

Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo La experiencia en México

Patricia Ramírez Romero y
Ania Mendoza Cantú (compiladoras)

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
Instituto Nacional de Ecología

Ensayos toxicológicos para la evaluación
de sustancias químicas en agua y suelo
La experiencia en México

Ensayos toxicológicos para
la evaluación de sustancias
químicas en agua y suelo
La experiencia en México

Patricia Ramírez Romero
y Ania Mendoza Cantú
(Compiladoras)

SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES
INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA

Primera edición: enero de 2008

D.R. © Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT)
Blvd. Adolfo Ruiz Cortines 4209. Col. Jardines de la Montaña
C.P. 14210. Delegación Tlalpan, México, D.F.
www.semarnat.gob.mx

Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT
Periférico sur 5000. Col. Insurgentes Cuicuilco
Deleg. Coyoacán, C.P. 04530, México, D.F.
www.ine.gob.mx

REVISORES:

Gabriela Castillo Morales, Leonora Rojas Bracho,
Mario Yarto Ramírez y un árbitro anónimo externo

DISEÑO DE LA PORTADA: Álvaro Figueroa
FOTO DE LA PORTADA: Claudio Contreras

ISBN: 978-968-817-882-9
Impreso en México ♦ *Printed in Mexico*

Índice

Agradecimientos	xiii
Prólogo	1
<i>Peter M. Chapman</i>	
Introducción	5
<i>Patricia Ramírez Romero y Ania Mendoza Cantú</i>	
 PRIMERA PARTE. ENSAYOS PARA AGUA DULCE	
 ENSAYOS INTERCALIBRADOS	
Ensayo de toxicidad aguda con el cladócero <i>Daphnia magna</i>	17
<i>María Consuelo Díaz Báez, Yolanda Pica Granados y Alicia Ronco</i>	
Ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla <i>Allium cepa</i> L mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces	33
<i>María Consuelo Díaz Báez, Alicia Ronco y Yolanda Pica Granados</i>	

Ensayo de toxicidad aguda con el cnidario *Hydra attenuata* 41
Yolanda Pica Granados, Alicia Ronco y María Consuelo Díaz Báez

Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga 55
Lactuca sativa L.
Maria Cecilia Sobrero y Alicia Ronco

Ensayo de toxicidad crónica con el alga *Selenastrum* 69
capricornutum (Pseudokirchneriella subcapitata) por el método
de enumeración celular basado en el uso de hemocitómetro Neubauer
Yolanda Pica Granados, Alicia Ronco y María Consuelo Díaz Báez

ENSAYOS CON AMPLIA EXPERIENCIA

Ensayo de toxicidad crónica con microalgas clorofíceas 89
Felipe Fernando Martínez-Jerónimo

Ensayo de toxicidad aguda con cladóceros de la familia 99
Daphnidae
Felipe Fernando Martínez-Jerónimo

Ensayo de toxicidad aguda con larvas y juveniles de los peces 115
Brachydanio rerio y Poecilia reticulata
Felipe Fernando Martínez-Jerónimo y Félix Espinosa Chávez

Ensayo de toxicidad aguda con el pez *Xiphophorus* 127
montezumae
Guillermina Alcaraz Zubeldia, Maribel Badillo Alemán
y Cecilia Vanegas Pérez

Ensayo de toxicidad con el nemátodo *Panagrellus redivivus* 139
Yolanda Pica Granados

ENSAYOS CON EXPERIENCIA

- Ensayo de toxicidad aguda con larvas y juveniles de los peces
tilapia, carpa y cíclidos 155
Omar Zapata-Pérez y Juan Manuel Pedrero Ríos

SEGUNDA PARTE. ENSAYOS PARA AGUA MARINA O SALOBRE

ENSAYOS CON AMPLIA EXPERIENCIA

- Ensayo de toxicidad aguda con camarones peneidos 167
*Cecilia Vanegas Pérez, Gabriela Gaxiola Cortez,
Cecilia Robles Mendoza, Sebastián Zúñiga Lagunas
y Miguel Betancourt Lozano ozano*

ENSAYOS CON EXPERIENCIA

- Ensayo de toxicidad aguda y crónica con la almeja catarina 191
Argopecten ventricosus
Alma Socorro Sobrino Figueroa

TERCERA PARTE. ENSAYOS EN SUELOS

ENSAYOS CON EXPERIENCIA

- Ensayo de toxicidad aguda con la lombriz de tierra 209
Eisenia andrei
*María del Carmen Cuevas Díaz, Ronald Ferrera Cerrato,
Adriana Roldán Martín y Refugio Rodríguez Vázquez*
- Ensayo de citotoxicidad aguda con celomocitos de la lombriz
de tierra *Eisenia foetida* 225
Raúl Uribe Hernández

Ensayo de genotoxicidad con la lombriz de tierra *Eisenia andrei* 233
Diana Corona Vadillo, Silke Cram Heydrich y Emilio Rojas del Castillo

Ensayo de toxicidad subcrónica con la lombriz de tierra 275
Eisenia andrei
María del Carmen Cuevas Díaz, Ronald Ferrera Cerrato,
Adriana Roldán Martín y Refugio Rodríguez Vázquez

Ensayo de inhibición de la germinación y del alargamiento radicular 285
en semillas de cebolla *Allium cepa* y Soya *Glycine max*
Raúl Uribe Hernández

Ensayos de metabolismo microbiano en suelo: actividad 291
deshidrogenasa y tasa de mineralización del nitrógeno
Martha Barajas Aceves

CUARTA PARTE. ENSAYOS APLICABLES A MÁS DE UNA MATRIZ

ENSAYOS CON AMPLIA EXPERIENCIA

Ensayo de toxicidad aguda con la bacteria *Vibrio fischeri* 307
(*Photobacterium phosphoreum*)
Yolanda Pica Granados y Gissel Trujillo Domínguez

Ensayo de mutagenicidad con la bacteria *Salmonella typhimurim.* 319
Prueba de Ames
Ana María Sandoval Villasana

QUINTA PARTE. PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS

Aseguramiento y control de calidad de los ensayos de toxicidad 347
María Consuelo Díaz Báez, Yolanda Pica Granados
y María Cecilia Sobrero

Lavado de material para ensayos de toxicidad	361
<i>Alma Socorro Sobrino Figueroa y Yolanda Pica Granados</i>	
Medición de pH y dureza	363
<i>Isabel Romero Terán</i>	
Procedimiento para la generación de extractos orgánicos y elutriados de suelos y sedimentos para su análisis en ensayos de toxicidad	371
<i>Yolanda Pica Granados y Gissel Trujillo Domínguez</i>	
Extracción de constituyentes tóxicos para las ensayos de toxicidad	383
<i>Isabel Romero Terán</i>	
Método de descapsulación de nauplios de <i>Artemia</i> sp. para la alimentación de camarones peneidos	391
<i>Cecilia Vanegas Pérez y Cecilia Robles Mendoza</i>	
Construcción de una cámara de iluminación casera para el ensayo de toxicidad con el alga <i>Selenastrum capricornutum</i> (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	395
<i>Homero Hernández Salgado</i>	
Cultivo de microalgas para la alimentación de la almeja catarina <i>Argopecten ventricosus</i>	401
<i>Alma Socorro Sobrino Figueroa</i>	
Los autores	405
Índice analítico	407

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer la participación del grupo de expertos que aportó su conocimiento, experiencia, esfuerzo, recursos y entusiasmo al desarrollo de este documento: Ernesto Mangas Ramírez (Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Escuela de Biología); Guillermo Muñoz Mejía (Instituto Mexicano del Petróleo); Irina Ize Lema (Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT); Ivonne Jaisibi Cuesta Zarco (Comisión Nacional del Agua, Gerencia de Saneamiento y Calidad del Agua); Lucía Salazar Coria (Instituto Mexicano del Petróleo, Dirección Ejecutiva de Medio Ambiente y Seguridad); María del Carmen González Macías (Instituto Mexicano del Petróleo, Dirección Ejecutiva de Medio Ambiente y Seguridad); Maribel Badillo Alemán (UNAM, Facultad de Ciencias); Mercedes Reyes (Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental, SEMARNAT) y S.S.S. Sarma (UNAM, Facultad de Estudios Superiores Iztacala).

Se hace una mención especial de agradecimiento a la Dra. Gabriela Castillo Morales, de la Universidad de Chile, por su valioso apoyo en la revisión de este documento. De igual manera, agradecemos ampliamente a la M. en C. Pica Granados del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, a través de quien se logró contar

con el apoyo de la Red Internacional WaterTox del International Development Research Centre, Ottawa, Canadá, que generosamente nos permitió reproducir algunos capítulos del libro: G. Castillo (ed.). 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IDRC/IMTA. Asimismo, agradecemos su valiosa contribución a los autores de estos capítulos.

Por último deseamos agradecer a las autoridades del INE y de la SEMARNAT, a la Universidad Autónoma Metropolitana, al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua y a la Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental A.C., que apoyaron en el desarrollo del Proyecto “Pruebas Biológicas para la Evaluación Ecotoxicológica de Sustancias Químicas”, del cual surge este documento.

PRÓLOGO

En la última década, Latinoamérica, y particularmente en México, han mostrado un crecimiento vigoroso en la producción científica, lo cual es un reflejo del aumento de la inversión en ciencia, tecnología y educación (Hermes-Lima y Navas 2006). Como resultado de lo anterior, el número de graduados con doctorado ha aumentado substancialmente, especialmente en las ciencias ambientales. De forma similar, el número de publicaciones científicas en Latinoamérica ha aumentado en este período a una tasa más acelerada que publicaciones similares en Norteamérica (Zenteno-Savín *et al.*, 2007), a pesar de las limitaciones financieras y de otro tipo, propias de los países en desarrollo (Hermes-Lima *et al.*, 2007).

El aumento de la investigación ambiental en México refleja también la preocupación pública (y por lo tanto política) por el medio ambiente. Más aún, esto refleja el aumento de los esfuerzos de los investigadores mexicanos (y de otros en Latinoamérica) por fortalecer su trabajo colaborando y aprendiendo de investigadores de otros países. El establecimiento de un capítulo de Norteamérica de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC, siglas en inglés) en

México, más que separar el capítulo de Latinoamérica, ilustra esta nueva actitud en el intercambio de conocimiento.

Pero los intercambios entre mexicanos y otros investigadores están lejos de ser unilaterales, tal como lo evidencia este útil e interesante libro, *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. Los investigadores de otros países pueden aprender en este libro cómo los investigadores mexicanos han adaptado y desarrollado pruebas de toxicidad para sus especies y necesidades particulares.

Las pruebas de toxicidad aportan una conexión esencial entre la química ambiental (la presencia de sustancias donde no deben estar o en concentraciones mayores a las basales, medidas a través de análisis químicos) y la ecotoxicología (la presencia de sustancias que causan efectos biológicos adversos, medidos en organismos individuales a través de pruebas de toxicidad y en poblaciones a través de análisis de estructura o función de las comunidades). Este libro sirve como punto de referencia para esta clase de pruebas en México, y a su vez provee información de interés internacional con respecto a especies y pruebas para ambientes tropicales.

La mayoría de las pruebas de toxicidad se basan todavía en especies de ambientes templados, que fueron desarrolladas originalmente para su aplicación en Norteamérica. No obstante, esto está cambiando rápidamente y este libro forma parte de esta evolución. Países como México comenzaron usando pruebas desarrolladas fuera del país, y poco a poco las han ido adaptando a sus condiciones locales específicas. Sin embargo, ahora desarrollan nuevas pruebas más apropiadas para cada país, como se documenta en este libro para el caso de México. Existen diferencias innegables en la sensibilidad de las especies a los contaminantes en las diferentes áreas geográficas del mundo (Chapman *et al.*, 2006). Por lo tanto, esta evolución hacia pruebas de toxicidad específicas para un país o región geográfica es importante, sobre todo para proveer la información más apropiada para la toma de decisiones ambientales.

Recomiendo este libro a investigadores y estudiantes dentro de México, ya que es un punto de referencia apropiado. Sin embargo, también lo recomiendo a investigadores y estudiantes fuera de México, ya que en el hay mucho que aprender de lo que los investigadores mexicanos han logrado.

Finalmente, agradezco a los editores de este libro la invitación para escribir este breve prologo, ya que ha sido un honor hacerlo.

BIBLIOGRAFÍA

- Chapman, P.M., B. McDonald, P.E. Kickham y S. McKinnon. 2006. Global geographic differences in marine metals toxicity. *Marine Pollution Bulletin* 52: 1081-1084.
- Hermes-Lima, M. y C.A. Navas. 2006. The face of Latin American comparative biochemistry and physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 146: 463-469.
- Hermes-Lima, M., N.C.F. Santos, A.C.R. Alencastro y S.T. Ferreira. 2007. Whither Latin America? Trends and challenges of science in Latin America. *IUMB Life* 59: 199-210.
- Zenteno-Savín, T., R.O. Belebóni y M. Hermes-Lima. 2007. The cost of Latin American science. Introduction for the second issue of CBP-Latin America. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 146: 463-469.

Peter M. Chapman
GOLDER ASSOCIATES LTD.

INTRODUCCIÓN

Patricia Ramírez Romero y Ania Mendoza Cantú

A lo largo de la historia, las actividades antropogénicas han generado una gran variedad de contaminantes, los cuales han ocasionado el deterioro de los distintos compartimentos ambientales, incluyendo el agua, el aire, el suelo y el sedimento, así como de la biota asociada y por ende de los ecosistemas. Estos efectos dependen de la concentración en la que se encuentren las sustancias, de su persistencia y de su biodisponibilidad, pudiendo ocasionar desde efectos no letales, como el desplazamiento temporal de algunas especies, hasta la muerte de poblaciones enteras.

Los efectos de la contaminación comenzaron a ser mayormente visibles a partir de la Revolución Industrial (1830-1890), cuando la producción en masa, así como el hacinamiento de personas en las ciudades, provocó condiciones insalubres que produjeron muertes masivas, enfermedades crónicas y degenerativas, además de la devastación de bosques y ríos (Neuzil y Kovarik, 1996). Esta situación se vio magnificada posteriormente por la llamada "Revolución Química", la cual propició la utilización de miles de sustancias para fabricar productos de consumo diario, sin la realización de estudios científicos para conocer los posibles efectos

de la mayoría de estas sustancias en el hombre y el medio ambiente (PBS, 2001). De hecho, en 1983 se estimó que aproximadamente 63,000 compuestos eran de uso común a nivel mundial, de los cuales 3,000 representaban aproximadamente el 90% del peso total de los compuestos producidos por la industria. En ese momento, se estimó además una producción de 200 a 1000 nuevos compuestos por año (Moriarty, 1988).

La investigación formal de los efectos adversos de los contaminantes sobre los organismos se inicia en la década de los años 30, a través del desarrollo de estudios para determinar la relación causa-efecto entre la presencia de contaminantes químicos en el agua y sus efectos biológicos en poblaciones de peces. Estos estudios se enfocaron en su mayoría a confirmar si un contaminante, del que se tenía sospecha, era el agente causante de un daño que ya había ocurrido y se basaron en pruebas de mortalidad de los organismos (pruebas de toxicidad aguda).

Entre los primeros animales acuáticos empleados en los estudios de toxicidad se encuentra la carpa dorada (pez ornamental), la cual es una especie de fácil manejo en condiciones controladas de laboratorio. Sin embargo, cuando se descubre que estos peces eran más resistentes que otras especies de importancia económica y social como las truchas, se inicia el desarrollo de una plétora de pruebas con una gran variedad de organismos. Con ello se demostró claramente la gran diferencia en la sensibilidad a los contaminantes que existe entre los organismos, la cual puede variar incluso en varios órdenes de magnitud (Macek, 1980).

Durante las décadas de 1940 a 1960, los estudios que demostraron los efectos que producían los plaguicidas agrícolas sobre la vida silvestre, catalizaron el desarrollo de la toxicología ambiental y con ella el desarrollo de pruebas en las que, además de la mortalidad, se medían otros indicadores de importancia ecológica, tales como el crecimiento y la reproducción en organismos acuáticos y terrestres. Fue en esta época cuando se reconoció que este tipo de estudios requerían de la participación de investigadores de distintas áreas del conocimiento como son la química, la ecología, la biología y la toxicología, entre otras. El término "ecotoxicología" fue establecido por Thuhaut en 1969 como una extensión natural de la toxicología (que estudia los efectos en organismos individuales) enfocada al estudio de los efectos ecológicos de los contaminantes o bien al estudio de los efectos de los contaminantes en los ecosistemas (Moriarty, 1988). En 1974 se ofreció por primera vez un programa a nivel licenciatura en toxicología ambiental en la Universidad de California, el cual fue pionero en los Estados Unidos y probablemente en el mundo.

En 1977 se reunió un grupo de científicos interesados en formalizar las pruebas de toxicidad con organismos vivos. A esa reunión asistieron no solamente académicos, sino también representantes del gobierno y de la industria, los cuales

discutieron las características que deberían tener estas pruebas y las categorizaron en orden de importancia de acuerdo a las siguientes aspectos:

- Ser capaces de generar resultados ecológicamente significativos
- Ser capaces de generar información defendible desde el punto de vista científico y legal
- Estar basadas en métodos disponibles rutinariamente y ser de amplia aplicación
- Ser predictivas de efectos ecológicos
- Ser aplicables a una amplia variedad de compuestos
- Ser simples y costo-efectivas

De las pruebas analizadas por este grupo de científicos, las evaluaciones de toxicidad aguda recibieron las calificaciones más altas, ya que cumplen con todas o casi todas las características descritas anteriormente (Henry, 2006). No obstante, cabe señalar que este tipo de evaluaciones pueden tener algunas limitantes, ya que el hecho de que demuestren que un contaminante ocasiona la mortalidad del 50% de una especie no necesariamente significa que pueda presentarse un daño ecológico. Asimismo, estas pruebas no pueden detectar fácilmente los efectos de compuestos que no sean letales pero que retarden el desarrollo (crecimiento o reproducción) de las especies, o de compuestos que produzcan daños a nivel poblacional, lo cual puede tener un impacto ecológico considerable (Moriarty, 1988). Sin embargo, es importante enfatizar que aún ahora las pruebas de toxicidad aguda son de gran utilidad porque permiten la construcción de bases de datos para la comparación de la sensibilidad de las especies a los contaminantes o de la toxicidad de un grupo de compuestos en una especie en particular, de una manera rápida y económica.

Actualmente, los resultados de las pruebas de laboratorio son aceptados como estimaciones conservadoras de los efectos potenciales de las sustancias en el medio ambiente y se reconoce su utilidad para los programas de monitoreo ambiental, así como para la regulación de sustancias, ya que son herramientas baratas, que permiten identificar y evaluar los efectos potenciales de los contaminantes generados por actividades agrícolas, acuícolas, industriales y urbanas, sobre componentes biológicos, con lo que se puede priorizar muestras o áreas que requieren estudios más exhaustivos y caros. Aún más, integradas con análisis químicos, geológicos y ecológicos, pueden ser utilizadas para determinar índices de calidad ambiental. Asimismo, las pruebas biológicas pueden ser utilizadas para evaluar la biodisponibilidad de contaminantes, inclusive en muestras con mezclas complejas, mediante una gran diversidad de respuestas a distintos niveles de organización biológica, que van desde alteraciones bioquímicas y moleculares, hasta disfunción endocrina,

modificaciones conductuales y fisiológicas (efectos sobre crecimiento, reproducción) y de los parámetros poblacionales.

Desde el punto de vista regulatorio las pruebas biológicas pueden utilizarse para establecer criterios de calidad ambiental, para controlar descargas de aguas residuales municipales e industriales, para regular el uso y producción de sustancias químicas y para enjuiciar y defender actividades relacionadas con los contaminantes en casos de litigio ambiental. Por último, las industrias pueden incorporar las pruebas biológicas a su proceso de toma de decisiones con respecto al desarrollo, manufactura y comercialización de sus productos (Rand y Petrocelli, 1985).

Alrededor del mundo se han desarrollado ejercicios en los que se ha buscado estandarizar pruebas de toxicidad (APHA, 1981, ASTM, 1980a y 1980b), así como seleccionar grupos de éstas con distintas especies para integrar lo que se conoce como "baterías de pruebas", las cuales tienen como objetivo tratar de identificar los efectos de los contaminantes y de nuevas sustancias sobre un grupo de organismos que representen distintos grupos taxonómicos de importancia ecológica y cuyas sensibilidades sean complementarias. De esta forma se hace posible detectar un efecto en el caso de muestras en las que se desconoce el origen de su toxicidad. Adicionalmente, se ha buscado demostrar su efectividad y reproducibilidad a través de ejercicios de intercalibración y estandarización-armonización.

En particular para Latinoamérica y en el caso de ambientes de agua dulce, cabe destacar el esfuerzo que el Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo de Canadá realizó en 1996, en el cual expertos de ocho países (Argentina, Canadá, Chile, Colombia, Costa Rica, India, México y Ucrania) llevaron a cabo un programa de intercalibración, con la finalidad de validar una batería de ensayos a través de muestras ciegas y su posterior aplicación en muestras ambientales. Como resultado de esta experiencia se publicó el libro *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones* (Castillo, 2004). Cabe destacar que de esta publicación, se han incorporado algunos capítulos en el presente documento, ya que se considera que las pruebas que se describen tienen aplicabilidad probada en México.

EXPERIENCIA Y NECESIDADES EN MÉXICO

En México, el sector académico ha desarrollado estudios de toxicología ambiental desde principios de los años 80, cuando se reconoció la necesidad de conocer los efectos que la contaminación estaba produciendo sobre los ecosistemas y sus componentes. Hoy en día existe un interés creciente por el desarrollo de procedimientos estandarizados para la evaluación ecotoxicológica de los compuestos o

elementos químicos potencialmente dañinos. Esto exige el desarrollo o adaptación de una serie de pruebas biológicas (batería de bioensayos) para medir directamente los efectos tóxicos en los organismos y en los ecosistemas. Este requerimiento surge debido a la necesidad de adaptar los bioensayos a las condiciones particulares de nuestro país, ya que la gran mayoría de las pruebas estandarizadas hoy en día han sido desarrolladas utilizando organismos y condiciones presentes en las áreas templadas del mundo. México, por el contrario, presenta vastas regiones subtropicales y tropicales que difieren en temperatura, iluminación, entre otras condiciones ambientales, lo cual puede cambiar no solamente el comportamiento fisicoquímico de los contaminantes, si no también el metabolismo de los organismos (Johannes y Betzer, 1975). Más aún, México junto con Brasil, Colombia e Indonesia, se encuentra entre los primeros lugares de las listas de riqueza de especies (SEMARNAP, 1999), por lo que es particularmente importante contar con pruebas que garanticen, en lo posible, la protección de esta megadiversidad. Contar con estos procedimientos le permitirá al país tener avances importantes en la protección del ambiente. Sin embargo, estas pruebas no pueden aplicarse tal cual se hace en otros países, ya que es indispensable tomar en cuenta, además de las características propias de nuestros ecosistemas, la infraestructura disponible, así como los recursos humanos y económicos existentes.

La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) ha identificado que varias de las actividades que son de su competencia, tales como la revisión de estudios ecotoxicológicos para el registro de nuevos plaguicidas, el análisis de estudios de evaluación de riesgo ecológico, la caracterización de los residuos industriales, la evaluación de la contaminación por emisiones, fugas, derrames y descargas, entre otras requieren de procedimientos estandarizados para medir los impactos que ocasionan sobre los organismos y los ecosistemas. Hoy en día dichas actividades se regulan únicamente con análisis fisicoquímicos, con los cuales no es posible determinar los efectos biológicos. Por tal motivo, es importante complementar dichos análisis con bioensayos de toxicidad para determinar los efectos sobre los individuos, los cuales puedan afectar a las poblaciones y los ecosistemas en general. Con la interacción de la información generada en ambas pruebas (fisicoquímicas y biológicas) se contará con una visión más completa de los efectos adversos que ocasionan los contaminantes sobre los componentes bióticos y abióticos de los ecosistemas, coadyuvando a determinar medidas integrales para proteger el ambiente.

Esta obra es un primer esfuerzo que trata de apoyar y responder a las necesidades anteriormente planteadas y nace como un proyecto bajo el auspicio e iniciativa del Instituto Nacional de Ecología (INE). La primera etapa de este proyecto consistió en la identificación en el país a los grupos de investigación e

individuos con experiencia en el desarrollo de pruebas de toxicidad para aguas (dulces, marinas y salobres), sedimentos y suelos. Esto se realizó con el apoyo de la Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental A.C., la cual cuenta con una base de datos de investigadores mexicanos. Asimismo, se identificaron expertos durante las diversas reuniones y actividades desarrolladas en la SEMARNAT y el INE. Como resultado de esta colaboración, se logró identificar a un grupo de 34 expertos, así como la generación de una base de datos en la que se detallan las líneas de investigación, las pruebas de aplicación rutinaria y el nivel de experiencia. Esta base de datos estará próximamente a disposición del público en general en la página electrónica del INE. Cabe aclarar que esta base de datos no es exhaustiva y estará sujeta a actualizaciones.

De los expertos identificados se reunió a un grupo en el Centro de Capacitación del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), para discutir los criterios de selección de los bioensayos de toxicidad para ser considerados, así como para estudiar propuestas de pruebas que coincidieran con éstos. Los criterios identificados se incluyen en la tabla 1 (página siguiente).

Con estos criterios, y de un universo de alrededor de 100 distintas especies y pruebas, se seleccionaron los ensayos que se detallan en este documento, los cuales en su mayoría describen evaluaciones de toxicidad aguda. Sin embargo, también se incluyeron algunas pruebas subletales en las que se evalúan parámetros como el crecimiento, la reproducción y otros indicadores.

Como se podrá observar, para algunas especies o grupos taxonómicos se presenta más de un ensayo, esto se debe a que los procedimientos varían en algunos detalles, pero debido a la amplia experiencia y probada efectividad de las pruebas se decidió no excluir ninguno. En un futuro sería recomendable integrar estos ensayos en uno que contenga las mayores ventajas y que por lo tanto dé los mejores resultados.

CLASIFICACIÓN DE LOS BIOENSAYOS

El presente documento ha sido preparado con la finalidad de proporcionar a los usuarios una serie de procedimientos detallados para la realización de varios bioensayos, reflejando la experiencia que han alcanzado cada uno de los expertos que participaron en la elaboración de esta publicación. De esta forma, se presentan 21 ensayos con organismos de agua dulce, de agua marina o salobre y de suelos, así como 8 procedimientos complementarios con métodos o técnicas que faciliten la realización de los ensayos, tales como el lavado de material, la determinación de pH y dureza de muestras acuosas o soluciones, la obtención de extractos o elutriados, entre otros.

Tabla 1. Criterios para la selección de pruebas biológicas en laboratorio para la evaluación toxicológica de sustancias químicas

Factibilidad	<p>Bajo costo Materiales y reactivos disponibles en la localidad Tiempo máximo de desarrollo, 5 días. Procedimiento de prueba simple Facilidad en la evaluación de la respuesta a medir</p>
De los organismos	<p>Fácil obtención (cepario) Fácil mantenimiento Representatividad ecológica De un grupo funcional (productores primarios, herbívoros, carnívoros, descomponedores) De un grupo taxonómico (bacterias, peces, insectos, etc.) De una ruta de exposición (dérmica, ingestión, branquial, combinadas, etc.) Con información sobre su sensibilidad a compuestos tóxicos (base de datos) Estadio más sensible Respuesta relevante a los compuestos tóxicos Sensibilidad a bajas concentraciones Sensibilidad a una amplia variedad de compuestos tóxicos Sensibilidad no redundante con otras especies Con información sobre su biología</p>
De la prueba	<p>Condiciones presentes en los ecosistemas mexicanos (temperatura, salinidad, dureza, etc.) Concentraciones químicas reales (que se presenten en el medio ambiente) Técnicamente seguros y no contaminantes Posibilidad de ser estandarizada Buena exactitud y precisión analíticas Aplicación universal (usos, ventajas y limitaciones) Significado ecológico de los resultados Buenas prácticas de laboratorio Validación de la salud de los organismos de prueba Requerimientos mínimos de sobrevivencia /reproducción en pruebas y testigos Edades o etapas de vida requeridos al inicio de la prueba Comprobación de concentraciones nominales</p>

Los ensayos presentados se clasificaron en tres categorías de acuerdo con su grado de desarrollo y experiencia de aplicación. Las pruebas para las que se cuenta

con una gran experiencia y además se ha demostrado su reproducibilidad en algún ejercicio de intercalibración, se clasificaron en la categoría de ensayos intercalibrados (IC). Una segunda categoría es la de los ensayos con amplia experiencia (AE), la cual se otorgó a aquellas pruebas que han sido empleadas ampliamente por un tiempo considerable, en al menos un laboratorio, y que han demostrado reproducibilidad. Por último se agruparon los ensayos con experiencia (E), que han sido probados y utilizados por un tiempo relativamente corto, por al menos un laboratorio, y que a la fecha han demostrado reproducibilidad, pero que requieren de ser probados por otros laboratorios y con un mayor número de compuestos. Para cada uno de los ensayos se describe la siguiente información:

- Principio de la prueba
- Material, reactivos y equipo necesarios
- Características de los organismos de prueba, incluyendo su obtención, cultivo y condiciones de mantenimiento
- Procedimiento de la prueba, incluyendo la obtención y expresión de los resultados
- Cuadro resumen del procedimiento de prueba

Este libro está dirigido a todos aquellos profesionales y estudiosos del medio ambiente, agencias de gobierno y organizaciones civiles, que requieran probar la toxicidad de muestras ambientales, descargas residuales, compuestos específicos o mezclas de éstos. De los ensayos aquí presentados, los lectores y usuarios pueden realizar una selección de las pruebas que más se ajusten a sus necesidades considerando varios factores, entre ellos que se pueden mencionar los siguientes: las instalaciones y equipos con que se cuente, el tipo de muestras, compuestos y matriz ambiental (agua, suelo, sedimento) que se deseen evaluar, la experiencia en el manejo de organismos de laboratorio, la disponibilidad o acceso a los organismos, etc. Algunas de estas pruebas, por su sencillez, pueden ser adaptadas como experimentos de laboratorio en escuelas de todo nivel.

Los ensayos presentados en este documento abarcan una variedad de ambientes y especies, aunque desafortunadamente no alcanzan a cubrir todas las necesidades que podrían tener el gobierno y otros sectores. Por ejemplo, no se incluyen pruebas con insectos polinizadores, ni con peces de agua marina. Asimismo, reconocemos que es necesaria una mayor experiencia en el desarrollo de pruebas para suelos y sedimentos. Esto quiere decir que en México todavía hace falta dedicar esfuerzos y recursos para la identificación, estandarización e intercalibración de este tipo de ensayos. A partir de este documento se pretende

comenzar una serie de ejercicios de intercalibración que resulten en la elección del grupo de ensayos más apropiado para los ambientes mexicanos. Asimismo, se continuará identificando pruebas adecuadas y expertos que puedan participar con su experiencia en estos ejercicios y se buscará obtener la capacitación necesaria en aquellas áreas en las que no haya experiencia a nivel nacional.

BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association (APHA). 1981. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 15ava edición APHA, AWWA, WEF, Washington, D.C.
- American Society of Testing and Materials (ASTM). 1980a. American Society for Testing and Materials: Standard practices for conducting tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. ASTM E 729-80. Filadelfia.
- . 1980b. American Society for Testing and Materials: Standard practices for conducting tests with larvae of four species of bivalve mollusks. ASTM E 724-80. Filadelfia.
- Castillo, G. (ed.). 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IDRC/IMTA, México. 202 pp. Disponible en: http://www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html.
- Henry, M. 2006. A history of aquatic toxicology. Disponible en: <http://biology.usgs.gov/s+t/SNT/noframe/co116.htm>. Consultado en septiembre 2005.
- Johannes, R. E. y S. B. Betzer. 1975. Introduction: marine communities respond differently to pollution in the tropics than at higher latitudes. En: E. J. Ferguson Wood y R. E. Johannes (eds.). *Tropical marine pollution*. Elsevier Oceanography Series 12, Amsterdam. Pp. 1-12.
- Macek, K. 1980. Aquatic toxicology: fact or fiction? *Environmental Health Perspectives* 34: 159-163.
- Moriarty, F. 1988. *Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems*. Segunda edición. Academic Press, Gran Bretaña. 289 pp.
- Neuzil, M. y W. Kovarik. 1996. *Mass Media and Environmental Conflict: America's Green Cruzades*. Sage Publications, Nueva York. 245 pp.
- Public Broadcasting Service (PBS). 2001. Trade Secrets: A Moyers Report. Disponible en: <http://www.pbs.org/tradesecrets>. Consultado en diciembre 2006.
- Rand, G. M. y S. R. Petrocelli. 1985. *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Methods and applications*. Taylor and Francis, Nueva York. 666 pp.
- SEMARNAP. 1999. *Biodiversidad*. SEMARNAP, México.

Primera parte

Ensayos para agua dulce

ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON EL CLADÓCERO *DAPHNIA MAGNA*

*María Consuelo Díaz Báez, Yolanda Pica Granados
y Alicia Ronco*

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: IC

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Dentro del grupo de los cladóceros, las especies del género *Daphnia* son las más utilizadas como organismos de prueba o de referencia en pruebas de toxicidad. La amplia distribución geográfica, el importante papel que cumplen al interior de la comunidad zooplanctónica, la facilidad de cultivo en el laboratorio, la reproducción partenogenética (lo cual asegura una uniformidad de respuesta), y el corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías, han hecho de este grupo un ideal para la evaluación de toxicidad, a nivel universal.

El género *Daphnia* se ubica dentro del orden cladócera de la clase crustácea, y especies como *D. magna*, *D. pulex*, y *D. similis*, son utilizadas extensivamente en pruebas de toxicidad, por lo cual existe una extensa información sobre las técnicas de cultivo, los requisitos de temperatura, luz y nutrientes, así como su respuesta a muchos compuestos tóxicos. Específicamente, los ensayos

Este ensayo apareció publicado originalmente en G. Castillo (ed.). 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IDRC, IMTA, Canadá. 202 pp. Se reproduce con la autorización de la editorial.

de toxicidad con *D. magna* (figura 1.1), permiten determinar la letalidad potencial de sustancias puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, y agua de poro de sedimentos, entre otros.

Figura 1.1. Vista general de *Daphnia magna*



En las pruebas de toxicidad con *D. magna*, neonatos menores de 24 horas de edad son expuestos a la muestra o compuesto a probar, por un período de 48 horas, al término del cual se cuantifica el número de organismos muertos. Con estos resultados se establece la proporción o porcentaje de mortalidad producida.

MATERIAL

Acuarios de 3 L de capacidad
Pipetas volumétricas y graduadas
de 1, 2, 5, 10 y 20 mL
Pipetas pasteur y bulbos de látex
Peras para pipetas
Puntas para micropipetas
Recipientes plásticos de 30, 50
y 100 mL

Vasos de precipitado de 2 000, 1,000
y 600 mL
Matraz aforado de 100 mL
Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL
Pipetas automáticas de 250, 500
y 1,000 μL
Papel aluminio
Garrafón o bidón de 20 L

Manguera delgada para bombas de acuario	Matraz Kitasato de 2 L
Espátulas	Platos para pesar reactivos
Papel parafilm	Hielera y hielo o geles refrigerantes
	Tubos de ensayo

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	Sulfato de magnesio (MgSO_4)
Cloruro de potasio (KCl)	Sulfato de calcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
Biotina	Tiamina
Vitamina B ₁₂	Selenito de sodio (Na_2SeO_4)
Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)	Agua deionizada o destilada

AGUA DURA RECONSTITUIDA

Para su preparación se recomienda colocar 19 L de agua deionizada o destilada en un garrafón y adicionar 2.4 g de MgSO_4 , 3.84 g de NaHCO_3 y 0.16 g de KCl. Agitar hasta disolver completamente las sales. Paralelamente, disolver 2.4 g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 1 L de agua deionizada o destilada. Es necesario tener en cuenta que la disolución de esta sal puede requerir un período de tiempo prolongado. Terminada la solubilización de la sal, incorporar la solución de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al garrafón, lo cual permitirá obtener 20 L de agua dura reconstituida.

Cuando se determine la necesidad de suplementar el agua dura reconstituida, deben prepararse por separado las soluciones de biotina, vitamina B₁₂, tiamina y selenito de sodio (Elendt y Bias,1990), de la siguiente forma:

Solución de biotina	0.0075 g/L
Solución de vitamina B12	0.010 g/L
Solución de tiamina	0.075 g/L
Selenito de sodio	0.010 g/L

Las soluciones preparadas se deben mantener refrigeradas (4 ± 2 °C), y pueden almacenarse por un período de hasta seis meses. Para un volumen de 20 L de agua dura reconstituida, se adicionan los siguientes volúmenes de cada una de las soluciones: tiamina 20 mL, vitamina B₁₂ 4 mL, biotina 2 mL y selenito de sodio 4 mL.

Una vez terminada la preparación del agua reconstituida, se mide el pH, el cual deberá oscilar entre 7.6 y 8.0. Posteriormente, se airea el líquido de

forma permanente hasta el momento de su uso (mínimo 24 horas). El aire utilizado debe estar libre de grasas y aceites.

EQUIPO

Microscopio estereoscópico	Balanza analítica
Plancha de agitación con magneto	Bombas para acuario
Controlador de temperatura ambiente (equipo de aire acondicionado u otro)	Refrigerador (4 ± 2 °C)
Bomba de vacío	Mechero de Bunsen
de oxígeno disuelto	Autoclave o equivalente Medidor
Tituladores para dureza y alcalinidad	Potenciómetro
Sistema purificador de agua (deionizador, sistema <i>Milli-Q</i> o una fuente de abastecimiento de agua destilada)	Termómetro
	Centrífuga

ORGANISMOS DE PRUEBA

Las hembras partenogénicas de *D. magna* pueden obtenerse directamente de compañías proveedoras de materiales biológicos, quienes certifican la especie. También pueden ser obtenidas de otras fuentes como laboratorios especializados donde se llevan a cabo pruebas de toxicidad con este cladóceros o por medio de su recolección en campo; en estos casos la especie deberá ser identificada taxonómicamente.

CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS DE PRUEBA

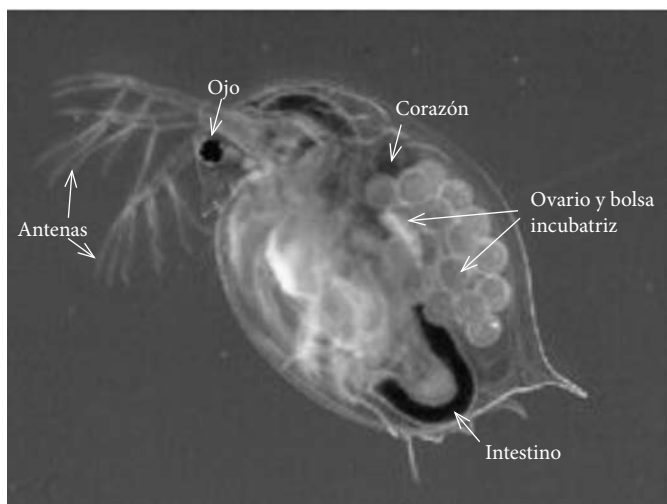
Los cultivos de *D. magna* pueden mantenerse en recipientes de 1, 2 o 3 L o cualquier otro sistema que resulte funcional. Con el fin de mantener condiciones óptimas para el crecimiento de los individuos, se recomienda mantener una densidad poblacional no mayor de 12 individuos por L.

Los organismos se mantienen en agua reconstituida con una dureza entre 160 y 180 mg CaCO₃/L. El agua se prepara en el laboratorio (APHA,1998) y puede suplementarse con una solución de vitaminas y selenio cuando se detecten problemas en la reproducción o se presente una alta mortalidad entre los 14 y 21 días por malformación de las antenas (figura 1.2).

Los cultivos se mantienen a una temperatura de 21 ± 2 °C, un fotoperíodo aproximado de 16 horas luz : 8 horas oscuridad y una intensidad lumínica de alrededor de 800 luxes (tabla 1.1).

Los suplementos alimenticios sólo se adicionan en caso de un crecimiento deficiente del cultivo.

Figura 1.2. Principales rasgos morfológicos de *Daphnia magna*



Se recomienda que antes de utilizar el agua se determine la concentración de oxígeno, la cual debe estar por encima de 6 mg/L, y la dureza, que debe encontrarse dentro del intervalo preestablecido de 160 a 180 mg CaCO_3/L . En caso de que alguno de estos parámetros de control se encuentre fuera de los intervalos mencionados, el agua deberá desecharse.

Igualmente, con cada lote de agua dura preparada, antes de su utilización ya sea como medio de cultivo o para la dilución de las muestras, se debe realizar un bioensayo que permita comprobar que no se presenta ningún efecto sobre la supervivencia de las *daphnias*. Para esta prueba, se coloca en tres recipientes un volumen de 30 mL de agua y 10 neonatos por recipiente. Al cabo de 48 horas la supervivencia deberá ser mayor del 90%, en caso contrario se debe desechar el agua reconstituida.

Tabla 1.1. Condiciones recomendadas para el mantenimiento de cultivos de *Daphnia magna*

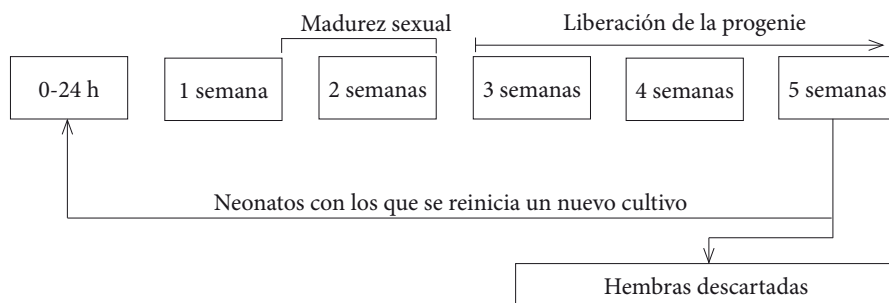
Temperatura	21 ± 2 °C
Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
Intensidad luminosa	800 luxes (luz blanca fría) en la superficie del líquido
Fotoperíodo	16 horas luz : 8 horas oscuridad
Recipientes de mantenimiento	Los cultivos se mantienen en recipientes de 2 L de vidrio transparentes, y deben permanecer tapados
Alimentación	Cultivos puros de <i>Selenastrum capricornutum</i> u otras algas verdes unicelulares
Suplemento alimenticio	Los cultivos pueden suplementarse con las soluciones de vitaminas y selenito
Densidad poblacional	No mayor de 12 individuos/L
Limpieza	Diariamente se deben retirar las exubias (mudas) y los restos que se encuentren en el fondo de los recipientes. Cada viernes se cambia el agua de los acuarios que deben lavarse con una esponja o un paño de tela, enjuagar varias veces con agua de-ionizada. No se debe emplear jabón ni otros detergentes.
Recolección de neonatos	Diariamente se retiran los neonatos con una pipeta Pasteur de plástico con una abertura lo suficientemente ancha para no ocasionar daños a los neonatos.

LIMPIEZA Y MANTENIMIENTO

Para el mantenimiento del cultivo se sugiere aplicar un ciclo de renovación definido a criterio del analista. El ciclo permite mantener un cultivo de organismos en etapas óptimas de reproducción. Algunos autores (CETESB, 1991) recomiendan mantener lotes de individuos separados por edad, desde 0 a 1 semana hasta 4 o 5 semanas de la siguiente forma:

Diariamente o cada tercer día dependiendo del desarrollo del cultivo, deben retirarse los neonatos, los cuales pueden ser destinados al desarrollo de pruebas o eliminados.

Con igual periodicidad se deberá efectuar la limpieza y el suministro de alimento. Para la limpieza se emplea un sifón con el cual se remueven las exubias y los restos de alimento depositados en el fondo de los recipientes.

Figura 1.3. Cultivo de *Daphnia magna* y su ciclo de renovación

Al finalizar, se recupera el volumen de agua en cada recipiente, adicionando o haciendo el recambio de 1/3 del volumen con agua reconstituida fresca.

Una vez por semana (por ejemplo el viernes), después del retiro de los neonatos y antes del suministro de alimento, se transfieren las hembras adultas a recipientes limpios conteniendo partes iguales del agua antigua y agua de dilución fresca.

Se recomienda desechar los organismos mayores de cuatro o cinco semanas, reemplazarlos e iniciar un nuevo cultivo con los neonatos colectados ese día (figura 1.3).

