réplica1	Réplica 2
$F_1 = \frac{CE_{50,1}}{\text{Min IC}_1}$	$F_2 = \frac{CE_{50,2}}{\text{Min IC}_2}$

Donde:

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

CE50 = definido como CE50 en el reporte impreso de la prueba

Min IC = límite inferior del intervalo de confianza

2) Relación de factores

$$F_{1,2,3} = \text{anti log } \sqrt{(\log F_1)^2 + (\log F_2)^2 + (\log F_3)^2}$$

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

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

4) Significancia

A partir de los cálculos anteriores, si la resultante de  $CE_{50 \text{ max}} / CE_{50 \text{ min}}$  excede el valor obtenido para  $F_{1,2,3}$ , entonces la diferencia entre las  $CE_{50}$  de las muestras replicadas, es **significativa**, mientras que en el caso de ser menor o igual, la diferencia será **no significativa**.

#### 9.7.4 Interpretación de resultados de control de calidad analíticos

Cuando los valores de la  $CE_{50}$  excedan el ámbito aceptable para el tóxico de referencia y para el control positivo, o se detecten problemas en la reproducibilidad, evidenciada mediante el análisis de pruebas replicadas, el laboratorio deberá revisar los posibles factores de variabilidad, entre los cuales se considera a los siguientes.

- 9.7.4.1 Organismo de prueba: almacenamiento óptimo de la bacteria liofilizada (inciso 7.1).
- 9.7.4.2 Caducidad de la bacteria liofilizada.
- 9.7.4.3 Manejo de la bacteria, durante su reconstitución (inciso 9.2).
- 9.7.4.4 Pericia y consistencia en la realización de las pruebas por parte de los analistas.
- 9.7.4.5 Una vez que se han revisado minuciosamente los factores mencionados se documentarán y se aplicarán las acciones necesarias para la corrección en el manejo de este procedimiento.

## 10 EXPRESION DE RESULTADOS

Al término de la prueba, la  $CE_{50}$  debe obtenerse mediante los siguientes cálculos: O se obtendrá directamente del software del equipo u otro estadístico disponible comercialmente.

La determinación de la  $CE_{50}$  podrá también realizarse mediante el uso del método Probit, aplicando un programa académico institucional o comercial disponible. En cualquier caso deberá determinarse la  $CE_{50}$  y el intervalo de confianza al 95%. (Ver APÉNDICE INFORMATIVO D.2).

10.1 Cálculo del valor de Gamma ( $r$ ) para cada concentración.

$$r_t = I_{tc} / I_t - 1$$

Donde:

$r_t$  es la Gamma al tiempo de incubación ( $t$ )

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

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

10.2 Graficar las Gammas contra la concentración de la muestra en papel para gráficas Log-Log (ver Figura 2); interpolar a valor de Gamma igual a 1 para obtener la CE<sub>50</sub>.