Cuando se van a realizar pruebas, el día previo se extraen los neonatos presentes en el cultivo, para de esa forma garantizar que los neonatos encontrados al día siguiente tengan menos de 24 horas de nacidos.

ALIMENTACIÓN

Para la alimentación de los cultivos, se puede emplear suspensiones de diferentes especies de algas (*Selenastrum capricornutum*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., etc.). Para el cultivo de los dos primeros géneros se recomienda utilizar medio AAP, cuyos detalles de preparación se presentan en el ensayo de toxicidad crónica para *S. capricornutum* de este documento. Para las restantes especies se puede utilizar medio Bristol, cuya composición se detalla en la tabla 1.2.

La alimentación con cultivos de *S. capricornutum* se realiza cada tercer día, después de la limpieza. Para determinar la cantidad de alimento (cultivo algal) que debe suministrarse a cada recipiente del cultivo, se calcula el volumen de la siguiente manera:

Tabla 1.2. Medio de cultivo Bristol para el cultivo de algas

Compuesto	Solución de macronutrientes		
	Solución número	Solución madre (g/L)	mL de la solución madre por L de solución
NaNO ₃	1	25	10
CaCl ₂ •H ₂ O	2	2.5	10
MgSO ₄ •7H ₂ O	3	7.5	10
K ₂ HPO ₄	4	7.5	10
NaCl	5	2.5	10
KH ₂ PO ₄	6	17.5	10
Mezcla 1:1*	8	3.1 g/100mL	
KOH		5.0 g/100mL	1
EDTA			
Mezcla 1:1*	9	0.498 g/100mL	
FeSO ₄ •7H ₂ O		0.1 mL/L	1
H ₂ SO ₄			
H ₃ BO ₃	10	1.142 g/100mL	1
Solución de elementos traza			1 mL/L
Compuesto		Solución Madre (g/100 mL)	
ZnSO ₄ •7H ₂ O		0.882	
MnCl ₂ •4H ₂ O		0.144	
MoO ₃		0.071	
CuSO ₄ •5H ₂ O		0.157	
Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O		0.049	

*Estas mezclas deben ser preparadas hasta el momento previo de su adición al medio Bristol.

$$V = \frac{A * B}{C}$$

donde:

V = volumen del concentrado algal

A = número de *daphnias* por acuario,

B = dosis óptima recomendada (1.5×10^6 células por *daphnia*/día)

C = concentración (número de células/mL) de la suspensión de algas (para su determinación se utiliza una cámara de Neubauer cuyo manejo se presenta en el ensayo con *S. capricornutum*).

CONTROL DE CALIDAD DEL CULTIVO

Para el control de calidad de los cultivos de *D. magna* es necesario establecer las características reproductivas de la población, haciendo un seguimiento de su ciclo de vida. Simultáneamente, se debe establecer la sensibilidad de los organismos de prueba a través de la carta control con el compuesto tóxico de referencia.

Para establecer los cambios en la sensibilidad del cultivo se recomienda realizar mensualmente un bioensayo utilizando el compuesto tóxico de referencia.

Para determinar posibles alteraciones del crecimiento del cultivo de *daphnias* es necesario hacer un seguimiento del ciclo de vida y establecer si hay cambios en el tiempo requerido para alcanzar la madurez sexual, en la tasa reproductiva y en la longevidad de los individuos.

Las características reproductivas se determinan mediante el siguiente procedimiento:

Seleccionar un número conocido (5 a 10) de neonatos pertenecientes al mismo parto (a la misma camada), colocarlos en recipientes individuales en las condiciones estandarizadas de cultivo y anotar la fecha de inicio del ensayo. Registrar diariamente el número de nuevos organismos que aparecen en el recipiente. Al final de la primera semana, debe empezar a observarse el crecimiento y maduración de los neonatos en la cámara de incubación, fenómeno que finaliza con el primer parto. El tiempo transcurrido entre el inicio del experimento y el primer parto define el tiempo requerido para alcanzar la madurez sexual. Este tiempo ha sido definido por varios autores (Edley y Law, 1988; Lewis y Maki, 1981; Goulden *et al.*, 1982), quienes han establecido un valor entre ocho y doce días como óptimo.

A partir del primer parto, registrar diariamente el número de neonatos, los cuales deben removerse de los recipientes de cultivo. Este procedimiento se realiza diariamente por un período de 21 días (un tercio del ciclo de vida), o cuando alguna de las hembras adultas muere (lo que suceda primero). Este registro permite calcular la tasa reproductiva correspondiente al promedio de crías producidas por hembra en un período de 21 días. De acuerdo a Girling y Garforth (1989) y Klüttgen y colaboradores, (1994), el valor promedio normal de neonatos por hembra adulta durante los primeros 21 días oscila entre 112 y 212.

El seguimiento diario de los organismos adultos en cada uno de los recipientes de cultivo, hasta que el número de individuos disminuye a un 20% de la población

inicial, permite calcular la longevidad de los individuos. El tiempo promedio de vida de los organismos corresponde al tiempo transcurrido desde el inicio del experimento hasta el primer caso de mortalidad natural. Valores de 40 a 60 días han sido reportados como la longevidad promedio óptima (Girling y Garforth: 1989; Gutiérrez *et al.*, 1989). La detección de mortalidad en períodos más cortos, hará necesario la revisión de las condiciones de mantenimiento del cultivo o incluso el manejo de suplementos en el agua dura (vitaminas y selenio).

Es importante tener en cuenta, que todas las actividades de limpieza, alimentación y remoción de neonatos del sistema deberán mantenerse regularmente durante todo el tiempo del experimento. Los resultados pueden registrarse en tablas como la que se presenta en la tabla 1.3.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Para el desarrollo de pruebas de toxicidad aguda con *D. magna* se emplean neonatos (< 24 horas de nacidos) expuestos a diferentes concentraciones de una muestra o de un agente tóxico durante un período de 48 horas. Como resultado de dicha exposición, es posible determinar la concentración de la muestra o compuesto problema que produce la muerte al 50% de la población de neonatos expuestos (concentración letal media o CL_{50}), con un nivel de confiabilidad del 95%.

También puede determinarse la concentración mínima donde aún se observa efecto de mortalidad (*Lower Observable Effect Concentration*, LOEC), así como aquella donde la muestra no produce la muerte de neonatos (*No observable Effect Concentration*, NOEC).

PRUEBA EXPLORATORIA

Cuando no hay un conocimiento del origen de las muestras o de su toxicidad, es recomendable llevar a cabo una prueba exploratoria, en la cual se prepara un amplio intervalo de concentraciones sin réplicas (por ejemplo: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, y 100%). Para la prueba se colocan 30 mL de cada una de las diluciones en un vaso de prueba; se pueden emplear vasos de polietileno desechables de 30 mL o vasos de precipitado de vidrio de 50 mL, adecuadamente lavados de acuerdo al procedimiento complementario complementario que se describe al final de este documento.

Se transfieren 10 neonatos en cada uno de ellos y a las 24 horas se registra el número de organismos muertos. Con esta información podrá establecerse el intervalo de concentración en el cual se puede esperar el 0 y el 100% de

Tabla 1.3. Formato para el registro de los resultados de los experimentos de reproducción con *Daphnia magna*

Día	Réplicas										Núm. neonatos	Núm. adultos	Neonatos/ neonatos
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													
.													
.													
21													
Total													

mortalidad. Este intervalo se utiliza como guía para la preparación de las diluciones en las pruebas definitivas.

Para la prueba exploratoria de muestras ambientales (efluentes y aguas superficiales) se recomienda utilizar un factor de dilución de 0.5, el cual permite cubrir un amplio intervalo de dilución (por ejemplo 100, 50, 25, 12.5, 6.25% etc.). Si se observa un alto porcentaje de mortalidad en la concentración más baja seleccionada, después de las primeras 24 horas del bioensayo, será necesario realizar más diluciones de la muestra y repetir la prueba exploratoria en ese nuevo intervalo de diluciones.

Para la preparación de las diluciones de las muestras se utiliza como medio de dilución agua dura reconstituida (180 y 160 mg/L CaCO₃), sin ningún suplemento. En la preparación del agua, se deben determinar los parámetros señalados anteriormente (APHA, 1998).

PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES EN PRUEBAS DEFINITIVAS

Las pruebas definitivas requieren por lo menos 5 diluciones, por lo que es necesario preparar un mínimo de 100 mL por dilución. Este volumen será suficiente para el llenado de las tres réplicas (25 mL en cada uno) de cada concentración.

Además de las diferentes concentraciones de la muestra, se debe preparar, junto con las respectivas réplicas, un control negativo con agua dura reconstituida sin suplementos y un control positivo con una solución del compuesto tóxico de referencia (Cr (VI)), preparada a partir de dicromato de potasio en la concentración que, de acuerdo a la carta control previamente elaborada, corresponda a la CL_{50} (ver procedimiento complementario de aseguramiento y control de calidad de los bioensayos).

El control negativo se emplea para verificar el adecuado estado de salud de los organismos, de manera que se esperaría que al término del experimento su sobrevivencia fuera mayor a 90%. El control positivo se emplea para valorar la estabilidad de la sensibilidad de los organismos. Aunque se pueden utilizar diferentes compuesto tóxicos de referencia, el recomendado para pruebas con *D. magna* es el Cr(VI).

Una vez preparadas cada una de las soluciones, se transfieren diez neonatos de menos de 24 horas de nacidos a cada uno de los recipientes. Para realizar este procedimiento se puede utilizar una pipeta despuntada. Terminada la transferencia, se cubren los vasos con papel Parafilm y se colocan bajo condiciones controladas de iluminación y temperatura (tabla 1.4) por un período de 48 horas.

Transcurrido el tiempo establecido, se revisan los vasos de prueba y se registra el número de organismos muertos en cada uno. La muerte se reconoce, por la carencia de movilidad o la ausencia de ritmo cardíaco. Antes de efectuar las lecturas se agitan los recipientes en forma circular para reactivar el movimiento de los organismos que se posan inmóviles en el fondo. Aquellos que no presenten movilidad pueden observarse con un microscopio estereoscópico para confirmar la ausencia de ritmo cardíaco.

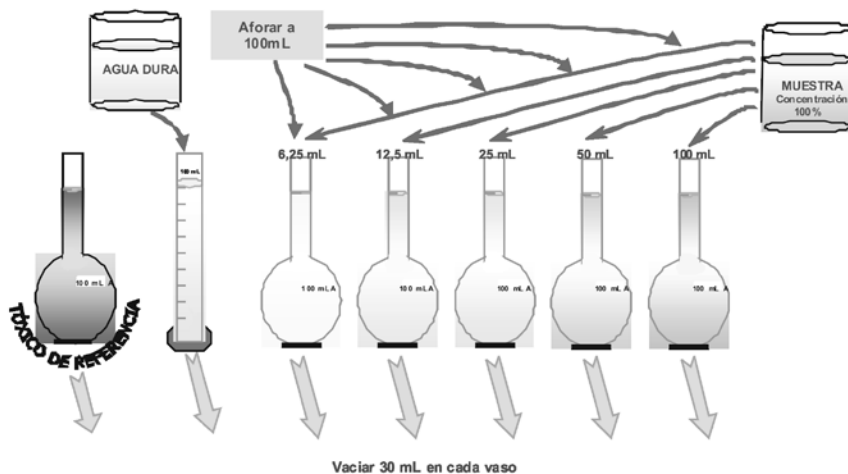
El resumen general de las condiciones de la prueba con *D. magna* se presenta en la tabla 1.4 y en las figuras 1.4 y 1.5.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

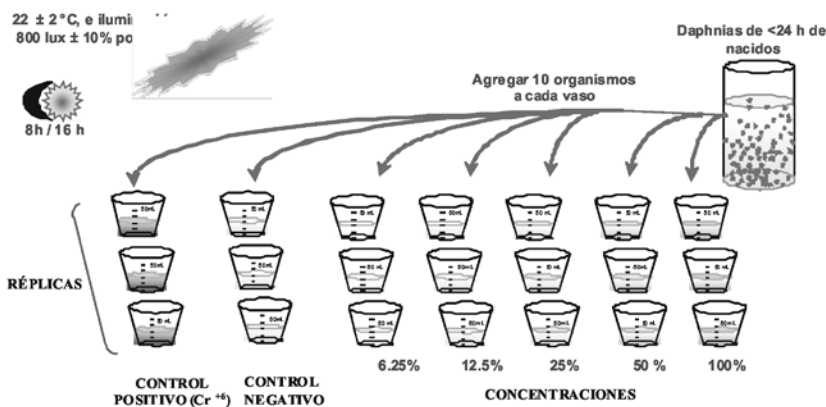
Para el cálculo de la CL_{50} y sus respectivos límites de confianza al 95% se utiliza el método Probit, ya sea manualmente o con ayuda de paquetes estadísticos que tengan este procedimiento.

Figura 1.4. Procedimiento de la prueba para el ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

1. PREPARACION DE DILUCIONES



2. PREPARACIÓN DE PRUEBA



El método de análisis Probit permite estimar la CE_{50} o CL_{50} ajustando los datos de mortalidad mediante una técnica de probabilidad para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancias. El porcentaje de organismos afectados o muertos por la acción tóxica de una sustancia se

Tabla 1.4. Condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	20 ± 2 °C
Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
Intensidad luminosa	10-20 ±E / m ² / s (800 ± 10% luxes)
Fotoperíodo	16 horas luz : 8 horas oscuridad
Recipientes de prueba	Vasos de 50 mL
Volumen de la solución de prueba	30 mL
Edad de los organismos de prueba	< 24 horas
Número de organismos en cada vaso	10
Número de réplicas	3
Agua de dilución	Agua dura reconstituida
Factor de dilución	0.3 o 0.5
Duración de la prueba	48 horas
Efecto medido	Mortalidad (inmovilidad)
Resultado final	CL ₅₀
Aceptabilidad de los resultados	Mortalidad en el control negativo < 10%
Control positivo	Cr(VI) a partir de una solución de K ₂ Cr ₂ O ₇

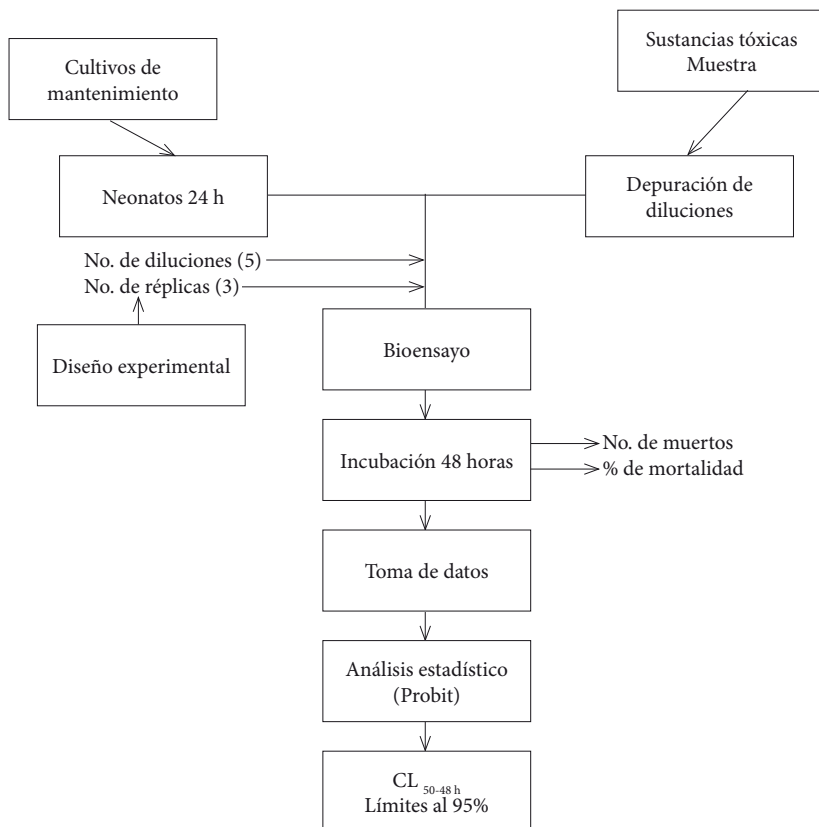
transforma a unidades Probit. Esta transformación permite el ajuste a una línea de regresión, en la cual la concentración correspondiente al Probit 0.5 corresponderá a la cantidad de sustancia capaz de generar el efecto estudiado en la mitad de la población.

Una de las restricciones del método es que para el cálculo de la CE₅₀ o CL₅₀ deben obtenerse valores intermedios entre 0 y 100% de mortalidad.

ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS

- La mortalidad en el control negativo no debe exceder el 10%.
- La concentración final de oxígeno disuelto debe ser mayor de 2 mg/L.
- La CL₅₀ para el compuesto tóxico de referencia deberá estar dentro de los límites de confianza preestablecidos en la carta control. En caso de emplear un control positivo de concentración cercana a la CL₅₀, los valores de mortalidad obtenidos deberán encontrarse cercanos al 50%. Se puede considerar aceptable el encontrar mortalidades entre el 33 y 57%.

Figura 1.5. Diagrama de flujo de las actividades vinculadas al desarrollo del ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*



BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association (APHA). 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Vigésima edición. American Public Health Association. Ap. 8010G, Washington D.C.
- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). 1991. *Agua-Teste de toxicidade com D. similis Clauss 1876, (Cladóceras, Crustácea), Metodo de ensaio*. L5.018. Agosto 1991. CETESB.
- Dutka B.J., 1989. *Methods for Microbiological and Toxicological Analysis of Water, Wastewaters and Sediments*. National Water Research Institute (NWRI) Environment Canada, Canadá.

- Edley, M. T. y R. Law. 1988. Evolution of Life Histories and Yields in Experimental Population of *Daphnia magna*. *Biological Journal of the Linnean Society* 34: 309-326.
- Eldredt B. P. y W. R. Bias. 1990. Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing Effects of the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *Daphnia magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.
- Girling, A. E. y B. M. Garforth, 1989. Influence of variations in culture medium on the survival and reproduction of *Daphnia magna*, *Buletin of. Environmental Contamination and Toxicology* 42:119-125.
- Goulden, C. E., R. M. Comotto, J. A. Jr. Hendrickson, L. L. Horning y K. L. Johnson. 1982. Procedures and recommendations for the culture and use of *Daphnia* in bioassay studies. En: J. G. Pearson, R. B. Foster y W. E. Bishop. (eds.). *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference*. ASTM STP 766, American Society for Testing and Materials, pp. 139-160.
- Gutiérrez, L. E., B. A. Lerdo de Tejada, R. I. Huerto-Delgadillo y C. J. García. 1989. *Procedimientos de evaluación tóxica de efluentes industriales líquidos utilizando Daphnia magna Straus (Cladóceras, Crustácea)*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, México. 105 pp.
- Klüttgen, B., U. Dülmer, M. Engels y H. T. Ratte. 1994., A Dam and Artificial Freshwater for the Culture of Zooplankton. *Water Research*. 28 (3): 743-746.
- Lewis, M. A. y A. W. Maki. 1981. Effects of water hardness and diet on productivity of *Daphnia magna* Strauss, in Laboratory Culture. *Hydrobiology* 85: 175-179.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1991. *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluent and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*. Cuarta edición. Weber, C.I., ed. EPA-600/4-90-027.

ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON BULBOS DE CEBOLLA *ALLIUM CEPA* L MEDIANTE LA EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO PROMEDIO DE RAÍCES

*María Consuelo Díaz Báez, Alicia Ronco
y Yolanda Pica Granados*

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: IC

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Cuando un bulbo de cebolla (*Allium* sp.) se rehidrata se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemas radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz, y por tanto su elongación (Fiskesjö 1985, 1993, 1997).

Este ensayo apareció publicado originalmente en G. Castillo (ed.). 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IDRC, IMTA, Canadá. 202 pp. Se reproduce con la autorización de la editorial.

El efecto puede determinarse en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas al compuesto tóxico contra la de cebollas no expuestas, luego de un período de 72 horas de prueba. La cuantificación del efecto se realiza estableciendo el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces respecto a la longitud promedio de las raíces del control.

MATERIAL

Tubos de ensayo de vidrio de 10 cm de largo y 1.5 cm de diámetro (o recipientes de mayor tamaño, dependiendo del tipo de bulbos a utilizar), gradillas o soportes para tubos, bisturí y reglilla para hacer mediciones en cm o mm.

REACTIVOS Y SOLUCIONES

MEDIO DE CRECIMIENTO

El medio de crecimiento que se utiliza en el desarrollo del ensayo se prepara de acuerdo con lo que se indica en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Medio de crecimiento para *Allium* sp.

Masa de sal para disolver en un litro de agua destilada		
Reactivo		Cantidad (mg)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		236.1
KNO_3		202
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		246
KH_2PO_4		136.1
$\text{Fe EDTA} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$		67.6
Elementos traza		
Reactivo		Cantidad (mg)
MnSO_4		0.55*
CuCl_2		0.0645*
NaMnO_4		0.001*
ZnSO_4		0.0007*
H_3BO_3		0.23*

* Los componentes correspondientes a elementos traza deben ser adicionados a partir de una solución stock.

La solución madre, preparada de acuerdo con lo indicado, se diluye 10 veces con agua destilada, y el pH se ajusta a 7.0 antes de utilizarla. También se puede utilizar agua dura o agua de la llave como medio de crecimiento. En el caso de usar cualquiera de estas opciones, el control negativo y el agua utilizada para preparar las diluciones de los compuestos o las muestras deberán ser los mismos.

ORGANISMOS DE PRUEBA

Para la elaboración de las pruebas se deben seleccionar bulbos de *Allium* sp. (cebolla amarilla) de 1.5 cm de diámetro, secos y sin formación de hojas o raíz. Éstos pueden ser obtenidos del mercado local o adquiridos a través de algún proveedor.

Previo al montaje de la prueba, los bulbos deben limpiarse eliminando la epidermis seca y removiendo, con un bisturí o instrumento punzante, los restos de tejido y raíces del área radicular (figura 2.1 (1)). No se deben dañar las raíces primordiales. Con el fin de eliminar los restos de tejido, es conveniente colocar los bulbos en agua destilada por 2 horas y dejar secar.

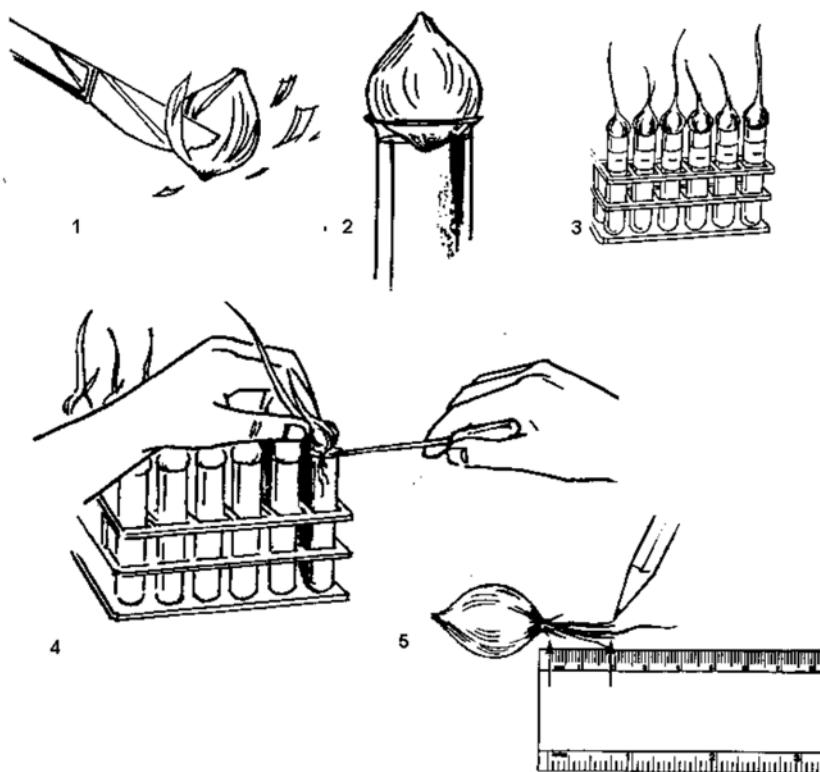
ALMACENAMIENTO DE LOS BULBOS DE CEBOLLA

Se recomienda adquirir los bulbos en vísperas de la realización de pruebas o, en su defecto, almacenarlos en un lugar donde se puedan garantizar condiciones secas y una temperatura entre 10 y 20 °C. En algunas regiones, los bulbos pueden mantenerse almacenados hasta por un año; sin embargo, en zonas geográficas donde la temperatura y la humedad son altas, el almacenamiento está limitado a unos pocos días.

CONTROL DE CALIDAD DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Dado que la prueba con cebollas no requiere mantenimiento de un cultivo, el control de calidad debe enfatizarse en la calidad de los lotes de material a utilizar. Por esa razón, debe darse especial importancia al almacenamiento del material, así como al control de hongos que pueden afectar la viabilidad de las cebollas y su normal desarrollo. Es por ello que se recomienda disponer de un número de cebollas por lo menos 3 o 4 veces mayor al requerido para las pruebas. Su almacenamiento debe hacerse en ambiente exento de humedad, a una temperatura entre 10 y 20 °C.

Figura 2.1. Esquema gráfico de los pasos a seguir en la prueba con *Allium cepa* L.
1) limpieza y pelado de bulbos; 2) ubicación de bulbos en tubos para exposición a las soluciones de ensayo; 3) colocación de tubos en soporte; 4) agregado de soluciones en los tubos durante el ensayo; 5) medición de longitud del haz de raíces al finalizar el tiempo de exposición de los bulbos



PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

CONTROL DE CALIDAD EN LAS PRUEBAS CON *A. CEPA*

Un elemento importante en la elaboración de las pruebas es el proceso de pelado de los bulbos. Durante este procedimiento debe evitarse el daño del anillo radicular. Igualmente, se debe trabajar con un alto número de réplicas para controlar la variabilidad de las pruebas. Se recomienda utilizar 12 réplicas por concentración, con el fin de descartar por lo menos 2 de los valores

más extremos. En el caso que exista un bajo desarrollo radicular en más de 2 bulbos del control, se considera que el lote de bulbos tiene problemas, por tanto los resultados no serán válidos.

Al igual que en todas las pruebas, se debe establecer la sensibilidad de los bulbos a los compuestos de referencia; se recomienda el empleo de Cu(II) a partir de sulfato de cobre y registrar registrar la sensibilidad mediante la confección de una carta control con por lo menos veinte pruebas. Resultados por encima o por debajo de la sensibilidad establecida son indicativos de problemas con el material biológico utilizado.

PREPARACIÓN DE DILUCIONES

Generalmente, se sugiere el empleo de una serie de 5 concentraciones, un control negativo y 1 o 2 controles positivos; este último contiene el compuesto de referencia mencionado en el párrafo anterior.

Para su preparación se emplea el método de dilución en forma secuencial aplicando un factor de 0.2 o 0.3.

Cuando se va a llevar a cabo una evaluación exploratoria, puede emplearse una serie de diluciones logarítmicas (por ejemplo: 100; 10; 1; 0.1; 0.01), lo cual permitirá establecer el intervalo de concentración conveniente para la determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}).

DESARROLLO DE LA PRUEBA

Cuando se trabaja con bulbos de diámetro pequeño, las pruebas se realizan en tubos de ensayo de 10 cm de longitud x 1.5 cm de ancho. En el caso de bulbos de mayor diámetro pueden utilizarse tubos o recipientes de mayor volumen, dependiendo del tamaño de los mismos. Es importante destacar que la profundidad de los recipientes debe ser tal que, al término de la prueba, la elongación máxima no alcance el fondo del recipiente (Fiskesjö, 1985).

En la prueba se utilizan 5 concentraciones de la muestra, un control negativo y 1 o 2 controles positivos, cada una con 12 réplicas. El ensayo se inicia con el llenado de los tubos con cada una de las diluciones y controles; este llenado debe hacerse hasta el borde del tubo. A continuación se colocan los bulbos limpios sobre la boca del tubo, cuidando que la zona radicular quede inmersa en el líquido (figura 2.1 (2)).

Los tubos se colocan en una gradilla, la cual se localiza sobre una mesa que no presente vibraciones y se mantienen a temperatura ambiente

(20 °C) durante un período de 72 horas. Debe evitarse la iluminación directa.

Dos veces al día durante el período de prueba, se debe reponer el volumen perdido por evaporación o absorción. Para reponer este volumen se utiliza la muestra o dilución correspondiente. Se recomienda inclinar el bulbo sin sacar las raíces del tubo, adicionando cuidadosamente el volumen con ayuda de una pipeta Pasteur (figura 2.1 (3 y 4)). En la tabla 2.2 y en las figuras 2.1 y 2.2 se resumen las condiciones de prueba.

Figura 2.2. Ensayo de toxicidad con *Allium cepa* L.

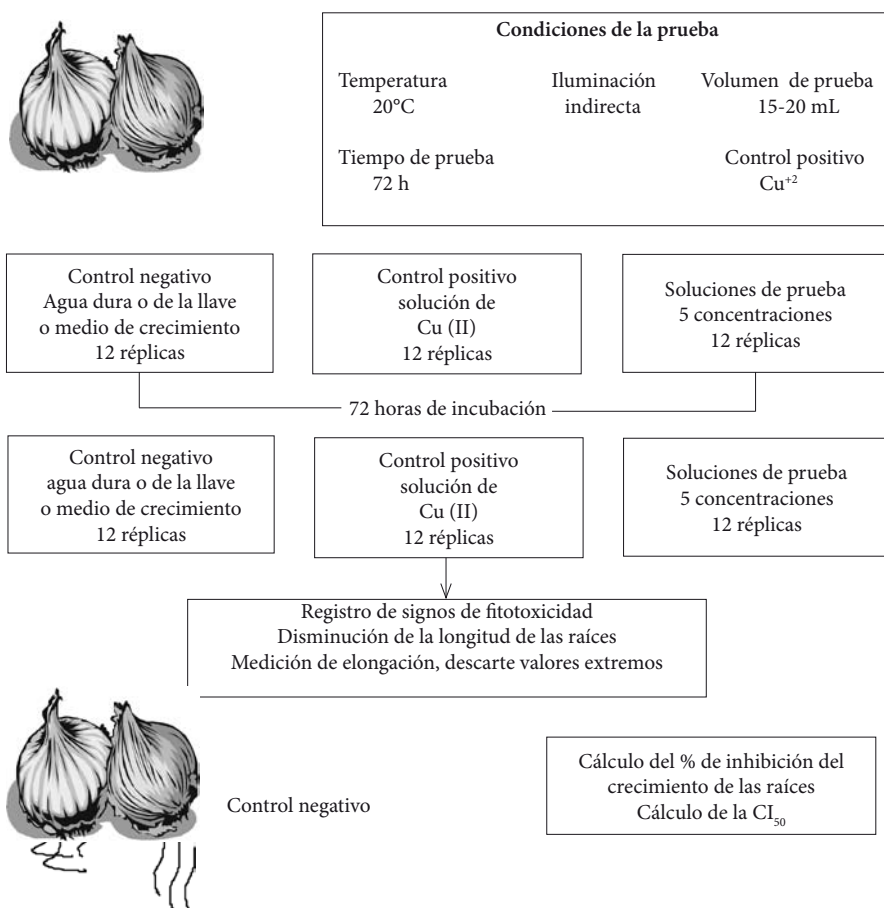


Tabla 2.2. Condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con *Allium cepa* L.

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	20 °C, ambiente
Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
Iluminación	Indirecta
Recipientes de prueba	Tubos de Ensayo de 10 cm x 1.5 cm diámetro
Número de réplicas	12
Material biológico	Bulbos de aproximadamente 1.5 cm de diámetro
Condición de los bulbos	Pelar los bulbos y la base, evitar dañar el anillo radicular
Agua de dilución	Agua de la llave o medio de crecimiento
Número de concentraciones	5
Duración de la prueba	72 horas
Efecto medido	Inhibición de crecimiento de las raíces
Control negativo	Agua de la llave o medio de crecimiento
Control positivo	Cobre (II) a partir de una solución de CuSO_4
Resultado final	CL_{50}

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

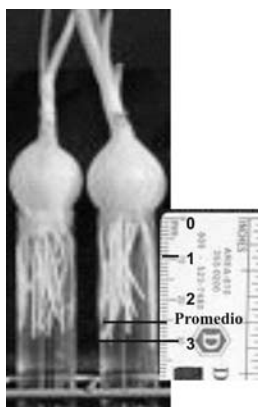
MEDICIÓN

Al término del período de exposición se registra la longitud promedio de las raíces, medición que se lleva a cabo con ayuda de una regla común con escala en milímetros (figura 2.3). La medición se lleva a cabo colocando la escala en el margen del tubo, se ubica el valor de longitud mínimo y máximo donde incide la mayoría de las raíces y el punto medio se define como el promedio. Se efectúa la estimación en cada tubo y se obtiene el promedio matemático de diez réplicas (los dos valores más extremos se descartan). Para obtener el porcentaje de efecto de inhibición se debe realizar la siguiente operación:

$$(\text{longitud del control} - \text{longitud de la muestra}) \times 100 / \text{longitud del control}$$

Con estos valores se construye una gráfica de concentración en función del porcentaje de inhibición y se calcula la CI_{50} mediante cualquiera de los siguientes métodos: Probit, promedios móviles o Sperman y Karber.

Figura 2.3. Elongación de las raíces de bulbos de cebolla después de un proceso de hidratación



BIBLIOGRAFÍA

- Fiskesjö, G. 1985. The Allium Test as Standard in Environmental Monitoring. *Hereditas* 102: 99-112.
- . 1993. The Allium Test in Wastewater Monitoring. *Environmental Toxicology and Water Quality* 8: 291-298.
- . 1997. Allium Test for Screening Chemicals; Evaluation of Cytological Parameters. En: W. Wancheng, J. W. Gorsuch y J. S. Hughes (eds.). *Plants for Environmental Studies*. CRC Press, Florida, pp. 308-329.

ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON EL CNIDARIO *HYDRA ATTENUATA*

*Yolanda Pica Granados, Alicia Ronco
y María Consuelo Díaz Báez*

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: IC

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Los pólipos de agua dulce del género *Hydra* son microinvertebrados de la clase Hydrozoa de amplia distribución geográfica. Se caracterizan por ser animales pluricelulares, cuyas células se disponen en dos capas: la epidermis y la gastrodermis, separadas por una mesoglea gelatinosa, la cual encierra una cavidad digestiva continua que se comunica directamente con el exterior a través de una abertura o boca. Algunas de las células intersticiales de la epidermis dan origen a los órganos característicos de defensa y ataque. Los más conocidos son los nematocistos, que corresponden a los miembros más simples de esta

Este ensayo apareció publicado originalmente en G. Castillo (ed.). 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IDRC, IMTA, Canadá. 202 pp. Se reproduce con la autorización de la editorial.

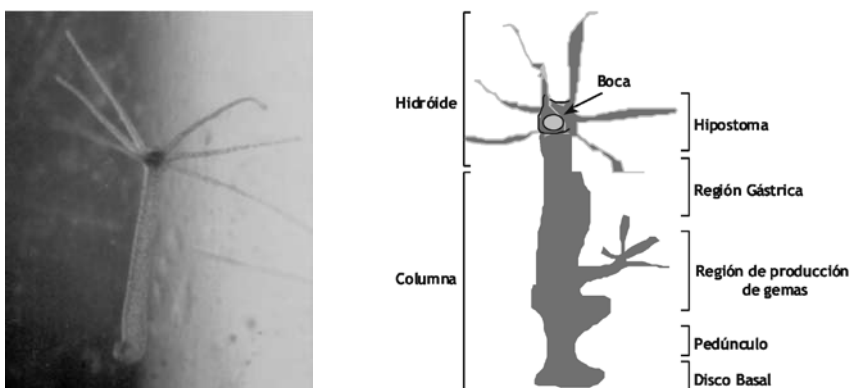
clase. En el extremo inferior presentan un pedúnculo con una base que se adhiere a diferentes superficies; en el extremo anterior se encuentra la boca, rodeada de cinco tentáculos (Campbell y Bode, 1983). Su tamaño varía de 5 a 20 mm de longitud y de 2 a 3 mm de espesor (figura 3.1).

La especie *H. attenuata* es empleada como organismo de prueba por la facilidad de su cultivo en laboratorio, su rápida reproducción, su estructura primaria (ectodermo, mesodermo y endodermo), que favorece el intercambio intra e intercelular y su potencial para la detección de compuestos tóxicos, así como por presentar cambios morfológicos fácilmente reconocibles bajo condiciones progresivas de intoxicación (Trottier *et al.*, 1997).

Los ensayos de toxicidad con *H. attenuata* permiten determinar subletalidad y letalidad potencial de sustancias puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros.

Las pruebas de toxicidad con *H. attenuata* tienen una duración máxima de 96 horas, tiempo durante el cual los organismos son expuestos al compuesto tóxico o muestra problema. Durante el ensayo, diariamente se hace un examen microscópico y se registra los cambios morfológicos producidos. La exposición de los organismos a compuestos tóxicos da lugar a una serie de cambios morfológicos (efectos subletales) y, dependiendo de la concentración, puede producir la muerte de los individuos (efectos letales). Los resultados de las pruebas permiten además de la estimación de la CL_{50} y la CE_{50} , establecer la LOEC, la NOEC y la concentración umbral de efectos observables (Threshold Observable Effect Concentration, TOEC) (Blaise y Kusui, 1997).

Figura 3.1. Morfología de *Hydra attenuata*



REACTIVOS Y SOLUCIONES

Todos los reactivos utilizados deben tener una calidad ACS o por lo menos tener un 99% de pureza. Para la preparación de las soluciones se debe utilizar agua destilada en vidrio o agua calidad *Millipore Super Q*.

MEDIO DE CULTIVO

Para el mantenimiento del cultivo y la limpieza del mismo después del proceso de alimentación, se utiliza el medio cuya formulación se presenta en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Reactivos utilizados en la preparación de medio de cultivo de *Hydra attenuata*

Reactivo	Cantidad
Cloruro de calcio: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.94 g
N-tris (hydroximetil)metil 1-2aminoetanosulfónico (Buffer TES)	2.2 g
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	0.080 g
Agua destilada	20 L

Para la preparación del medio se disuelven inicialmente los compuestos en 1 L de agua, posteriormente se coloca la solución en un recipiente de polipropileno o equivalente (material inerte) y se completa a un volumen 20 L con agua destilada. El pH del medio debe ser 7.0 ± 0.1 , en caso contrario deberá ajustarse con una solución de NaOH o HCl 1 N. El volumen preparado se almacena a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) y será suficiente para proveer medio fresco para dos semanas.

MEDIO DE CULTIVO SIN EDTA

Para el enjuague de las hidras, antes de llevar a cabo las pruebas de toxicidad, se recomienda utilizar medio de cultivo sin EDTA. Su preparación se efectúa siguiendo el procedimiento anterior, pero sin la adición del ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA).

MEDIO DE CULTIVO PARA SUPLEMENTAR MUESTRAS DE AGUA

Cuando se analizan muestras de aguas naturales, aguas residuales o agua de poro de sedimentos se debe adicionar a ellas una concentración de cloruro de calcio y *Buffer* TES igual a la presente en el medio de cultivo. Para adicionar estos compuestos se procede de la siguiente forma:

A un volumen de 100 mL de muestra filtrada (0.22 μm) se adiciona 0.0147 g de cloruro de calcio y 0.011 g de *Buffer* TES. Se disuelven los compuestos y se ajusta el pH a un valor de 7.0 ± 0.1 , con una solución de NaOH o HCl 1 N. Este ajuste se realiza antes de la preparación de las diluciones de la muestra.

ORGANISMOS DE PRUEBA

CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS DE PRUEBA

Para el cultivo masivo de *H. attenuata* se utilizan recipientes circulares de vidrio de fondo plano de aproximadamente 20 cm de diámetro. Los individuos se mantienen en un volumen de medio suficiente para llenar 2 o 3 cm de la altura del recipiente. Los recipientes se mantienen a 20 ± 2 °C, bajo una intensidad luminosa de 800 luxes (equivalente a la incidencia de luz natural en áreas interiores,) y un fotoperíodo de 16 horas de luz : 8 horas de oscuridad. Los cultivos se alimentan con *Artemia* sp. recién eclosionada, por lo menos cuatro días a la semana y la limpieza se hace regularmente dos veces al día después de la alimentación.

ALIMENTACIÓN Y LIMPIEZA

Dependiendo de la calidad de los huevos de *Artemia*, 24 o 48 horas antes de la alimentación se coloca media cucharadita de quistes de *Artemia* sp. en 500 mL de una solución salina (10 g NaCl/L). Es recomendable evitar emplear previamente cualquier otra sustancia desencapsulante.

Para una óptima eclosión de los quistes se debe mantener la solución con aireación constante, iluminación continua y una temperatura de 28 ± 2 °C. Aunque existen diferentes diseños para obtener estas condiciones, la forma más simple de lograrlas es colocar una bombilla de 100 watts sobre el recipiente a una distancia conveniente para evitar exceder la temperatura óptima de eclosión. Una vez que los quistes han eclosionado y se obtienen nauplios, se procede a la desinfección de la artemia, deteniendo el burbujeo de aire.

Después de 5 minutos, los quistes no eclosionados sedimentan y los nauplios forman una nube que flota cerca al fondo del recipiente.

Una vez sedimentados los quistes, se succiona la nube de nauplios mediante una pipeta Pasteur, evitando tomar los quistes no eclosionados. A continuación, se los coloca en un tamiz de 125 mallas, permitiendo el drenaje del exceso de líquido. Inmediatamente, se sumerge el tamiz en un recipiente circular de vidrio de 10 cm de diámetro de fondo plano, que contenga 100 a 150 mL de una solución de NaCl (10g/L) y media pastilla de yodo disuelta en dicha solución. Generalmente se utilizan tabletas de yodo comerciales para desinfección de aguas, formuladas con tetraglicina hidroper-yodo. En el caso que exista dificultad para obtener estas pastillas, se pueden utilizar 5 gotas de una solución de yodo-povidona de uso fármaceutico, cuya formulación debe indicar un contenido de 8 a 10 g de yodo-povidona en 100 mL.

Después de 10 o 15 minutos se drena el tamiz para eliminar el excedente de la solución y se transfiere a otro recipiente de iguales dimensiones, con medio de cultivo. Se deja reposar 3 minutos y se enjuaga dos o tres veces, repitiendo la operación de transferencia a recipientes con medio fresco. Durante este proceso los quistes no eclosionados deben ser removidos, evitando su incorporación al cultivo de *H. attenuata* durante la alimentación y reduciendo el riesgo de infecciones en el cultivo.

Un vez desinfectada la *Artemia*, se procede a alimentar a las hidras esparciéndolas sobre el cultivo masivo en forma de zig-zag, con ayuda de una pipeta Pasteur. Este procedimiento se lleva a cabo por lo menos cuatro días a la semana. En general se recomienda alimentar de martes a viernes. Una vez alimentado el cultivo, se debe esperar 1 o 2 horas para efectuar una primera limpieza y eliminar los nauplios excedentes. Después de 4 o 5 horas de la alimentación se debe llevar a cabo una segunda limpieza del cultivo para eliminar los residuos de la digestión. La limpieza se efectúa reemplazando todo el medio de cultivo con medio fresco. Durante el cambio, las hidras flotantes se recuperan al filtrar el medio de desecho con un tamiz de 60 mallas.

Se recomienda realizar una limpieza intensiva una vez por semana. Para ello se deben desprender los organismos del fondo del recipiente frotando suavemente con el dedo medio de la mano, posteriormente se mueve el líquido generando un efecto de vórtice. Se espera a que las hidras se acumulen en el centro del recipiente y luego se las transfiere a un tamiz de 60 mallas (esta operación puede realizarse con ayuda de una pipeta volúmetrica de 100 mL en posición invertida). A continuación se procede a eliminar las impurezas retenidas por el cultivo mediante el enjuague con medio fresco. Los recipientes

vacíos se lavan con abundante agua destilada hasta eliminar la película mucosa formada en el fondo. Terminada la limpieza, se colocan los organismos en un recipiente limpio con medio de cultivo fresco y se cubren permitiendo la entrada de aire (Johnson *et al.*, 1990).

CONTROL DEL CULTIVO

Antes de iniciar las pruebas de toxicidad, es importante verificar si la salud de las hidras y el desarrollo del cultivo están en condiciones óptimas. Para ello, se recomienda evaluar bajo las condiciones prevalentes en el laboratorio la tasa de crecimiento del cultivo.

Para determinar la tasa de crecimiento (k), se colocan en un recipiente pequeño, con suficiente medio de cultivo, 5 organismos de tamaño similar, que presenten una yema. En una hidra adulta cada hidrante está localizado en la cabeza del animal. Como cada hidra seleccionada tiene una yema, el número de hidrantes al tiempo cero será igual a 10. Diariamente por un período de una semana se cuenta el número de organismos totales. Durante todo este experimento las actividades de limpieza y alimentación se mantienen, evitando la pérdida de hidras durante estas tareas.

Registrados los resultados se procede a la tabulación y procesamiento de los datos. En la tabla 3.2 se presenta un ejemplo para ilustrar el procesamiento de los datos.

Tabla 3.2. Resultados hipotéticos de crecimiento de *Hydra attenuata*

Tiempo (días)	Número de organismos
0	5
1	7
2	11
3	19
4	27
5	36
6	44

Con los resultados de la tabla se construye una gráfica colocando el número de organismos obtenidos por día en la ordenada (Y) y el tiempo en días en la abscisa (X). Mediante un ajuste por mínimos cuadrados, ya sea de forma manual o con ayuda de un programa de computación o con una calculadora, se obtienen los valores del intercepto en la ordenada (b) y la pendiente (m) de

la ecuación de la recta. Para el cálculo de la tasa de crecimiento (k) se utiliza la siguiente ecuación:

$$k = \frac{\ln 2}{T} = \frac{0.693}{T}$$

donde:

T = tiempo (días) requerido para que la población se duplique

Una vez graficada la recta, se calcula la tasa de crecimiento de la población de hidras (k) de acuerdo a la ecuación mencionada. Para calcular T , se despeja X de la ecuación de la recta Y y se establece el tiempo requerido para que población se duplique.

Tomando como ejemplo los valores de la tabla 3.2, se seleccionó el valor de 38, correspondiente al doble de la población observada al tercer día (19 organismos). Por tanto, el tiempo real requerido para que la población se duplique será:

$$y = mx + b$$

$$b - y = mx$$

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Sustituyendo en la ecuación:

$$x = \frac{38 - 0.82}{6.82} = 5.45$$

Entonces T será:

$$5.45 - 3 = 2.45$$

Sustituyendo:

$$k = \frac{\ln 2}{2.45} = \frac{0.693}{2.45} = 0.28$$

Se sugiere que la determinación de la tasa de crecimiento (k) se realice de forma periódica. En general los valores de k varían entre 0.3 y 0.4. En caso de obtenerse valores menores al mencionado intervalo, es necesario efectuar acciones correctivas sobre la alimentación y limpieza del cultivo a fin de lograr el crecimiento óptimo (Trottier *et al.*, 1997). El control del crecimiento de cultivo es una tarea que debe hacerse regularmente. El seguimiento podrá realizarse tres veces por año una vez que se adquiera experiencia suficiente en el manejo de los cultivos. En la tabla 3.3 se resumen las condiciones de cría y mantenimiento de los organismos.

Tabla 3.3. Condiciones recomendadas para el mantenimiento de cultivos de *Hydra attenuata*

Temperatura	21 ± 2 °C
Calidad de la luz	Fluorescente, blanco-frío
Intensidad luminosa	< 800 lux en la superficie del líquido
Fotoperíodo	16 horas luz: 8 oscuridad
Recipientes de mantenimiento	Circulares de vidrio transparente de 20 cm de diámetro de fondo plano, tipo refractario. Deben permanecer cubiertos con un vidrio o papel de modo que se permita la entrada de aire
Alimentación	4 días por semana alimentar con nauplios de <i>Artemia</i> sp., desinfectados con solución yodada
Dosis de alimento	No requiere de control estricto, sólo la adición de 2 a 3mL de medio de cultivo, conteniendo una nube densa de artemias eclosionadas a cada recipiente de cultivo y homogeneizar su distribución para que cada hydra pueda tomar entre 1 y 6 nauplios
Densidad poblacional	No requiere control estricto, sólo se requiere iniciar un nuevo recipiente cuando se observa una cobertura densa de hydras en el fondo y demasiados organismos libres flotando en el medio
Limpieza	Diaria, con dos recambios de medio de cultivo: el primero 2 horas después de la alimentación y el segundo 4 o 5 horas más tarde. Recuperar organismos flotantes con tamiz de 60 mallas. Semanal, con desprendimiento de organismos del fondo. Recuperar los organismos con un tamiz y transferir a recipientes limpios con medio de cultivo fresco.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En caso de muestras acuosas, excepto soluciones de compuestos puros, debe filtrarse un volumen aproximado de 150 mL de muestra a través de una membrana de 0.22 μm .

PREPARACIÓN DE DILUCIONES

Para la realización de pruebas se recomienda trabajar con un mínimo de 7 diluciones seriadas de la muestra problema y utilizar 2 controles, uno negativo y otro positivo. En el primero, los organismos son expuestos por el mismo período de tiempo y en condiciones iguales a los ensayos; sin embargo, no se utiliza ningún compuesto tóxico en la solución de prueba. Generalmente, se utiliza medio de cultivo o agua reconstituida con una dureza entre 160 y 180 mg CaCO_3/L . El objetivo de este control es evaluar la salud de los organismos y se realiza conjuntamente con las muestras analizadas.

El control positivo corresponde a una solución de concentración conocida del compuesto tóxico de referencia, cuyo efecto está bien establecido, al cual se expone los organismos de prueba. Se emplea para evaluar la sensibilidad de los organismos y se analiza conjuntamente con las muestras bajo estudio. Para *H. attenuata* se recomienda utilizar preferentemente Cr(VI) (a partir de dicromato de potasio) o NaCl. Cada laboratorio debe contar con la carta control para el compuesto tóxico seleccionado.

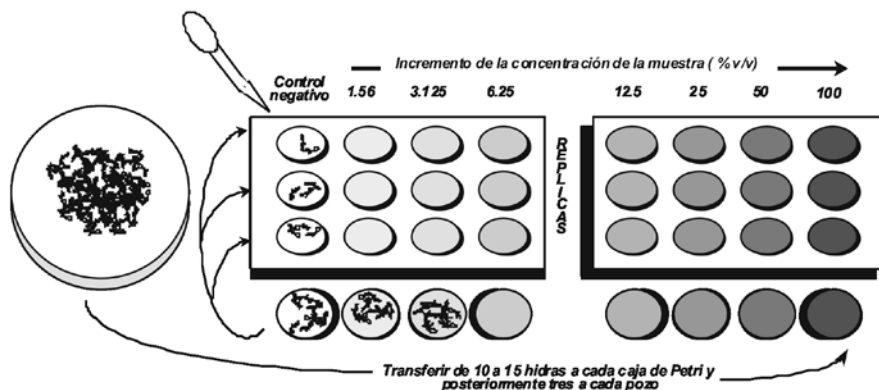
Para las pruebas exploratorias con compuestos tóxicos puros o muestras ambientales, se recomienda emplear una serie de diluciones logarítmicas (por ejemplo: 100, 10, 1, 0.1, 0.01) e identificar posteriormente el intervalo de concentraciones conveniente en el que deberá desarrollarse la prueba definitiva.

Como medio de dilución se debe emplear agua dura reconstituida sin ningún suplemento (ver su fórmula en el ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna* de este documento). Este medio será empleado como control negativo, así como en la preparación de las diluciones de la muestra y del compuesto tóxico de referencia, ya sea Cr (VI) o NaCl.

SISTEMA DE PRUEBA

Las pruebas de toxicidad se llevan a cabo en micro placas de cultivo celular de 12 pozos (figura 3.2). En ellas se preparan tres réplicas por cada concentración de la muestra o del control positivo y tres más para el control negativo. El llenado de los pozos se efectúa adicionando un volumen de 4 mL. Se inicia con los tres pozos o réplicas del control negativo y se continúa con las diluciones de la muestra, comenzando con la de menor concentración. En paralelo, se adiciona un volumen de 3 a 4 mL de cada solución en cajas Petri de 35 x 10 mm.

Figura 3.2. Disposición de las concentraciones de prueba en el ensayo con *Hydra attenuata* y transferencia de organismos



TRANSFERENCIA DE LOS ORGANISMOS

Se selecciona un grupo de organismos mantenidos sin alimentación durante 24 horas. Se elimina el medio de cultivo invirtiendo el recipiente y descartando el líquido, los organismos permanecerán adheridos al fondo del recipiente. A continuación se adiciona un volumen de medio de cultivo sin EDTA.

Se resuspenden los organismos y se concentran en el centro del recipiente, utilizando el mismo procedimiento indicado para la limpieza intensiva. En este procedimiento se omite el empleo del tamiz para retener a los organismos flotantes ya que puede producirse daño de la epidermis y causar hipersensibilidad de los organismos durante la prueba.

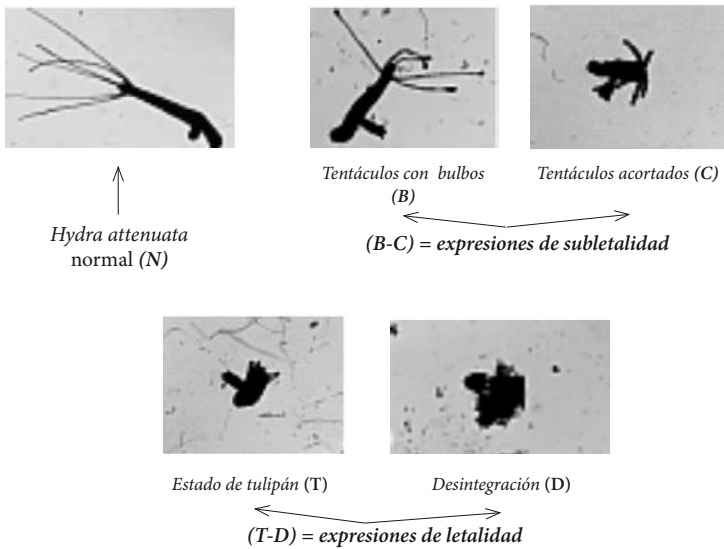
A continuación, se colocan las hidras en un recipiente de 10 cm de diámetro con medio de cultivo sin EDTA y, con la ayuda de una pipeta Pasteur, se trans-

fieren de 10 a 15 organismos a cada una de las cajas Petri. Esta transferencia permite reducir el efecto de dilución producido por el medio de cultivo sobre la concentración de la muestra. Posteriormente se colocan 3 hidras en cada pozo, evitando aquellas que presenten yemas.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La prueba se desarrolla por un período de exposición de 96 horas. Cada 24 horas se realiza la observación de los organismos con la ayuda de un microscopio estereoscópico o lentes de acercamiento con capacidad de 6 a 10X, con la intención de registrar los cambios morfológico ocurridos. Dichos cambios se clasifican como se establece en la figura 3.3.

Figura 3.3. Microfotografías de *Hydra attenuata* mostrando diferentes efectos adversos sobre su morfología. A) normal, B) bulbo, C) acortamiento de tentáculos, D) estadio de tulipán y E) desintegración (Trottier *et al*, 1997)



Al terminar la revisión diaria, se suma el número total de hidras que presentan el mismo estado morfológico en los tres pozos correspondientes a cada dilución. Con los resultados, se forman tres grupos: el primero definido por el número de hidras normales, el segundo con organismos que presentan efectos reversibles (número de bulbos + número de cortas) y el tercero con organismos

que presentan efectos irreversibles (número de tulipanes + número de desintegradas). A partir de los resultados registrados, se obtiene para cada concentración el porcentaje de efecto subletal y letal. El primero se calcula a partir de la suma del número de organismos que presentan anomalías en su morfología, ya sea del tipo reversible o irreversible, y el segundo se obtiene a partir del número de organismos con anomalías exclusivamente irreversibles. Con estos datos se estiman los valores de CE_{50} o de CL_{50} , según corresponda, mediante los métodos estadísticos Probit, promedios móviles o Sperman y Karber, así como los valores de la LOEC, NOEC, y TOEC. Este último se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$TOEC = (NOEC \times LOEC)^{1/2}$$

En la tabla 3.4 se resumen las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad aguda con *H. attenuata*.

Tabla 3.4. Condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad aguda con *Hydra attenuata*

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	22 ± 2 °C
Calidad de luz	Iluminación natural (cercana a una ventana), fluorescente o blanco-frío
Intensidad luminosa	800 luxes
Recipientes	Tubos de Ensayo de 10 cm x 1.5 cm diámetro
Fotoperíodo	16 horas luz : 8 horas oscuridad
Volumen del recipiente de prueba	5 mL en placas estériles de 12 pozos
Volumen de la solución de prueba	4 mL
Características de los organismos	Pólipos sin yemas, en ayuno de 24 horas
Densidad inicial de organismos	3 hidras por pozo
Número de réplicas	3
Agua de dilución	Agua dura reconstituida (sin suplementos)
Factor de dilución	0.3 o 0.5
Duración de la prueba	96 horas, con revisión cada 24 horas
Efecto medido	Cambios morfológicos. Número de organismos normales, con tentáculos, con bulbos o acortados (reversibles), o sin tentáculos y pólipos desintegrados (irreversibles)
Resultado final	CE_{50} para subletalidad y (CL_{50}) para letalidad
Aceptabilidad de los resultados	Morfología normal en el 100% de los organismos en el control negativo
Control positivo	Cr (VI) a partir de una solución de $K_2Cr_2O_7$

BIBLIOGRAFÍA

- Blaise, C. y T. Kusui. 1997. Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Environmental Toxicology and Water Quality* 12: 53-60.
- Campbell, R. D. y H. R. Bode. 1983. Terminology for morphology and cell types. En: H. M. Lenhoff (ed.). *Hydra: Research methods*. Plenum Press, Nueva York.
- Johnson, E. M., B. E. G. Gabel, L. M. Newman y R. Giacobbe. 1990. *The Hydra Assay Manual. A Practical Guide to Supplies, Techniques and Mechanics of the Assay*. Department Anatomy, Daniel Baugh Institute, Jefferson Medical College, Filadelfia, EE.UU.
- Trottier, S., C. Blaise, T. Kusui y E.M. Johnson. 1997. Acute toxicity Assessment of Aqueous Samples Using a Microplate-based *Hydra attenuata* Assay. *Environmental Toxicology and Water Quality* 12: 265-271.

ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE LECHUGA *LACTUCA SATIVA L.*

Maria Cecilia Sobrero y Alicia Ronco

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: IC

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

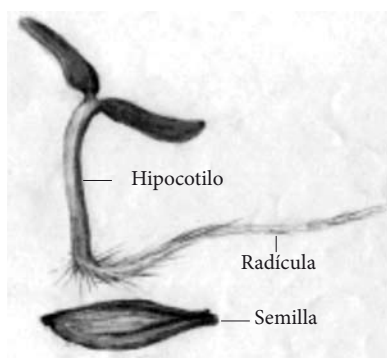
El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 horas de exposición) en el que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo (figura 4.1). Es importante destacar que durante el período de germinación y los primeros días

Este ensayo apareció publicado originalmente en G. Castillo (ed.). 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IDRC, IMTA, Canadá. 202 pp. Se reproduce con la autorización de la editorial.

de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es de gran importancia para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocotilo constituyen indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta.

A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sin embargo pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocotilo, dependiendo ello del modo y sitio de acción del compuesto. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocotilo constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar el efecto en la germinación. Este

Figura 4.1. Morfología de la semilla y la plántula de lechuga *Lactuca sativa* L.



ensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales (lagos, ríos), aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas (Bowers *et al*, 1997; Cheung *et al*, 1989; Dutka, 1989). A diferencia de otras pruebas en las que se consideran algas o plantas acuáticas sumergidas como organismo de diagnóstico, el bioensayo con semillas permite evaluar la fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbiedad de manera directa y sin necesidad de filtración previa, reduciéndose así las interferencias debidas al pretratamiento y simplificando el procedimiento de prueba.

Si bien *L. sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, la información generada a partir de esta prueba de toxicidad proporciona datos acerca del posible efecto de los contaminantes en las comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminados, siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola. Por otra parte, es de fácil y rápida germinación por lo que es posible desarrollar la prueba en pocos días.

Este bioensayo de toxicidad ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y compuestos puros, además de la evaluación del efecto fitotóxico de plaguicidas sobre especies no blanco, necesarios para el registro de estos compuestos (OECD, 1984; Wang, 1987; USEPA, 1989).

En la incorporación de esta prueba en una batería de bioensayos es importante considerar el compromiso entre la sensibilidad de la especie *L. sativa*, el reducido tiempo de exposición de la prueba con semillas, los bajos costos asociados y que no requiere equipamiento sofisticado, en particular en la aplicación a muestras ambientales o en el monitoreo de procesos de detoxificación, saneamiento, control de efluentes o reuso de biosólidos.

MATERIAL

- Cajas Petri de 100 mm de diámetro
- Matraces aforados de 50 mL
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL
- Regla u otro elemento de medición
- Pinzas
- Toallas de papel
- Bolsas plásticas

Papel de filtro Whatman No. 3 (o equivalente), 90 mm de diámetro. El papel de filtro que se seleccione como sustrato de germinación debe tener las siguientes características: trama amplia y porosa que asegure una buena capacidad de retención de líquido; resistencia de la fibra del papel para que las radículas crezcan por su superficie sin atravesarlo, situación que dificultaría la remoción de las plántulas sin dañarlas; ausencia de residuos tóxicos (por ejemplo, blanqueadores; y que no promueva el desarrollo de hongos (no asociados a las semillas).

EQUIPO

Cámara oscura de temperatura controlada (22 ± 2 °C).

REACTIVOS

Agua dura reconstituida (APHA, 1992). Para su preparación se recomienda utilizar reactivos grado ACS y agua destilada en vidrio o de calidad *Millipore Super Q*. La forma de preparación de esta agua se muestra en ensayo de toxicidad aguda con el cladóceros *Daphnia Magna* de este documento.

ORGANISMOS DE PRUEBA

En este ensayo se usan semillas de lechuga de la especie *L. sativa* L variedad mantecosa.

OBTENCIÓN, CONTROL Y CONSERVACIÓN DE LAS SEMILLAS

La obtención de las semillas de lechuga se realiza en semilleras locales, procurando que sean semillas sin curar (sin fungicidas o plaguicidas), con buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula e hipocotilo.

VERIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS

Previo a la implementación de la prueba, es recomendable verificar que cada lote nuevo de semillas que se utilice tenga un porcentaje de germinación superior al 90%, sincronización en la germinación y baja variabilidad de la elongación de la radícula e hipocotilo (coeficiente de variación < 30%).

Es necesario además caracterizar las condiciones de germinación del lote de semillas, evaluando la respuesta frente a la luz (fotoblastismo positivo o negativo: germinación en presencia o ausencia de luz, respectivamente) y la temperatura óptima de germinación.

Con el fin de reducir la variabilidad en los resultados, para el caso de semillas no seleccionadas y que presenten gran heterogeneidad en el tamaño, es conveniente realizar una selección previa descartando las fracciones de mayor y menor tamaño y utilizando solamente la fracción más numerosa y de tamaño intermedio. La fracción de menor tamaño puede presentar un alto porcentaje de semillas vanas, mientras que las semillas de mayor tamaño pueden ser más vigorosas, variando la sensibilidad frente a los compuestos tóxicos.

Si no es posible obtener lotes de semillas con poder germinativo igual o mayor al 90%, se debe aumentar el número de semillas por caja para obtener un número mínimo de 18 semillas germinadas. Por otra parte, si se desea aumentar la confiabilidad de los resultados, o en caso de contar con semillas que posean una alta variabilidad en la elongación de la radícula de los controles negativos, aún habiéndolas seleccionado de tamaño uniforme, se recomienda aumentar el número de réplicas por tratamiento.

Las semillas seleccionadas se almacenan fraccionadas a 4° C, en oscuridad y en ambiente seco. Conservadas en estas condiciones mantienen su vigor al menos durante 2 años. Un indicador de la reducción de la vitalidad y envejecimiento de las semillas es la reducción en el poder germinativo y el aumento en la variabilidad de las medidas de elongación de radícula e hipocotilo en el control negativo. En este caso se recomienda realizar las pruebas de toxicidad utilizando un nuevo lote de semillas.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

Para realizar una curva dosis respuesta se recomienda preparar un mínimo de 5 o 6 diluciones de la muestra o compuesto a estudiar de manera que se obtengan valores de toxicidad intermedios entre el 100 y 0%. Para las muestras ambientales se recomienda el uso de un factor de dilución de 0.3 o 0.5 para la preparación de la serie de diferentes concentraciones. El uso de un factor de 0.3 permite evaluar la toxicidad considerando el intervalo entre el 100% y 1% de la muestra realizando 5 diluciones (100, 30, 10, 3 y 1%). Al aplicar un factor de dilución de 0.5, es necesario utilizar mayor número de diluciones

para abarcar el mismo intervalo de concentraciones (100, 50, 25, 12, 6, 3 y 1.5%) pero se obtiene mayor precisión en los resultados. Para la preparación de cada dilución se utiliza agua dura reconstituida (es posible el uso de agua mineral dura para consumo humano), realizando el control negativo con el agua de dilución empleada.

Para el caso de las muestras cuya toxicidad es desconocida, previo a la realización de la prueba definitiva, se sugiere hacer una prueba exploratoria (ensayo preliminar) utilizando diluciones logarítmicas (100, 10, 1, 0.1, 0.01) que permitan establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 y 0%, necesarios para calcular la CI_{50} .

CONTROL DE CALIDAD DE PRUEBAS

Es importante establecer cuales son los valores de elongación en el control negativo, así como la sensibilidad de las semillas frente al compuesto tóxico de referencia (control positivo), determinando para cada lote de semillas el valor de CE_{50} . Se realizan cartas control para evaluar el crecimiento en los controles negativos (promedio $\pm 2\sigma$ de la elongación de la radícula) y de la sensibilidad frente al compuesto tóxico de referencia (promedio $\pm 2\sigma$ de la CE_{50} para el Zn(II) preparado a partir de sulfato de zinc).

Como se mencionó anteriormente, la reducción en el poder germinativo (< 90%) y el aumento en la variabilidad de las medidas de elongación de radícula e hipocotilo en el control negativo a lo largo del tiempo, son indicadores de la reducción de la vitalidad y envejecimiento de las semillas. En este caso se recomienda utilizar un nuevo lote de semillas.

DESARROLLO DE LA PRUEBA

En la figura 4.2 y la tabla 4.1 se resume el procedimiento del ensayo de toxicidad aguda con semillas. Para llevar a cabo el ensayo se deben realizar los siguientes pasos:

Colocar en cada caja Petri un disco de papel de filtro

Marcar correctamente cada caja con la dilución correspondiente, así como la fecha y hora de inicio y término del bioensayo

Saturar el papel de filtro con 4 o 5 mL de la dilución evitando que se formen bolsas de aire

Con la ayuda de una pinza, colocar cuidadosamente 20 semillas, dejando

espacio suficiente entre las semillas para permitir la elongación de las raíces.

Tapar las cápsulas y colocarlas en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad. Dado que algunas variedades de semillas de lechuga requieren oscuridad para que se produzca la germinación (semillas fotoblásticas negativas), las cajas de Petri deben cubrirse de la luz inmediatamente después de colocarlas las semillas en su interior y durante el período de ensayo

Incubar por 120 horas (5 días) a una temperatura de 22 ± 2 °C

Realizar repeticiones para cada dilución ensayada.

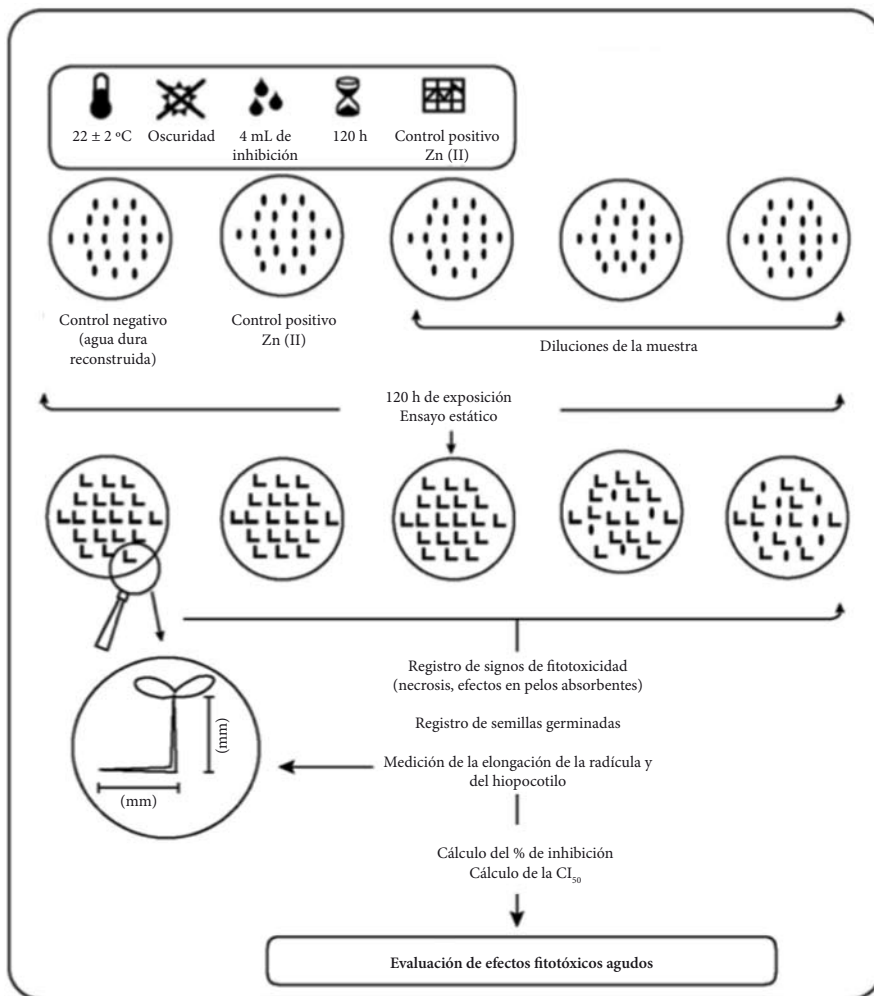
Tabla 4.1. Condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad aguda con *Lactuca sativa* L.

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	20 ± 2 °C
Calidad de luz	Oscuridad
Volumen de la solución de prueba	4 mL
Agua de dilución	Agua dura reconstituida
Número de semillas por réplica	20
Número de réplicas	3
Duración de la prueba	120 horas
Efecto medido	Inhibición en la elongación de la radícula e hipocotilo. Inhibición en la germinación
Resultado final	CE ₅₀ o CI ₅₀ o % inhibición
Aceptabilidad de los resultados	Germinación > 90% Control positivo y negativo de acuerdo con los valores admitidos en las cartas control
Control positivo	Zn (II) a partir de ZnSO ₄

MEDIDA DE LOS PUNTOS FINALES DE EVALUACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD

Cada punto final se evalúa comparando el efecto generado en los organismos expuestos a la muestra con respecto a la respuesta en los organismos del control negativo, sujetos a las mismas condiciones de ensayo, excepto por la ausencia de muestra. Terminado el período de exposición (120 horas), se procede a cuantificar el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula y del hipocotilo.

Figura 4.2. Esquema general del procedimiento de prueba de toxicidad con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L.



Efecto en la germinación

Registrar el número de semillas que germinaron normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula.

Efecto en la elongación de la radícula e hipocotilo

Utilizando una regla o papel milimetrado, medir cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocotilo de cada una de las plántulas, correspondientes a cada concentración del compuesto tóxico o dilución de muestra y a los controles. La medida de elongación de la radícula se considera desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocotilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocotilo se considera desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones (figura 4.3). La figura 4.4 muestra los distintos estadios de la semilla durante la prueba de germinación y elongación.

Figura 4.3. Esquema de plántula de *Lactuca sativa* al finalizar el período de exposición

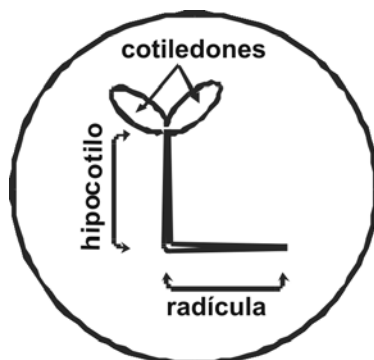
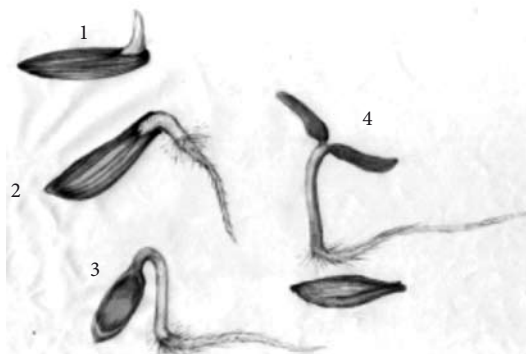


Figura 4.4. Estadios por los que atraviesa la semilla *Lactuca sativa* durante el ensayo de germinación y elongación



Antes de retirar las plántulas de las cajas Petri para evaluar el efecto en los puntos finales anteriormente mencionados, es importante realizar una observación detallada del estado general de las mismas y del crecimiento de la radícula sobre el papel de filtro. Informar cualquier indicador de fitotoxicidad o de crecimiento anormal en las plántulas tratadas y en los controles (ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes poco desarrollados, radículas con crecimiento ensortijado, necrosis en los cotiledones, etc.). La necrosis (presencia de tejido muerto) se evidencia como manchas localizadas de coloración parda, blanca o marrón. Al evaluar el efecto en la germinación, consignar además aquellas semillas con germinación anormal (emergencia de cotiledones o cotiledones e hipocotilo solamente, pero sin emergencia de la radícula) o con desarrollo de hongos.

Un procedimiento factible de realizar para facilitar la medición de la radícula e hipocotilo, es proceder a congelar las cajas Petri correspondientes a todos los tratamientos y descongelarlas a medida que se van midiendo (no conservar el material luego de ser descongelado). De esta manera las plántulas descongeladas adquieren una consistencia blanda, favoreciendo la medición. Si se procede a evaluar el efecto sobre las plantas descongeladas es importante proceder de igual manera con todas las réplicas de la prueba. Este procedimiento reduce la variabilidad en las medidas, principalmente cuando el crecimiento de las radículas es ensortijado o no es parejo. Por otro lado, antes de congelar el material se debe realizar previamente la observación general de efectos fitotóxicos en las plantas vivas al finalizar el período de exposición.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Se realizan los siguientes cálculos:

- Promedio y desviación estándar de la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas de cada repetición
- Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocotilo con el promedio de elongación para cada dilución respecto del promedio de elongación del control negativo
- Porcentaje de inhibición en la germinación
- Con los datos anteriores, se elabora la gráfica dosis-respuesta, colocando en la ordenada el porcentaje de inhibición y en la abscisa la concentración. Mediante un método gráfico o el uso de programas estadísticos, se calcula la concentración que produce el 50% de inhibición (CI_{50}/CE_{50}) para cada

punto final evaluado. Para el caso de muestras en donde la inhibición es inferior al 50%, o para determinar el valor correspondiente al NOEC o LOEC, se realiza el análisis de comparación de medias (t *Student*, Dunnett) para verificar la significancia estadística en el porcentaje de efecto.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los efectos cuantificados sobre la elongación de la radícula o del hipocotilo son efectos subletales. La inhibición en la germinación podría considerarse como un efecto letal siempre y cuando podamos corroborar que finalizada la exposición a una muestra las semillas no germinaron por muerte del embrión y que no existe simplemente un retraso en el proceso de germinación, manteniéndose la viabilidad de la semilla. Al evaluar la fitotoxicidad de muestras ambientales complejas o con compuestos volátiles, en algunos casos se ha observado que al finalizar el período de exposición la inhibición en la germinación es elevada, pero si se extiende el período de ensayo, sin renovar la exposición a la muestra, las semillas comienzan a germinar. La vitalidad de las semillas que no han germinado es posible verificarla mediante la prueba de tetrazolium para viabilidad (Ellis *et al.*, 1985), pudiendo de esta manera asignarle con certeza a la inhibición de la germinación, el valor e importancia de un efecto letal. No obstante esto, la inhibición en la germinación registrada al finalizar la prueba, se considera fitotoxicidad aunque el efecto en la germinación sea reversible.

Otro aspecto a considerar es el mayor desarrollo en la elongación de la radícula o el hipocotilo en algunas muestras con respecto al control. La exaltación en un punto final u hormesis no debe ser interpretada como un efecto favorable o estimulante. Si bien es posible que muchos compuestos (por ejemplo Cu, Zn) a bajas concentraciones produzcan exaltación por ser micronutrientes vegetales, esta respuesta debe ser evaluada de manera conjunta con los efectos registrados en otras pruebas. En la aplicación de la prueba con semillas a muestras ambientales conjuntamente con otros organismos como parte de una batería, se ha detectado en diferentes ocasiones que la exaltación en la respuesta en el hipocotilo o radícula se corresponde con toxicidad frente a otros ensayos de la batería.

ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS

El ensayo deberá repetirse en caso de que:

- En el control negativo el porcentaje de germinación sea inferior al 90 % y exista una alta variabilidad en la elongación de la radícula (coeficiente de variación > 30%)
- En el control positivo el porcentaje de germinación sea inferior al 90 % y la variación de la sensibilidad de las semillas se encuentre fuera de lo permitido por las cartas control
- Existan posibles interferencias en el proceso normal de germinación o desarrollo de las plántulas en los controles
- Se presente toxicidad del sustrato. Cuando se reemplaza el papel utilizado por otras marcas más económicas o se utiliza papel de filtro cualitativo en planchas, hay que tener en cuenta los posibles efectos tóxicos del papel. Si se ha tenido buenos resultados con una marca o calidad determinada de papel, es conveniente no variar el sustrato de ensayo.
- Se presente suciedad de las cajas Petri. Si no es posible utilizar material desechable, es importante asegurar un enjuague minucioso del material para evitar la presencia de residuos de detergente u otra solución de limpieza.
- Se presente un exceso de agua o de muestra utilizada para embeber el papel, lo que determina una baja disponibilidad de oxígeno necesario para el normal desarrollo del proceso de germinación. El papel de filtro utilizado como sustrato de germinación de las semillas debe estar bien mojado, con sobrante de líquido para evitar la desecación, pero en ningún caso las semillas deben quedar sumergidas.
- Se presente un déficit hídrico durante el período de exposición. Se recomienda envolver las cápsulas con una bolsa plástica para evitar que el papel de filtro de las mismas pierda agua durante el ensayo. Si se esta experimentando con compuestos volátiles, no deben colocarse en una misma bolsa cápsulas que correspondan a diferentes concentraciones de ensayo. También se puede colocar dentro de la cámara de cultivo un recipiente con agua para generar un ambiente húmedo, reduciendo así la evaporación. Hay que tener en cuenta que la pérdida de humedad de las cápsulas genera una concentración del compuesto cuya toxicidad estamos evaluando y, por lo tanto, las conclusiones a las que arribaremos serán erróneas.
- Se produzca una exposición a la luz durante el proceso de imbibición. Inmediatamente después de colocar las semillas sobre el papel filtro, se recomienda tapar y envolver las cajas Petri, cubriéndolas de la luz (para el caso de semillas fotoblásticas negativas).
- Se presente una elevación de la temperatura de ensayo. Las semillas de *L. sativa* expuestas a una temperatura superior (apenas unos grados) a

la óptima para la germinación, no germinarán aunque se les coloque posteriormente a temperaturas inferiores (termodormancia o dormancia inducida por la temperatura).

BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association (APHA). 1992. *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Editorial Díaz de Santos, S.A., Madrid. 1,576 pp.
- Bowers N., J. R. Pratt, D. Beeson y M. Lewis. 1997. Comparative Evaluation of Soil Toxicity using Lettuce Seeds and Soil Ciliates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 207-213.
- Cheung Y.H., M.H Wong. y N.F.Y. Tam. 1989. Root and Shoot Elongation as an Assessment of Heavy Metal Toxicity and Zn Equivalent Value of Edible Crops. *Hydrobiologia* 188/189: 377-383.
- Dutka B. 1989. Short-Term Root Elongation Toxicity Bioassay. Methods for Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments. National Water Research Institute (NWRI). Environment Canada, Canadá.
- Ellis, R. H., T. D. Hong y E. H. Roberts, 1985. *Handbook of Seed Technology for Genebanks. Vol.1 Principles and Methodology*. International Board of Plant Genetic Resources, Roma. 210 pp.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 1984. Terrestrial Plants: Growth Test. Guideline for Testing of Chemicals N ° 208. OECD Publications Service, París.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1989. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. US EPA 600/3-88/029, Corvallis.
- Wang W, 1987. Root elongation method for toxicity testing of organic an inorganic pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 6: 409-414.

ENSAYO DE TOXICIDAD CRÓNICA CON EL ALGA *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM* (*PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA*) POR EL MÉTODO DE ENUMERACIÓN CELULAR BASADO EN EL USO DE HEMOCITÓMETRO NEUBAUER

Yolanda Pica Granados, Alicia Ronco y María Consuelo Díaz Báez

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: IC

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

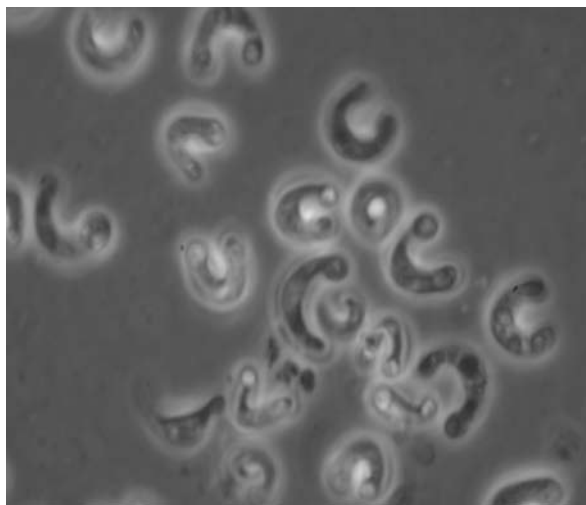
El género y la especie de *Selenastrum capricornutum* fueron modificados formalmente a *Pseudokirchneriella subcapitata* (Hindak, 1990); sin embargo, para mantener consistencia con la literatura que la refiere, se empleará en éste procedimiento su nombre original *S. capricornutum*.

S. capricornutum es una alga verde (clorofita) unicelular con forma de media luna (figura 5.1) y un volumen aproximado de entre 40 y 60 μm^3 , que puede encontrarse en sistemas acuáticos epicontinentales eutróficos u oligotróficos. Este ensayo puede ser utilizado por sí mismo o como parte de una

Este ensayo apareció publicado originalmente en G. Castillo (ed.). 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IDRC, IMTA, Canadá. 202 pp. Se reproduce con la autorización de la editorial.

batería para estimar la potencial de fitotoxicidad de aguas dulces superficiales o subterráneas, aguas servidas y otro tipo de muestras líquidas, tales como eluriados o lixiviados, agua intersticial de sedimentos o cualquier compuesto puro soluble en agua. La prueba es especialmente adecuada para ser practicada en laboratorios que cuenten con una infraestructura básica, siendo un ensayo sencillo y de bajo costo.

Figura 5.1. Microfotografía de *Selenastrum capricornutum*



Cuando las células son expuestas a muestras que contienen contaminantes tóxicos su reproducción se afecta, alterando la tasa de crecimiento de la población de las algas. El efecto de inhibición de la población causada por los agentes tóxicos en una muestra luego de 72 horas de exposición, bajo condiciones de temperatura controlada (24 ± 2 °C), se determina comparándolo con el crecimiento normal observado en un sistema libre de agentes contaminantes, conocido como control. Dependiendo del número de concentraciones y réplicas preparadas para el desarrollo del experimento, se determina la CI_{50} , la LOEC y la NOEC.

El ensayo con el alga *S. capricornutum* presentado en este documento, es una modificación del método estándar publicado por la Agencia de Protección Ambiental de Canadá (Environment Canada, 1992). Los cambios introducidos

(Blaise *et al.*, 2000) corresponden al uso de volúmenes reducidos (2.6 mL en viales vidrio de borosilicato de 20 mL) y la cuantificación de las células mediante una cámara de conteo (Neubauer) utilizando un microscopio óptico.

MATERIAL

- Pipetas de vidrio graduadas de 5 y 10 mL
- Pipeta automática de 100 µL con puntas estériles
- Pipeta automática de 100-1 000 µL con puntas estériles
- Viales de centelleo de vidrio de borosilicato claro de 20 mL de capacidad
- Papel (film) transparente
- Cámaras de iluminación (ver procedimiento complementario de este documento)
- Gasa y algodón
- Tubo de vidrio o pipeta de vidrio despuntada
- Manguera de acuario
- Botellas o matraces aforados de 1 L
- 5 Botellas o matraces aforados de 500 mL
- 6 Botellas o matraces aforados de 100 mL
- Recipiente de vidrio claro de boca angosta para cultivo, preferentemente esterilizable, de 10 a 20 L de capacidad
- Asas bacteriológicas
- Tubos de centrifuga (opcional)
- Tubos de cultivo con tapa de rosca
- Tubos de centrifuga de plástico de 50 mL, con tapa de rosca y estériles (opcional)
- Hemocitómetro o cámara Neubauer
- Matraz de filtración de 4 L

EQUIPO

- Microscopio óptico con aumento de 100X
- Potenciómetro
- Balanza analítica
- Bombas de acuario
- Bomba de vacío
- Sistema de filtración
- Mechero o campana de flujo laminar

- Centrífuga (opcional)
- Base de agitación o vortex (opcional)

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Todos los reactivos utilizados deben tener calidad ACS o al menos de 99% de pureza. Para su preparación se emplea agua destilada en vidrio o *Millipore Super Q* (USEPA, 1992).

MEDIO DE CULTIVO PARA PROLIFERACIÓN DE ALGAS (1X)

El medio de cultivo se basa en la preparación de una serie de cinco soluciones. La primera de ellas conteniendo micronutrientes y las cuatro restantes con macronutrientes; todas ellas con las concentraciones adecuadas para asegurar un crecimiento óptimo de las algas durante el período de incubación.

Para la preparación de las cinco soluciones *stock*, rotular cinco frascos de 500 mL (preferentemente material aforado) de la siguiente manera: solución 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Agregar 350 mL de agua a cada uno de ellos.

SOLUCIÓN 1. MICRONUTRIENTES

Se elabora adicionando las diversas sales y soluciones enlistadas en la tabla 5.1, las cuales deberán agregarse al frasco de 500 mL, etiquetado como solución 1, en el orden fijado en dicha tabla sin alterar la secuencia de adición, ya que se formarán precipitados difíciles de solubilizar. Es necesario asegurarse que antes de adicionar el siguiente compuesto o solución las sales se encuentren completamente disueltas.

Para la preparación de las soluciones de cloruro de zinc, cloruro de cobalto, molibdato de sodio y cloruro de cobre, se emplean 5 frascos de 100 mL de capacidad, que deben ser previamente etiquetados con el nombre de cada compuesto disuelto. En el caso del cloruro de cobre se etiquetan dos frascos, diferenciándolos con los números I y II. Posteriormente seguir las instrucciones que se señalan a continuación.

SOLUCIÓN DE CLORURO DE ZINC

Verter en el frasco 70 mL de agua, agregar luego 164 mg de cloruro de zinc. Llevar a volumen final de 100 mL con agua y mezclar bien.

Tabla 5.1. Reactivos utilizados en la preparación de la solución de micronutrientes para el ensayo con *Selenastrum capricornutum*

Compuesto	Fórmula	Masa en gramos (g) o volumen (mL) de solución stock
1 Cloruro de magnesio	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6.08
2 Cloruro de calcio	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2.20
3 Ácido bórico	H_3BO_3	0.0928
4 Cloruro de manganeso	$MnCl_2 \cdot 4H_2O^*$	0.208
5 Cloruro de zinc (solución)	$ZnCl_2^*$	1 mL de la solución
6 Cloruro férrico	$FeCl_3 \cdot 6H_2O^*$	0.0799
7 Cloruro de cobalto (solución)	$CoCl_2 \cdot 6H_2O^*$	1 mL de la solución
8 Molibdato de sodio (solución)	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	1 mL de la solución
9 Cloruro de cobre (solución)	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	1 mL de la solución
10 Etilen diaminotetracético, sal disódica	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0.150

* Estos compuestos pueden ser sustituidos por sulfatos. Por ejemplo, $ZnCl_2$ o $ZnSO_4$. Si así se hiciera, recalcular estequiométricamente la masa a utilizar.