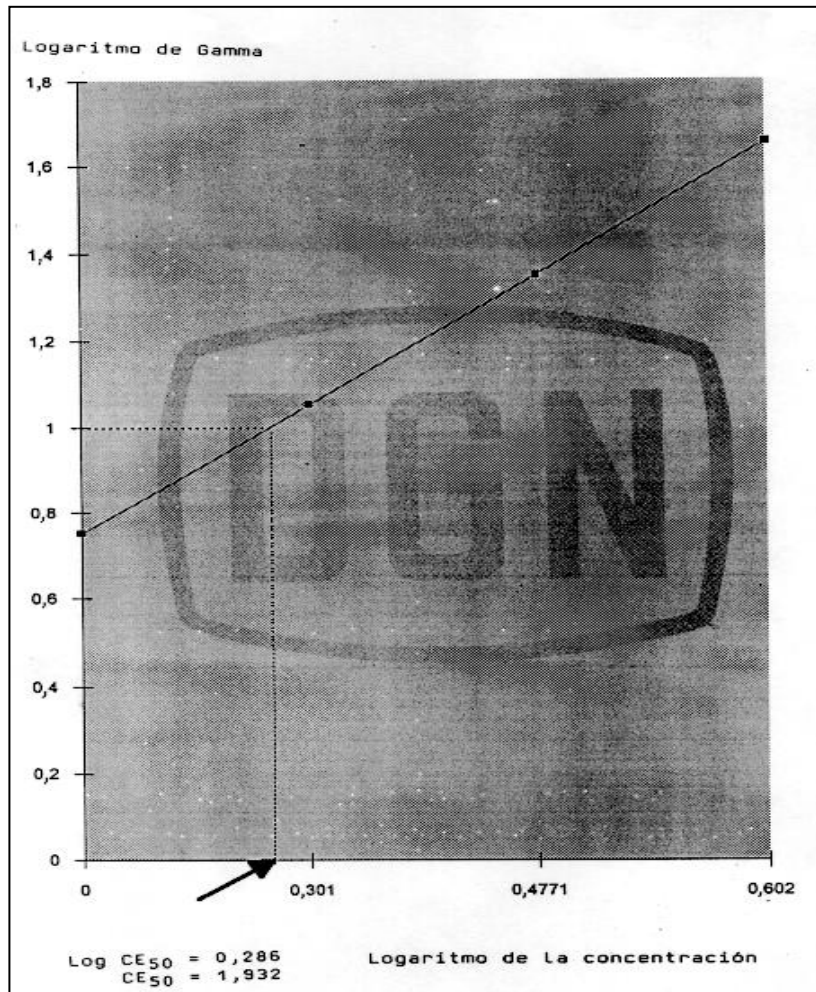


Figura 2.  
Ejemplo para graficar resultados en papel Log-Log.

## 11 INFORME DE LA PRUEBA

### 11.1 Información que debe estar contenida en la bitácora del analista.

- 11.1.1 Referencia del método de prueba aplicado.
- 11.1.2 Tipo de muestra (ver inciso 2: campo de aplicación)
- 11.1.3 Forma de almacenamiento y preservación de la muestra.
- 11.1.4 Datos fisicoquímicos al inicio del análisis: pH, oxígeno disuelto, conductividad, salinidad, temperatura de agua y ambiente (inciso 8.1).

- 11.1.5 Características aparentes de la muestra: olor, color, presencia o ausencia de burbujas y espuma.
- 11.1.6 En el caso de muestras de sedimento indicar tipo de sedimento aparente (limoso, rocoso, arenoso y cualquier otro).
- 11.1.7 Fecha de inicio y término del análisis.
- 11.1.8 Tipo de prueba realizada (exploratoria o definitiva).
- 11.1.9 Concentraciones utilizadas en las pruebas definitivas.
- 11.1.10 Porcentaje de inhibición de la prueba presuntiva o exploratoria.
- 11.1.11 Respuesta obtenida (CE<sub>50</sub>), expresada como Unidades Toxicológicas (UT) y los límites de confianza al 95%.
- 11.1.12 Firma del(los) responsable(s) de la realización de las pruebas de toxicidad.
- 11.1.13 Cualquier detalle de operación no especificado en esta norma e incidentes que puedan afectar el resultado.

Es importante registrar también el tóxico de referencia utilizado en la prueba de sensibilidad y la CE<sub>50</sub> obtenida para el lote de prueba.

## **11.2 Expresión de resultados**

Los resultados correspondientes a la CE<sub>50</sub>, en el rango de tiempo seleccionado, (inciso 3) se expresarán como sigue:

- 11.2.1 Cuando se trate de aguas de tipo residual o de cuerpos de agua, los resultados se expresarán en Unidades Toxicológicas (UT).
- 11.2.2 Cuando se trate de sustancias puras, los resultados se expresarán en miligramos por litro (mg/L).

## **APÉNDICE NORMATIVO**

### **APÉNDICE A: Lavado de material y cristalería ¿???????**

Todos los materiales y recipientes de uso rutinario en el área, 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:

- Lavar el material con detergente libre de fosfatos y enjuagar dos veces con agua de la llave.
- 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.
- Enjuagar con agua destilada o desionizada hasta eliminar los residuos ácidos y escurrir.



- Enjuagar con acetona de grado reactivo analítico o superior a éste para eliminar residuos orgánicos. Enjuagar con agua desionizada y dejar secar a completamente a temperatura ambiente o en horno.
- Se sugiere optar por el secado en horno, por un tiempo mínimo de 3 h a aproximadamente 100 °C para asegurar la eliminación total de los productos de lavado.
- Guardar el material protegiéndolo de contaminación.

## **12 BIBLIOGRAFIA Anexar manual LumisTox?? Y otros?**

- 12.1 APHA, AWWA, WPCF, 1989. Standard Methods for the examination of water and Wastewater. (Métodos para el análisis de agua y de aguas residuales) American Public health Association, Port City Press, Baltimore, Maryland, E.U.A. 10-200 p.± láminas.
- 12.2 Bulich, A.A. 1979. Use of luminescent Bacteria for Determining Toxicity in Aquatic Evironments. (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.
- 12.3 Bulinc, A.A. 1990. The Luminescent Bacteria Toxicity Test: its Potential as an in Vitro Alternative. (Prueba de toxicidad de la bacteria Luminiscente: su potencial como una alternativa in Vitro) Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence 5: 71-71.
- 12.4 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 Pharmaceutucal Chemicals. (Prueba de toxicdad de la bacteria bioluminiscente; una alternativa para la compresión de las pruebas de reactividad biológica in Vitro, así como para la comparación de la reactividad biológica de la mayor parte de los químicos farmacéuticos) Pharmacop. Forum, 15(1): 4812-4814.
- 12.5 CETESB, 1991. Bioensaio de Toxicidade Aguda comPhotobacterium phosphoreum. Sistema Microtox. Método de ensayo. (Bioensayo de toxicidad aguda con Photobacterium phosphoreum. Sistema Microtox. Método de ensayo) Sao Paulo, SP. Brasil s.p.
- 12.6 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.