SOLUCIÓN DE CLORURO DE COBALTO

Verter en el frasco 70 mL de agua, agregar 71.4 mg de cloruro de cobalto. Llevar a volumen con agua hasta completar 100 mL y mezclar bien.

SOLUCIÓN DE MOLIBDATO DE SODIO

Verter en el frasco 70 mL de agua, luego agregar 363 mg de molibdato de sodio. Finalmente completar el volumen hasta 100 mL con agua y mezclar bien.

SOLUCIÓN DE CLORURO DE COBRE

Verter 70 mL de agua en dos de los frascos de 100 mL. En el primero de ellos agregar 60 mg de cloruro de cobre, luego llevar a volumen de 100 mL con agua y mezclar bien. Una vez lista esta primera solución de cloruro de cobre, tomar 1 mL, verterlo en el segundo frasco y completar el volumen de 100 mL con agua. Un mL de esta segunda solución es el que se emplea para la preparación de la solución 1 de micronutrientes.

Después de haber agregado todos los componentes al frasco de la solución 1 de micronutrientes, llevar a volumen de 500 mL con agua (tabla 5.1).

SOLUCIONES DE MACRONUTRIENTES

Adicionar en los frascos respectivos de 500 mL las cantidades de las sales indicadas a continuación (tabla 5.2).

Tabla 5.2. Reactivos utilizados en la preparación de la solución de macronutrientes para el ensayo con *Selenastrum capricornutum*

Frasco	Compuesto	Fórmula	Masa (g)
Solución 2	Nitrato de sodio	NaNO_3	12.25
Solución 3	Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.35
Solución 4	Fosfato de potasio	K_2HPO_4	0.522
Solución 5	Bicarbonato de sodio	NaHCO_3	7.5

Mezclar bien hasta disolver y posteriormente adicionar agua hasta alcanzar el volumen de aforo.

Las soluciones *stock* pueden ser conservadas refrigeradas (sin congelar) durante dos meses.

Por cada litro de medio de cultivo que se desee preparar, se adiciona en agua destilada 1 mL de cada una de las cinco soluciones en forma ordenada. Así, se debe iniciar con la 1 hasta terminar con la 5, llevando a volumen de 500 mL al finalizar. Se sugiere no alterar el orden de adición de las soluciones ya que se pueden formar precipitados difíciles de eliminar. Mezclar bien después de la adición de cada solución.

Al final, el pH del medio deberá ser de 7.5 ± 0.1 , por lo que es necesario ajustarlo, ya sea con NaOH o HCl 1 N. Inmediatamente, filtrar el medio bajo condiciones asépticas (mechero o campana de flujo laminar) a través de una membrana de éster de celulosa de $0.22 \mu\text{m}$ de abertura de poro y 47 mm de diámetro. El sistema de filtración y el matraz de captación deben estar estériles. Para la filtración se puede utilizar una bomba de vacío. El medio nutritivo esterilizado se inocula con las algas.

MEDIO NUTRITIVO ENRIQUECIDO (18X)

Este medio se prepara a partir de las soluciones 1, 2, 3, 4, y 5 empleadas en la elaboración del medio nutritivo para la proliferación de algas. Para la preparación se recomienda utilizar un recipiente aforado de 1 L debidamente rotulado. Se coloca 800 mL de agua a los cuales se adiciona 18 mL de cada

una de las soluciones ordenadamente como ya se indicó. Terminada la adición de las soluciones, llevar a volumen con agua destilada y ajustar el pH a 7.5 ± 0.1 con NaOH o HCl 1 N.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE BICARBONATO DE SODIO

Para la preparación de esta solución se toma un matraz aforado de 1 L y se coloca 900 mL de agua destilada, se adiciona 1 mL de la solución 5 empleada anteriormente, se mezcla y se completa el volumen.

MEDIO SÓLIDO PARA MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS

Este medio se prepara disolviendo 1 g de agar-agar en 100 mL del medio nutritivo para desarrollo de *S. capricornutum*. Posteriormente, se llenan con medio varios tubos de ensayo hasta la mitad de su volumen. Se cierran los tubos y esterilizan en autoclave u olla de presión a 120 °C y 15 libras de presión durante 15 o 20 minutos. Al término de este período, se sacan los tubos, se aprietan sus tapas y se dejan enfriar en posición inclinada hasta que el medio se solidifique. El medio sólido puede conservarse en refrigeración hasta por un mes.

ORGANISMOS DE PRUEBA

CULTIVO Y PROPAGACIÓN DE LAS ALGAS

La inoculación se realiza bajo condiciones de esterilidad, ya sea mediante el trabajo cerca de un mechero o utilizando una campana de flujo laminar. El cultivo se puede iniciar a partir de cepas mantenidas en medio sólido, tomando las células con un asa y esparciéndolas en el medio nutritivo líquido, o a partir de un cultivo líquido de algas que haya alcanzado la fase estacionaria y tenga una densidad celular entre 1 y 3 millones de células/mL. Cuando los cultivos alcanzan esta densidad se caracterizan por presentar un color verde intenso, que se logra entre los cinco y siete días después de la inoculación. En el caso que se seleccione esta última opción, se deben tomar 50 mL del cultivo por cada litro de medio estéril.

El medio inoculado se coloca a 24 ± 2 °C dentro de una cámara con iluminación superior a 2000 luxes, manteniendo aireación permanente. En el caso que no se cuente con el sistema de iluminación se puede utilizar un sistema

similar al presentado en el procedimiento complementario de este documento. Para la aireación, se puede emplear una bomba de aire para acuarios o utilizar directamente el aire de la línea del laboratorio. En este último caso, se deben eliminar las impurezas intercalando filtros entre la fuente y el recipiente de cultivo. Los filtros permiten mantener condiciones axénicas, y eliminan las partículas sólidas o líquidas (polvo del aire, emulsiones de aceite, etc). Existen filtros especiales disponibles en el mercado de artículos para laboratorio. En el caso de no contar con ellos puede fabricarse en el laboratorio, empackando carbón activado y lana de vidrio.

La manguera se conecta a un tubo hueco de vidrio o a una pipeta despuntada previamente esterilizada. El tubo se introduce en el medio inoculado cuidando de que el extremo llegue cerca del fondo del recipiente para que el burbujeo evite la formación de depósitos de algas. El extremo opuesto, se conecta a la manguera y deberá sobresalir del recipiente; para ello, se fija a la boca de la botella de cultivo con un tapón estéril.

Una vez que el cultivo alcanza la fase estacionaria (cinco a siete días), se retira de la cámara de incubación y se deja reposar a 4 °C. Esto puede hacerse en el refrigerador o en el interior de un cuarto frío, bajo condiciones de oscuridad de 48 a 72 horas. El cultivo sedimentado es separado del sobrenadante por decantación, lo cual permite obtener el concentrado de algas que se utilizará en las pruebas de toxicidad o en la alimentación de otros organismos como es el caso de *Daphnia magna*. Este medio de proliferación también puede ser empleado para otras especies de algas tales como *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp., entre otras.

CONTROL DEL CULTIVO

Generalmente las algas se mantienen en tubos de medio sólido estéril inclinados. El medio sólido se prepara adicionando a la solución de macro y micronutrientes (descritas anteriormente), agar-agar en una concentración del 1.5 a 2%. En otros casos, las células se mantienen inmovilizadas a una matriz esférica de alginato. Estas esferas con las células de algas se mantienen en medio AAP de concentración simple (Blaise *et al.*, 2000) a 4 °C en la oscuridad hasta por un período de seis meses.

Cualquiera que sea el método de preservación, los cultivos deben renovarse haciendo nuevos trasposos cada 3 o 6 meses. Bajo condiciones de preservación, el riesgo de contaminación es menor. Cada vez que se vaya a iniciar un nuevo cultivo, se desinmovilizan las células o se hace un nuevo trasposo, a partir de

los cuales se prepara el nuevo cultivo patrón en medio líquido. Este patrón se utiliza para la preparación del inóculo que se utilizará en los ensayos.

Para mantener las células algales en buen estado fisiológico se recomienda iniciar semanalmente un nuevo cultivo de mantenimiento. Cada transferencia se realiza bajo condiciones de esterilidad, examinando microscópicamente el cultivo para controlar alteraciones morfológicas.

La aparición de células anormales puede deberse a un exceso de alguno de los micronutrientes o a la deficiencia de nutrientes, especialmente cuando la transferencia se realiza durante la fase de declinación del crecimiento. Tanto las cepas como los cultivos estándar deben mantenerse bajo las mismas condiciones de luz, temperatura y fotoperíodo que se fijan para realizar los ensayos de toxicidad.

Al igual que los otros organismos de prueba, los nuevos cultivos deberán mostrar la sensibilidad establecida en la carta control con el compuesto tóxico de referencia seleccionado. En general, se recomienda utilizar Cu (II) como compuesto tóxico de referencia.

REACTIVACIÓN DE ALGAS INMOVILIZADAS

Alternativamente al mantenimiento de un cultivo de algas, algunos laboratorios mantienen las algas inmovilizadas sobre alginato en la forma de perlas, las cuales pueden conseguirse comercialmente. En este caso, cuando se van a realizar pruebas de toxicidad, es necesario liberar las células de la matriz de alginato, para lo cual se sigue el procedimiento que se describe a continuación:

Para la desinmovilización, se toman entre 10 y 12 perlas con algas, asegurándose de que estén libres de medio líquido. Se transfieren a un tubo cónico de 50 mL, se adiciona 5 mL de citrato de sodio 0.1 M, y se sella el recipiente. A continuación se agita vigorosamente durante treinta segundos, repitiendo el procedimiento cada dos minutos hasta que la matriz se haya disuelto completamente (de 20 a 30 minutos). Con ayuda de un agitador o vortex (a intensidad moderada), se puede reducir el tiempo de proceso a 5 minutos. Una vez disueltas las perlas, centrifugar a 3,000 rpm durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante, conservar las algas sedimentadas, resuspender las células en 5 mL de la solución amortiguadora de bicarbonato de sodio.

INOCULACIÓN DE LAS ALGAS EN MEDIO SÓLIDO PARA SU PRESERVACIÓN

Bajo condiciones de esterilidad, se transfieren con un asa bacteriológica las algas cultivadas en medio sólido al tubo con medio fresco, esparciendo las células en estría sobre la superficie del medio. La inoculación se inicia en la zona más profunda del tubo y se continúa hacia el exterior.

Una vez inoculado los nuevos tubos, se incuban a 24 ± 2 °C con iluminación continua e intensidad de luz superior a 2 000 luxes por un período entre 48 y 72 horas. Cuando se observe crecimiento se retiran los tubos de la cámara de iluminación y se almacenan en oscuridad a 4 ± 2 °C. Bajo estas condiciones, las algas continuarán creciendo pero de forma lenta.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE ALGAS PARA DESARROLLO DE PRUEBAS

Conocido el número células presentes en el inóculo mediante cámara de Neubauer, se debe hacer una dilución con el fin de obtener en cada vial de prueba una concentración inicial de 10 000 células/mL. Como el volumen final en cada vial, incluyendo el inóculo es de 2.6 mL (figura 5.2), se prepara 2 mL de una suspensión de algas que contenga 2.6×10^6 células/mL de la siguiente manera:

$$\text{Volumen (mL) del cultivo de algas para 2 mL} = 2 \text{ mL} / \text{Factor de dilución}$$
$$\text{Factor de dilución (FD)} = \text{Número de células/mL en el concentrado} / 2.6 \times 10^6 \text{ células/mL}$$

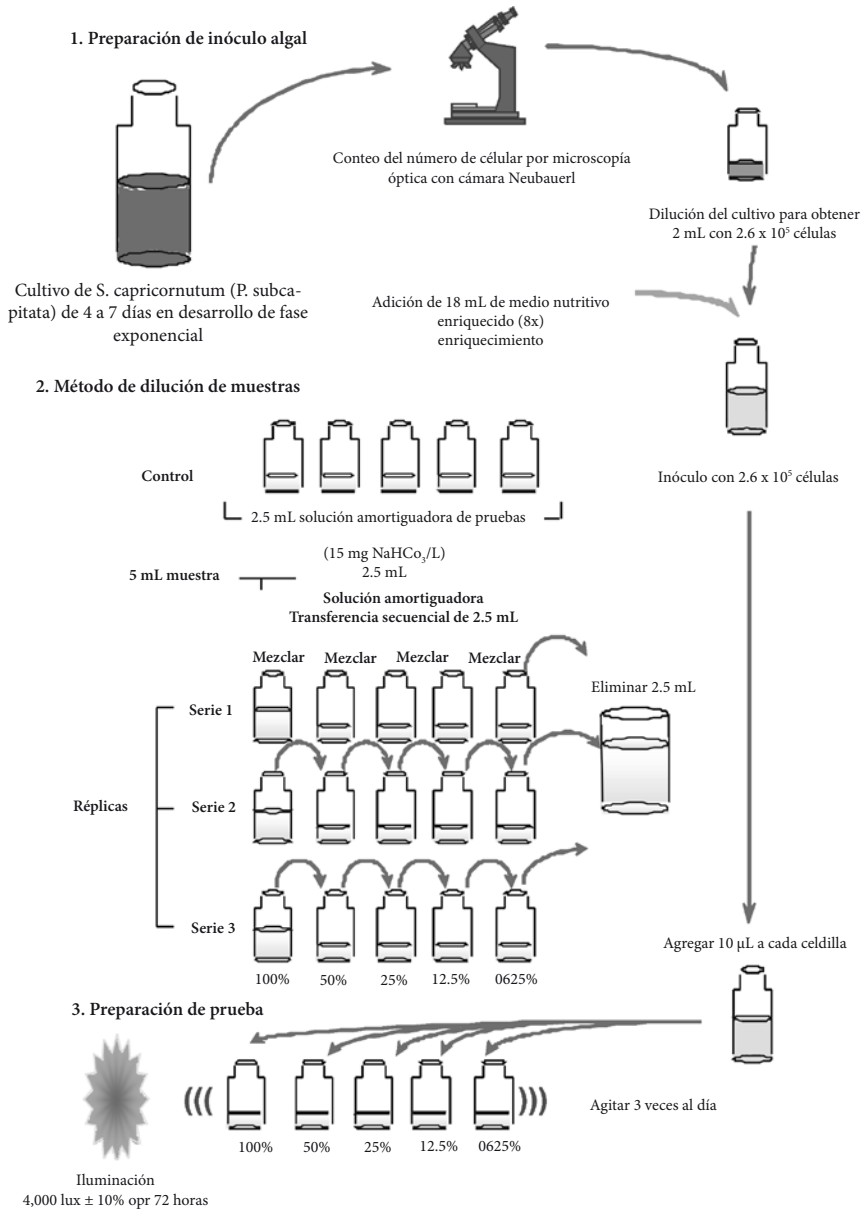
La preparación del inóculo que será utilizado en las pruebas debe provenir de un cultivo en fase exponencial. La densidad del cultivo será determinada con ayuda de un celda de conteo o cámara Neubauer. La densidad celular del cultivo se obtiene para poder calcular el factor de dilución necesario para asegurar una concentración de 2.6 millones de células por mililitro (2.6×10^6 células./mL) en un volumen de 2 mililitros.

Con el fin de ilustrar este cálculo se presenta el siguiente ejemplo:

Cálculo del factor de dilución (FD):

$$\text{FD} = \text{Número de células/mL en concentrado} / 2.6 \times 10^6 \text{ células/mL}$$

Figura 5.2. Esquema del procedimiento de prueba con *Selenastrum capricornutum*



Si la concentración de células por mililitro en el cultivo fue de 2.9×10^6 células/mL, entonces:

$$FD = 2.9 \times 10^6 \text{ células/mL} / 2.6 \times 10^6 \text{ células/mL} = 1.115$$

Cálculo del volumen de cultivo de algas en 2 mL (V):

$$V \text{ (mL)} = 2\text{mL} / \text{factor de dilución}$$

Sustituyendo en el ejemplo, el volumen de cultivo en 2 mL será:

$$V \text{ (mL)} = 2\text{mL} / 1.115 = 1.79 \text{ mL}$$

El resultado indica que deberá tomarse 1.79 mL del concentrado de algas y adicionar solución amortiguadora hasta completar un volumen de 2 mL. Esta dilución se puede realizar en tubos cónicos de centrífuga de 50 mL con ayuda de una pipeta automática.

Los 2 mL tendrán una concentración de algas de 2.6×10^6 células/mL, la cual nuevamente se diluye adicionando 18 mL del medio nutritivo enriquecido (18X) para tener una densidad final de 2.6×10^5 células/mL.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

DILUCIÓN DE MUESTRAS

Se recomienda que el sistema experimental incluya las diluciones de la muestra problema, así como las correspondientes al control positivo que contiene al compuesto tóxico de referencia y una serie de cinco viales que serán de utilidad como control negativo.

Los cinco viales rotulados como control (C_1 hasta C_5) deben llenarse solo con 2.5 mL de la solución amortiguadora de bicarbonato de sodio. Para el caso de las muestras problema o de control positivo, se requiere por lo menos 15 viales de vidrio de borosilicato de 20 mL, similares a los utilizados en contadores de centelleo (Arensberg *et al.*, 1995) organizados en series de 5 viales cada una. Cada serie constituye una réplica. Se rotulan los viales de la primera serie de la siguiente manera: P_1 , Q_1 , R_1 , S_1 , y T_1 , la segunda, deberán rotularse de la misma forma pero con el subíndice 2, y la tercera con el subíndice 3. En los viales rotulados P_1 , P_2 , y P_3 se colocan 5 mL de solución más concentrada de la muestra (100%). Los restantes viales se utilizarán para la preparación de las diluciones seriadas de la muestra (figura 5.2).

Para iniciar el proceso de dilución de la muestra, en cada uno de los viales restantes se coloca 2.5 mL de solución amortiguadora de bicarbonato de sodio. A continuación, se transfiere 2.5 mL de la muestra (100%) del vial rotulado como P_1 al vial Q_1 , la concentración en este vial corresponde a la primera dilución 1:2 o 50% (v/v). Se mezcla y se continúa el proceso tomando 2.5 mL del vial Q_1 y pasándolo al R_1 en cual se tiene la segunda dilución 1:2 y una concentración de 25% (v/v), y así sucesivamente hasta llegar al vial T_1 . Como al finalizar en el vial T_1 se tiene un volumen de 5 mL se toman 2.5 mL y se descarta. Se sigue el mismo procedimiento para las series 2 y 3 y al finalizar el proceso de dilución, se mezcla el contenido de cada uno de los viales del sistema de prueba.

Terminado el proceso de dilución de la muestra, se procede a adicionar 100 μ L del inóculo de algas anteriormente preparado y cuya concentración es 2.6×10^5 células/mL, a cada uno de los viales de la prueba. La concentración final de las algas en cada uno de los viales será 10 000 células/mL.

Se colocan los viales en la cámara con iluminación fluorescente (luz blanca fría), con una intensidad luminosa entre 60-80 μ E/m²s (aproximadamente 4 000 luxes). En el procedimiento complementario de este documento se presentan el diseño y los pasos para elaborar un modelo piramidal de cámara que puede ser construido con materiales de bajo costo y que permite que en toda el área se tenga una distribución homogénea de luz.

La incubación de los viales se lleva a cabo durante 72 horas. Si no se cuenta con un sistema de agitación orbital, se debe hacer agitación manual de cada uno de los viales tres veces durante el día. La agitación contribuye a promover el adecuado desarrollo de la población de las algas.

El resumen general de las condiciones recomendadas para esta prueba se presenta en la tabla 5.3 y en las figuras 5.2 y 5.3.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Al finalizar el tiempo de exposición, se inicia el conteo del número de algas en cada vial. Para el conteo se toman entre 20 a 50 μ L de la suspensión con ayuda de una pipeta automática y se coloca en la celda de conteo o la cámara Neubauer.

La cuantificación se efectúa siguiendo el método de manejo recomendado para este tipo de celdas, el cual que se describe más adelante.

Conocidos los recuentos del número de algas, se procede a establecer el porcentaje de inhibición (% I) en cada una de las diluciones, el cual se cuantifica de la siguiente manera:

$$\% I = 100 - [(\text{promedio células/mL de las réplicas en la dilución} / \text{promedio células/mL de las réplicas del control})] \times 100$$

Tabla 5.3. Condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad crónica con *Selenastreum capricornutum*

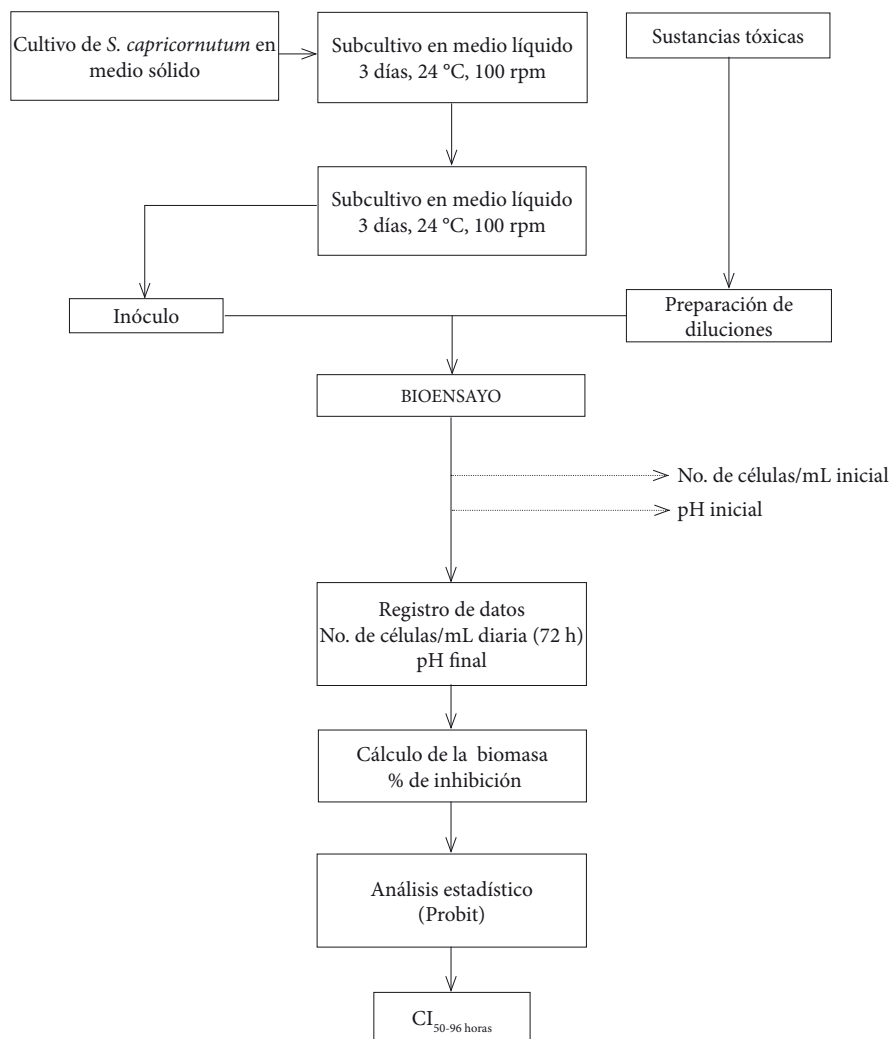
Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	24 ± 2 °C
Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
Intensidad luminosa	60-80 µE/m ² /s (4,000 ± 10% luxes)
Fotoperíodo	Iluminación continua
Recipientes de prueba	Viales de 20 mL
Volumen de la solución de prueba	2.6 mL
Edad del cultivo usado como inóculo	4 a 7 días
Densidad celular inicial	104 células/mL
Número de réplicas	3
Tipo de agitación	Manual, discontinua
Agua de dilución	Solución amortiguadora de bicarbonato de sodio
Factor de dilución	0.3 o 0.5
Duración de la prueba	72 horas
Efecto medido	Crecimiento (conteo)
Resultado final	IC ₅₀
Aceptabilidad de los resultados	Densidad celular en el control >16 veces a la densidad inicial
Control positivo	Cu(II), a partir de una solución de CuSO ₄

CONTEO DE LAS ALGAS CON LA CÁMARA NEUBAUER

La cámara Neubauer, también conocida como hemocitómetro, consta de un cubre-objetos de cuarzo y un porta-objetos de un grosor mayor a los de uso común. En la parte superior del porta-objetos se encuentran cuatro canales longitudinales y uno transversal central. En la parte superior e inferior del canal transversal están grabadas dos rejillas de 9 mm² de superficie, las cuales están a su vez subdivididas en una cuadrícula más pequeña (figura 5.4. A y B) (UNAM, 1986).

Usando el objetivo de 10X de un microscopio óptico, se enfoca de forma que en el campo se cubra un cuadrado cuya área corresponde a 1 mm², generalmente se trabaja con el cuadro central. El área del cuadro central es de 1 mm² y se encuentra subdividida en 25 cuadrados. Cada uno de estos cuadrados mide 0.2 mm de lado, por lo que el área de cada uno será 0.04 mm².

Figura 5.3. Diagrama de flujo del ensayo con *Selenastrum capricornutum*



Al colocar el cubre-objetos sobre el porta-objetos se tiene una profundidad de 0.1mm de forma que el volumen contenido en cada uno de los cuadrados grandes será 0.1 mm^3 ($1.0 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3$).

El conteo con la cámara se lleva a cabo de la siguiente forma:

- Limpiar con papel de arroz la cámara Neubauer
- Colocar el cubre-objetos sobre los canales tal como se indica en la figura 5.4.
- Agitar manualmente el frasco con la solución de algas a evaluar hasta observar coloración homogénea o disolver los agregados celulares.
- Con ayuda de una pipeta serológica de 1 mL o con una pipeta automática de 100 μL , tomar 0.01 mL de la suspensión de algas y, colocando la punta de la pipeta en el borde del cubre-objetos, dejar que la solución ingrese a la cámara por capilaridad, sin que ella pase a los canales laterales (figura 5.4 C). Si se forman burbujas se debe repetir la operación, lavando y secando la cámara previamente
- Colocar la cámara Neubauer en la platina del microscopio y enfocar con el objetivo 10X
- Localizar el cuadro central de la rejilla de 25 cuadros de 0.04 mm^2 , hacer un cambio de lente al objetivo de 40X y contar las células que se encuentran sobre el mismo
- Contar el número de células en el cuadrado central tomando precauciones para evitar contar dos veces la misma célula u omitir alguna
- Para obtener resultados más exactos se recomienda tener un conteo entre 200 y 300 células por muestra. Cuando en el cuadro central existan menos de doscientas células, es necesario revisar más cuadros para el conteo. Se sugiere continuar el conteo en los cuatro cuadros que forman las esquinas de la cuadrícula. Si aún así no se alcanza las 200 células, se debe contar el total en los 25 cuadros
- Anotar el número de cuadros contados
- En caso opuesto, en que el número de células sea muy elevado y se dificulte su conteo, será necesario diluir la suspensión en una proporción conocida, la cual debe tomarse en cuenta en la estimación final.

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR

La densidad celular de la suspensión de algas se calcula de la siguiente forma:

- En caso de haber empleado los cuadrantes de 0.04 mm , se calcula en número de células en 0.1 mm^3 con la siguiente ecuación:
Número de células en $0.1 \text{ mm}^3 = \text{Número total de células contadas} / \text{Número de cuadros de } 0.04 \text{ mm}^2 \text{ en el conteo}$
- Esto dará el número total de células por 0.1 mm^3 (volumen obtenido de

multiplicar el área de 1mm² x 0.1mm profundidad de la cámara).

- El número de células por mL, se obtendrá de multiplicar el valor obtenido anteriormente por 10,000, como lo muestra la siguiente ecuación:
Número de células por mL = Número de células en 0.1 mm³ x 10, 000
- En caso de haber empleado los cuadrantes de 1 mm, se calcula el número de células en 0.1 mm³ con al siguiente ecuación:
Número de células en 0.1 mm³ = Número total de células contadas/Número de cuadros 1 mm² en el conteo.
- Este valor corresponderá al número total de células en 0.1 mm³. Para obtener el número por mL, se multiplica por 10,000.

CONTROL DE CALIDAD EN LAS PRUEBAS

El valor de CI₅₀ obtenido para el compuesto tóxico de referencia debe estar dentro de lo admitido por la carta control. Sin embargo, algunos autores (ISO,1989) evalúan tanto el crecimiento de la población como el efecto de las sustancias tóxicas, midiendo los cambios en la tasa de crecimiento (μ) de la población, la cual se calcula de la siguiente forma:

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{\Delta t}$$

donde:

N = Densidad celular al final del ensayo

N_0 = Densidad celular inicial nominal

Δt = Intervalo de tiempo considerado

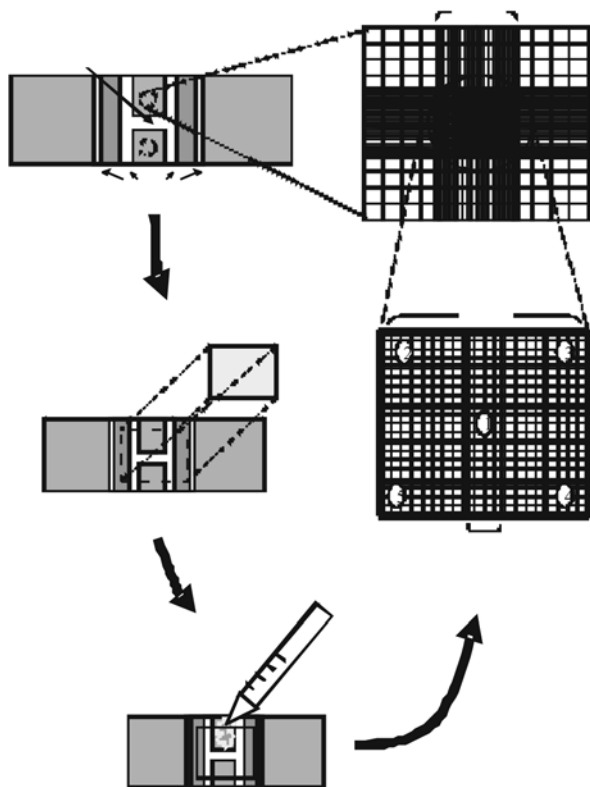
Es necesario tener en cuenta que, debido al carácter logarítmico de la tasa de crecimiento, pequeñas diferencias en μ pueden corresponder a grandes diferencias en biomasa; por lo tanto, estos valores no son numéricamente comparables. Por ello debe indicarse con cual variable fue calculada la CI₅₀, ya sea en términos del número de células CI_{50b} o en términos de la tasa de crecimiento CI_{50r}. En general el valor de la CI_{50r} es menor que la CI_{50b}.

Al igual que en otras pruebas de toxicidad, se recomienda realizar dos controles, uno negativo y otro positivo. En el primero, los organismos se desarrollan por el mismo período de tiempo, en condiciones iguales a los ensayos, pero sin compuesto tóxico en la solución de prueba (inóculo de algas en solución amortiguadora). El control positivo corresponde a una solución de concentración conocida del compuesto tóxico de referencia y cuyo efecto está

bien establecido. En general se utiliza como compuesto tóxico de referencia al Cu(II) (a partir de sulfato de cobre) a la concentración correspondiente a la CI_{50} .

Es importante tener en cuenta que los resultados son aceptados cuando la densidad celular en el control negativo aumenta al menos 16 veces al finalizar el ensayo o cuando la tasa de crecimiento se mantiene entre 0.9 y 1.0 d^{-1} y la variación en las réplicas es no mayor al 20%. La inhibición en el control positivo debe estar dentro de lo establecido en la carta control.

Figura. 5.4. Conteo celular de *Selenastrum capricornutum* mediante la utilización de la cámara Neubauer



BIBLIOGRAFÍA

- Arensberg, P., V. H. Hemmingsen y N. Nyholm, 1995. A. *Miniscale Algal Toxicity Test Chemosphere* 30: 2,103-2,115.
- Blaise C., G. Forget y S. Trottier. 2000. Toxicity Screening of Aqueous Samples Using a Cost-Effective 72-hour Exposure *Selenastrum capricornutum* Assay. *Environmental Toxicology* 15: 352-359.
- Environment Canada. 1992. Biological Test Method: Growth Inhibition Test Using the Freshwater alga *Selenastrum capricornutum*. Environmental Protection Series EPS 1/RM/24.
- Hindak, F. 1990. Studies of the *Clorococcal Algae* (clorophyta), Vied Biologicke Prace (Slovenskej Akademick Vied), *Bratislava* 36:1-225
- International Standards Organization (ISO).1989. Water Quality Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subapicatus* and *Selenastrum capricornutum*. ISO 8692.
- Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 1986. Biología Celular. Manual de Prácticas. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 20-28.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1992. *Short-term methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*. EPA-600/4-91-022. Tercera edición. A. L. Philip Lewis, D. J. Klem y J. M. Lazorchak.

ENSAYO DE TOXICIDAD CRÓNICA CON MICROALGAS CLOROFÍCEAS

Felipe Fernando Martínez-Jerónimo

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: AE

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Esta prueba se basa en la determinación de los efectos inhibitorios que sobre la tasa de crecimiento poblacional pueden producir los compuestos tóxicos puros, así como los contenidos en mezclas de composición conocida, en productos formulados o los que pueden estar presentes en muestras de agua o en efluentes con o sin tratamiento. Este ensayo se fundamenta en que una población microalgal, cuando se encuentra en condiciones propicias para su desarrollo, es capaz de aumentar su tamaño de población, por lo que en esas condiciones es posible detectar si los productos problema o muestras a analizar producen inhibición en la tasa de crecimiento poblacional. Las microalgas, como componentes del fitoplancton, constituyen el grupo de productores primarios que son fundamentales en todos los ecosistemas acuáticos, ya que determinan la productividad de los mismos y permiten el desarrollo de consumidores de

diferente nivel trófico. Es por ello que resulta importante evaluar los efectos sobre este grupo de organismos. Siendo la tasa de crecimiento una respuesta sensible y fácil de monitorear, se puede evaluar la disminución de dicha respuesta como un indicador del estrés al cual están sujetas las poblaciones de microalgas. Este supuesto es válido para especies de microalgas que se reproducen asexualmente, por fragmentación o por la formación de autosporas. La tasa de crecimiento poblacional se puede medir directa o indirectamente, lo cual es una gran ventaja de esta prueba. Las mediciones directas se realizan mediante el conteo (en una cámara Neubauer o hemacitómetro) de los individuos en muestras representativas, mientras que las mediciones indirectas se obtienen a través de la determinación de la densidad óptica (o absorbancia) a una longitud de onda adecuada, el peso seco, el contenido de clorofila u otros pigmentos fotosintéticos, la concentración de proteínas, etc.

Este método consiste en exponer a las microalgas a una serie de concentraciones o diluciones de las muestras problema, espaciadas geoméricamente en base 2. En el bioensayo definitivo, la concentración mayor deberá inhibir completamente el crecimiento, en tanto que la tasa de crecimiento poblacional en la concentración menor no deberá diferir significativamente de la determinada para el tratamiento usado como control negativo.

Se sugiere emplear como organismos de prueba a las microalgas clorofíceas *Pseudokirchneriella subcapitata* (anteriormente conocida como *Selenastrum capricornutum* o *Raphidocelis subcapitata*) (figura 6.1) o *Ankistrodesmus falcatus* (figura 6.2), que son especies de reproducción asexual y unicelulares, por lo que es sencillo realizar con ellas las cuentas para la determinación de la densidad celular, cuando se escoge a ésta como una medida directa del tamaño de la población algal.

La respuesta medida es la inhibición en la tasa de crecimiento poblacional en un período de 96 horas de exposición. La ventaja de esta prueba es que es de fácil realización y proporciona una medida directa de los efectos sobre la población experimental expuesta.

Esta prueba es adecuada para la evaluación de los efectos tóxicos crónicos de efluentes con o sin tratamiento, muestras de agua de cuerpos de agua receptores de descargas, compuestos puros y mezclas de composición conocida o desconocida, principios activos y productos formulados comerciales. Es útil además para la clasificación de la toxicidad de compuestos en el monitoreo de la calidad del agua en ecosistemas acuáticos y en la evaluación de la eficiencia de los sistemas de tratamiento de las aguas residuales.

Figura 6.1. Microfotografía de *Pseudokirchneriella subcapitata* (antes denominada como *Selenastrum capricornutum*) (obtenida por microscopía de contraste de fases)

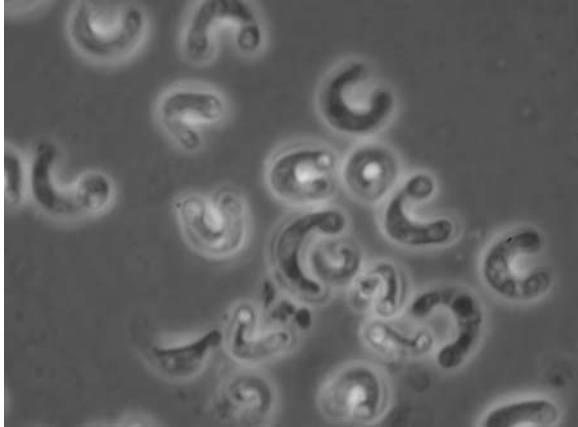
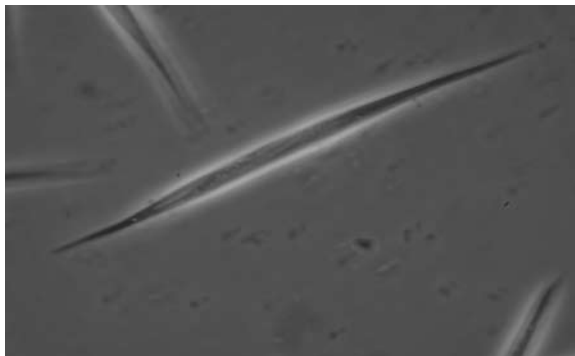


Figura 6.2. Microfotografía de *Ankistrodesmus falcatus* (obtenida por microscopía de contraste de fases).



INFRAESTRUCTURA EN EL LABORATORIO

Para esta prueba se requiere que el laboratorio cuente con un área para trabajo en condiciones de esterilidad (cuarto de inoculación o campana de flujo laminar con filtración y esterilización de aire), además de área para esterilización

de materiales y soluciones (con horno y autoclave). Adicionalmente, se deberá contar con una área acondicionada para el cultivo, la cual debe tener un sistema regulado de iluminación artificial con lámparas fluorescentes “luz de día”, con control de temperatura y con suministro de aire comprimido filtrado y libre de aceite. El suministro de aire se emplea sólo para la producción de inóculos y para la propagación de cultivos activos de la cepa, pues los bioensayos se realizan sin aireación, aunque en este último caso es deseable el contar con una placa agitadora orbital, a fin de evitar la sedimentación de las microalgas. También se puede evitar la sedimentación durante los bioensayos mediante agitación manual periódica.

MATERIAL

La cristalería que se requiere es la típica de un laboratorio, aunque debe incluir los materiales indispensables para el trabajo microbiológico, además de pipetas automáticas, propipetas, etc. De manera específica, se debe considerar que los ensayos toxicológicos se deben realizar en matraces Erlenmeyer de vidrio, de 50 o 125 mL de capacidad total, y tubos de ensaye con tapón de baquelita de 100 X 15.

EQUIPO

Los equipos requeridos son los básicos de cualquier laboratorio de análisis biológicos, los cuales incluyen: balanza analítica, microscopio óptico, estereomicroscopio, autoclave (de gas o eléctrica), potenciómetro, oxímetro salinómetro o conductivímetro y espectrofotómetro.

REACTIVOS

Es indispensable contar con los compuestos necesarios para la preparación del medio de cultivo para el crecimiento algal que se detallan más adelante. Este medio funciona también como agua de dilución para preparar las soluciones de la muestra problema durante el bioensayo. Para simplificar la preparación del medio de cultivo se sugiere la preparación de soluciones concentradas, que deberán conservarse en frascos herméticamente cerrados, protegidos de la luz y a baja temperatura.

Todos los reactivos deberán ser grado analítico y de la máxima pureza posible, a fin de evitar exponer a los organismos a elementos traza o compuestos

potencialmente tóxicos, lo que podría afectar la respuesta de las microalgas durante el bioensayo.

ORGANISMOS DE PRUEBA

La cepa utilizada debe provenir de un cepario o colección de laboratorio autorizado o certificado. Aunque particularmente *A. falcatus* es una especie que puede ser obtenida mediante colectas de muestras de fitoplancton de cuerpos de agua dulce, los procesos de aislamiento, purificación e identificación son laboriosos y tardados, por lo que es preferible adquirirla a través de un laboratorio que cuente con ella. Una vez obtenida, la cepa debe ser conservada de acuerdo a las instrucciones del proveedor, en refrigeración y en medio de cultivo solidificado con agar bacteriológico al 1.5%. La calidad microbiológica de la cepa debe ser revisada periódicamente, pues aun cuando no se requieren cepas axénicas, la carga bacteriana en la cepa unialgal debe ser reducida y la población algal nunca debe estar contaminada con hongos, protozoarios ni con otros organismos fotosintéticos, tales como las cianobacterias, que con relativa facilidad pueden contaminar a una cepa monoespecífica, sobre todo cuando no se realiza un manejo aséptico o cuando no se trabaja con medios de cultivo y materiales debidamente esterilizados.

CULTIVO Y MANTENIMIENTO O ALMACENAMIENTO DE LOS ORGANISMOS

Las cepas se conservarán en tubos de ensaye de 150 X 15, con tapón de baquelita, que contendrán medio de cultivo solidificado mediante la adición de agar bacteriológico al 1.5%. También se recomienda mantener cultivos activos de la cepa en matraces de 125 o 250 mL. El mantenimiento de las condiciones asépticas en el medio de cultivo y en los materiales que se emplearán es fundamental para garantizar la calidad de respuesta de las microalgas; también se debe considerar que todo el manejo y conservación de las cepas, así como los procesos para realizar los bioensayos, presupone condiciones de esterilidad. El medio de cultivo sugerido es el recomendado por la Agencia para la Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 2002), que se muestra en la tabla 6.1, el cual es adecuado tanto para la conservación de la cepa como para la propagación de los inóculos y como agua de dilución para los bioensayos. Sin embargo, para realizar cultivos de crecimiento rápido (preparación de inóculos) se recomienda, de manera adicional, el medio Basal de Bold que se muestra en la tabla 6.2.

Tabla 6.1. Composición del medio de cultivo y agua de dilución para las pruebas de toxicidad con microalgas clorofíceas (USEPA, 2002)

Macronutrientes	Concentración (mg/L)*	Elemento	Concentración (mg/L)*
NaNO ₃	25.5	N	4.20
MgCl ₂ •6H ₂ O	12.2	Mg	2.90
CaCl ₂ •2H ₂ O	4.41	Ca	1.20
MgSO ₄ •7H ₂ O	14.7	S	1.91
K ₂ HPO ₄	1.04	P	0.186
NaHCO ₃	15.0	Na	11.0
		K	0.469
		C	2.14
Micronutrientes	(µg/L)*	Elemento	(µg/L)*
H ₃ BO ₃	185.0	B	32.5
MnCl ₂ •4H ₂ O	416.0	Mn	115.0
ZnCl ₂	3.27	Zn	1.57
CoCl ₂ •6H ₂ O	1.43	Co	0.354
CuCl ₂ •2H ₂ O	0.012	Cu	0.004
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	7.26	Mo	2.88
FeCl ₃ •6H ₂ O	160.0	Fe	33.1
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	300.0		
Na ₂ SeO ₄	2.39	Se	0.91

*Las cantidades indicadas se diluyen en agua destilada o deionizada (con conductividad menor a 5 µS cm⁻¹).

Los medios de cultivo se preparan a partir de soluciones patrón o concentradas. Tanto para la propagación como para los bioensayos se requiere proporcionar iluminación continua con intensidad luminosa de 4,500 a 5,000 luxes y el crecimiento e incubación se logra a temperatura de 25 ± 1 °C. La calidad de respuesta de la cepa debe ser evaluada periódicamente con el compuesto tóxico de referencia, sulfato de cobre, evaluando la concentración media de inhibición (CI₅₀). Los bioensayos en su fase de prueba definitiva, tienen duración de 96 horas.

Tabla 6.2. Composición del medio de cultivo basal de Bold para el mantenimiento de cepas y propagación de microalgas clorofíceas

Reactivo	Concentración (mg/L)*
NaNO ₃	250
CaCl ₂ ·2H ₂ O	25
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75
K ₂ HPO ₄	75
KH ₂ PO ₄	175
NaCl	25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.98
H ₂ SO ₄	0.001 (ml/L)
H ₃ BO ₃	11.42
EDTA	50
KOH	31
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82
MnCl ₂ ·4H ₂ O	14.4
MoO ₃	0.71
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.49

*En agua destilada o deionizada.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

PREPARACIÓN DEL MATERIAL ANTES DE LA PRUEBA

Todos los materiales empleados deberán ser de vidrio de borosilicato, lavado de acuerdo al procedimiento complementario descrito en este documento, para eliminar todo vestigio de compuestos tóxicos que pudiera afectar los resultados en el bioensayo. Como se ha dicho, todo el manejo debe realizarse en condiciones asépticas, con materiales, medios de cultivo y soluciones esterilizadas de manera adecuada. Para ello puede usarse calor seco a 200 °C durante 1 hora, autoclave a 15 libras/pulgada² por 15 minutos o filtración *Millipore*[®] con membranas estériles de 0.45 µm. En este último caso el equipo y membranas deben ser previamente esterilizados en autoclave.

DESARROLLO DE LA PRUEBA

El bioensayo es estático, sin renovación de la solución de prueba, realizándose siempre con soluciones acuosas de las muestras problema. Cuando se trate de materiales de baja hidrosolubilidad, se deberán emplear disolventes de baja toxicidad, como acetona, etanol, metanol o dimetil sulfóxido, teniendo siempre presente que su concentración no debe ser superior a 1 mL/L, independientemente de que se deberá implementar una segunda serie control que contenga la máxima cantidad de solvente utilizada. Se deberá evaluar el pH y la conductividad eléctrica de las muestras al inicio y al término de la prueba. Se ensayarán al menos 5 concentraciones o diluciones de los materiales a evaluar, contando cada una de ellas con al menos 3 réplicas. Los recipientes de prueba sugeridos son matraces Erlenmeyer de 50 o 125 mL, aunque también se pueden emplear tubos de ensayo de 100 X 15, de preferencia con tapón de baquelita o con tapones de algodón recubiertos de gasa. El volumen total de prueba será de 25, 75 o 7 mL. La temperatura debe ser de 25 ± 2 °C, la iluminación continua con intensidad de 4,500 a 5,000 luxes, proporcionada por lámparas fluorescentes “luz de día”. El inóculo inicial en todos los casos será de 10,000 células/mL. La respuesta evaluada será la densidad celular determinada a las 24, 48, 72 y 96 horas en todas las réplicas de todas las concentraciones y de la serie testigo, mediante conteo en la cámara Neubauer. Adicionalmente se deberán hacer observaciones al microscopio compuesto de muestras de los cultivos, para registrar posibles alteraciones en la morfología celular (con respecto a la serie testigo), así como determinar si ocurren cambios en los patrones de distribución citoplásmica de las células o en la coloración del cultivo. Para evaluar la densidad poblacional se empleará la cámara Neubauer o hemacitómetro y el microscopio compuesto al aumento de 40X. Se debe tener una variación máxima del 20% entre las dos cuentas de una misma muestra, de lo contrario se deberá repetir o aumentar el número de conteos por muestra, teniendo cuidado en el llenado de ambos lados de la cámara de Neubauer. La distribución de los recipientes de cultivo en el área de incubación deberá ser aleatoria, a fin de evitar sesgos por efectos diferenciales en la iluminación o en la temperatura. De manera resumida, el procedimiento de prueba se muestra en la tabla 6.3.

EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Se trazarán las curvas individuales de incremento poblacional para todas las concentraciones y el testigo, incluyendo en cada una, para cada tiempo, los datos de

Tabla 6.3. Condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad crónica con microalgas clorofíceas

Tipo de prueba	Estática sin renovación de la solución de prueba
Duración	96 horas (prueba definitiva)
Iluminación	Artificial, controlada, con lámparas fluorescentes "luz de día" de 4,500 a 5,000 luxes
Fotoperíodo	Iluminación continua (24 horas luz:0 horas oscuridad)
Temperatura	25 ± 1 °C
Aireación	No, agitación manual periódica durante toda la prueba
Recipientes de prueba	Matraces Erlenmeyer de 50 o 125 mL o tubos de ensayo de 100 X 15, con tapón de baquelita o tapón de algodón
Volumen de prueba	25, 75 o 7 mL
Edad de cultivo al inóculo	6 días (fase exponencial de crecimiento)
Densidad celular del inóculo	10,000 células/mL
Concentraciones o diluciones ensayadas	Mínimo 5, más el control negativo (prueba definitiva)
Replicas por concentración	Mínimo 3
Efecto medido	Inhibición del crecimiento poblacional, medida como densidad celular
Efectos adicionales medidos	Cambios en la morfología y el aspecto celular
Periodicidad de las observaciones	Cada 24 horas
Criterio de aceptación de la prueba	La densidad celular en el testigo, al término de la prueba (96 horas), debe ser superior a 1X10 ⁶ células/mL y el coeficiente de variación para el control no debe exceder del 20%

todas las réplicas, así como los valores promedio y las barras de error estándar para la densidad celular, que se expresará como células algales por mL. Adicionalmente, con los datos de densidad celular para todas las réplicas en cada concentración y en el control a las 96 horas, se realizará un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, a fin de determinar si existen diferencias significativas entre las concentraciones y con respecto al control. Si el resultado del ANOVA es significativo, entonces se deberán realizar pruebas *post hoc* o comparaciones múltiples para determinar los tratamientos que difieren significativamente entre si. Se sugiere emplear métodos como el de Tukey, SNK o LSD; como complemento a estas comparaciones se aplicará la Prueba de Dunnett para determinar las concentraciones o diluciones que producen densidades celulares significativamente menores, con respecto al control negativo. El análisis de comparaciones múltiples también permite determinar los valores de

LOEC, NOEC y la MATC (máxima concentración permisible del compuesto tóxico) o la concentración de seguridad para exposiciones crónicas.

También con los datos promedio de densidad celular a las 96 horas se determinará el porcentaje de inhibición con respecto al control negativo y se calculará la concentración media de inhibición (CI_{50}) o concentración efectiva media (CE_{50}) e intervalo de confianza ($P = 0.95\%$) a las 96 horas por el método que resulte más adecuado (Probit, Logit, Binomial o Ángulos Móviles Promedio). La inhibición se determinará como porcentajes de disminución en la densidad celular con respecto a la densidad celular promedio alcanzada en la serie utilizada como control negativo. En caso de que se detectaran efectos estimulatorios (mayor crecimiento poblacional en alguna concentración de la muestra problema que la registrada en el control negativo) no se incluirán esos datos para la determinación de la CE_{50} , a fin de evitar errores en su estimación, aunque esto deberá quedar reflejado en las gráficas de crecimiento poblacional. Si este fuera el caso y si además se determinara que el efecto es significativo, se deberán discutir las posibles causas de la estimulación. Este ensayo es semejante a los protocolos de prueba propuestos como métodos estandarizados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (USEPA, 1996), la Sociedad Americana de Evaluación y Materiales (ASTM, 2004) y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, 1984).

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, R. A. (ed.). 2005. *Algal culturing techniques*. Phycological Society of America, Elsevier Academic Press, Amsterdam. 578 pp.
- American Society of Testing and Materials (ASTM). 2004. E 1218 – 04, Standard guide for conducting static toxicity tests with microalgae, ASTM International, West Conshohocken, PA 19428-2959, United States. 14 pp.
- Organization for the Economical Cooperation and Development (OECD). 1984. *Alga, growth inhibition test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 201.
- United Nations. 2005. *Globally Harmonized System Of Classification and Labeling of Chemicals (GHS)*. Primera ed. revisada, ST/SG/AC.10/30/Rev.1, Nueva York y Ginebra. 526 pp.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. *Algal toxicity*. Tiers I and II. Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.5400. EPA 712-C-96-164.
- . 2002. *Short term Methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. Cuarta edición. U.S. EPA Office of Water, Washington, D.C. EPA-821-R-02-013. 335 pp.

ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON CLADÓCEROS DE LA FAMILIA DAPHNIDAE

Felipe Fernando Martínez-Jerónimo

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: AE

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba se basa en la determinación de efectos letales agudos (inmovilización o mortalidad), observados en un tiempo de exposición de 48 horas, en especies dulceacuícolas de cladóceros planctónicos. Este es un bioensayo que se puede aplicar con los cladóceros *Daphnia magna* (figura 7.1), *D. exilis* (figura 7.2), *D. pulex* (figura 7.3), *Ceriodaphnia dubia* (figura 7.4) o *Moina macrocopa* (figura 7.5), aunque es necesario que la identidad específica sea determinada por un especialista, debiéndose proporcionar el origen de la cepa utilizada, y cuando sea procedente, el número de catálogo.

Estas especies, conocidas genéricamente como “pulgas de agua”, son componentes habituales del zooplancton, distribuyéndose de manera habitual en cuerpos de agua naturales, presas, bordos, charcas temporales y estanques con fertilización orgánica, en diferentes partes del territorio nacional. Son espe-

Figura 7.1. *Daphnia magna*.
Hembra partenogenética

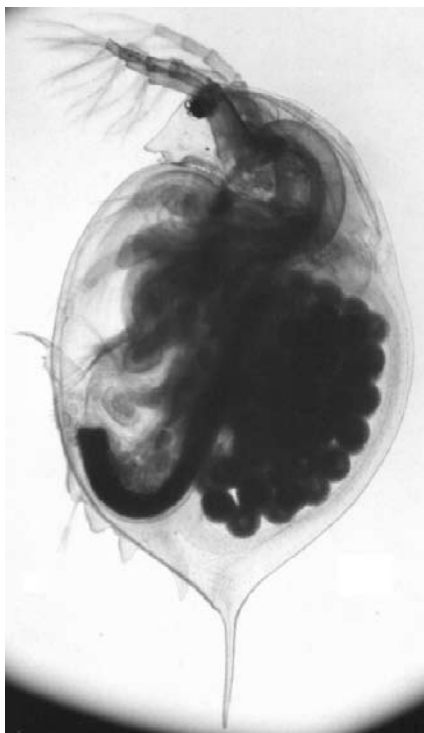


Figura 7.2. *Daphnia exilis*.
Hembra y macho



cies que se reproducen sexual y asexualmente, siendo esta última modalidad reproductiva una característica importante en la implementación de cultivos controlados de laboratorio. Se tiene bien documentado que la reproducción asexual, que se realiza mediante partenogénesis, se presenta principalmente cuando las condiciones de desarrollo son las adecuadas, produciéndose entonces camadas exclusivamente de hembras, que pueden a su vez alcanzar la fase reproductiva y continuar reproduciéndose de manera asexual mientras persistan condiciones favorables de alimentación, baja densidad poblacional, y los principales factores ambientales y de calidad química del agua sean los adecuados. Cuando alguno o algunos de estos factores se tornan adversos, entonces parte de la progenie estará constituida por machos que al crecer pueden dar lugar a la reproducción sexual al fecundar a las hembras, dando

Figura 7.3. *Daphnia pulex*. Hembra partenogenética



Figura 7.4. *Ceriodaphnia dubia*



Figura 7.5. *Moina macrocopa*. Hembra partenogenética



como consecuencia la formación de una estructura de resistencia conocida como efipio, que contiene uno o dos embriones (dependiendo de la especie) en estado latente, y que mantienen la diapausa hasta que se propician condiciones ambientales adecuadas para que se reinicie el desarrollo embrionario y emerjan juveniles que pueden dar inicio a un nuevo ciclo de reproducción asexual. En la modalidad reproductiva partenogenética, el desarrollo embrionario es directo y se lleva a efecto en la cámara incubatriz de la hembra, de la que emergen organismos juveniles (neonatos), que son liberados al medio cuando completan su desarrollo. La *facies* de los juveniles recién liberados es semejante a la del adulto, aunque obviamente es de menor talla. Todas estas especies son filtradoras, consumiendo una diversidad de partículas que incluyen diferentes especies de microalgas, así como materia orgánica en suspensión, por lo que se les considera componentes importantes en los ecosistemas acuáticos al permitir el flujo energético entre los productores primarios y órdenes superiores de consumidores, en las tramas tróficas de los sitios donde se distribuyen.

La prueba se realiza con los neonatos de estas especies, que son los juveniles con edad menor a 24 horas, contada a partir de su expulsión de la cámara incubatriz. La respuesta que se evalúa es la inmovilización o la mortalidad de los organismos de prueba, a 24 y 48 horas de exposición a las soluciones tóxicas ensayadas.

El bioensayo consiste en exponer a los neonatos a diferentes concentraciones de las muestras problema, que pueden ser compuestos químicos puros o en mezclas, productos formulados, diluciones porcentuales de efluentes y muestras de agua de sistemas receptores. Se requiere la preparación de al menos cinco concentraciones o diluciones, más una serie control. Estas soluciones se preparan después de un ensayo exploratorio para la definición del intervalo, siguiéndose una serie geométrica base 2. Para cada solución se debe contar con al menos tres réplicas, cada una de las cuales constará de al menos 10 neonatos.

Esta es una prueba relativamente rápida, que en un lapso de 48 horas proporciona información, a partir de la cual es posible determinar la concentración letal media (CL_{50}). La talla de los neonatos de todas las especies sugeridas es adecuada para preparar el bioensayo y hacer normalmente las evaluaciones de inmovilidad o mortalidad sin necesidad de emplear ningún equipo óptico.

La prueba es adecuada para la evaluación de los efectos tóxicos agudos (letales) de efluentes con o sin tratamiento, muestras de agua de cuerpos de agua receptores de descargas, sustancias puras y en mezclas de compo-

sición conocida o desconocida, principios activos y productos formulados comerciales. Es útil para la clasificación de la toxicidad de compuestos, en el monitoreo de la calidad del agua en ecosistemas acuáticos y en la evaluación de la eficiencia de los sistemas de tratamiento de las aguas residuales.

INFRAESTRUCTURA EN EL LABORATORIO

Los laboratorios que se dediquen a este tipo de evaluaciones toxicológicas deberán contar con cámaras bioclimáticas o cuartos con fotoperíodo y temperatura controlados. Adicionalmente, tendrán que disponer de la infraestructura mínima indispensable para realizar el cultivo controlado de microalgas y el mantenimiento de la cepa de cladóceros que empleará para las evaluaciones de toxicidad aguda, la cual se detalla en el ensayo correspondiente.

MATERIAL

Los recipientes de cultivo para los reproductores deberán ser de vidrio de borosilicato, del volumen adecuado, dependiendo del protocolo de producción que se implemente. Para las pruebas de toxicidad aguda se emplearán preferentemente recipientes de vidrio de borosilicato, los cuales deberán ser sometidos a la rutina de limpieza adecuada para garantizar su uso libre de factores que pudieran modificar la toxicidad de las muestras analizadas.

Para la realización de las evaluaciones se empleará la cristalería y equipos menores adecuados y suficientes para garantizar procedimientos seguros y repetibles, tales como propipetas, pipetas automáticas calibradas, matraces aforados de la capacidad necesaria, pesamuestras desechables, espátulas de acero inoxidable, etc.

EQUIPO

Los equipos requeridos son los básicos de cualquier laboratorio de análisis biológicos, los cuales incluyen: balanza analítica, microscopio óptico, estereomicroscopio, autoclave (de gas o eléctrica), campana de flujo laminar o área esterilizada para trabajo microbiológico, potenciómetro, oxímetro, salinómetro/conductivímetro, cámara bioclimática (con control de temperatura, iluminación y control de fotoperíodo y espectrofotómetro).

REACTIVOS

Se deberá contar con los reactivos necesarios para la preparación del agua de dilución y de los medios de cultivo, tanto para los cladóceros como las microalgas. Los compuestos deberán ser grado analítico y libres de impurezas, tales como metales pesados. Se sugieren las marcas J. T. Baker[®], Aldrich[®] y Sigma Chemical[®].

En todos los casos se recomienda la preparación de soluciones concentradas (patrón o "stock") a partir de las cuales se puedan elaborar los medios de cultivo y el agua de dilución. Se deberá tener un control sobre los procedimientos para la preparación de soluciones patrón y medios de cultivo y poner especial atención sobre la conservación de sustancias que pudieran degradarse o contaminarse (como las soluciones de vitaminas); en todos los casos se deberán aplicar las condiciones de mantenimiento que eviten la modificación de la concentración o alteración química de las soluciones.

ORGANISMOS DE PRUEBA

De las especies que se pueden emplear para este bioensayo, *D. magna* es un organismo que no se distribuye naturalmente en el territorio nacional, pues aunque su distribución geográfica abarca el Continente Americano, sólo se le puede encontrar en cuerpos dulceacuícolas templados de los Estados Unidos de Norteamérica y Canadá. Las otras especies de cladóceros aquí mencionadas, son de amplia distribución, incluyendo múltiples localidades de México. Los organismos que se utilicen para llevar a cabo esta evaluación deben ser obtenidos de laboratorios que cuenten con cepas controladas. Se pueden obtener mediante compra en distribuidores de material científico que garanticen la identidad específica y calidad del material biológico. Es posible obtenerlos mediante colecta, aunque en este caso se deberá desarrollar el cultivo hasta una F2, además de conseguir un certificado de identidad expedido por alguna institución acreditada, en la que se deberá depositar una muestra fijada o viva para que le sea asignada una clave de catálogo o colección. No es permitida la utilización de organismos comprados como alimento en tiendas de mascotas, pues no se conoce la procedencia ni historia química, y la calidad del material con frecuencia no garantiza una adecuada repetibilidad, lo que hace poco confiables los resultados obtenidos.

Los laboratorios que realicen este tipo de bioensayos deberán contar con la cepa adecuada, como ya se mencionó anteriormente, y lograr su estabilización

siguiendo las instrucciones específicas de mantenimiento que se detallan como parte de este documento. Los lotes de reproductores deberán ser monitoreados continuamente, poniendo especial énfasis en cualquier indicio que denote la reproducción sexual (detección de machos, epípsios o hembras epípsias), pues esto es reflejo de un cultivo inadecuado en el que se están presentando condiciones ambientales adversas que pueden afectar la calidad de respuesta de los organismos de prueba.

Todos los cultivos de reproductores deben ser iniciados con hembras partenogenéticas de edad conocida, con alimentación controlada. Los neonatos para los bioensayos deberán proceder de lotes estabilizados y con control en la alimentación y en el mantenimiento, para los cuales se establecerá una duración máxima (dependiendo de la especie, 25 días para las especies pequeñas y 40 días para los cladóceros de mayor talla).

CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS

El cultivo se divide en dos fases: el mantenimiento de la cepa y el lote de reproductores para la obtención de organismos de prueba. En el primer caso se emplearán los recipientes que resulten adecuados para la conservación de la cepa, pudiendo ser acuarios de volumen pequeño (menor a 5 L) o vasos de precipitados de 1, 2 ó 3 L, preferentemente de vidrio de borosilicato o de plástico Nalgene®. En todos los casos, como medio de cultivo se deberá utilizar agua reconstituida de la dureza adecuada (dependiendo de la especie), preparada según se detalla en el ensayo correspondiente. La temperatura para ambos tipos de cultivo deberá ser de 20 ± 2 °C, y el fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad); la iluminación será la ambiental de laboratorio (aproximadamente 1,000 luxes). Como alimento se emplearán microalgas clorofíceas, preferentemente las especies *Ankistrodesmus falcatus*, *Pseudokirchneriella subcapitata* (antes *Selenastrum capricornutum* o *Raphidocelis subcapitata*) o *Scenedesmus spp*; en cualquier caso se deberá especificar cuál fue la especie empleada. Los detalles adicionales para el cultivo del alimento, así como su separación (“cosecha”), conservación, viabilidad, etc., se detallan más adelante. Debido a la diferencia en dimensiones de las especies de microalgas susceptibles de ser empleadas como alimento, se sugiere suministrar como concentración alimentaria adecuada 8 mg/L en peso seco.

La calidad de respuesta de los neonatos se deberá evaluar periódicamente mediante bioensayos con compuestos tóxicos de referencia (controles positivos), preferentemente con cromo hexavalente. Invariablemente se deberá

contar con cartas control que permitan realizar el seguimiento del lote de reproductores, así como del cultivo “stock”. Los valores de control serán los establecidos en las publicaciones científicas existentes.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

PREPARACIÓN DEL MATERIAL ANTES DE LA PRUEBA

Se deberán seguir los lineamientos mínimos básicos para garantizar la calidad de la respuesta de los organismos de prueba, evitando cualquier posible interacción o alteración por probables residuos de compuestos tóxicos remanentes en el material (cristalería) empleado para la realización de los bioensayos.

Es fundamental controlar y estandarizar las condiciones de mantenimiento de la cepa y el desarrollo del cultivo de los reproductores para la producción de organismos de prueba (neonatos) de las especies de cladóceros propuestas para la evaluación de la toxicidad aguda en ambientes dulceacuícolas.

En todos los casos se deberán aplicar las siguientes condiciones:

- Alimentos suministrados. A base de microalgas clorofíceas de las especies *A. falcatus*, *P. subcapitata* o *Scenedesmus* sp.
- Procedimientos para la preparación/obtención del alimento. Estas microalgas se obtendrán mediante cultivo en condiciones controladas de laboratorio. Se deberá mencionar la cepa utilizada (número de catálogo y origen) y detallar cualquier modificación en el proceso de cultivo.
- Medio de cultivo para microalgas. Se sugiere el Basal de Bold (tabla 6.2 del ensayo con microalgas clorofíceas), aunque es posible utilizar otros; si este último fuera el caso, se deberá incluir la formulación empleada y explicar las razones para utilizarlo. Invariablemente el medio de cultivo deberá ser esterilizado en autoclave (15 libras/pulgada² por 15 minutos) y todo el procedimiento del cultivo de microalgas se hará en condiciones asépticas.
- Recipientes de cultivo para microalgas. Se sugiere que los cultivos se realicen en matraces de 2,000 mL, aunque esto dependerá de los requerimientos de cada laboratorio.
- Condiciones de iluminación para el cultivo de microalgas. Los cultivos de microalgas deberán ser incubados con iluminación artificial continua y controlada de 4,500 luxes, proporcionada con lámparas fluorescentes “luz de día”.

- Temperatura para el cultivo de microalgas. Deberá ubicarse en el intervalo de 25 a 28 °C.
- Aireación durante el cultivo de microalgas. Se deberá suministrar aire comprimido como fuente de carbono y para evitar la sedimentación. El medio de cultivo sugerido carece de bicarbonato de sodio, que funcionaría como el aporte de carbono para la fotosíntesis, por lo que es absolutamente indispensable la aireación. En este caso se deberá tener cuidado en que el aire se encuentre filtrado para evitar introducir polvo o contaminantes biológicos al medio de cultivo, siendo preferentemente el empleo de compresoras libres de aceite.
- Inóculos de microalgas. Los inóculos deberán ser renovados periódicamente y deberán partir de muestras mantenidas en medio de cultivo solidificado con agar bacteriológico al 1.5%. Su manejo, al igual que en la fase de producción, se realizará en condiciones asépticas. No se requiere de cepas axénicas, aunque si es necesario evitar una carga bacteriana excesiva que pudiera influir sobre la calidad del alimento para los cladóceros. Para la fase de producción de las microalgas (producción de alimento para las especies de cladóceros consumidoras), se utilizarán inóculos líquidos en proporción porcentual del 10 al 20% del volumen de medio de cultivo.
- Tiempos de cosecha de los cultivos de microalgas. Los cultivos serán “cosechados” en la fase de crecimiento exponencial, la cual se presenta en un lapso de 7 a 10 días, cuando se parte de un inóculo del 5%. Es conveniente que, al menos en una fase preliminar, sea determinada la curva de crecimiento poblacional algal, mediante lecturas diarias de la densidad algal, lo cual se puede realizar mediante determinaciones indirectas de la biomasa, como es a través del incremento en la densidad óptica, determinada en un espectrofotómetro a 600-670 nm de longitud de onda. En una gráfica de incremento poblacional es posible identificar los tiempos de crecimiento exponencial y cuando la población se estabiliza, información que permitiría contar con datos sustentados para establecer estos tiempos de “cosecha”.
- Forma de cosecha de las microalgas. La biomasa será separada por centrifugación en centrífuga clínica o por filtración con membranas de nitrocelulosa de 2 µm de apertura de poro. También se puede lograr una separación adecuada por sedimentación, preferentemente en condiciones de oscuridad y a baja temperatura (refrigeración a 4-5 °C).
- Forma y tiempo de conservación de las microalgas. La biomasa “cosechada” se debe conservar en refrigeración y utilizarse por un período no mayor a

10 días después de haber sido separada (“cosechada”). Para instrucciones más amplias, se sugiere revisar Andersen (2005).

- Mantenimiento de cultivos “stock” o de reserva de cladóceros. Estos cultivos tienen como propósito la conservación de la cepa y funcionan como reservorio para la separación de juveniles o adultos a partir de los cuales se pueden implementar los cultivos para la obtención de organismos de prueba.
- Medio de cultivo para cladóceros. Se empleará agua semidura reconstituida (tabla 7.1)
- Recipientes de cultivo (tipo, volumen) para cladóceros. Se utilizarán de manera principal cristalizadores, vasos de precipitados o pequeños acuarios de entre uno y 5 L, según las necesidades y de acuerdo a la infraestructura disponible. Es conveniente que los recipientes sean preferentemente de vidrio de borosilicato.
- Alimento y cantidad. Como son cultivos de reserva, se alimentan al menos una vez por semana (preferentemente dos veces), con la suficiente cantidad de alimento.
- Condiciones generales de mantenimiento. Se recambiará aproximadamente el 50% del medio de cultivo cada 10 días. Se deberá vigilar que la densidad poblacional no se incremente excesivamente, pues esto propiciaría la aparición de machos y la reproducción sexual; para evitar esta situación, periódicamente se realizará una “cosecha” de cladóceros. Tampoco es deseable la acumulación de metabolitos ni la proliferación de organismos saprobios en estos cultivos, por lo que, cuando los tiempos de mantenimiento y recambio se extiendan a los tiempos máximos, se deberán hacer determinaciones de la concentración de amonio ($N-NH_4$), cuya concentración nunca deberá exceder de 1.5 mg/L.
- Producción de neonatos. Este sistema de cultivo es el que permite la producción controlada de los neonatos (las crías con edad menor a 24 horas) que se emplearán para las pruebas de toxicidad, por lo que es importante que se implemente una rutina detallada que garantice la cantidad adecuada para satisfacer los requerimientos en los tiempos programados, así como la calidad de la respuesta de estos organismos de prueba.
- Medio de cultivo para neonatos. Se empleará también agua semidura reconstituida.
- Recipientes de cultivo (tipo, volumen) para neonatos. Preferentemente vasos de precipitados de vidrio, de 150 mL de volumen total.
- Volumen de cultivo para neonatos. Se recomienda de 80 a 100 mL como volumen de cultivo.

- Alimento y densidad. Preferentemente se empleará *A. falcatus* en concentración de 400,000 células/ mL. Si se utilizan otras especies de las aquí sugeridas, la concentración de alimento será la equivalente a 8-10 mg/L en peso seco.
- Densidad de reproductores. En los recipientes de cultivo sugeridos se dispondrán individualmente a los organismos con que se iniciarán estos sistemas de producción de neonatos.
- Periodicidad de recambio de alimento y medio de cultivo. El medio de cultivo y el alimento deberán ser restituidos completamente tres veces por semana, en días alternos (lunes, miércoles y viernes).
- Temperatura. Deberá mantenerse controlada en un valor de 20-22 °C.
- Intensidad luminosa y fotoperíodo. La iluminación deberá ser la ambiental de laboratorio, proporcionada por lámparas fluorescentes “luz de día”. Si se prefiere iluminación natural, ésta nunca deberá ser directa sobre los cultivos. El fotoperíodo será de 16:8 (luz: oscuridad).
- Duración (vigencia) de los lotes de reproductores. Estos lotes se iniciarán a partir de neonatos obtenidos de reproductores previamente separados de los lotes de mantenimiento. A partir de su implementación, la duración máxima en condiciones de producción efectiva de neonatos será de 35 días para *D. exilis* y para *D. pulex*. En el caso de *C. dubia*, la duración será de 25 días y para *M. macrocopa* de 20 días. Después de tales plazos de vigencia, el lote deberá ser desechado. Es necesario que se establezca un programa desfasado de inicio y finalización de los lotes a fin de que en todo momento se pueda contar con organismos de prueba de las características deseables.
- Frecuencia y forma de separación (manejo) de la progenie. La progenie deberá ser separada todos los días en el período hábil (lunes a viernes). Esto evita efectos de sobrepoblación en los recipientes de producción y permite que se puedan iniciar pruebas toxicológicas todos los días en ese período hábil.
- Con las condiciones antes descritas, es posible garantizar la calidad del material biológico y reducir significativamente la variabilidad en los resultados. De cualquier forma, con una periodicidad no menor a 3 meses, se deberán realizar ensayos de sensibilidad con el compuesto tóxico de referencia cromo hexavalente (a partir de dicromato de potasio). Detalles adicionales sobre el mantenimiento de cultivos de reserva y de la implementación de cultivos para la producción de organismos de prueba pueden encontrarse en el listado bibliográfico que se anexa a este ensayo.

Tabla 7.1. Composición del agua semidura reconstituida utilizada como medio de cultivo y para la obtención de neonatos de cladóceros, así como agua de dilución para bioensayos de toxicidad aguda

Tipo de agua	Reactivos grado analítico (mg/L) en agua destilada o deionizada					Características finales	
	NaHCO ₃	CaSO ₄ ·2H ₂ O	MgSO ₄	KCl	pHa	Dureza ^b	Alcalinidad
Semidura	96	60	60	4	7.4-7.8	80-100	60-70

^a Valor de equilibrio después de 24 horas de aireación

^b expresado como mg/L de CaCO₃

Tabla 7.2. Condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad aguda con cladóceros

Tipo de prueba	Estática, sin renovación de la solución de prueba
Duración	48 horas (prueba definitiva)
Intensidad luminosa	600-1,000 luxes (ambiental de laboratorio)
Fotoperíodo	16 hora luz : 8 horas oscuridad
Temperatura	20 ± 1 °C
Aireación	No
Suministro de alimento	No
Volumen de los recipientes de prueba	100 mL
Volumen de prueba	80 mL
Edad de los organismos	Neonatos (edad < 24 horas)
Concentraciones o diluciones ensayadas	Mínimo 5, más testigo
Replicas por concentración	Mínimo 3
Organismos por réplica	10
Agua de dilución	Reconstituida semidura (80-100 mg/L como CaCO ₃)
Efecto medido	Mortalidad o inmovilidad a 48 horas, con observaciones a 24 horas
Criterio de aceptación de la prueba	Inmovilidad o mortalidad en los testigos menor o máximo de 10 % al término de la prueba

DESARROLLO DE LA PRUEBA

Este bioensayo es de tipo estático, sin renovación de la solución de prueba, con una duración total de 48 horas, aunque es recomendable realizar observaciones preliminares a las 3, 6 y 24 horas de inicio de la prueba. Se deberán evaluar la concentración de oxígeno disuelto, el pH, la conductividad y salinidad al

inicio y término de la prueba definitiva. Como agua de dilución se empleará agua reconstituida de tipo semidura (80 a 100 mg/L como CaCO_3) (USEPA, 2002), ya que con excepción de *D. magna*, que prospera mejor en agua dura, las otras tres especies recomendadas se desarrollan satisfactoriamente en este tipo de agua. La formulación de esta agua de dilución se muestra en la tabla 7.1. En el caso de sustancias de baja hidrosolubilidad, se podrán dispersar en el agua de dilución mediante sonicación, o bien se utilizarán disolventes de baja toxicidad, como la acetona, etanol, metanol o dimetil sulfóxido. Como ya fue mencionado, la evaluación toxicológica se realizará con los neonatos de la especie seleccionada, los cuales serán obtenidos siguiendo el procedimiento aquí propuesto. Durante los bioensayos no se deberá suministrar alimento a los organismos de prueba. El resumen de las condiciones de ensayo se muestra en la tabla 7.2.

La evaluación de la toxicidad aguda de un efluente, muestra de cuerpo acuático receptor de descargas contaminantes o producto químico (simple o formulado), sigue la siguiente secuencia de análisis toxicológicos:

- Prueba de clasificación. Evaluación preliminar que permite determinar si la muestra analizada genera toxicidad aguda en los organismos de prueba, sobre la base de que la intoxicación aguda es una respuesta que se expresa en tiempos de exposición cortos (48 horas o menos, para invertebrados menores), y que conduce a la muerte o inmovilización de los individuos. De acuerdo a esta prueba, en el caso de productos químicos se puede concluir *a priori* si el o los presuntos agentes tóxicos presentes en la muestra problema producen o no producen efectos tóxicos agudos, ya que varios protocolos internacionales consideran un límite de prueba máximo de 100 mg/L para determinar que un producto o sustancia produce efectos tóxicos agudos.
- Prueba para determinación de intervalo. Si la muestra ensayada genera respuesta de intoxicación aguda, esto es, si el análisis anterior resulta positivo (con más del 10% de mortalidad en la muestra de agua o efluente sin diluir a 24 horas, o en la exposición a 100 mg/L al producto puro o formulado), entonces esta parte del estudio tiene como propósito definir el intervalo de concentraciones o diluciones entre los que se puede ubicar la CL_{50} , que se define como la concentración (o dilución, en el caso de efluentes y muestras de agua) que produce el 50 % de mortalidad en los organismos de prueba, en el período de observación establecido (48 horas para neonatos de cladóceros).

- Prueba definitiva. De acuerdo al análisis anterior, este bioensayo permite establecer el cuadro de mortalidades a 48 horas de observación, que conduce al cálculo de la CL_{50} y su correspondiente intervalo de confianza.

EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Con los valores de inmovilidad o mortalidad a 48 horas se deberá construir la tabla resumen de mortalidades, con los valores acumulados registrados en todos los tiempos en que se hicieron observaciones o al menos para 24 y 48 horas, a partir de la cual se hará la estimación de la CL_{50} . Existen diversos programas de cómputo que permiten hacer este cálculo de manera sencilla, incluyendo la determinación del intervalo de confianza. El método para hacer esta determinación puede ser cualquiera de los siguientes: Probit, Logit, Binomial, Semilog y Ángulos Móviles Promedio. En cualquier caso se requiere proporcionar la referencia del método y del software empleado. Tratándose de sustancias puras o en mezclas, principios activos y productos formulados, se deberá clasificar el grado de toxicidad de acuerdo al valor de mortalidad que se produce y según las tablas disponibles para este propósito (United Nations, 2005.)

Este método de prueba es semejante a los protocolos de la Agencia para la Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (USEPA, 2002), y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, 2004).

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, R. A. (ed.). 2005. *Algal culturing techniques*. Phycological Society of America, Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Cañizares-Villanueva, R. O., F. Martínez-Jerónimo y F. Espinosa-Chávez. 2000. Acute Toxicity to *Daphnia magna* of effluents containing Cd, Zn, and a mixture Cd-Zn, after metal removal by *Chlorella vulgaris*. *Environmental Toxicology* 15: 160-164.
- Environment Canada. 1990. *Biological test method: reference method for determining acute lethality of effluents to Daphnia magna*. Reference Method EPS 1/RM/14, Ottawa, Ontario, Canada.
- Martínez-Jerónimo, F. 2003. Effect of photoperiod and temperature on the somatic growth of *Daphnia magna* (Branchiopoda: Anomopoda). *Scientia Naturae* 6: 15-22.

- Martínez-Jerónimo, F., F. Espinosa-Chávez y R. Villaseñor-Córdova. 2000. Effect of culture volume and adult density on the neonate production of *Daphnia magna*, as test organisms for aquatic toxicity tests. *Environmental Toxicology* 15: 155-159.
- Martínez-Jerónimo, F., y A. Gutierrez Valdivia. 1991. Fecundity, reproduction, and growth of *Moina macrocopa* fed different algae. *Hydrobiologia* 222: 49-55.
- Martínez-Jerónimo, F., R. Villaseñor, G. Ríos y F. Espinosa. 1994. Effect of food type and concentration on the survival, longevity, and reproduction of *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 287: 207-214.
- Martínez-Jerónimo, F., R. Villaseñor, F. Espinosa y G. Ríos. 1997. Metodología para la producción de neonatos de *Daphnia magna* (Anomopoda: Daphnidae), como organismo de prueba en toxicología acuática. *Zoología Informa* 36-37: 59-81.
- Muñoz-Mejía, G., F. Espinosa-Chávez y F. Martínez-Jerónimo. Impact of algae and concentrations on reproduction and survival of cladocerans. Manuscrito.
- Organization for the Economical Cooperation and Development (OECD). 2004. *Daphnia sp. acute immobilization test*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 202.
- Rodríguez-Estrada, J., R. Villaseñor-Córdova y F. Martínez-Jerónimo. 2003. Efecto de la temperatura y tipo de alimento en el cultivo de *Moina micrura* (Kurz, 1874) (Anomopoda: Moinidae) en condiciones de laboratorio. *Hidrobiológica* 13: 239-245.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1995. Análisis de agua-Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna* Straus (Crustacea-Cladocera. NMX-AA-087-1995-SCFI.
- United Nations. 2005. *Globally Harmonized System Of Classification and Labeling of Chemicals (GHS)*. First Revised Edition, ST/SG/AC.10/30/Rev.1. Nueva York y Ginebra.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. *Aquatic invertebrate acute toxicity test, freshwater Daphnids*. Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.1010. EPA 712-C-96-114.
- . 2002. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 5th Edition. U.S. EPA Office of Water, Washington, D.C. EPA-821-R-02-012.

ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON LARVAS Y JUVENILES DE LOS PECES *BRACHYDANIO RERIO* Y *POECILIA RETICULATA*

Amplia experiencia

*Felipe Fernando Martínez-Jerónimo
y Félix Espinosa Chávez*

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: AE

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

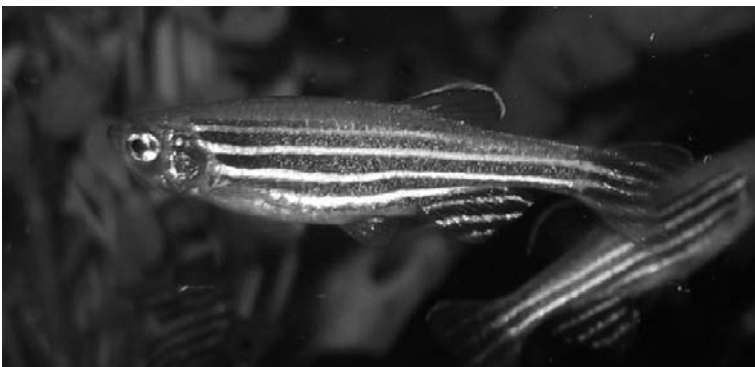
La prueba se basa en la determinación de efectos de intoxicación aguda (inmovilización o mortalidad), observados en un tiempo de exposición de 96 horas, en larvas de *Brachydanio rerio* (pez cebra) (figura 8.1) o en juveniles de *Poecilia reticulata* (“guppy”) (figura 8.2), ambas especies de peces dulceacuícolas. Durante este ensayo se expone al organismo seleccionado a diferentes concentraciones de muestras problema que pueden ser compuestos (puros o combinados) o productos formulados, que deben ser solubilizados y estar biodisponibles en el agua de dilución. Este ensayo también es utilizado para determinar efectos tóxicos agudos ocasionados por efluentes con o sin tratamiento, así como muestras de aguas de sistemas acuáticos diversos, que pueden recibir descargas de

aguas contaminadas, así como aguas subterráneas que reciban influencias contaminantes (lixiviados).

Figura 8.1. Organismos adultos de *Poecilia reticulata*. A) macho y B) hembra



Figura 8.2. Organismo adulto de *Brachidanio rerio*



Para realizar este bioensayo se debe garantizar la calidad del material de prueba, teniendo control sobre el linaje y la forma de producción de los organismos de ensayo, siendo importante indicar el origen del lote utilizado.

La relevancia del empleo de peces como organismos de prueba radica en su ubicación y función en los sistemas acuáticos, ya que además de ocupar diferentes posiciones tróficas en los ecosistemas, al tratarse de organismos vertebrados, son normalmente considerados como buenos representantes de organismos de mayor complejidad y por lo tanto los efectos tóxicos observados en ellos son más fáciles de comprender e interpretar, pues además muchas especies de peces representan pesquerías de importancia comercial o son sujeto de cultivo para la producción de alimentos o como especies ornamentales.

En el caso de *B. rerio*, la prueba se realiza con las larvas recién eclosionadas del huevo con edad menor a 24 horas, que cuentan con reserva de vitelo. En el caso de los juveniles de *P. reticulata*, los organismos de prueba son los juveniles recién avivados de la hembra vivípara (edad menor a 24 horas).

El bioensayo consiste en exponer a los organismos de prueba a diferentes concentraciones de los compuestos problema o diluciones porcentuales de efluentes y muestras de agua problema. Se requiere la preparación de al menos cinco concentraciones o diluciones, más una serie control. Estas soluciones se preparan después de un ensayo exploratorio para la determinación del intervalo, siguiéndose preferentemente una serie geométrica base 2. Para cada solución se debe contar con al menos tres réplicas, cada una de las cuales constará de 10 individuos de las características antes descritas.

Se evalúa la mortalidad cada 24 horas y hasta el término del bioensayo (96 horas), haciendo anotaciones sobre el número de organismos afectados (que se observan con movilidad o desplazamientos anormales). Los datos de mortalidad acumulada al término de la prueba permiten construir la gráfica concentración-efecto, que es la base para la determinación de la Concentración Letal Media (CL_{50}).

La prueba es adecuada para la evaluación de los efectos tóxicos agudos (letales) de efluentes con o sin tratamiento, muestras de agua de cuerpos de agua receptores de descargas, compuestos puros y en mezclas de composición conocida o desconocida, principios activos y productos formulados comerciales. Es además adecuada para la clasificación de la toxicidad de compuestos, en el monitoreo de ecosistemas acuáticos y en la evaluación de la eficiencia de los sistemas de tratamiento de las aguas residuales.

INFRAESTRUCTURA EN EL LABORATORIO

Los laboratorios que se dediquen a este tipo de evaluaciones toxicológicas deberán contar con cámaras bioclimáticas o cuartos con fotoperíodo y tempera-

tura controlados. Adicionalmente, tendrán que disponer de la infraestructura suficiente para realizar el cultivo controlado de alimento y para propiciar las condiciones de mantenimiento y reproducción que se detallan en el apartado correspondiente de este ensayo.

MATERIAL

Los recipientes para el cultivo y mantenimiento de los reproductores deberán ser preferentemente de vidrio de borosilicato, del volumen adecuado para garantizar no se rebase la carga máxima que puede tolerar el sistema en función de la cantidad de oxígeno disuelto (1 g/L de biomasa en peso fresco). Para las pruebas de toxicidad aguda se emplearán preferentemente recipientes de vidrio de borosilicato de volumen no menor a 250 mL (para *B. rerio*) o 500 mL (para *P. reticulata*), los cuales deberán ser sometidos a la rutina de lavado adecuada para garantizar su uso libre de compuestos que pudieran modificar la toxicidad de los productos o las muestras problema.

Para la preparación de los bioensayos se empleará la cristalería y materiales adecuados y suficientes para garantizar procedimientos seguros y repetibles, tales como pipetas automáticas calibradas de diferentes volúmenes, matraces aforados de la capacidad necesaria, pesamuestras desechables, espátulas de acero inoxidable, etc.

EQUIPO

Los equipos requeridos son los básicos de cualquier laboratorio de análisis biológicos y de manera general incluye el siguiente equipamiento: balanza analítica, estereomicroscopio, potenciómetro, oxímetro, salinómetro o conductivímetro, cámara bioclimática (con control de temperatura, iluminación y de fotoperíodo), espectrofotómetro, compresor de aire y bombas sumergibles.

REACTIVOS

Se deberá contar con los reactivos necesarios para la preparación del agua de dilución y de los medios de cultivo, tanto para los peces como para la producción de alimento para los reproductores. Los reactivos deberán ser grado analítico y libres de trazas de metales pesados. Se sugieren las marcas J. T. Baker®, Aldrich® o Sigma Chemical®.