- 12.7 CETESB, 1991. Implementacao de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. (Implementación de pruebas de toxicidad en el control de efluentes líquidos) Serie Manuais. Sao Paulo, SP. Brasil, 7p
- 12.8 Environment Canadá, 1992. Biological Test Method: Toxicity Test Using Luminescent Bacteria *Photobacterium phosphoreum*. (Método de prueba biológica: Prueba de toxicidad utilizando la bacteria Luminescente *Photobacterium Phosphoreum*) EPS 1/RM/24. 61p.
- 12.9 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.
- 12.10 Dezwart, D. And W. Slooff. 1983 The Microtox as an Alternative Assay in the Acute Toxicity Assessment of Water Pollutants. (el Micotox como un ensayo alternativo del análisis de toxicidad aguda de contaminantes de agua). Aquatic Toxicol. 4:129-138 pp.
- 12.11 DIN 38 412 Parte 34: Determination of the inhibitory effect of wastewater 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 Luminescente liofilizada)
- 12.12 Dutka, B. J., G. Bitton. 1986. Toxicity Testing Using Microorganisms. (Pruebas de toxicidad utilizando microorganismos) Vol. II. CRC Press, Inc. Florida . 202 p.
- 12.13 EPA, 1991. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Método para medir la toxicidad aguda de efluentes y aguas receptoras con organismos marinos y dulceacuícolas) EPA/600/4-90/027.
- 12.14 EPS, 1990. Guidance Document on Control of Toxicity Tests Precision Using Reference Toxicants. (Guía para el control de la precisión en la prueba de toxicidad utilizando tóxicos de referencia) Report EPS 1/RM/12 Canadá.
- 12.15 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.
- 12.16 ISO.80000-1:2009. Quantities and Units-Part 9: Physical Chemistry and Molecular Physics, 1<sup>st</sup> Edition; Geneva, Switzerland.

- 12.17 IUPAC, 2007, Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry-The Green Book, 3<sup>rd</sup> Ed.; RSC Publishing, Cambridge [ISBN 978-0-85404-433-7]. Page 48, Sec. 2.10.
- 12.18 Kinne, o. 1971 Marine Ecology. (Ecología Marina). Volumen 1 Environmental Factores Part. 2. Wiley Interscience. New York
- 12.19 Mallak, F.P. and R. L. Brunker. 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 bacterial systems. Toxicity Series, Vol. 1. Marcel Dekkar, New York. 65-76 pp.
- 12.20 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.
- 12.21 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, Frescwater Fisheries Management Branch, Arthur Rylah Institute, Fisheries Division, department of Conservation Forests and Lands.
- 12.22 Pielou, E.C. 1969. An Introduction to Mathematical ecology. (Introducción a la Ecología matemática) wiley Intersciencias John Wiley and Sons, New York.
- 12.23 SARH. 1992. Ley de Aguas Nacionales. Publicada en el Diario Oficial de la Federación del 1 de diciembre de 1992.
- 12.24 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.
- 12.25 Stephan, C.E., 1977 Methods for calculation an LC<sub>50</sub>. (Métodos para el cálculo de la CL<sub>50</sub>) 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.

### **13 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES.**

Esta Norma coincide básicamente con 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.

Difiere en la inclusión del Apéndice Normativo A (Lavado de material y cristalería) para el cuidado y lavado del material utilizado para las pruebas de toxicidad en general (véase APÉNDICE INFORMATIVO D.1).

**México D.F., a**

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

- D.2 Se recomienda el uso del programa elaborado por la EPA, junto con las actualizaciones al mismo. Dicho programa puede obtenerse en la siguiente dirección electrónica: <http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm>
- D.3 El sistema de extracción utilizado puede ser el Soxhlet o equivalente.

**HERRAMIENTAS BIOLÓGICAS PARA EL ANÁLISIS DE TOXICIDAD Y DETECCIÓN DE EFECTOS ASOCIADOS A CONTAMINANTES, EN SISTEMAS ACUÁTICOS EPICONTINENTALES, COSTEROS Y AGUAS DE USO ANTROPOGÉNICO. DESARROLLO, ADAPTACIÓN Y CALIBRACIÓN DE TECNOLOGÍAS (2ª Etapa).**