En todos los casos se recomienda la preparación de soluciones concentradas (“stock”), a partir de las cuales se pueden preparar de manera más sencilla los medios de cultivo y el agua de dilución. Se deberá tener un control sobre los procedimientos para la preparación de soluciones concentradas y medios de cultivo, y poner especial atención en la conservación de los compuestos que pudieran degradarse o contaminarse; en todos los casos se deberán aplicar las condiciones de mantenimiento que eviten la modificación de la concentración o alteración química de las soluciones.

ORGANISMOS DE PRUEBAS

Los organismos que se utilicen como organismos de prueba para este ensayo deben ser obtenidos a partir de cultivos controlados de laboratorio; también se pueden obtener mediante adquisición con distribuidores de material biológico que garanticen la identidad específica y la calidad del material biológico, aunque no es lo más recomendado. Lo que no es permitido y deberá evitarse; por lo tanto, es la utilización de organismos comprados en tiendas de mascotas, pues en este caso no se conoce la procedencia, linaje, ni la historia química, que son factores que pueden modificar significativamente la respuesta biológica durante su exposición a la muestra problema.

Los laboratorios que realicen este tipo de bioensayos deberán contar con la cepa adecuada, como ya se mencionó anteriormente, y lograr su estabilización siguiendo las instrucciones específicas de mantenimiento que se detallan como parte de este ensayo. Los lotes de reproductores deberán ser monitoreados continuamente, poniendo especial énfasis en cualquier indicio que denote alteración en el desarrollo normal de la especie, pues esto es síntoma de un cultivo inadecuado en el que se manifiestan factores ambientales y de manejo del sistema de producción que pueden afectar la calidad del material biológico y por lo tanto su respuesta durante la realización del bioensayo.

Todos los cultivos deben ser iniciados con hembras y machos sanos, con alimentación controlada. Los organismos de prueba para los bioensayos deberán proceder de lotes estabilizados y controlados, para los cuales se establecerá una vigencia máxima del lote para la producción de crías (dependiendo de la especie elegida).

CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS DE PRUEBA

La obtención de los organismos de prueba depende del lote de reproductores. En particular, *B. rerio* es una especie de relativo fácil mantenimiento y propagación en condiciones de cautiverio, aunque se deben propiciar condiciones especiales a los reproductores para que se pueda consumir exitosamente el proceso reproductivo, debiendo considerar que este pez es ovíparo, con fecundación externa y que el tamaño del huevo es relativamente pequeño. Para un adecuado cultivo es indispensable contar con el abasto suficiente y oportuno de alimento, que debe ser vivo y obtenido en condiciones controladas, al menos para las primeras fases de desarrollo larvario (después de que se ha absorbido el saco vitelino) y hasta que los organismos tienen la capacidad de ingerir alimento balanceado en hojuelas. Para lo anterior, es deseable implementar sendos cultivos de protozoarios (*Paramecium* sp.) y de *Ceriodaphnia dubia*; ésta última podría sustituirse con nauplios de *Artemia franciscana* obtenidos a partir de la eclosión de quistes.

Para el cultivo de reproductores se emplearán los recipientes que resulten adecuados para el desarrollo de los adultos, preferentemente acuarios de vidrio de 20 L de volumen total. La densidad de organismos por recipiente nunca deberá rebasar el máximo recomendado de 1 g/L de biomasa (peso húmedo). Como medio de cultivo se deberá utilizar agua reconstituida semidura, preparada según se detalla más adelante. La temperatura para el cultivo debe ser entre 25 y 27 °C, y el fotoperíodo de 16:8 (horas luz: horas oscuridad); la iluminación será la ambiental de laboratorio (1,000 luxes). Los reproductores se pueden alimentar exclusivamente con alimento balanceado en hojuelas, pero se obtienen mejores resultados cuando se complementa con alimento vivo producido en laboratorio (nunca deberá suministrarse alimento vivo comprado en tiendas de mascotas o en acuarios, tales como “pulgas de agua” o el oligoqueto acuático *Tubifex*). Los cultivos de alimento vivo (protozoarios y *C. dubia*) deberán realizarse siguiendo recomendaciones que pueden encontrarse en múltiples manuales y en publicaciones científicas, algunas de las cuales se incluyen en las referencias bibliográficas para este ensayo.

Se deberá contar con bitácoras de control que permitan realizar el seguimiento del lote de reproductores, en las que se incluya la edad de los reproductores, el régimen de alimentación (frecuencia, cantidad), la mortalidad (si ocurriera), así como algunas características básicas de la calidad del agua (temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto y concentración de

amonio), a fin de identificar posibles causas de variación o de error durante las pruebas.

En el caso de *P. reticulata*, su condición de pez vivíparo, que además presenta un marcado dimorfismo sexual, facilita considerablemente el mantenimiento de los reproductores y la producción de crías como organismos de prueba. Con esta especie es factible tener buenos resultados alimentando exclusivamente con alimento balanceado en hojuelas, aunque un complemento periódico de alimento vivo (en este caso el cladócero *Moina macrocopa*), contribuye a tener mejores resultados reproductivos. Los recipientes para el cultivo y los procedimientos que se deberán aplicar son semejantes a los sugeridos para *B. rerio*, con excepción de lo relativo a la alimentación, como ya fue indicado.

De manera sintética a continuación se presentan las condiciones de mantenimiento y de cultivo de los reproductores para la producción de organismos de prueba (larvas) de *B. rerio* y *P. reticulata* (juveniles):

- Alimentos suministrados. Para los adultos, alimento balanceado en hojuelas, complementado, durante el proceso reproductivo, con cladóceros obtenidos mediante cultivo. Para la alimentación de las larvas de *B. rerio* se utilizarán protozoarios grandes, como *Paramecium* sp., suministrados *ad libitum* a partir del día 5 y hasta los 12 días de edad; posteriormente se suministran rotíferos o cladóceros pequeños (*C. dubia*). Desde las 6-8 semanas, los juveniles pueden consumir exclusivamente hojuelas de alimento balanceado. Como fue indicado antes, para *P. reticulata* se ahorra el mantenimiento de la fase larvaria, pues como es una especie vivípara, de las hembras avivan las crías en la fase de juveniles, que son de talla mayor y pueden consumir directamente alimento balanceado en hojuelas (molido en pequeñas fracciones).
- Procedimientos para la preparación/obtención del alimento. Aunque no se pueden sugerir marcas, existen alimentos balanceados en hojuelas de marcas reconocidas, con formulación adecuada para peces tropicales. Los cladóceros (*M. macrocopa* o *C. dubia*) se deben obtener mediante cultivos controlados de pequeña escala, empleando para su alimentación microalgas clorofíceas (también cultivadas) como *Ankistrodesmus falcatus*, *Scenedesmus* sp., *Chlorella vulgaris* o *Pseudokirchneriella subcapitata* (anteriormente conocida como *Selenastrum capricornutum*), en las concentraciones suficientes para lograr una adecuada producción de biomasa, considerando que es necesario suministrar por recipiente de cultivo no menos del 4% del peso húmedo dia-

riamente. Las microalgas sugeridas también se obtendrán mediante cultivo en condiciones controladas de laboratorio, empleando medios de cultivos sintéticos y completos.

- Obtención de los reproductores. En el caso de *B. rerio*, la generación de un lote de reproductores se logra en aproximadamente 90 días a partir de una muestra de huevos fecundados, cuando el mantenimiento se realiza en un sistema de cultivo cerrado, con recirculación del agua y con sistema de filtración biológica para evitar la acumulación de productos del metabolismo nitrogenado, como el amonio, que es de elevada toxicidad para los peces. Las condiciones de calidad del agua que se deben mantener son las que se muestran en la tabla 8.1. La incubación de los huevos se realiza en un receptáculo rectangular construido con red, aproximadamente un litro de volumen y 500 micras de luz de malla. Este sistema incubador se sumerge directamente en el agua de un contenedor del sistema de recirculación, y en su interior se colocan talos de la macrofita *Miriophyllum sp.*, como soporte para los huevos en desarrollo. Debido a que esta macrofita se emplea únicamente como superficie para la distribución de los huevos fecundados, se puede coleccionar directamente en la naturaleza (en muchos cuerpos de agua es abundante, principalmente en la zona litoral), o bien se puede adquirir en acuarios comerciales; en cualquier caso se deberá desinfectar para eliminar posibles depredadores o la presencia de saprobiontes, que afecten la viabilidad de los huevos o que alteren la calidad del agua. El método de desinfección más efectivo y menos agresivo consiste en sumergir los talos en una solución de KOH a pH 10, durante 30 minutos, después de lo cual se deben lavar con abundante agua limpia. Dentro de la red, un difusor de aire permite la correcta oxigenación e impide que los huevos se aglutinen. Bajo estas condiciones, la eclosión culmina aproximadamente a las 48-72 horas, si la temperatura es mantenida aproximadamente a 25 °C. Después de esta etapa, los alevines sobreviven sin consumir alimento hasta diez días si la temperatura es de 20 °C. A partir de los 5 días aproximadamente se puede iniciar la alimentación exógena suministrando células de *Paramecium sp.* (ración a saciedad) durante una semana, ofreciendo entonces a *C. dubia* (ración a saciedad) como dieta. La alimentación del pez cebra puede continuar hasta la etapa reproductiva con alimento balanceado en hojuelas suministrando también *ad libitum*.
- Obtención de las larvas. Una vez que se logra la diferenciación y la madurez sexual (las hembras son más grandes, más robustas y el abdomen es prominente por el crecimiento de las gónadas), se separan machos y hembras y se

colocan por parejas (proporción 1:1) en el interior de una red incubadora de 2.5 mm de luz de malla, en una densidad de 5 parejas por litro; esta operación induce la expulsión de gametos masculinos y femeninos y permite la fecundación externa, los huevos fecundados pueden atravesar la red incubadora y depositarse en el fondo del contenedor, de donde son recogidos por sifoneo. Se debe resaltar que de no separar los huevos fecundados de los progenitores, éstos los devorarían casi de inmediato. Cabe agregar que durante este proceso se debe detener la recirculación del agua, para evitar el arrastre y por lo tanto la pérdida de los huevecillos, los cuales pueden ser colectados y reunidos para ser incubados en un sistema como el descrito previamente.

En el caso de *P. reticulata*, se aplican en general las mismas condiciones antes descritas, aunque se obvia todo el proceso de colecta de huevecillos, incubación y alevinaje. El marcado dimorfismo sexual ayuda a que sea muy sencillo colocar en los contenedores de reproducción una proporción 1:1 de machos y hembras. Las hembras fecundadas, que son de mayor talla y cuyo abdomen empieza a crecer marcadamente conforme transcurre la gestación, son cuidadosamente separadas y colocadas en redes incubadoras, que tienen una malla de la abertura adecuada para permitir la salida de las crías, cuando son liberadas, reteniendo a las hembras adultas para evitar la posible depredación de los juveniles. También en este caso se recomienda que tanto el mantenimiento como la fase reproductiva sea llevada a cabo en un sistema de cultivo cerrado con recirculación del agua, manteniendo las condiciones descritas en la tabla 8.1.

Tabla 8.1. Condiciones generales de calidad de agua para el crecimiento y reproducción de *Brachidanio rerio* y *Poecilia reticulata*

Amonio*	Nitrito*	Nitrato*	pH	Temperatura	Oxígeno*	% saturación Oxígeno
<0.002	n. d.	20	7.5- 8.0	25±1 °C	>5.0	>77

* valores promedio en mg/L.

Con las condiciones antes descritas, es posible garantizar la calidad del material biológico y reducir significativamente la variabilidad en los resultados. De cualquier forma, con una periodicidad no menor a 3 meses, se deben realizar ensayos con el compuesto tóxico de referencia, cromo hexavalente (a partir de dicromato de potasio).

PROCEDIIMIENTO DE LA PRUEBA

PREPARACIÓN DEL MATERIAL ANTES DE LA PRUEBA

Se deberán seguir los lineamientos mínimos básicos para garantizar la calidad de la respuesta de los organismos de prueba, evitando cualquier posible interacción o alteración con probables residuos de compuestos tóxicos remanentes o persistentes en el material (cristalería) empleado para la realización de los bioensayos.

DESARROLLO DE LA PRUEBA

Este bioensayo es de tipo estático, sin renovación de la solución de prueba, con una duración total de 96 horas. Dependiendo del tipo de compuestos o muestras de agua problema que se estén analizando, en algunos casos podría ser necesario hacer recambio total de la solución de prueba a las 48 horas (principalmente cuando se trata de materiales volátiles, inestables, de fácil degradación o efluentes con alta demanda bioquímica de oxígeno). De cualquier forma se deberán hacer registros de mortalidad o de efectos visibles a las 1, 3, 6, 24, 48, 72 y 96 horas, anotando esta información en una bitácora diseñada para este propósito. Como parte del seguimiento del bioensayo, se deberán evaluar la concentración de oxígeno disuelto, el pH, la conductividad y la salinidad del agua, al inicio y al término de la prueba definitiva; se sugiere también registrar la concentración de amonio al inicio y término del bioensayo. Como agua de dilución se empleará agua reconstituida de tipo semidura (80 a 100 mg/L como CaCO_3) (USEPA, 2002), ya que las dos especies recomendadas se desarrollan satisfactoriamente en este tipo de agua. La forma de preparar esta agua de dilución se muestra en la tabla 8.2.

Para la determinación de la toxicidad de compuestos de baja hidrosolubilidad, éstos se podrán dispersar en el agua de dilución mediante sonicación, o bien mediante el empleo de disolventes de baja toxicidad como dimetil sulfoxido, etanol o acetona. Como ya fue mencionado, la evaluación toxicológica se realizará con las larvas o juveniles de la especie seleccionada, que serán obtenidos siguiendo las instrucciones para la producción que se detallan en el apartado correspondiente. En ningún caso se deberá suministrar alimento a los organismos de prueba durante todo el bioensayo. El resumen de las condiciones de prueba se muestra en la tabla 8.3.

Tabla 8.2. Composición del agua semidura reconstituida utilizada como medio de mantenimiento para reproductores y de producción de crías de *Brachydanio rerio* y *Poecilia reticulata*, para el cultivo de cladóceros (alimento vivo), así como agua de dilución para bioensayos de toxicidad aguda

Tipo de agua	Reactivos grado analítico (mg/L) en agua destilada o deionizada				Características finales		
	NaHCO ₃	CaSO ₄ ·2H ₂ O	MgSO ₄	KCl	pH ^a	Dureza ^b	Alcalinidad
Semidura	96	60	60	4	7.4-7.8	80-100	60-70

^a Valor de equilibrio después de 24 horas de aireación.

^b Expresado como mg/L de CaCO₃.

Tabla 8.3. Condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad aguda con larvas y juveniles de *Brachydanio rerio* y *Poecilia reticulata*

Tipo de prueba	Estática, sin renovación de la solución de prueba o con renovación total a las 48 horas
Duración	96 horas (prueba definitiva)
Intensidad luminosa	600-1,000 luxes (ambiental de laboratorio)
Fotoperíodo	16 horas luz :8 horas oscuridad
Temperatura	25 ± 1 °C
Aireación	No (a menos que la concentración de oxígeno disuelto sea menor de 2.5 mg/L)
Suministro de alimento	No
Volumen de los recipientes de prueba	250 mL
Volumen de prueba	150 mL
Edad de los organismos	Larvas (edad < 24 horas) para <i>B. rerio</i> , o juveniles de <i>P. reticulata</i> recién avivados (edad < 24 horas)
Concentraciones o diluciones ensayadas	Mínimo 5, más testigo
Replicas por concentración	Mínimo 3
Organismos por réplica	10
Agua de dilución	Reconstituída semidura (80-100 mg/L como CaCO ₃)
Efecto medido	Mortalidad o inmovilidad a 96 horas, con observaciones a 24, 48 y 72 horas.
Criterio de aceptación de la prueba	Inmovilidad o mortalidad en los testigos menor o máximo del 10 % a 96 horas

EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Con los valores de mortalidad o inmovilidad a 96 horas de deberá construir la tabla de mortalidades acumuladas a todos los tiempos en que se hayan hecho determinaciones; con los datos de 96 horas se hará la estimación de la CL_{50} . Existen diversos programas de cómputo que permiten hacer este cálculo de manera sencilla, incluyendo la determinación del intervalo de confianza. El método para obtener este valor puede ser cualquiera de los siguientes: Probit, Logit, Binomial, Semilog y Ángulos Móviles Promedio. En cualquier caso se requiere proporcionar la referencia del método y del software empleado. Tratándose de compuestos puros o en mezclas, principios activos y productos formulados, se deberá clasificar el grado de toxicidad según el valor de la CL_{50} y de acuerdo a las tablas disponibles para este propósito (United Nations, 2005).

Este método de prueba es semejante a los protocolos de la Agencia para la Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (USEPA, 2002) y de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, 1992).

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, R. A. (ed.). 2005. *Algal culturing techniques*. Phycological Society of America, Elsevier Academic Press, Amsterdam. 578 pp.
- Martínez-Jerónimo, F. y A. Gutierrez Valdivia. 1991. Fecundity, reproduction, and growth of *Moina macrocopa* fed different algae. *Hydrobiologia* 222: 49-55
- Muñoz-Mejía, G., F. Espinosa-Chávez y F. Martínez-Jerónimo. Impact of algae and concentrations on reproduction and survival of cladocerans. Manuscrito.
- Martínez-Jerónimo, F., R. Villaseñor, G. Ríos y F. Espinosa. 1994. Effect of food type and concentration on the survival, longevity, and reproduction of *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 287: 207-214.
- Organization for the Economical Cooperation and Development (OECD). 1992. *Fish acute toxicity test*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 203.
- United Nations. 2005. *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*. Primera ed. revisada, ST/SG/AC.10/30/Rev.1. New York y Geneva. 526 pp.
- 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.
- . 2002. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. Quinta edición. U.S. EPA Office of Water, Washington, D.C. EPA-821-R-02-012. 266 pp.

ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON EL PEZ *XIPHOPHORUS* *MONTEZUMAE*

*Guillermina Alcaraz Zubeldia,
Maribel Badillo Alemán
y Cecilia Vanegas Pérez*

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: AE

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

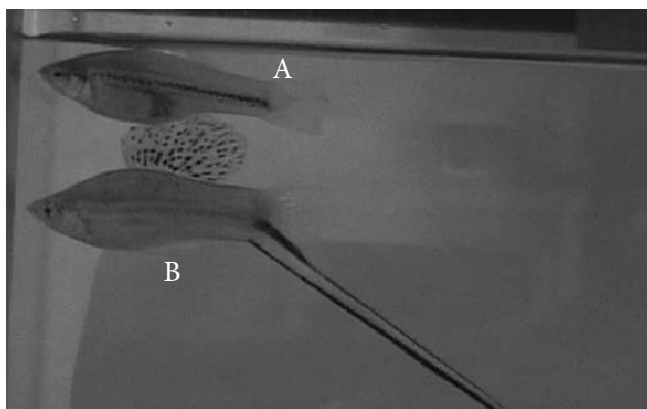
Los lineamientos que se presentan se centran en la evaluación de la toxicidad aguda de compuestos tóxicos en juveniles de peces poecílidos de *Xiphophorus montezumae*. La especie se propone como organismo de prueba para la evaluación del efecto tóxico agudo de contaminantes en cuerpos de agua dulceacuícolas. En los ensayos agudos, la respuesta final a evaluar es la mortalidad de los organismos, al cabo de un tiempo determinado de exposición a compuestos tóxicos. La sensibilidad de los organismos se determina a través de la estimación de la concentración letal media durante el tiempo (x) de la exposición (CL_{50-x} h).

El pez cola de espada de Moctezuma, *X. montezumae*, es una especie endémica de México que se distribuye en el noroeste de México en las cuencas del río Tamesí en Tamaulipas, al norte de Veracruz y en los afluentes del río

Pánuco en San Luis Potosí. Sin embargo, su localidad tipo es en el manantial Capuchinas y Río Verde, cerca de Rascón en San Luis Potosí (Espinoza, 1993).

X. montezumae es un organismo bentopelágico de agua dulce, con forma corporal alargada, comprimida y con un pedúnculo caudal muy ancho. Las hembras miden en promedio 6.5 cm de longitud y los machos 5 cm. Su coloración es amarilla en todo el cuerpo, con escamas marginadas en negro en la región dorsal. Son organismos con dimorfismo sexual externo; los machos presentan una elongación en la parte baja de la aleta caudal con forma de pincho o espada y su aleta anal se transforma en gonopodio al llegar a la madurez sexual (figura 9.1). El gonopodio empieza a distinguirse alrededor de los 4 meses de edad y se caracteriza por un ensanchamiento del tercer radio anal, con una segmentación más evidente. De tal manera, los machos juveniles no se distinguen de las hembras hasta que empiezan a desarrollar el gonopodio y la espada (Espinoza, 1993).

Figura 9.1. Dimorfismo sexual en organismos adultos de *Xiphophorus montezumae*
A) hembra y B) macho



MATERIAL

Acuarios de vidrio para el mantenimiento de los organismos de 40 L (26 x 30 x 50 cm) y 80 L (60 x 40 x 37 cm). Acuarios de vidrio de 20 L (41 x 26 x 20 cm) para los bioensayos. Cristalería: vasos de precipitados, matraces Erlen-

meyer, probetas, etc. Espátulas. Accesorios de acuario: mangueras, piedras de aireación, redes de mano, etc. Alimento en hojuelas (45% proteína); alimento vivo (*Artemia* sp.).

EQUIPO

Pipetas automáticas de diferentes volúmenes (5 μ L -50 μ L, 50 μ L-100 μ L, 100 μ L-1000 μ L), balanza analítica, oxímetro, potenciómetro, termómetro, salinómetro, sistema de filtración mecánica, uv y biológica, sistema de aireación continua, sistema para el control del fotoperíodo, equipo para la determinación de amonio total y nitrito (por ejemplo espectrofotómetro, electrodos, etc).

REACTIVOS

Sal de acuario, tiosulfato de sodio y reactivos para las técnicas de determinación de amonio total y nitrito (por ejemplo azul de indofenol y sulfanilamida).

ORGANISMOS DE PRUEBA

ORIGEN DE LOS ORGANISMOS

Los organismos juveniles de *X. montezumae* que se utilicen en las pruebas de toxicidad deben ser capturados en alguna de las localidades tipo de San Luis Potosí (Manantial Capuchinas y Río Verde) o bien ser descendientes directos de organismos silvestres reproducidos y criados en el laboratorio o en algún acuario comercial.

Se recomienda la reproducción de estos organismos en condiciones controladas debido a su fácil cultivo y al gran número de descendientes que se pueden obtener. Para garantizar la calidad de los reproductores se deben utilizar organismos adultos sanos. Durante su traslado al laboratorio, desde el sitio de captura en el medio natural o desde un ambiente de cultivo, los organismos deben ser manipulados lo menos posible para disminuir el estrés.

Para la reproducción de *X. montezumae* se colocan parejas de un macho y una hembra en un acuario de 40 L de capacidad durante una semana, a una temperatura de 25°C. Posteriormente, se retira al macho dejando a la hembra sola hasta el parto. Una vez que hayan nacido las crías, éstas se transfieren a un acuario de crianza de 20 L de capacidad, no excediendo más de 30 crías

por acuario. Al cabo de un mes de nacidas, las crías deben ser trasladadas a un acuario de 40 L hasta que alcancen la talla deseada. La aireación del acuario que contiene a las crías debe ser mínima para que toda la energía de los recién nacidos se traduzca en un excelente crecimiento. El acuario de cría debe carecer de grava en el fondo, ya que la grava provoca que las crías queden atrapadas en el fondo hasta que mueren.

En condiciones controladas de laboratorio, las hembras de *X. montezumae* llegan a tener entre 30 y 100 crías por parto y hasta 3 partos con un solo apareamiento. El tiempo de gestación es de 30 días aproximadamente. Inmediatamente después del nacimiento las crías deben ser alimentadas. Éstas pueden alcanzar en un lapso de 2.5 a 3 meses la talla de 30 mm de longitud estándar, talla recomendada para realizar las pruebas de toxicidad.

Para los ensayos de toxicidad se recomienda utilizar descendientes de diferentes padres, (siempre y cuando sean de la misma edad) para considerar la variabilidad biológica normal de la especie. De tal manera, las crías descendientes de diferentes padres pueden ser agrupadas para su mantenimiento.

ACLIMATACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS

Las condiciones físicas y químicas del agua en que se mantienen los organismos en el laboratorio dependen del origen y del estadio de los mismos. Los reproductores capturados del medio natural o transferidos de un ambiente de cultivo se mantienen durante los primeros cinco días en las condiciones de captura o cultivo. Posteriormente, la temperatura se ajusta a una tasa de 1 °C/día, hasta alcanzar las condiciones de evaluación requeridas (siempre dentro de los intervalos adecuados para la especie). Una vez alcanzadas las condiciones requeridas, los adultos de *X. montezumae* deben ser mantenidos en éstas al menos durante siete días antes de dar inicio a la etapa de reproducción.

Durante el período de aclimatación y mantenimiento de los organismos los parámetros fisicoquímicos deben mantenerse en condiciones adecuadas para la especie y los diferentes estadios (reproductores, crías y juveniles) (tabla 9.1).

El control de la concentración de amonio, nitrito y nitrato en el agua se mantiene a través de recambios parciales de agua. El volumen y frecuencia del recambio de agua debe permitir mantener bajos los niveles de los compuestos nitrogenados para evitar su acumulación y acción tóxica sobre los organismos (Lewis y Morris, 1986; Randall y Tsui, 2002). Durante la etapa de mantenimiento y aclimatación, el fotoperíodo se debe mantener 12 horas

Tabla 9.1. Parámetros fisicoquímicos para el mantenimiento adecuado de los diferentes estadios de *Xiphophorus montezumae* en condiciones controladas

Temperatura	20 a 27 °C
Dureza	60-80 mg/L CaCO ₃
Amonio	<1.0 ppm
pH	7 a 8
Oxígeno Disuelto	6.0 mg/L
Salinidad	0.1

luz :12 horas oscuridad (de 3000 a 4000 luxes de luz). Diariamente se deben registrar y controlar los parámetros fisicoquímicos del agua.

El agua utilizada tanto para el mantenimiento de los organismos como para los bioensayos de toxicidad debe ser previamente filtrada con filtro mecánico, carbón activado y UV, garantizando así las condiciones de calidad de la misma. El agua no debe estar en contacto con bombas o tuberías metálicas y debe prepararse agregando 14.5 g de sal de acuario (comercial) y 3.5 g de tiosulfato de sodio por cada 20 L de agua, manteniéndola en oscuridad bajo aireación intensa, al menos 48 horas antes de su uso.

Los peces se mantienen en tanques medianos o grandes (40 a 80 L de capacidad) equipados con sistemas de filtro biológico o filtros de cascada, considerando una densidad de 1 g de peso húmedo (PH) de organismo por cada 2 L de agua. Debe cuidarse que el sistema de filtración genere poca corriente.

Para la alimentación de los reproductores y juveniles se recomienda una dieta combinada de alimento comercial en hojuelas y de tipo congelado o vivo (*Artemia sp*). Para las crías, se recomienda el suministro *ad libitum* de alimento vivo (nauplios de *Artemia sp*). El patrón de alimentación diario consiste en el suministro de alimento vivo o congelado por las mañanas y de hojuelas comerciales por las tardes (tabla 9.2); las hojuelas comerciales deben tener un mínimo de 45% de contenido proteico (tabla 9.3).

Durante el período de aclimatación y mantenimiento, los organismos deben ser revisados constantemente. Si se presenta más del 10% de mortalidad en el grupo, se observan indicadores de enfermedad o se detecta algún tipo de condición funcional o conductual inadecuada, el lote debe ser descartado para experimentación.

Tabla 9.2. Patrón de alimentación para el mantenimiento de diferentes estadios de *Xiphophorus montezumae* en condiciones de laboratorio

Estadio	Alimento comercial en hojuelas, % proteína	Suministro de alimento comercial	Suministro de alimento vivo (<i>Artemia</i> sp)
Crías	45	No	ad libitum
Juveniles	45	<i>Ad libitum</i>	10 % PHc*
Reproductores	45	10% PHc	10 % PHc*

*PHc: Peso húmedo corporal

Tabla 9.3. Valor nutricional de las hojuelas comerciales suministrados como alimento a los diferentes estadios de *X. montezumae*

Composición	Porcentaje %
Proteína cruda	46
Grasa cruda	8.0
Fibra cruda	2.0
Humedad	6.0
Fósforo	1.3
Vitamina C	3 mg/kg

COMPUESTOS TÓXICOS DE PRUEBA

Para evaluar la toxicidad aguda de compuestos aislados, éstos deben tener un elevado grado de pureza (grado reactivo). Si el compuesto tóxico de prueba (compuesto aislado; extracto) es soluble en agua, la solución madre debe ser preparada en agua deionizada. Si el compuesto tóxico de prueba es estable en solución, debe prepararse una solución madre única al inicio de las pruebas. Si el compuesto tóxico de prueba no es estable en solución (por ejemplo sujeto a oxidación u otras transformaciones químicas o biológicas) una nueva solución debe prepararse previo a su uso. Si el compuesto tóxico de prueba no es soluble en agua, una solución acuosa madre debe ser obtenida por la solución inicial del compuesto en un disolvente acarreador (por ejemplo acetona, etanol, propilenglicol, etc.). En este caso, en las pruebas experimentales se debe considerar

un grupo testigo del disolvente, evaluando el volumen máximo adicionado. Si se evalúan mezclas complejas (por ejemplo efluentes, lodos, etc.), la mezcla inicial será considerada como la "solución madre" (100%) a partir de la cual se efectuarán las diluciones experimentales correspondientes.

El volumen máximo de la solución madre que se adiciona a los acuarios experimentales debe ser el menor volumen posible que no modifique las características del medio experimental (por ejemplo volumen y pH), preferentemente no mayor del 0.5% respecto al volumen total. La concentración del compuesto problema debe ser determinada analíticamente en submuestras del medio al menos al inicio y al término de los bioensayos. Sin embargo, si se presumen transformaciones o cambios en las concentraciones de los compuestos tóxicos se deben evaluar las concentraciones reales durante el transcurso de las pruebas. Si se efectúan recambios del medio, se deben evaluar las concentraciones reales antes y después del recambio.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

CÁMARAS EXPERIMENTALES

Los bioensayos deben ser de tipo estático o semi-estático. El agua que se utiliza en las pruebas debe ser previamente preparada como se señaló con anterioridad.

Los acuarios experimentales deben ser de vidrio, preferentemente de 20 L de capacidad. Los acuarios deben ser lavados previamente con detergente libre de fosfatos y disolventes; posteriormente deben ser enjuagados con HCl al 10% y en seguida con agua corriente y destilada antes de su uso (UNEP/FAO/IAEA, 1986).

Para las pruebas, se recomienda, por cada gramo de tejido húmedo de animal (g PH), utilizar un mínimo de 1 L de agua (1 g PH/L), y de manera ideal una relación de 2 L/ g PH.

PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS

En el transcurso de las pruebas deben registrarse y mantenerse constantes el pH, la temperatura, la dureza y el oxígeno disuelto (la aireación debe ser de burbujeo fino y constante durante el tiempo de exposición). El fotoperíodo se mantiene en 12 horas luz: 12 horas oscuridad (entre 3,000 y 4,000 luxes de luz).

ALIMENTACIÓN

La alimentación de los animales se debe suspender 24 horas antes iniciar las pruebas y durante el desarrollo de las mismas (96 horas), con el fin de evitar interferencia por los procesos digestivos. Para períodos de exposición mayores, se recomienda alimentar a los organismos; el suministro del alimento debe ser de manera ideal una vez al día (sólo de hojuelas comerciales; 10% PHc) retirando el alimento remanente después del período de alimentación (2 horas) y posteriormente retirando las heces producidas. En este caso, el agua de los acuarios debe ser recambiada diariamente, preferentemente el 75% del volumen total, y las soluciones y concentración de los compuestos tóxicos deben ser ajustadas apropiadamente. En el caso del 100% de recambio se recomienda contar con series adicionales de acuarios, con las concentraciones respectivas de los compuestos problema para transferir cuidadosamente a los organismos.

ORGANISMOS DE PRUEBA

Los organismos experimentales expuestos a los diferentes niveles del(los) compuesto(s) tóxico(s) deben ser similares en talla (longitud estándar) y en peso. Para ello, una submuestra representativa de los organismos provenientes del mantenimiento (mínimo 30 organismos) debe ser pesada y medida para garantizar la evaluación de peces de pesos homogéneos. Se recomienda que los bioensayos se realicen con juveniles de *X. montezumae* de 0.8 a 1.1 g PH. Los organismos que mueran durante el transcurso de las pruebas o que sobrevivan a la misma deben ser pesados y medidos al final de la prueba. Durante el transcurso del procedimiento experimental, los organismos deben manipularse lo menos posible para evitar la posible influencia del estrés sobre la respuesta tóxica.

DURACIÓN DE LAS PRUEBAS Y RECAMBIO

El período de exposición depende de los objetivos que se persigan. Las pruebas de toxicidad aguda deben realizarse por un período de 96 horas. En caso de que sea necesario prolongar las pruebas por períodos mayores a 96 horas, los organismos deberán ser alimentados durante este tiempo para evitar alteraciones nutricionales. Cuando se requiera alimentar a los animales, se deben realizar recambios de agua después del retiro de las heces.

Las soluciones del compuesto problema deben ser renovadas al menos una vez cada 24 horas. En todos los casos en que se realicen recambios se deben tomar muestras de las soluciones de exposición antes y después de los recambios para determinar analíticamente las concentraciones del compuesto tóxico problema.

PRUEBAS DE INTERVALO DE TOXICIDAD

Para estimar la toxicidad de un compuesto se deben efectuar pruebas del intervalo de toxicidad. Cuando se carece de información relativa a la toxicidad de la muestra problema se deben utilizar progresiones de las concentraciones en escala logarítmica; cuando existe información disponible, por ejemplo en otras especies de *Xiphophorus*, se pueden utilizar progresiones de las concentraciones en escala aritmética. En el caso de mezclas complejas (por ejemplo, efluentes, lodos, etc.) se efectúan las diluciones correspondientes (por ejemplo, 10, 20, 40, 60 y 80%) a partir de la mezcla original (100%).

Se considera un mínimo de seis concentraciones experimentales y un grupo testigo sin adición del compuesto problema; en el caso de que el compuesto problema se haya disuelto en algún disolvente, se debe considerar un testigo del disolvente utilizado. Por cada concentración se considera al menos una réplica. En cada cámara experimental y para cada concentración se exponen un mínimo de 10 organismos. Los peces se eligen de los sistemas de mantenimiento y se colocan al azar en los acuarios experimentales de exposición. Previo a la adición de los compuestos en estudio, los organismos se mantienen un mínimo de 24 horas en aclimatación en los acuarios de exposición, sin proporcionar alimento. La adición de la solución de prueba debe efectuarse de manera muy lenta, con una agitación suave para evitar una posible exposición de los organismos a la elevada concentración de la solución madre, garantizando la completa mezcla del compuesto tóxico en el medio y cuidando de no estresar a los organismos expuestos.

La mortalidad se registra a lo largo del tiempo de exposición, con observaciones a las 0, 2, 4, 8, 12 y cada 12 horas posteriores hasta el término del ensayo. Los organismos muertos durante el período de exposición deben ser removidos lo antes posible para evitar el deterioro de la calidad del agua. Además de la mortalidad, se registran cambios en el comportamiento de los peces (por ejemplo alteraciones del equilibrio, nado errático, cambios en la actividad locomotora y en la conducta alimentaria, etc.). La falta de respuesta de los organismos cuando sean tocados suavemente con una varilla

de vidrio se considera como criterio de mortalidad. Si en el transcurso de las pruebas, la mortalidad de los grupos testigo excede el 10%, la prueba se invalida; el uso de factores de corrección por la mortalidad de los testigos no es válido.

PRUEBA DEFINITIVA

A partir de los resultados de la prueba de intervalo de toxicidad, se establecen las concentraciones adecuadas para evaluar la toxicidad aguda del compuesto tóxico. Se sigue el mismo procedimiento señalado previamente, si bien se recomienda en este caso evaluar un mínimo de dos réplicas por concentración experimental. Al igual que en la prueba de intervalo de toxicidad, la mortalidad se registra a lo largo del tiempo de exposición, con observaciones a las 0, 2, 4, 8, 12 y cada 12 horas posteriores hasta el término del ensayo. En la tabla 9.4 se integran las condiciones de prueba recomendadas para los ensayos de toxicidad con juveniles de *X. montezumae*.

Tabla 9.4. Condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad aguda con juveniles de *Xiphophorus montezumae*

Tipo de ensayo	Estático o semi-estático
Temperatura	25 ± 1 °C
Calidad de luz	Blanca-fría
Fotoperíodo	12 horas luz :12 horas oscuridad
Volumen del acuario	20 L
Volumen de la solución de prueba	18 L
Agua de dilución	Filtrada, reposada y fuertemente aireada
Edad de los organismos	Juveniles de 0.1 a 1.1 g PH
Número de peces por réplica	10
Número de réplicas	2
Duración de la prueba	96 horas
Efectos medidos	Respuesta final: mortalidad Respuestas adicionales: alteración en la actividad y la conducta alimentaria.
Resultado final	CL ₅₀ y TL ₅₀
Aceptabilidad de los resultados	Sobrevivencia en el grupo testigo ≥ 90%

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

A partir de los resultados de mortalidad obtenidos de las pruebas de toxicidad aguda se determina la concentración letal media (CL_{50}) o el tiempo medio de muerte (TL_{50}). Para el análisis no se consideran los datos de los grupos testigos, las concentraciones o tiempos en que la sobrevivencia sea 100% o bien las concentraciones con 100% de mortalidad.

Para la determinación de la CL_{50} o TL_{50} , se utilizan los programas específicos de cómputo diseñados para este fin. Preferentemente se utilizan modelos tipo Probit : X, Probit : log X o arcoseno: X, seleccionando el modelo de mejor ajuste. La validez de los modelos se determina a través de la prueba de X^2 . En cada caso se obtienen los valores de $CL_{50}-t \pm I.C.$ y $TL_{50}-x \pm I.C.$ (I.C. = intervalo de confianza; $\alpha = 0.05$).

VALIDACIÓN DE LAS PRUEBAS DEFINITIVAS

Los bioensayos se consideran válidos siempre y cuando cumplan con las siguientes especificaciones:

- a) La mortalidad del grupo testigo no sea mayor del 10%.
- b) La concentración real de los compuestos no exceda el 20% de la concentración nominal de los mismos.
- c) La variabilidad entre las réplicas no exceda el 20%.
- d) Los cálculos ($CL_{50}-t \pm I.C.$ y $TL_{50}-x \pm I.C.$) se deben realizar con las concentraciones del compuesto tóxico determinadas analíticamente.
- e) El valor calculado de la CL_{50} debe estar incluido dentro del intervalo de concentraciones experimentales y el modelo Probit debe ser significativo para asegurar la confiabilidad de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcaraz G., X. Chiapa, V. Espinosa y C. Vanegas. 1999a. Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp *Penaeus setiferus* postlarvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 30 (1): 90-97.
- Alcaraz G., V. Espinosa y C. Vanegas. 1999b. Acute effect of ammonia and nitrite on respiration of *Penaeus setiferus* postlarvae under different oxygen levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 30 (1): 98-106.
- Espinosa, H. P. 1993. Listados faunísticos de México III. Los peces dulceacuícolas

- mexicanos. Departamento de Zoología, Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Kruesi, C. K. 2004. Desempeño de nado en machos de *Xiphophorus montezumae*: El costo de un ornamento. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 45 pp.
- Lewis Jr., W. M. y D. P. Morris. 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. *Transactions of American Fish Society* 115: 183-195.
- Randall, D. J. y K. T. N. Tsui. 2002. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin* 45: 17-23.
- United Nations Environment Program, Food & Agriculture Organization, International Atomic Energy Agency (UNEP/FAO/IAEA). 1986. *Test of the acute lethal toxicity of pollutants to marine fish and invertebrates*. Reference Methods for Marine Pollution Series. No. 43. UNEP.
- Vanegas C. 1996. Efectos subletales del cadmio y del zinc en el camarón blanco *Penaeus setiferus*. Tesis de doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

ENSAYO DE TOXICIDAD CON EL NEMÁTODO *PANAGRELLUS REDIVIVUS*

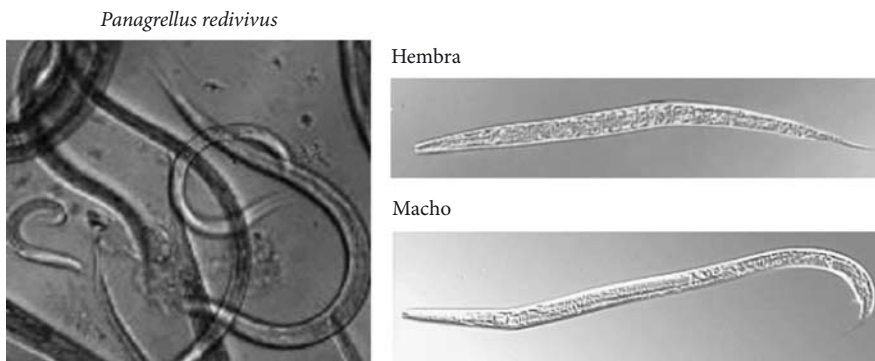
Yolanda Pica Granados

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: AE

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Panagrellus redivivus es una especie dioica y ovovivípara. El primer estadio de desarrollo ocurre en el útero de las hembras y es denominado como J1, en el que se desarrolla la embriogénesis con una duración aproximada de 20 horas. Cuando el estadio J1 muda da lugar a los juveniles o J2, que emergen del huevo y son expulsados por la vulva de la hembra como libres nadadores (figura 10.1).

Los recién nacidos (J2) continúan su crecimiento pasando por otros dos estadios juveniles, J3 y J4, hasta alcanzar el estado adulto a las 96 horas de su nacimiento. Cada estadio se caracteriza por la longitud del organismo (Burke y Samoiloff, 1980; Samoiloff *et. al.* 1980; Samoiloff, 1980), ámbito que está bien definido para *P. redivivus* (tabla 10.2). Sin embargo, bajo condiciones

Figura 10.1. Microfotografía de *Panagrellus redivivus*

adversas del medio de vida, los organismos responden ya sea muriendo o mostrando alteraciones en su período de desarrollo. Estas manifestaciones de efecto se determinan por el monitoreo del crecimiento de una población de 100 organismos en estadio J2 a lo largo de un período de 96 horas. A partir de su seguimiento es posible determinar efectos letales, a través del número de organismos muertos. Asimismo, se pueden observar efectos subletales crónicos y de genotoxicidad, a través del número de organismos estancados en etapas retardadas de desarrollo (J2, J3 y J4) o, en caso de alcanzar etapas adultas, también se pueden evaluar efectos de mayor escala temporal por el número de hembras grávidas y el número de sus huevos.

El nemátodo de la especie *P. redivivus* es un organismo de prueba aplicable al biomonitoreo de aguas y sedimentos. Se ha usado para la detección de toxicidad de muestras ambientales complejas como son aguas residuales, suelos, sedimentos y lodos contaminados, ya sea a través del análisis de fracciones químicas obtenidas a partir del pretratamiento de muestras o de la obtención de elutriados o extractos (Samoiloff *et al.*, 1983, Samoiloff, 1987; Ongley *et al.*, 1988).

MATERIAL

- Pipetas serológicas de vidrio graduadas de 1 y 10 mL
- Pipeta automática de 100 μ L, con puntas estériles
- Pipeta automática de 100-1,000 μ L, con puntas estériles

- Pipeta automática para tubo capilar de 25 μ L (por ejemplo Drummond serie 200 dialamatic)
- Pipetas Pasteur
- Puntas Geloader para pipeta Eppendorf
- Viales de vidrio de borosilicato de 2.5 mL de fondo plano
- Bases para viales de 2.5 mL, pueden emplearse microplacas de 16 pozos sin tapa
- Recipientes para preparación de diluciones, pueden emplearse tubos de cultivo de 20 mL.
- Aro de soporte para mini tamiz y malla de nylon poliamida de 12 μ m
- Aro de soporte para mini tamiz de 2 a 2.36 mm de malla (8 mallas) para separación de material sólido (sedimento o suelos) en la lectura de pruebas
- 6 cajas Petri de vidrio de 100 mm
- 6 cajas Petri de vidrio de 35 x 10 mm
- Pipetas volumétricas de vidrio clase A de 1 a 100 mL
- Matraces volumétricos de vidrio clase A de 10 a 1 000 mL
- 2 frascos de vidrio de 1 L de boca ancha
- 4 botellas de dilución de 250 mL
- 1 matraz Erlenmeyer de 1 L esterilizable en autoclave
- Gasa y algodón
- Bulbos para pipetas
- Pincel de pelo natural con mango de madera (esterilizable en autoclave)
- Tubos de centrifuga de vidrio de 50 mL con tapa.

EQUIPO

- Microscopio estereoscópico con resolución de 10X
- Retícula para lente ocular de 100 x 1 mm²
- Balanza analítica capaz de medir 0.001 g y calibrada
- Autoclave o similar
- Sistema de filtración
- Mechero o campana de flujo laminar
- Base de agitación o vortex (opcional)
- Controlador de temperatura ambiental o incubadora (20 \pm 2 °C)
- Centrifuga con capacidad de 700 g

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Todos los reactivos utilizados deben tener calidad ACS o al menos de 99% de pureza. Para su preparación se emplea agua Tipo II destilada o deionizada (APHA, 1998).

BUFFER M9

Es una solución buffer no nutritiva empleada durante la transferencia o inoculación de *P. redivivus* a medios de cultivo masivo o de aislamiento y producción de organismos J2. Provee sólo condiciones estándar del ambiente de vida adecuado para los nemátodos. Su composición se muestra en la tabla 10.1.

Tabla 10.1. Composición de la solución buffer M9 para el ensayo con *Panagrellus redivivus*

	Compuesto	Fórmula	Masa en gramos (g) o volumen (mL) de solución stock
1	Fosfato de sodio dibásico	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6.00
2	Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	3.00
3	Cloruro de sodio	NaCl	5.00
4	Agua destilada tipo II	H_2O	1000
5	Esterilizar en autoclave la mezcla anterior y después agregar solución de sulfato de magnesio 1M (12.034 g/100mL)	MgSO_4	1.00

Para preparar esta solución se deben mezclar los compuestos mencionados uno a uno en el orden señalado, disolver y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El buffer M9 es un líquido no nutritivo usado para lavar los animales, limitando su crecimiento y dando un medio ambiente estándar. En caso de que se observe precipitación de las sales después de la esterilización en autoclave, es preferible esterilizar por filtración utilizando una membrana de 0.22 μm .

SOLUCIÓN DE COLESTEROL

P. redivivus requiere esteroides para lograr su maduración. Esta solución provee la cantidad necesaria para todos los medios relacionados con su crecimiento.

La solución se prepara mezclando 1 g de colesterol en 10 mL de etanol. Se debe calentar suavemente, mezclando hasta que el colesterol se disuelva.

MEDIO HARINA-AGUA PARA CULTIVO MASIVO

Este medio se emplea para mantener los cultivos en stock. Su elaboración consiste en mezclar 100 g de harina, preferentemente de trigo, de producción orgánica y poco refinada, en 100 mL de agua destilada. La mezcla se vacía en un frasco de boca ancha, evitando ensuciar sus paredes y se cubre con un plato de caja Petri. Esta mezcla se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

MEDIO AGAR-AGUA

Este medio es útil para mantener los cultivos stock, para la reproducción de hembras grávidas y la posterior obtención de organismos en estadio J2. En 1000 mL de agua destilada se mezclan 17 g de agar bacteriológico (Oxoid No.3 o Bioxon). Una vez disuelto el agar, se esteriliza la mezcla en autoclave por 15 minutos a 121°C. Después se agregan 0.5 mL de la solución de colesterol al agar caliente y se agita para evaporar el etanol. Se dejan entibiar y se vacían

Figura 10.2. Cultivo masivo de *Panagrellus redivivus*



aproximadamente 20 mL en cajas Petri de 100 mm. Las placas pueden mantenerse en refrigeración hasta su inoculación con los nematodos.

SUSPENSIÓN DE LEVADURA

Esta solución se prepara disolviendo 50 mg de levadura en 100 mL de agua destilada. Después de distribuyen 4 mL en una serie de viales o tubos de 7 mL y se esterilizan en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Esta suspensión es usada como una fuente de comida para cultivos en crecimiento.

MEDIO DE CRECIMIENTO M9Y

Es un medio limitado en nutrientes que se emplea como medio de dilución durante la preparación del sistema de prueba. Se elabora mezclando 99 mL de buffer M9 y 1 mL de suspensión de levadura. La solución se esteriliza en

Figura 10.3. Medio agar-agua para la reproducción de hembras grávidas de *Panagrellus redivivus* y aislamiento posterior de organismos J2



autoclave por 15 minutos a 121°C. Posteriormente y antes de que se enfríe, se agregan 0.05 mL de la solución de colesterol y se agita el agar para evaporar el etanol de dicha solución.

Todas las soluciones y medios escritos pueden conservarse en refrigeración a 4 ± 2 °C hasta por dos meses.

ORGANISMOS DE PRUEBA

CULTIVO MASIVO DE ORGANISMOS

El cultivo de *P. redivivus* se mantiene en frascos con medio de harina-agua, el cual se inocula con una pequeña población (varios cientos de individuos en buffer M9) utilizando una pipeta Pasteur. Después de algunos días los enjambres de nemátodos pueden ser observados en las paredes del frasco. Grandes poblaciones pueden ser mantenidas por varios días en este cultivo, pero deberán ser preparados nuevos cultivos por lo menos una vez al mes.

Cuando se tienen programadas una serie de pruebas es conveniente preparar una semana antes el medio de cultivo en cajas Petri, las cuales se inoculan con el nemátodo de la forma mencionada. Estos organismos al reproducirse

Figura 10.4. Separación de organismos J2 de *Panagrellus redivivus* y colocación en viales con muestras



empezarán a hacerse visibles en la tapa de la caja Petri de donde pueden lavarse con buffer M9 para obtener las hembras, sin arrastrar restos de harina que interfieran en la prueba.

CULTIVOS DE ORGANISMOS PARA LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD

La prueba se inicia con organismos en estado de desarrollo J2, por ello un día antes de cada prueba se separan las hembras y se inoculan en placas de cultivo con medio agar-agua que contiene también colesterol, para tener un adecuado suministro de animales J2 en un estado fisiológico similar (figura 10.5).

Los nemátodos de un cultivo stock en caja Petri son inundados con buffer M9 y son pasados a través de un tamiz, en la malla de éste quedan los organismos de mayor tamaño, los cuáles se recuperan mediante un enjuague con buffer M9 sobre una placa fresca de agar a una profundidad no mayor de 2 a 4 mm de buffer.

Dentro de estos adultos separados habrá muchas hembras grávidas. Estas hembras producirán de 10 a 20 organismos J2 en un período de 12 horas. Al día siguiente, se tamizan nuevamente los organismos y se lavan con medio M9, pero ahora los organismos que se utilizan son los que pasan por el tamiz. Esta progenie definida en estado J2 será usada en el bioensayo. Se recomienda lavar perfectamente a las hembras y a los J2 con buffer M9, a temperatura ambiente para remover los residuos de harina que pudieran tener.

CONTROL DEL CULTIVO

El cumplimiento de las etapas de desarrollo de *P. redivivus* es una forma práctica de controlar el estado de salud de su cultivo. Para llevarlo a cabo se recomienda dar seguimiento colocando 10 sistemas de prueba preparados con 500 μ L de medio M9Y, el cual es una solución amortiguadora adicionada con 1% de suspensión de levadura de 5 mg/mL. En cada uno de ellos se colocaron 10 nemátodos en estadio J2, previamente aislados del cultivo masivo. Después de 96 horas el 100% de los organismos J2, con tallas de 250 a 350 μ m, deberán haber alcanzado su talla adulta de 750 a 2000 μ m.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

PREPARACIÓN DE DILUCIONES DE MUESTRAS PROBLEMA

Para los bioensayos con muestras problema líquidas (agua, extractos orgánicos y elutriados) se preparan alícuotas de 10 mL diluidas en medio M9Y. Con este fin pueden ser empleadas las siguientes condiciones:

Para muestras acuosas (concentración máxima de la muestra 10%) se adiciona: 1.0 mL de muestra + 9.0 mL de medio M9Y.

Para extracto orgánico en metanol (concentración máximo del disolvente 3%) se adiciona: 0.3 mL de extracto orgánico de la muestra en 9.7 mL de medio M9Y.

Para extracto orgánico en dimetilsulfóxido (contenido máximo del disolvente 1%) se adiciona: 0.1 mL de extracto orgánico de la muestra + 9.9 mL de medio M9Y.

DESARROLLO DE LA PRUEBA

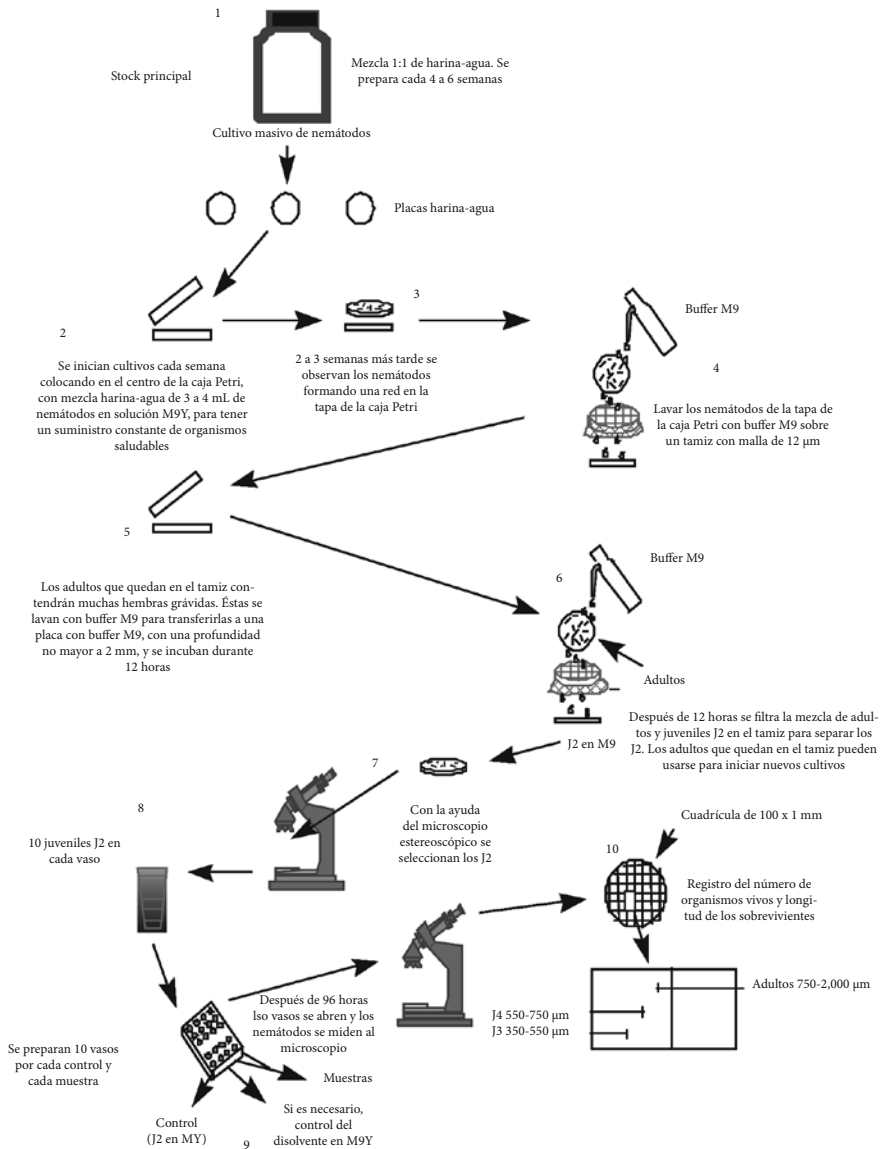
Cada una de las diluciones preparadas se distribuye en volúmenes de 0.5 mL en 10 recipientes de prueba, lo cuales pueden ser, para el caso de muestras líquidas, vasos pequeños de vidrio o materiales plásticos no tóxicos, de fondo plano, de aproximadamente 1 cm de diámetro y capacidad de 2.5 mL, disponibles en el mercado local (figura 10.4).

Bajo el microscopio y con la ayuda de una micropipeta Drummond con capilar y punta (*Eppendor geloader tips*) se toman 10 nemátodos J2 y se colocan dentro de los recipientes sobre las soluciones de prueba. Es importante que la gota en que se tomen a los diez nemátodos sea lo más pequeña posible a fin de que la concentración de la dilución de la muestra problema se afecte lo menos posible.

Cada serie de pruebas se debe acompañar del blanco de procedimiento del método aplicado en el manejo de las muestras o de las soluciones involucradas en el mismo (agua, metanol, dimetilsulfóxido). Dicho blanco se debe diluir en medio M9Y en la misma relación (v/v) empleada en la preparación de las muestras problema (véase el procedimiento de aseguramiento y control de calidad de los ensayos de toxicidad al final de este documento).

En paralelo, se debe preparar un control negativo con medio M9Y y un control positivo con soluciones del compuesto tóxico de referencia (Zn(II) preparadas a partir de sulfato de zinc).

Figura 10.5. Procedimiento de prueba para el ensayo con *Panagrellus redivivus*



Para el control negativo se emplean 5 viales conteniendo sólo 500 µL el medio M9Y, en los cuales se colocan 10 organismos en estadio J2, en espera de que al término de las 96 horas de exposición alcancen su talla adulta (tabla 10.2).

El control positivo se prepara empleando soluciones de Zn (II) en medio M9Y, cuyas concentraciones sugeridas son 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 mg/L. Para ello, se distribuyen en 5 recipientes 500 µL de cada dilución y 10 organismos en estadio J2.

Los animales se dejan crecer en los recipientes bien tapados durante 96 horas con control de temperatura a 20 ± 2 °C.

Después de 96 horas, los recipientes se abren y se registra el número de sobrevivientes en cada vaso. Posteriormente, se tapan de nuevo y se colocan en agua caliente a 60 °C por unos minutos, el calor mata a los nemátodos y provoca su estiramiento para una mejor apreciación de su tamaño. La revisión y medición de cada organismo puede efectuarse en este momento u optar también por aplicar tinción, preferentemente con una gota de rosa de bengala (0.5 g/L) o con otros colorantes como azul-algodón-lactofenol o azul de metileno.

La longitud debe determinarse de forma inmediata midiendo a través de un microscopio con reglilla ocular. Se recomienda hacer la medición a un aumento de 1.6X. De esta manera se registra el número de animales en cada estadio de acuerdo al rango señalado en la tabla 10.2.

Tabla 10.2. Longitud corporal de *Panagrellus redivivus* en las distintas etapas de su desarrollo

Etapas	Talla
J2	250 a 350 µm
J3	350 a 550 µm
J4	550 a 750 µm
Adulto	750 a 2000 µm

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los efectos sobre la sobrevivencia, el crecimiento y la maduración de la población expuesta a muestras problema son expresados como porcentajes, en relación a los valores obtenidos para estos mismos parámetros en la población del control.

SOBREVIVENCIA

Es el porcentaje de sobrevivientes en la población expuesta a una muestra que se sospecha tóxica, en relación a los sobrevivientes de la población control. Este parámetro se estima a partir de la siguiente ecuación:

$$S = 100 * \frac{ST}{SC}$$

donde:

S = sobreviencia

ST = número de sobrevivientes de la prueba

SC = número de sobrevivientes del control

Para determinar si la diferencia de la sobrevivencia observada para la muestra problema es significativamente distinta respecto a la del control se calcula el valor de x^2 de la siguiente forma:

$$x^2 = \frac{(ST - SC)^2}{SC}$$

Si x^2 es mayor a 5 indica que la letalidad es significativa.

CRECIMIENTO

El segundo parámetro empleado es la inhibición del crecimiento, término que se aplica cuando un número significativo de animales en la prueba no alcanza el estadio J4 o el estado adulto. Este parámetro se obtiene a partir de la ecuación:

$$C = 100 * \frac{(J4T + AT) / ST}{(J4C + AC) / SC}$$

donde:

C = crecimiento

J4T = número de organismos J4 en la población de prueba

AT = número de organismos adultos en la población prueba

ST = número de sobrevivientes de la prueba

J4C número de organismos J4 en la población control

AC = número de organismos adultos en la población control
 SC = número de sobrevivientes del control

La significancia estadística de las diferencias entre el crecimiento en el control y el observado en la muestra problema también se calcula a través del análisis por x^2 , a partir de la siguiente fórmula:

$$C = 100 * \frac{((J4T + AT) - (J4C + AC))^2}{(J4C + AC)}$$

Con estos datos es posible establecer si se presentó una inhibición o estimulación del crecimiento.

MADURACIÓN

La maduración resulta de un desarrollo normal hasta el estadio de J4; sin embargo, los nemátodos no logran la maduración gonádica que les permite convertirse en adultos y avanzar su reproducción. La evolución del estadio J4 a adulto requiere de la acción de esteroides y de la actividad genética. La inhibición específica de esta muda sugiere la acción de agentes genotóxicos. Para el cálculo de este parámetro se emplea la siguiente ecuación:

$$C = 100 * \frac{(AT) / (J4T + AT)}{(4C + J4C + AC)}$$

donde:

M = maduración

AT = número de organismos adultos en la población prueba

J4T = número de organismos J4 en la población de prueba

AC = número de organismos adultos en la población control

J4C número de organismos J4 en la población control

La significancia estadística de las diferencias entre la maduración en el control y la muestra problema también se calcula a través del análisis por x^2 , a partir de la siguiente fórmula:

$$x^2 = 100 * \frac{(AT - AC)^2}{AC}$$

Si x^2 es mayor a 5 indica un efecto significativo en la maduración.

ESTADO GENERAL DE SALUD

Es un valor sumario que relaciona los diversos parámetros medidos y pone énfasis en la comparación del crecimiento y de la maduración. Para ello, se da a los diferentes parámetros un valor de peso ponderado, que para la sobrevivencia es de 4, para el crecimiento de 2 y para la maduración de 1. Para su cálculo se emplea la siguiente ecuación:

$$E = 100 * \frac{(4 * S) + (2 * C) + M}{7}$$

donde

E = estado general de salud

S= sobrevivencia

C = crecimiento

M = maduración

ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS

Los resultados de la prueba deben ser ignorados y la prueba repetida si alguno de los siguientes puntos es observado:

- Si menos que el 90 % de la población control alcanza el estado adulto
- Si más del 10 % de la población control muere
- Si hay crecimiento microbiano excesivo en el sistema de prueba

BIBLIOGRAFÍA

American Public Health Association (APHA). 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Vigésima edición. American Public Health Association, Washington D.C. 8-20-8-23 pp.

- Burke D. J. y M. R. Samoiloff. 1980. Studies on the X-chromosome of the nematode *Panagrellus redivivus*: E M S induced visible mutations. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 22: 295-302 .
- Ongley, E. D., D. A. Birkholz, J. H. Carey y M. R. Samoiloff. 1988. Is water a relevant sampling medium for toxic chemicals? An alternative environmental sensing strategy. *Journal of Environmental Quality* 17: 391-401.
- Samoiloff M. R. 1980. Sex and tissue specific patterns of protein synthesis and turnover in the free - living nematode *Panagrellus redivivus*. *Comparative. Biochemistry and Physiology* 65A: 483-486.
- Samoiloff M. R., S. Schulz, Y. Jordan, K. Denich y E. Arnott. 1980. A rapid simple long-term toxicity assay for aquatic contaminants using the nematode *Panagrellus redivivus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37: 1167-1174 .
- Samoiloff M. R., J. Bell, D. A. Birkholz, G. R. B. Webster, E. Arnott, R. Pulak y a. Madrid. 1983. Combined bioassay-chemical fractionation scheme for the determination and ranking of toxic chemicals in sediments. *Environmental Science and Technology* 17: 329-334.
- Samoiloff M. R. 1987. Toxicity testing of sediments: Problems, Trends, and solutions. En: J. O. Nriagu (ed.). *Aquatic Toxicology and Water Quality Management*. John Wiley and Sons, Nueva York, pp. 143-152.

ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON LARVAS Y JUVENILES DE LOS PECES TILAPIA, CARPA Y CÍCLIDOS

Con experiencia

Omar Zapata-Pérez y Juan Manuel Pedrero Ríos

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: E

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Esta prueba se basa en exponer a los peces a compuestos tóxicos por un período de hasta 96 horas. Durante este tiempo es necesario registrar la mortalidad de los peces a las 24, 48, 72 y 96 horas, para calcular la concentración del compuesto tóxico que causa una mortalidad de 50 % de la población expuesta. A esta concentración capaz de matar a la mitad de los organismos, se le denomina concentración letal media (CL_{50}).

Para la realización de la prueba es útil conocer la solubilidad del compuesto a probar en el agua, así como, evaluar el método analítico para determinar la concentración del compuesto tóxico en el agua. La fórmula estructural química, la pureza del compuesto, la estabilidad en agua y luz (pK_a , P_{ow}) y la presión de vapor son datos adicionales que deben ser conocidos para un

mejor entendimiento y desarrollo de la prueba. El método desarrollado en esta sección puede ser utilizado con diferentes especies de peces como: tilapias (*Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mosambicus* o tilapias híbridas), carpas (*Ciprinus carpio*) y diferentes cíclidos como las mojarras (*Cichlasoma urophthalmus* y *Cichlasoma synspilum*).

Las tilapias, las carpas y los cíclidos son organismos muy conocidos por su gran capacidad de adaptación y de diversificación de ambientes en función de la alimentación. Por otro lado, son peces que habitan en diferentes regiones tropicales del mundo, donde las condiciones de temperatura son favorables para su reproducción y crecimiento.

Aún cuando estas especies presentan una gran resistencia física a diferentes condiciones ambientales, son buenos organismos para trabajos toxicológicos y adicionalmente, cuentan con diferentes características que son ideales para evaluar los efectos de los compuestos tóxicos. Entre estas características podemos mencionar las siguientes:

- Tasa de crecimiento acelerado. Permite evaluar los efectos causados por los contaminantes a corto, mediano y largo plazo.
- Períodos reproductivos continuos y alta tasa de fecundidad. Características ideales para poder evaluar los efectos generacionales, lo que es ideal en estudios de carcinogénesis y teratogénesis.
- Adaptación al cautiverio. Aspecto que nos permite realizar diferentes pruebas toxicológicas sin estresar a los organismos y, por lo tanto, disminuir la variabilidad de los resultados. Adicionalmente, nos ayuda a no perder ejemplares durante el período de experimentación, evitando así retrasos y pérdidas económicas.
- Alto valor proteínico. Estos organismos tienen una amplia aceptación en el consumo humano y, adicionalmente, están descritas como especies con un alto valor proteínico y una excelente calidad en la carne.
- Distribución en aguas semicálidas y cálidas. Esto permite encontrar a estas especies en diferentes estados del país y así poder desarrollar los ensayos toxicológicos en diferentes regiones, cuyos resultados pueden ser extrapolados y comparados.
- Fácil cultivo. Esta característica ha permitido seleccionar a estos organismos en las granjas acuícolas por su fácil cultivo, el cual está asociado a la resistencia a vivir tanto en aguas dulces como salobres, e incluso pueden acostumbrarse a las aguas poco oxigenadas. Pueden ser cultivadas en estanques o en jaulas y soportan altas densidades poblacionales.

Este ensayo es útil para evaluar la toxicidad aguda de cualquier compuesto orgánico e inorgánico; también puede ser utilizado para evaluar descargas de aguas, conteniendo diferentes contaminantes.

Los resultados de esta prueba, pueden ser empleados para predecir la toxicidad potencial de los diferentes compuestos que se encuentran en el ambiente. Estas pruebas tienen una gran relevancia en los programas de monitoreo ambiental, donde estos experimentos son empleados por diferentes agencias de vigilancia ambiental, para determinar las fuentes, los efectos y la toxicidad de los compuestos provenientes en las descargas industriales y urbanas.

DEFINICIONES

Concentración letal media (CL_{50}): es la concentración de una sustancia que causa el 50 % de la mortalidad a un grupo de organismos durante un período de experimentación.

Muerte: un pez es considerado muerto si no se observa algún movimiento en sus opérculos, branquias y si no responde cuando la aleta caudal es tocada.

Prueba estática: es la prueba efectuada para evaluar la CL_{50} en donde la solución en donde se encuentran los peces (agua) no es cambiada durante el experimento.

Sustancia estándar: sustancia que es utilizada para comprobar y confirmar las condiciones de la prueba (verificar si hay reproducibilidad).

INFRAESTRUCTURA EN EL LABORATORIO

La infraestructura de laboratorio recomendada e indispensable para llevar a cabo estas pruebas de toxicidad es la siguiente: cuarto húmedo, zona de estanquería, área estéril y campana de extracción para trabajar con seguridad los compuestos tóxicos.

MATERIAL

Los materiales utilizados para realizar esta prueba de toxicidad estática son muy sencillos y fáciles de conseguir. Algunos ejemplos del material empleado son: cristalería, guantes, bata y anteojos, instrumentos menores, como pipetas automáticas, espátulas, frascos, viales, papel aluminio, mangueras y piedras aireadoras, hielera, hielo, bolsas de desechos, etc., depósito para los

desechos tóxicos, depósito para el material biológico empleado, redes para peces, alimento balanceado de acuerdo a la talla del pez y caretas, guantes y demás equipo de seguridad.

EQUIPO

Aún cuando esta prueba se considera de bajo costo, existen algunos equipos que son necesarios para garantizar la reproducibilidad y el éxito de los experimentos. Dentro de los equipos indispensables podemos mencionar a los siguientes: oxímetro, potenciómetro, termómetro de precisión, baño ultrasónico, refrigerador, balanza analítica, microjeringas y micropipetas, acuarios o tanques, hechos con materiales inertes o de vidrio para evitar la adsorción de los contaminantes, bombas de aireación y balanza granataria.

REACTIVOS

Los compuestos y reactivos que se deben emplear son de alta calidad y de preferencia con una pureza del 100%. Esto para evitar que los compuestos problema contengan alguna impureza que pueda interferir con los resultados. Existen diferentes proveedores de reactivos que tienen en sus catálogos reactivos de alta calidad o totalmente puros. Este es el caso de compañías como: Sigma, Aldrich, Merck, J.T. Baker, etc.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Para la preparación de las soluciones de trabajo y las stock es indispensable disolver las sustancias de prueba en agua deionizada. En el caso de los compuestos que tienen una baja solubilidad en el agua, éstos deben ser disueltos de preferencia por medio de un ultrasonido o por otros medios físicos. El pH de las soluciones stock debe ser ajustado antes de iniciar la prueba.

El ensayo se debe realizar sin ajustar el pH en el agua de los tanques, en el caso de encontrarse con algún cambio en el pH, el experimento debe ser repetido nuevamente. Por otro lado, también es de suma importancia considerar la cantidad de compuesto problema a evaluar, ya que se debe tener mucha atención para que este compuesto no reaccione químicamente con el agua y se precipite.

CONSERVACIÓN DE LAS SOLUCIONES

Es recomendable preparar las soluciones antes de iniciar los experimentos. De preferencia, deben ser almacenadas y refrigeradas en frascos o tubos especiales de color ámbar para almacenar estándares químicos para evitar así la evaporación y degradación de los compuestos.

TIEMPO MÁXIMO DE CONSERVACIÓN

El tiempo máximo de conservación de una solución de trabajo depende del tipo de compuesto problema que se esté evaluando, así como del medio en el que se encuentre. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, es recomendable prepararlo al momento de iniciar la prueba.

ORGANISMOS DE PRUEBA

ORIGEN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Los organismos que se utilizan para estas pruebas toxicológicas pueden ser obtenidos de granjas acuícolas privadas o gubernamentales, de centros educativos, centros de investigación y, dependiendo del objetivo del proyecto, podrán ser colectados en el campo, siempre y cuando en esa zona no exista algún contaminante o el compuesto problema que se pretende evaluar.

Para este caso, es muy recomendable coleccionar los organismos de sitios libres de contaminación, como es el caso de lugares que son refugios protegidos o en sitios donde haya poca actividad antropogénica. Por otro lado, para realizar estas pruebas toxicológicas es muy recomendable obtener y utilizar crías de peces de una misma camada, para disminuir la variabilidad de las respuestas biológicas de los organismos expuestos a los compuestos problema.

CARACTERÍSTICAS DE LOS ORGANISMOS PARA INICIAR EL CULTIVO O LA PRUEBA

Para iniciar las pruebas de toxicidad, los organismos deben ser seleccionados de acuerdo a su talla (3 a 5 cm de longitud total) y, en algunos casos, dependiendo de los objetivos del ensayo, deben seleccionarse sólo macho o hembras.

Por otro lado, se debe asegurar que los organismos utilizados para la experimentación estén libres de enfermedades y parásitos y que, bajo ninguna circunstancia, sean empleados para un segundo experimento.

CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS

Una vez que las hembras han desovado a sus crías, éstas deben separarse lo antes posible con la ayuda de una malla, para evitar que sean consumidas por los peces más grandes. Los alevines se pueden colocar en estanques de 100 a 500 L con agua sin cloro y de preferencia es recomendable alimentarlos a libre demanda con alimento fino balanceado según su talla.

Cuando los alevines han adquirido un tamaño de aproximadamente 2 cm, éstos se pueden transportar a otros estanques con temperatura y luz controlada y con un sistema de circulación de agua y aireación continua. De la misma manera, es indispensable que los organismos se alimenten tres veces al día.

Las condiciones óptimas de luz y temperatura para la experimentación con tilapias, carpas y cíclidos son de 12 a 14 horas de luz, con una temperatura constante entre 21 y 25 °C. El oxígeno disuelto en el agua, es uno de los principales parámetros que debe ser monitoreado para garantizar el buen desarrollo del experimento. Para garantizar un buen resultado con este tipo de pruebas toxicológicas, la concentración de oxígeno disuelto debe oscilar entre 5 y 6 mg/L.

Además, la concentración de nutrientes, el pH, la dureza y la alcalinidad son parámetros que también deben ser vigilados antes de iniciar el experimento. Los valores ideales para la aclimatación de los peces, se muestran en la tabla 11.1.

Cabe destacar que la dureza y la alcalinidad, indicadas en tabla 11.1, son altas debido a las condiciones hidrológicas que prevalecen en la Península de Yucatán. Por tal razón, estos parámetros tendrán que ajustarse dependiendo de la región donde se realice el experimento. Dado que estos parámetros también pueden variar constantemente, dependiendo de la calidad del agua de cada lugar, es indispensable realizar un estudio previo al experimento para conocer las condiciones generales de la calidad del agua.

Tabla 11.1. Condiciones recomendadas para la aclimatación de tilapias, carpas y cíclidos de la Península de Yucatán

Amonio (mg/L)	Nitrito (mg/L)	Nitrato (mg/L)	Fosfato (mg/L)	Silicato (mg/L)	pH	Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)	Dureza (mg CaCO ₃ /L)
0.097	0.008	2.523	1.113	16.321	8.03	339	442

LIMPIEZA

Todos los días, por la mañana, se deben sifonear los acuarios con una manguera delgada para eliminar los residuos orgánicos provenientes de los desechos del metabolismo de los peces. El agua que se recupere debe ser filtrada con una malla, para retener el material de desecho, y el agua filtrada se debe colocar en un envase de vidrio previamente lavado. Posteriormente, el agua del envase debe regresarse al acuario de donde fue extraída, ese procedimiento evita hacer recambios de agua durante el experimento.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

PREPARACIÓN DEL MATERIAL ANTES DE LA PRUEBA

Antes de iniciar el experimento, se debe lavar perfectamente toda la cristalería y materiales con agua destilada y deionizada. En el caso de los acuarios, éstos deben ser lavados solamente con agua potable y posteriormente se llenan con agua, se tapan y se les adiciona un flujo continuo de aire. Por ningún motivo los estanques deben ser lavados con disolventes, detergentes u otros compuestos abrasivos que puedan interferir con los resultados del ensayo.

Es importante considerar que los acuarios que son empleados para el grupo control deben tener, sin excepción alguna, el mismo manejo que los acuarios que son utilizados para los tratamientos.

CALIBRACIÓN DE EQUIPOS

El buen mantenimiento y una buena calibración de los equipos (balanzas, oxímetros, potenciómetros y sistemas de aireación) garantizan la obtención de buenos resultados. Por tal razón, es recomendable mantener siempre calibrados los equipos y verificar su funcionamiento antes de iniciar el ensayo.

ACLIMATACIÓN DE LOS ORGANISMOS

El período de aclimatación debe ser de al menos 12 días antes de iniciar la prueba toxicológica. Los peces deben estar sanos, libres de parásitos y, como se mencionó, no deben haber sido utilizados antes.

Es indispensable que los peces que se encuentran en el proceso de aclimatación se mantengan en las mismas condiciones ambientales (temperatura, calidad de agua, flujo de aire, etc.) durante el período de experimentación.

Los peces deben ser alimentados al menos una vez por día; sin embargo, la alimentación se debe suspender 24 horas antes del inicio del experimento. Durante el experimento no debe suministrarse a los peces ningún tipo de alimento.

Por otro lado, es importante registrar el número de peces que mueren durante el proceso de aclimatación. En caso de que la mortalidad de los peces exceda el 10 % del total de los organismos, es necesario volver a iniciar este proceso, pues es muy probable que durante la fase de experimentación también se presente una tasa de mortalidad alta, no asociada a los tratamientos.

DESARROLLO DE LA PRUEBA

Tanto en los controles como en los tratamientos se utilizan acuarios de vidrio de 60 x 40 x 40 cm con un volumen total de agua de 70 a 80 L. En cada acuario se colocan 12 crías de peces de entre 3 y 5 cm de longitud total.

Las condiciones de temperatura, régimen de iluminación y calidad del agua son las mismas descritas para la aclimatación, excepto los niveles de oxígeno disuelto en el agua, los cuales deben mantenerse por encima del 60 % de la saturación.

Para la prueba se deben utilizar al menos cinco concentraciones geométricas, un control positivo y otro negativo, y en algunos casos, también es necesario contar con un control que lleve el mismo vehículo en el cual fue preparado el compuesto problema añadido a los tratamientos. Todo lo anterior se prepara por triplicado.

Los peces no deben ser alimentados durante el proceso de experimentación. Asimismo, es necesario evitar el estrés en los organismos, ya que en la literatura se describe que el estrés puede interferir y cambiar el comportamiento de los peces, influyendo de esta manera en los resultados de los ensayos.

La prueba tiene una duración de hasta 96 horas, y es deseable que al iniciar el experimento los investigadores verifiquen el estado de salud de los peces cada tres horas, anotando los cambios fisiológicos y de comportamiento que sean visibles, como: falta de movimiento, consumo de oxígeno, pigmentación, pérdida de equilibrio, etc.

Todas las mañanas se deben sifonear los acuarios, ayudándose con una manguera delgada para eliminar los residuos orgánicos, de la misma manera descrita en la aclimatación.

CRITERIO PARA EVALUAR LA RESPUESTA

Los peces deben ser observados durante todo el tiempo de experimentación. El criterio utilizado para considerar a un pez muerto es cuando se observa la carencia de movimiento, especialmente si no existe movimiento en el opérculo branquial. También puede ser detectado si al tocarle la aleta caudal, no existe respuesta alguna.

Los peces considerados como muertos, se deben retirar inmediatamente del acuario y se deben depositar en una bolsa especial de material de desecho biológico y tóxico, Por ninguna razón se debe dejar o desechar estas bolsas en un depósito de basura tradicional doméstica.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los registros de la mortalidad para cada período de exposición son expresados en porcentaje y pueden ser graficados contra la concentración de la sustancia, en una hoja de papel con escala logarítmica. También se pueden utilizar los procedimientos estadísticos para calcular las CL_{50} de cada período de exposición. Los límites de confianza ($p = 0.95$) para los valores de las CL_{50} son determinados usando diferentes programas estadísticos como Statistica.

REPORTE DE LA PRUEBA

El reporte de la prueba toxicológica debe incluir la siguiente información:

- Compuesto tóxico evaluado
- Propiedades físicas
- Propiedades químicas
- Propiedades naturales
- Datos de identificación.
- Especie de pez utilizado
- Nombre científico
- Tamaño
- Sexo
- Condiciones del experimento
- Procedimiento utilizado (por ejemplo estático, semiestático o con flujo)
- Características de la calidad del agua
- Concentraciones de oxígeno, temperatura y pH

Métodos de preparación de las soluciones
 Concentración empleada
 Número de peces tratados en cada acuario
 Expresión de los resultados
 Resultados con valores de las máximas concentraciones que no causaron mortalidad.
 Resultados con las mínimas concentraciones que causaron 100 % de mortalidad.
 Mortalidad acumulativa.
 Valores de las CL50.
 Gráficas con las curvas de concentración-mortalidad.
 Procedimientos estadísticos para obtener los valores de las CL50.
 Mortalidad en los controles
 Incidentes u observaciones durante el experimento
 Anormalidades o afectación en los peces por la exposición a las sustancias evaluadas

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para que el experimento sea validado, la mortalidad de los peces control no debe exceder el 10%, en caso de que este porcentaje de mortalidad sea mayor, se debe suspender el experimento.

También, se deben tener evidencias de que la concentración de la sustancia que se está evaluando se ha mantenido al menos en un 80 % de la concentración nominal durante el desarrollo de la experimentación. En caso de que la concentración nominal sea menor de un 80 %, los resultados deberán ser ajustados a las concentraciones medidas en el experimento.

Tabla 11.2. Condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad aguda con crías y juveniles de tilapia, carpa y cíclidos

Tipo de ensayo	Estático
Aclimatación	12 días antes de iniciar el experimento
Recambios de agua	Ninguno
Temperatura	23 ± 2 °C
Fotoperíodo	12 a 14 horas luz : 10 a 12 horas oscuridad
Volumen de los acuarios	70 a 80 L
Número de peces por acuario	12
Tamaño de los peces	3 a 5 cm

(Continúa)

Tabla 11.2. Condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad aguda con crías y juveniles de tilapia, carpa y cíclidos (*continúa*)

Número de réplicas	3
Duración de la prueba	96 horas
Efecto medido	CL ₅₀ , mortalidad (%) o sobrevivencia (%)
Validación del método	Control positivo y negativo de acuerdo a los valores admitidos en las cartas control Mortalidad de peces control (menor al 10%)

BIBLIOGRAFÍA

- Finney D.J. 1978. *Statistical Methods in Biological Assay*. Griffin, Weycombe, Gran Bretaña.
- Litchfield J.T. y F. Wilcoxon. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 96, 99-113.
- Organization for the Economical Cooperation and Development. 1992. *OECD Guideline for testing of chemicals*. Fish acute, Toxicity Test 203. Adopted by council July 1992.
- Passino, D. R. M. y S. B. Smith. 1987. Acute bioassays and hazard evaluation of representative contaminants detected in Great Lakes fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 6: 901-907.
- Peltier, W.H. y C.I. Weber. 1985. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms*. EPA 600/4-85-013. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, EE.UU.
- Pramanik, A. y S.K. Sarkar. 1987. Comparative study of the sensitivity of egg, spawn and fry of *Cyprinus carpio* exposed to ammonium sulphate at different temperatures. *Geobios* 14: 229-230.
- Rand, G.M. y S.R. Petrocelli, eds. 1985. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications*. Hemisphere Publishing, Nueva York, EE.UU.
- Russo, R.C. y R.V. Thurston. 1977. The acute toxicity of nitrite to fishes. En: *Recent advances in fish toxicology - a symposium*. EPA 600/3-77-085. U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR, pp. 118-131.
- Sprague J.B. 1969. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. *Water Research* 3: 793-821.
- . 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. *Water Research* 4: 3-32.
- Sprague, J.B. y A. Fogels. 1977. Watch the Y in bioassay. En W.R. Parker, E. Pessah, P.G. Wells, y G.F. Westlake, (eds.). *Proceedings of the 3rd Aquatic Toxicity Workshop*. Halifax, NS, Canada, November 2-3, pp. 107-118.

- Springborn Bionomics, Inc. 1986. 96-hour acute (LC50) with rainbow trout. Contract Report BW-86-10-2044. Wormald DCN, Thurso, Canadá.
- Stephan C.E. 1977. Methods for calculating an LC50. En: F.I. Mayer y J.L. Hamelink (eds.). *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. ASTM STP 634, pp 65-84, American Society for Testing and Materials.
- Zar, J. H. 1974. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ, EE.UU.

Segunda parte

*Ensayos para agua
marina o salobre*

ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON CAMARONES PENEIDOS

*Cecilia Vanegas Pérez, Gabriela Gaxiola Cortez,
Cecilia Robles Mendoza, Sebastián Zúñiga Lagunas
y Miguel Betancourt Lozano*

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: AE

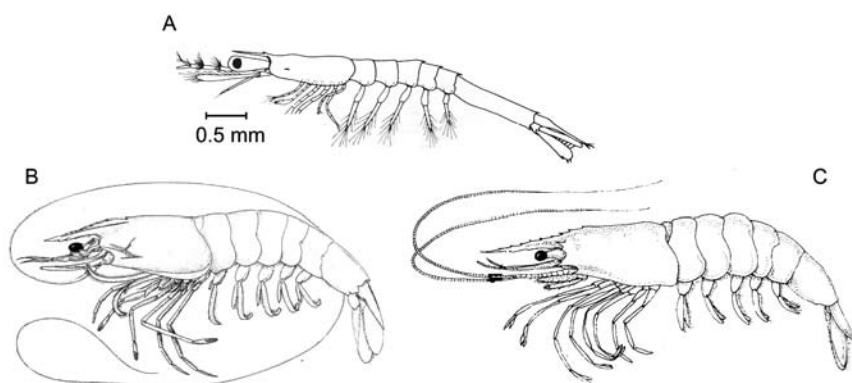
PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Este ensayo se centra en la evaluación de la toxicidad aguda de compuestos en agua en postlarvas (PL) (figura 12.1A) y juveniles de los camarones peneidos, haciendo énfasis en los camarones blancos *Litopenaeus setiferus* y *Litopenaeus vannamei* (figura 12.1 B y C). Estos estadios se proponen como organismos de prueba para evaluar el efecto tóxico de contaminantes en ambientes lagunares-estuarinos.

Los camarones *L. setiferus* y *L. vannamei* se distribuyen en el Golfo de México y en el Pacífico mexicano, respectivamente. Pérez-Farfante y Kensley (1997) reclasificaron estas especies dentro del género *Litopenaeus* por presentar telicum abierto en el caso de las hembras, y petasma con una costa ventral corta en el caso de los machos. Ambas especies presentan una reconocida importancia comercial, a la vez que desempeñan un papel ecológico relevante

en el ecosistema marino y en los ambientes lagunares-estuarinos. *L. vannamei* ha sido ampliamente cultivado a nivel mundial, mientras que estudios recientes demuestran el elevado potencial de *L. setiferus* como especie cultivable en México. La reproducción de ambas especies bajo condiciones de laboratorio ha sido exitosa en el país, lo cual garantiza el suministro constante de especímenes. Numerosa literatura ha sido reportada para *L. vannamei* en contraste con la generada para *L. setiferus*; no obstante, estudios recientes han abordado la fisiología, nutrición, reproducción y ecología de esta última especie (Gaxiola, 1994; Rosas *et al.*, 1995a y 1995b; Brito, *et al.*, 2000; Brito, 2001; Gallardo, 2005). Evidencia directa demuestra que las postlarvas y juveniles de las especies son sensibles al efecto tóxico de compuestos nitrogenados (Alcaraz *et al.*, 1997, 1999a y 1999b; Robles, 1997; Frias-Espericueta *et al.*, 2000), a los metales pesados (Zúñiga, 2002; Vanegas, 1996; Frias-Espericueta *et al.*, 2001), a plaguicidas y bifenilos policlorinados (Galindo *et al.*, 1996; Reyes *et al.*, 2002 y 2003; Comoglio *et al.*, 2005; Roque *et al.*, 2005; Betancourt *et al.*, 2006; García de la Parra *et al.*, 2006) y a fluidos de perforación del petróleo (Nuñez, 2002).

Figura 12.1. Morfología de *Litopenaeus setiferus* y *Litopenaeus vannamei*. A) Primera postlarva de camarones peneidos (esquema reproducido de Dobkin, 1970), B) camarones adultos de *Litopenaeus setiferus* y C) camarones adultos de *Litopenaus vannamei* (esquemas reproducidos de Dore y Frimodt, 1987 y Williams, 1984)



En los ensayos agudos, la respuesta final a evaluar es la mortalidad de los organismos, al cabo de un tiempo determinado de exposición a compuestos tóxicos. La importancia de estos bioensayos obedece a que permiten evaluar

la sensibilidad de los organismos a la muestra o compuesto problema en estudio en un tiempo relativamente corto, en relación con la duración del estadio de vida de los organismos. La sensibilidad de los organismos se determina a través de la estimación de la concentración letal media durante el tiempo (x) de la exposición (CL_{50} -xh).

MATERIAL

Acuarios de vidrio de 4, 40 y 60 L. Cristalería: vasos de precipitados, matraces Erlenmeyer, probetas, etc. Espátulas. Accesorios de acuario: mangueras, piedras aireación, redes, etc. Alimento para los organismos: Alimento formulado particulado con porcentaje de proteína del 40%.

EQUIPO

Balanza analítica; pipetas de diferentes volúmenes (por ejemplo pipetas automáticas de 5 μ L-50 μ L, 50 μ L-100 μ L, 100 μ L-1000 μ L); oxímetro; potenciómetro; termómetros; refractómetro-salinómetro; sistema de filtración mecánica, UV y biológica; sistema de aireación continua; sistema para el control del fotoperíodo; sistema de acuarios para el mantenimiento de los organismos, y equipo para la determinación de amonio total y nitrito (por ejemplo espectrofotómetro, electrodos, etc.)

REACTIVOS

Compuesto tóxico de referencia: dodecil sulfato de sodio, cloruro de cadmio o sulfato de cobre. Sal para preparación de agua de mar artificial. Reactivos para las técnicas de determinación de amonio total y nitrito (por ejemplo azul de indofenol y sulfanilamida)

ORGANISMOS DE PRUEBA

ORIGEN DE LOS ORGANISMOS

Los organismos para las pruebas, en etapa de larva o postlarva, deben de provenir de laboratorios de producción de postlarvas de reconocida calidad. Para garantizar la calidad de los organismos debe conocerse el manejo previo de los reproductores, el mantenimiento previo de los organismos a

ser utilizados en los bioensayos (patrón y dinámica de alimentación, parámetros fisicoquímicos, densidad, pruebas de calidad, etc.), así como las condiciones de su transporte (parámetros fisicoquímicos, densidad, edad, tamaño, peso, etc.) al laboratorio donde se efectuarán las evaluaciones. Los lineamientos que se señalan a continuación se circunscriben a los estadios de postlarva y juvenil.

ACLIMATACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS

A su llegada al laboratorio, los organismos deben ser mantenidos al menos durante los primeros cinco días en las condiciones de recepción. Los parámetros fisicoquímicos de temperatura y salinidad deben ser ajustados, respectivamente, a una tasa de 1 °C y 1 ups por día, hasta alcanzar las condiciones de evaluación requeridas, siempre dentro de los intervalos óptimos para cada estadio y para cada especie (tabla 12. 1). Una vez alcanzadas las condiciones adecuadas, los organismos deben ser mantenidos en éstas al menos durante cinco días antes de los ensayos.

Tabla 12.1. Parámetros fisicoquímicos para el mantenimiento de diferentes estadios de *Litopenaeus setiferus* y *Litopenaeus vannamei* en condiciones de laboratorio

Especie	Estadio	T (°C)	S (ups)	pH	O.D. (mg O ₂ /L)	N-NH ₃ (mg/L)	N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	Densidad (org/L)	Referencia
<i>L. setiferus</i>	PL 9	25	30-35	8.4	≥ 5.0	< 0.2	< 5	2 1, 2, 3, 4, 5	
	PL 20-30	28	25-28	8.4	≥ 5.0	< 0.2	< 5	2 1, 2, 5, 6, 7, 8	
	Juveniles >30 días	28	25-28	8.4	≥ 5.0	< 0.2	< 5	1 1, 2, 5, 6, 7, 8	
<i>L. vannamei</i>	PL 20-30	28	25-28	8.4	≥ 5.0	< 0.2	< 5	2 8	
	Juveniles >30 días	28	25-28	8.4	≥ 5.0	< 0.2	< 5	1 8	
	Juveniles 1.6 ± 0.1 g PH		28	30-35	8.1	≥ 5.0	< 0.2	< 5 1	6

1 Alcaraz *et al.*, 1999a. 2 Alcaraz *et al.*, 1999b. 3 Brito *et al.*, 2000. 4 Brito, 2001. 5 Gaxiola, 1994. 6 Nuñez, 2002. 7 Pascual *et al.*, 2004. 8 Piña, 2001. 9 Robles, 1997.

T: temperatura, S: salinidad, O.D.: oxígeno disuelto, PL-x: días después de la última metamorfosis de larva a postlarva, PH: peso húmedo.

De preferencia los organismos deben ser mantenidos en sistemas con filtro biológico y agua de mar artificial (o reconstituida), o bien en sistemas de flujo de agua marina natural proveniente de áreas no contaminadas, previamente filtrada con filtro mecánico, carbón activado y UV, y garantizando las condiciones de calidad de la misma. El agua utilizada no debe estar en contacto con bombas o tubería metálica. El agua de mar debe mantenerse en aireación intensa al menos 24 horas antes de su uso, de tal manera que se garantice la completa solubilidad de las sales, en el caso de agua de mar reconstituida, y de los niveles de oxígeno disuelto a saturación (>5.0 mg/L). Las condiciones anteriores deben ser tanto para el mantenimiento de los organismos, como para las pruebas experimentales. Durante la etapa de mantenimiento y aclimatación, el fotoperíodo se debe mantener en 12 horas luz :12 horas oscuridad. Diariamente se deben registrar, controlar y regular los parámetros fisicoquímicos.

Los esquemas de alimentación para estadios tempranos de *L. setiferus* y *L. vannamei* (misis a PL7-10) han sido establecidos por Brito *et al.* (2000) y Brito (2001), incluyendo en la dieta nauplios de *Artemia*, *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis chuii* y alimento microparticulado formulado, de acuerdo a las necesidades específicas proteicas de los diferentes estadios tempranos. Asimismo, se han establecido los patrones de alimentación para postlarvas y juveniles tempranos de *L. setiferus* y *L. vannamei*, de acuerdo a los requerimientos nutricionales de los estadios de cada especie, que garantizan una condición fisiológica óptima (tabla 12.2).

Estudios recientes demuestran el desarrollo y crecimiento exitoso desde postlarvas tempranas (a partir de PL 5) hasta juveniles de *L. setiferus* y *L. vannamei*, mantenidos bajo condiciones controladas de laboratorio con alimento particulado formulado comercial (40% proteína) (Gaxiola, 2006; datos no publicados). Por tal motivo, se recomienda para la alimentación de las postlarvas y los juveniles de ambas especies, el suministro de alimento comercial de reconocida calidad, garantizando un aporte proteico mínimo constante del 40% (por ejemplo Malta Cleyton; Purina), considerando los tamaños de partícula y la frecuencia de alimentación específicas para cada estadio (tabla 12.3).

Durante las etapas de aclimatación y de mantenimiento, la evaluación de los niveles de nitrógeno del amoníaco (N-NH₃; mg/L) y del nitrógeno de nitrito (N-NO₂; mg/L) debe efectuarse de manera rutinaria, para definir el nivel y frecuencia de recambio de agua y evitar la acción tóxica de estos compuestos sobre los organismos, debido a su acumulación (Robles, 1997; Alcaraz *et al.*,

Tabla 12.2. Patrones de alimentación para diferentes estadios del camarón blanco

Especie	Estadio	Alimento formulado y particulado, % proteína	Suministro	Complemento	Referencia
<i>L. setiferus</i>	PL 9	60	<i>Ad libitum</i>	Nauplios <i>Artemia</i> sp.; 40 n/d/org	1, 2, 3, 4, 5
	PL 20-25 10.0±0.7 mg PH	40	<i>Ad libitum</i> 2-3 veces/d	Nauplios <i>Artemia</i> sp.; 10 n/d/org	1, 2, 5, 6, 7, 9
	Juveniles 30 a 40 días 43.8±4.8 mg PH	40	10% PHc 2-3 veces/d	No	1, 2, 5, 6, 7, 9
<i>L. vannamei</i>	PL 20-25 16.8±0.8 mg PH	40	<i>Ad libitum</i> 2-3 veces/d	Nauplios <i>Artemia</i> sp.; 10 n/d/org	8
	PL 40-45 80.5±4.0 mg PH	0	10% PHc 2-3 veces/d	No	8
	Juveniles 1.6 ±0.1 g PH	35 – 40	10% PHc 2-3 veces/d	No	6
		4			

PH: peso húmedo; PHc: peso húmedo corporal.

1Alcaraz *et al.*, 1999a. 2Alcaraz *et al.*, 1999b. 3 Brito *et al.*, 2000. 4 Brito, 2001. 5 Gaxiola, 1994. 6 Nuñez, 2002. 7 Pascual *et al.*, 2004. 8 Piña, 2001. 9 Robles, 1997.

1999a). La evaluación de los niveles del nitrógeno del amonio total (N-AT; mg/L) y del nitrito puede realizarse a través de los métodos de azul de indofenol y de sulfanilamida, respectivamente (Rodier, 1981). La determinación de las concentraciones de N-NH₃ se obtiene a través de las ecuaciones señaladas por Bower y Bidwell (1978) (anexo 12.1, ecuación 1), considerando la salinidad, la temperatura y el pH de la solución experimental.

Los organismos deben ser revisados constantemente a lo largo de los períodos de aclimatación y mantenimiento, y en caso de que se observe una mortalidad mayor al 20%, señales de enfermedad o comportamiento alterado, el lote deberá ser descartado para experimentación.

Tabla 12.3. Patrón de alimentación para postlarvas y juveniles de *Litopenaeus setiferus* y *Litopenaeus setiferus* (Gaxiola, 2006; datos no publicados)

Estadio	Alimento formulado y particulado, % proteína	Tamaño de partícula (µm)	Suminsitro
PL 5 a PL 30	40	250 - 350	<i>Ad libitum</i>
PL 30 a PL 50*	40	500	<i>Ad libitum</i>
> PL 50*	40	0.5 a 1.0 cm	2-3 veces/d 10% PHc 2-3 veces/d

PHc: peso húmedo corporal.

*PL 50: juveniles de 50 días de edad después de la última metamorfosis de larva a postlarva.

COMPUESTOS TÓXICOS DE PRUEBA

Para evaluar la toxicidad aguda de compuestos aislados, éstos deben tener un elevado grado de pureza (grado reactivo). Si el compuesto tóxico de prueba (compuesto aislado o extracto) es soluble en agua, la solución madre debe ser preparada en agua deionizada. Si el compuesto tóxico es estable en solución, debe prepararse una solución madre única al inicio de las pruebas. Si el compuesto tóxico no es estable en solución (sujeto a oxidación u otras transformaciones químicas o biológicas) una nueva solución debe prepararse previo a su uso. Si el compuesto tóxico no es soluble en agua, una solución acuosa madre debe ser obtenida por la solución inicial del compuesto en un disolvente acarreador (por ejemplo acetona, etanol, propilen-glicol, etc.). En este caso, se debe considerar un testigo del disolvente en las pruebas experimentales, evaluando la cantidad máxima adicionada. Si se evalúan mezclas complejas (por ejemplo efluentes, lodos, etc.), la mezcla inicial será considerada como la “solución madre” (100%), a partir de la cual se efectuarán las diluciones experimentales correspondientes.

El volumen máximo que se adiciona de la solución madre a los acuarios experimentales debe ser el menor posible, de modo que no modifique las características del medio experimental (por ejemplo volumen, salinidad, pH), preferentemente no mayor del 0.5% respecto al volumen total. La concentración de los compuestos tóxicos debe ser determinada analíticamente en submuestras del medio al menos al inicio y al término de los bioensayos. Sin

embargo, si se presumen transformaciones o cambios en las concentraciones de los compuestos tóxicos se deben evaluar las concentraciones reales durante el transcurso de las pruebas. Si se efectúan recambios del medio, se deben evaluar las concentraciones reales antes y después del recambio.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

CÁMARAS EXPERIMENTALES

Los bioensayos deben ser de tipo estático o semi-estático dependiendo del suministro, la calidad del agua, de la estabilidad del compuesto en estudio y de los estadios de los organismos en evaluación. Si el agua de mar es natural, ésta debe proceder preferentemente de un sistema continuo de bombeo de agua de mar y ser previamente filtrada (filtración mecánica, química y UV), fuertemente aireada y mantenida en oscuridad al menos 48 h antes de su uso. Alternativamente, se utiliza agua de mar artificial preparada según ensayos convencionales, fuertemente aireada y decantada en oscuridad al menos 24 horas antes de su utilización. Los acuarios experimentales deben ser preferentemente de vidrio, lavados previamente con detergente libre de fosfatos y disolventes, posteriormente con HCl al 10% y enjuagados perfectamente bien con agua corriente y con agua de mar antes de su uso (UNEP, 1986). La forma de las cámaras depende de los estadios bajo análisis; en el caso de los juveniles de los camarones, el área es un aspecto de importancia dado el hábito bentónico de los organismos. El volumen de las cámaras debe considerar la edad y el peso de los organismos. Se recomienda utilizar de 1 a 2 L de solución por gramo de tejido animal.

PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS

En el transcurso de las pruebas deberán registrarse y mantenerse constantes la salinidad, el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto (la aireación debe ser constante, con burbujeo fino); los niveles de amonio y de nitrito no deberán exceder los señalados en las tablas 12.5 a 12.7. El fotoperíodo se mantendrá en 12 horas luz: 12 horas oscuridad.

ALIMENTACIÓN

Los organismos no deben ser alimentados 24 horas antes del desarrollo de las pruebas, a fin de evitar interferencia de los procesos digestivos (Alcaraz *et*

al., 1999a y 1999b; Frias-Espericueta *et al.*, 2000). Dependiendo del tiempo de exposición y de los objetivos de las pruebas, los organismos serán o no alimentados durante el transcurso de éstas. Si los organismos son alimentados, el suministro debe ser de manera ideal una vez al día, retirando el alimento remanente después de período de alimentación adecuado para cada estadio y retirando posteriormente las heces producidas. En este caso, el agua de los acuarios debe ser recambiada diariamente, preferentemente el 75% del volumen total y las soluciones y concentración de los compuestos tóxicos deben ser ajustadas apropiadamente. En el caso del 100% de recambio se recomienda contar con series adicionales de acuarios, con las concentraciones respectivas de los compuestos tóxicos experimentales adicionados, para transferir cuidadosamente a los organismos.

ORGANISMOS DE PRUEBA

Para el inicio de las pruebas de toxicidad aguda, tanto las postlarvas como los juveniles deben presentar estadios y pesos similares y estar en etapa de intermuda. En los juveniles, el estadio de intermuda puede ser establecido a partir de la revisión al microscopio óptico del telson de los organismos (Drach y Tchernigovtzeff, 1967). Se recomienda que las pruebas se realicen con postlarvas de 20 días de edad (PL20) y con juveniles de 50 días de edad (días después de la última metamorfosis de larva a postlarva); en este último estadio el sistema digestivo está completamente desarrollado (Lovett y Felder, 1989; Lovett y Felder, 1990a, 1990b).

Los organismos deben ser pesados y medidos al final de la prueba para garantizar la homogeneidad de los grupos experimentales. Alternativamente, una sub-muestra representativa (mínimo 30 organismos) debe ser pesada y medida. Los organismos deben manipularse lo menos posible durante la totalidad del procedimiento experimental para evitar la posible influencia del estrés sobre la respuesta tóxica.

DURACIÓN DE LAS PRUEBAS Y RECAMBIO

El período de exposición depende de los objetivos que se persigan. De preferencia las pruebas se realizan durante 72 horas para postlarvas y 96 horas para juveniles. Para períodos mayores, los organismos deben ser alimentados para evitar alteraciones nutricionales o de inanición. Las soluciones de prueba deben ser renovadas al menos una vez cada 24 horas. Se deben tomar

muestras de las soluciones antes y después de los recambios para determinar analíticamente la concentración del compuesto tóxico de prueba.

PRUEBAS DE INTERVALO DE TOXICIDAD

Para estimar la toxicidad de un compuesto se deben efectuar pruebas del intervalo de toxicidad. Cuando se carece de la información relativa a la toxicidad del producto se deben utilizar progresiones de las concentraciones en escala logarítmica; cuando existe información disponible, por ejemplo en otras especies de peneidos de estadios y hábitats similares, se pueden utilizar progresiones de las concentraciones en escala aritmética. En el caso de mezclas complejas (por ejemplo efluentes, lodos, etc.) se efectúan las diluciones correspondientes (por ejemplo 10, 20, 40, 60 y 80%) a partir de la mezcla original (100%).

Se considera un mínimo de seis concentraciones experimentales y un grupo testigo sin adición del compuesto tóxico; en el caso de que el compuesto tóxico se requiera disolver, se considera un testigo del disolvente utilizado. Se considera al menos una réplica por cada concentración. En cada cámara experimental y para cada concentración se exponen un mínimo de 10 organismos. Los camarones se eligen de los sistemas de mantenimiento y se colocan al azar en los acuarios experimentales de exposición. Previo a la adición de los compuestos en estudio, los organismos se mantienen mínimo 24 horas en aclimatación en los acuarios de exposición, sin proporcionar alimento. La adición de la solución de prueba deberá efectuarse de manera muy lenta con una agitación suave (para evitar una posible exposición de los organismos a la elevada concentración de la solución madre), garantizando la completa mezcla del compuesto tóxico en el medio y cuidando de no estresar a los organismos expuestos.

La mortalidad se registra a lo largo del tiempo de exposición, con observaciones a las 0, 2, 4, 8, 12 y cada 12 horas posteriores hasta el término de la exposición. Los organismos muertos durante el período de exposición deben ser removidos lo antes posible para evitar el deterioro de la calidad del agua. Además de mortalidad, se registran cambios en el comportamiento de los camarones (por ejemplo alteraciones del equilibrio, nado errático, cambios en la actividad locomotora y en la conducta alimentaria, etc.), así como las mudas producidas. La falta de respuesta de los organismos cuando sean tocados suavemente con una varilla de vidrio se considerará como criterio de mortalidad. Si en el transcurso de las pruebas, la mortalidad de los grupos testigo excede el 10%, la prueba se invalida; el uso de factores de corrección por la mortalidad de los testigos no es válido.

PRUEBA DEFINITIVA

A partir de los resultados de las pruebas de intervalo de toxicidad, se establece el intervalo de concentraciones adecuadas para evaluar la toxicidad aguda del producto o compuesto. Se sigue el mismo procedimiento señalado previamente, si bien en este caso se debe considerar un mínimo de dos réplicas por concentración experimental. Asimismo, la mortalidad se registra a lo largo del tiempo de exposición, con observaciones a las 0, 2, 4, 8, 12 y cada 12 horas posteriores hasta el término de la exposición, la cual puede prolongarse hasta 144 h o más dependiendo de los objetivos que se persigan.

En la tabla 12.4 se integran las condiciones de prueba recomendadas para los ensayos de toxicidad con postlarvas y juveniles de *Litopenaeus setiferus* y *L. vannamei*.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

A partir de los resultados de mortalidad obtenidos se determina la concentración letal media (CL_{50-t}), esto es la concentración (X) a la cual muere el 50% de la población en un tiempo determinado (t , horas), o el tiempo mediano de muerte (TL_{50}), esto es el tiempo (t , horas) en el cual muere el 50% de la población en una concentración determinada (X). En ambos casos no se consideran en los análisis el grupo testigo (sin adición del compuesto tóxico; mortalidad < 10%) o las concentraciones en las cuales se obtuvo el 100% de mortalidad.

Para la determinación de la CL_{50} o el TL_{50} se utilizan los programas de cómputo diseñados para ello, utilizando preferentemente modelos Probit: X o Probit: $\log X$, seleccionando el modelo de mejor ajuste y estableciendo la significatividad de los modelos a través de la prueba de X^2 . En cada caso se obtendrán los valores de $CL_{50-t} \pm I.C.$ y $TL_{50-x} \pm I.C.$ (I.C. = intervalo de confianza; $\alpha = 0.05$).

VALIDACIÓN DE LAS PRUEBAS DEFINITIVAS

Los ensayos serán válidos siempre y cuando cumplan con las siguientes especificaciones:

- a) La mortalidad del grupo testigo no es mayor del 10%.
- b) La concentración real de los compuestos no excede el 20% de la concentración nominal de los mismos.

- c) La variabilidad entre las réplicas no excede el 20%.
- d) Los cálculos ($CL_{50}-t \pm I.C.$ y $TL_{50}-x \pm I.C.$) se deben realizar con las concentraciones del compuesto tóxico determinadas analíticamente.
- e) El valor calculado de la CL_{50} debe estar incluido dentro del intervalo de concentraciones experimentales y el modelo Probit debe ser significativo para asegurar la confiabilidad de los resultados.

Tabla 12.4. Condiciones recomendadas para los ensayos de toxicidad con postlarvas y juveniles de *Litopenaeus setiferus* y *Litopenaeus. vannamei*

Tipo de bioensayo	Estático o semi-estático (con recambio)
Duración del bioensayo	Postlarvas: mínimo 72 horas Juveniles: mínimo 96 horas
Fotoperíodo	12 horas luz :12 horas oscuridad
Temperatura	28 ± 1 °C
Salinidad	Postlarvas: 30 ± 1 ups Juveniles: 28 ± 1 ups
Oxígeno disuelto	≥ 5.0 mg O ₂ /L
Amonio y nitrito	< 0.2 mg N-NH ₃ /L; < 5.0 mg N-NO ₂ -/L
Edad de los organismos	Postlarvas: PL 20 (20 días de edad) Juveniles: 50 días de edad
Volumen de los recipientes de prueba	Postlarvas: 10 L Juveniles: 20 L
Número de concentraciones experimentales (excluidos los testigos)	6
Número de réplicas	Mínimo 2
Número de organismos por recipiente de prueba	10
Efecto final medido	Mortalidad: CL_{50c} o TL_{50}
Efectos adicionales medidos	Alteración en la actividad locomotora y en la conducta alimentaria
Aceptabilidad de los resultados	Mortalidad en el grupo testigo: $\leq 10\%$
Control positivo	Dodecil sulfato de sodio; CL_{50} -96h \pm I.C. <i>Litopenaeus setiferus</i> Postlarvas (PL20): 23.9 ± 2.97 mg/L Juveniles (45 d): 20.1 ± 8.05 mg/L

BIBLIOGRAFÍA

- Alcaraz, G., X. Chiapa, V. Espinosa y C. Vanegas. 1999a. Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp *Penaeus setiferus* postlarvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 30: 90-97.

- Alcaraz, G., V. Espinosa y C. Vanegas. 1999b. Acute effect of ammonia and nitrite on respiration of *Penaeus setiferus* postlarvae under different oxygen levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 30: 98-106.
- Alcaraz, G., V. Espinoza, X. Chiapa y C. Vanegas. 1997. Temperature tolerance of *Penaeus setiferus* exposed to ammonia and nitrite. *Aquatic Toxicology* 39: 345-353.
- Betancourt-Lozano, M., D. J. Baird, R.S. Sangha y F. González-Farías. 2006. Induction of morphological deformities and moulting alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles exposed to the triazole-derivative fungicide Tilt. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51: 69-78.
- Bower, C. E. y J. P. Bidwell. 1978. Ionization of ammonia in seawater: Effects of temperature, pH and salinity. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 35: 1012-1016.
- Brito, R., M. E. Chimal, G. Gaxiola y C. Rosas. 2000. Growth, metabolic rate and digestive enzyme activity in the white shrimp *Litopenaeus setiferus* early postlarvae fed different diets. *Journal of the Experimental Marine Biology and Ecology* 225: 21-36.
- Brito, R. 2001. Fisiología y bioquímica de la nutrición de postlarvas tempranas de los camarones blancos *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) y *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 57 pp.
- Comoglio, L., O. Amin, A. Roque, M. Betancourt-Lozano, D. Anguas y M. Haro. 2005. Evaluation of sublethal biomarkers in *Litopenaeus vannamei* on foodborne exposure to methyl parathion. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 66-74.
- Dobkin, S. 1970. *Manual de métodos para el estudio de larvas y primeras postlarvas de camarones y gambas*. Instituto Nacional de Investigaciones Biológico Pesqueras, México, D. F. 82 pp.
- Dore, I. y C. Frimodt. 1987. *An illustrated guide to shrimp of the world*. Van Nostrand Reinhold, Nueva York, 229 pp.
- Drach, P. y C. Tchernigovtzeff. 1967. Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie et Milieu* 18: 595-617.
- Frias-Espericueta, M. G., D. Voltolina y J. I. Osuna-Lopez. 2001. Acute toxicity of cadmium, mercury, and lead to whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67: 580-586.
- Frias-Espericueta, M.G., M. Harfush-Melendez y F. Paez-Osuna. 2000. Effects of ammonia on mortality and feeding of postlarvae shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 65: 98-103.
- Galindo-Reyes, J.G., A. Medina-Jasso y C. Villagrana-Lizarraga. 1996. Toxic effects of organochlorine pesticides on *Penaeus vannamei* shrimps in Sinaloa, Mexico. *Chemosphere* 33: 567-575.

- Gallardo, P. 2005. Alimentos artificiales con hidrolizados proteicos de origen marino en la nutrición de larvas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, D. F., 146 pp.
- García-de la Parra, L.M., J.C. Bautista-Covarrubias, N. Rivera-de la Rosa, M. Betancourt-Lozano y L. Guilhermino. 2006. Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65: 372-380.
- Gaxiola, G. 1994. Requerimientos nutricionales de las postlarvas de *Penaeus setiferus* y *Penaeus duorarum* (Crustacea, Penaeidea). Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 110 pp.
- Lovett, D.L. y D. L. Felder. 1989. Ontogeny of gut morphology in the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda, Penaeidae). *Journal of Morphology*. 201: 253-272.
- Lovett, D.L. y D.L. Felder. 1990a. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biological Bulletin* 178: 144-159.
- Lovett, D.L. y D. L. Felder. 1990b. Ontogenetic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biological Bulletin* 178: 160-174.
- Núñez, R. 2002. Efecto letal y subletal de un fluido de perforación polimérico en postlarvas y juveniles de *Litopenaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda). Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 78 pp.
- Pascual, C., E. Centeno, G. Cuzon, J. Suarez, A. Sánchez, G. Gaxiola, G. Taboada, T. Maldonado y C. Rosas. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary proteins. *Aquaculture* 239: 375-395.
- Pérez-Farfante, I. 1970. *Claves ilustradas para la identificación de camarones de la América Latina*. Instituto Nacional de Investigaciones Biológicas, México, 48 pp.
- Pérez-Farfante, I. y B. Kensley. 1997. *Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world*. Editions du Muséum, París, 233 pp.
- Piña, L. 2001. Tolerancia al amonio, nitrito y oxígeno disuelto en postlarvas y juveniles de *Litopenaeus setiferus* y *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Tesis de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 60 pp.
- Reyes, J.G., L. Dalla-Venezia y M.G. Alvarez. 2002. Effect of some organophosphorus pesticides on oxygen consumption of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52: 134-136.
- Reyes, G.G., J.M. Verdugo, D. Cassin y R. Carvajal. 2003. Pollution by polychlorinated biphenyls in an estuary of the Gulf of California. Their toxicity and

- bioaccumulation in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Marine Pollution Bulletin* 46: 959-963.
- Robles, C. 1997. Alteraciones fisiológicas de postlarvas y juveniles de camarón blanco *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda) por efecto del amoniaco. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 38 pp.
- Rodier, J. 1981. *Análisis de las aguas*. Omega, Barcelona, 504 pp.
- Roque, A., S. Abad, L.M. Garcia de la Parra, D. Baird, A.L. Guerra-Flores, B. Gomez-Gil y Betancourt-Lozano. 2005. Evaluation of the susceptibility of the cultured shrimp *Litopenaeus vannamei* to vibriosis when orally exposed to methyl parathion. *Chemosphere* 60: 126-134.
- Rosas, C., A. Bologaro-Crevenna, A. Sánchez, G. Gaxiola, I. Soto y E. Escobar. 1995a. Role of digestive gland in the energetic metabolism of *Penaeus setiferus*. *Biological Bulletin* 189: 168-174.
- Rosas, C., A. Sánchez, P. Gallardo, J. Quiroz, G. Gaxiola, E. Diaz y L. Soto. 1995b. Oxygen consumption and ingestión rate of *Penaeus setiferus* larvae fed *Chaetocerus ceratosporum*, *Tretaselmis chunii* and *Artemia nauplii*. *Aquaculture Nutrition* 1: 13-20.
- United Nations Environmental Program (UNEP) 1986. *Test of the acute lethal toxicity of pollutants to marine fish and invertebrates*. Reference Methods for Marine Pollution Series. No. 43. UNEP/FAO/IAEA.
- Vanegas, C. 1996. Efectos subletales del cadmio y del zinc en el camarón blanco *Penaeus setiferus*. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 118 pp.
- Zúñiga, S. 2002. Efecto del cadmio en la osmorregulación de juveniles de *Litopenaeus setiferus*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 92 pp.
- Williams, A. 1984. *Shrimps, lobsters, and crabs of the atlantic coast of the eastern United States*. Maine to Florida. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 550 pp.

Anexo 12.1. Cálculos para determinar el porcentaje de amoniaco en agua de mar.

Tabla 12.5. Porcentaje de amoniaco en agua de mar (23 a 27 ups) a diferentes pH y temperaturas (Bower y Bidwell, 1978)

T (°C)	pH															
	7.5	7.6	7.7	7.8	7.9	8.0	8.1	8.2	8.3	8.4	8.5	8.6	8.7	8.8	8.9	9.0
0	10.13	0.23	0.29	0.37	0.47	0.59	0.74	0.92	1.16	1.46	1.83	2.29	2.87	3.50	4.28	5.10
1	10.1	0.25	0.32	0.40	0.50	0.63	0.79	0.99	1.24	1.56	1.96	2.45	3.07	3.83	4.74	5.70
2	10.07	0.27	0.34	0.42	0.53	0.67	0.84	1.06	1.33	1.67	2.09	2.62	3.28	4.09	5.04	6.10
3	10.03	0.29	0.37	0.47	0.59	0.74	0.92	1.16	1.46	1.83	2.29	2.87	3.50	4.28	5.10	6.10
4	10	0.32	0.40	0.50	0.63	0.79	0.99	1.24	1.56	1.96	2.45	3.07	3.83	4.74	5.70	6.76
5	9.97	0.34	0.42	0.53	0.67	0.84	1.06	1.33	1.67	2.09	2.62	3.28	4.09	5.04	6.10	7.20
6	9.94	0.36	0.46	0.57	0.72	0.90	1.14	1.42	1.79	2.24	2.80	3.50	4.37	5.44	6.60	7.80
7	9.9	0.40	0.50	0.63	0.79	0.99	1.24	1.56	1.96	2.45	3.07	3.83	4.74	5.70	6.76	7.90
8	9.87	0.42	0.53	0.67	0.84	1.06	1.33	1.67	2.09	2.62	3.28	4.09	5.04	6.10	7.20	8.40
9	9.84	0.46	0.57	0.72	0.90	1.14	1.42	1.79	2.24	2.80	3.50	4.37	5.44	6.60	7.80	9.10
10	9.81	0.49	0.61	0.77	0.97	1.22	1.53	1.91	2.40	3.00	3.74	4.67	5.70	6.80	8.00	9.30
11	9.77	0.53	0.67	0.84	1.06	1.33	1.67	2.09	2.62	3.28	4.09	5.10	6.20	7.40	8.70	10.00
12	9.74	0.57	0.72	0.90	1.14	1.42	1.79	2.24	2.80	3.50	4.37	5.44	6.60	7.80	9.10	10.40
13	9.71	0.61	0.77	0.97	1.22	1.53	1.91	2.40	3.00	3.74	4.67	5.70	6.80	8.00	9.30	10.60
14	9.68	0.66	0.82	1.04	1.30	1.63	2.05	2.56	3.21	4.00	4.99	6.20	7.40	8.70	10.00	11.30
15	9.64	0.72	0.90	1.14	1.42	1.79	2.24	2.80	3.50	4.37	5.44	6.60	7.80	9.10	10.40	11.70
16	9.61	0.77	0.97	1.22	1.53	1.91	2.40	3.00	3.74	4.67	5.70	6.80	8.00	9.30	10.60	11.90
17	9.58	0.82	1.04	1.30	1.63	2.05	2.56	3.21	4.00	4.99	6.20	7.40	8.70	10.00	11.30	12.60
18	9.55	0.88	1.11	1.39	1.75	2.19	2.74	3.43	4.28	5.32	6.61	8.18	9.80	11.50	13.20	14.90
19	9.51	0.97	1.22	1.53	1.91	2.40	3.00	3.74	4.67	5.70	6.80	8.00	9.30	10.60	11.90	13.20
20	9.48	1.04	1.30	1.63	2.05	2.56	3.21	4.00	4.99	6.20	7.68	9.48	11.40	13.30	15.20	17.10

(Continúa)

Tabla 12.5. Porcentaje de amoniaco en agua de mar (23 a 27 ups) a diferentes pH y temperaturas (Bower y Bidwell, 1978) (continúa)

T (°C)	pK _{as}	pH										
		7.5	7.6	7.7	7.8	7.9	8.0	8.1	8.2	8.3	8.4	8.5
21	9.45	1.11	1.39	1.75	2.19	2.74	3.43	4.28	5.32	6.61	8.18	10.09
22	9.42	1.19	1.49	1.87	2.34	2.93	3.66	4.57	5.68	7.05	8.72	10.73
23	9.38	1.30	1.63	2.05	2.56	3.21	4.00	4.99	6.20	7.68	9.48	11.65
24	9.35	1.39	1.75	2.19	2.74	3.43	4.28	5.32	6.61	8.18	10.09	12.38
25	9.32	1.49	1.87	2.34	2.93	3.66	4.57	5.68	7.05	8.72	10.73	13.15
26	9.29	1.60	2.00	2.51	3.13	3.91	4.88	6.06	7.52	9.28	11.41	13.95
27	9.26	1.71	2.14	2.68	3.35	4.18	5.21	6.47	8.01	9.88	12.13	14.81
28	9.23	1.83	2.29	2.87	3.58	4.47	5.56	6.90	8.54	10.51	12.89	15.70
29	9.2	1.96	2.45	3.07	3.83	4.77	5.94	7.36	9.09	11.18	13.68	16.63

Tabla 12.6. Porcentaje de amoniaco en agua de mar (28 a 31 ups) a diferentes pH y temperaturas (Bower y Bidwell, 1978)

T (°C)	pK _{as}	7.5	7.6	7.7	7.8	7.9	8.0	8.1	8.2	8.3	8.4	8.5
0	10.14	0.23	0.29	0.36	0.46	0.57	0.72	0.90	1.14	1.42	1.79	2.24
1	10.11	0.24	0.31	0.39	0.49	0.61	0.77	0.97	1.22	1.53	1.91	2.40
2	10.08	0.26	0.33	0.42	0.52	0.66	0.82	1.04	1.30	1.63	2.05	2.56
3	10.04	0.29	0.36	0.46	0.57	0.72	0.90	1.14	1.42	1.79	2.24	2.80
4	10.01	0.31	0.39	0.49	0.61	0.77	0.97	1.22	1.53	1.91	2.40	3.00
5	9.98	0.33	0.42	0.52	0.66	0.82	1.04	1.30	1.63	2.05	2.56	3.21
6	9.95	0.35	0.44	0.56	0.70	0.88	1.11	1.39	1.75	2.19	2.74	3.43
7	9.91	0.39	0.49	0.61	0.77	0.97	1.22	1.53	1.91	2.40	3.00	3.74
8	9.88	0.42	0.52	0.66	0.82	1.04	1.30	1.63	2.05	2.56	3.21	4.00
9	9.85	0.44	0.56	0.70	0.88	1.11	1.39	1.75	2.19	2.74	3.43	4.28
10	9.82	0.48	0.60	0.75	0.95	1.19	1.49	1.87	2.34	2.93	3.66	4.57
11	9.78	0.52	0.66	0.82	1.04	1.30	1.63	2.05	2.56	3.21	4.00	4.99
12	9.75	0.56	0.70	0.88	1.11	1.39	1.75	2.19	2.74	3.43	4.28	5.32
13	9.72	0.60	0.75	0.95	1.19	1.49	1.87	2.34	2.93	3.66	4.57	5.68
14	9.69	0.64	0.81	1.01	1.27	1.60	2.00	2.51	3.13	3.91	4.88	6.06
15	9.65	0.70	0.88	1.11	1.39	1.75	2.19	2.74	3.43	4.28	5.32	6.61
16	9.62	0.75	0.95	1.19	1.49	1.87	2.34	2.93	3.66	4.57	5.68	7.05
17	9.59	0.81	1.01	1.27	1.60	2.00	2.51	3.13	3.91	4.88	6.06	7.52
18	9.56	0.86	1.08	1.36	1.71	2.14	2.68	3.35	4.18	5.21	6.47	8.01
19	9.52	0.95	1.19	1.49	1.87	2.34	2.93	3.66	4.57	5.68	7.05	8.72
20	9.49	1.01	1.27	1.60	2.00	2.51	3.13	3.91	4.88	6.06	7.52	9.28
21	9.46	1.08	1.36	1.71	2.14	2.68	3.35	4.18	5.21	6.47	8.01	9.88
22	9.43	1.16	1.46	1.83	2.29	2.87	3.58	4.47	5.56	6.90	8.54	10.51

(Continúa)

Tabla 12.6. Porcentaje de amoniaco en agua de mar (28 a 31 ups) a diferentes pH y temperaturas (Bower y Bidwell, 1978) (continúa)

T (°C)	pK _{as}	pH										
		7.5	7.6	7.7	7.8	7.9	8.0	8.1	8.2	8.3	8.4	8.5
23	9.39	1.27	1.60	2.00	2.51	3.13	3.91	4.88	6.06	7.52	9.28	11.41
24	9.36	1.36	1.71	2.14	2.68	3.35	4.18	5.21	6.47	8.01	9.88	12.13
25	9.33	1.46	1.83	2.29	2.87	3.58	4.47	5.56	6.90	8.54	10.51	12.89
26	9.300	1.56	1.96	2.45	3.07	3.83	4.77	5.94	7.36	9.09	11.18	13.68
27	9.270	1.67	2.09	2.62	3.28	4.09	5.10	6.33	7.84	9.68	11.89	14.52
28	9.240	1.79	2.24	2.80	3.50	4.37	5.44	6.76	8.36	10.30	12.63	15.40
29	9.210	1.91	2.40	3.00	3.74	4.67	5.81	7.20	8.90	10.95	13.41	16.32

Tabla 12.7. Porcentaje de amoniaco en agua de mar (32 a 40 ups) a diferentes pH y temperaturas (Bower y Bidwell, 1978)

T (°C)	pK _{as}	pH										
		7.5	7.6	7.7	7.8	7.9	8.0	8.1	8.2	8.3	8.4	8.5
0	10.16	0.22	0.27	0.35	0.43	0.55	0.69	0.86	1.08	1.36	1.71	2.14
1	10.13	0.23	0.29	0.37	0.47	0.59	0.74	0.92	1.16	1.46	1.83	2.29
2	10.1	0.25	0.32	0.40	0.50	0.63	0.79	0.99	1.24	1.56	1.96	2.45
3	10.06	0.27	0.35	0.43	0.55	0.69	0.86	1.08	1.36	1.71	2.14	2.68
4	10.03	0.29	0.37	0.47	0.59	0.74	0.92	1.16	1.46	1.83	2.29	2.87
5	10	0.32	0.40	0.50	0.63	0.79	0.99	1.24	1.56	1.96	2.45	3.07
6	9.97	0.34	0.42	0.53	0.67	0.84	1.06	1.33	1.67	2.09	2.62	3.28
7	9.93	0.37	0.47	0.59	0.74	0.92	1.16	1.46	1.83	2.29	2.87	3.58
8	9.9	0.40	0.50	0.63	0.79	0.99	1.24	1.56	1.96	2.45	3.07	3.83
9	9.87	0.42	0.53	0.67	0.84	1.06	1.33	1.67	2.09	2.62	3.28	4.09
10	9.84	0.46	0.57	0.72	0.90	1.14	1.42	1.79	2.24	2.80	3.50	4.37
11	9.8	0.50	0.63	0.79	0.99	1.24	1.56	1.96	2.45	3.07	3.83	4.77
12	9.77	0.53	0.67	0.84	1.06	1.33	1.67	2.09	2.62	3.28	4.09	5.10
13	9.74	0.57	0.72	0.90	1.14	1.42	1.79	2.24	2.80	3.50	4.37	5.44
14	9.71	0.61	0.77	0.97	1.22	1.53	1.91	2.40	3.00	3.74	4.67	5.81
15	9.67	0.67	0.84	1.06	1.33	1.67	2.09	2.62	3.28	4.09	5.10	6.33
16	9.64	0.72	0.90	1.14	1.42	1.79	2.24	2.80	3.50	4.37	5.44	6.76
17	9.61	0.77	0.97	1.22	1.53	1.91	2.40	3.00	3.74	4.67	5.81	7.20
18	9.58	0.82	1.04	1.30	1.63	2.05	2.56	3.21	4.00	4.99	6.20	7.68
19	9.54	0.90	1.14	1.42	1.79	2.24	2.80	3.50	4.37	5.44	6.76	8.36
20	9.51	0.97	1.22	1.53	1.91	2.40	3.00	3.74	4.67	5.81	7.20	8.90
21	9.48	1.04	1.30	1.63	2.05	2.56	3.21	4.00	4.99	6.20	7.68	9.48
22	9.45	1.11	1.39	1.75	2.19	2.74	3.43	4.28	5.32	6.61	8.18	10.09

(Continúa)

Tabla 12.7. Porcentaje de amoniaco en agua de mar (32 a 40 ups) a diferentes pH y temperaturas (Bower y Bidwell, 1978)

T (°C)	pK _a s											
	7.5	7.6	7.7	7.8	7.9	8.0	8.1	8.2	8.3	8.4	8.5	
23	9.41	1.22	1.53	1.91	2.40	3.00	3.74	4.67	5.81	7.20	8.90	10.95
24	9.38	1.30	1.63	2.05	2.56	3.21	4.00	4.99	6.20	7.68	9.48	11.65
25	9.35	1.39	1.75	2.19	2.74	3.43	4.28	5.32	6.61	8.18	10.09	12.38
26	9.32	1.49	1.87	2.34	2.93	3.66	4.57	5.68	7.05	8.72	10.73	13.15
27	9.29	1.60	2.00	2.51	3.13	3.91	4.88	6.06	7.52	9.28	11.41	13.95
28	9.26	1.71	2.14	2.68	3.35	4.18	5.21	6.47	8.01	9.88	12.13	14.81
29	9.23	1.83	2.29	2.87	3.58	4.47	5.56	6.90	8.54	10.51	12.89	15.70

Ecuación 1

$$\% NH_3 = 100 [1 + \text{antilog} (P_{k_{as}}(T) - pH)]$$

donde:

pK_{as} = constante de disociación ácida

$$pK_{as}(T) = pK_a^s(T = 298 \text{ °K}) + 0.0324(298 - T \text{ °K})$$

ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA Y CRÓNICA CON LA ALMEJA CATARINA *ARGOPECTEN VENTRICOSUS*

Alma Socorro Sobrino Figueroa

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: E

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La almeja catarina (figura 13.1) es un recurso pesquero importante en el estado de Baja California Sur, ya que en esta entidad se pesca el 95% de la producción nacional (SAGARPA, 2003). *Argopecten ventricosus* se distribuye desde Isla de Cedros, Baja California y Golfo de California hasta el norte de Perú (Keen, 1971). Generalmente habita en aguas someras de lagunas, ensenadas y bahías protegidas, sobre fondos lodosos o arenosos; en ocasiones está asociada a macroalgas o pastos marinos y se alimenta de partículas que atrapa por filtración en la interfase sedimento-agua. Ambas condiciones hacen que estos moluscos sean idóneos para considerarlos como posibles “centinelas” o bioindicadores en estudios de monitoreo ambiental. Estos organismos alcanzan el estado adulto entre los 6 y 8 meses de edad y su ciclo de vida dura de manera natural 2 años (Félix-Pico, 1978; Secretaria de Pesca, 1984; Monsalvo, 1998).

Esta especie es mucho más sensible a los efectos de contaminantes que otras especies de bivalvos, como ostiones (*Crassostrea gigas*, *C. virginica*) y mejillones (*Chromomytilus chorus*) (Sobrino-Figueroa, 2001), asimismo al someterlos a algún estresor no permanecen con las valvas cerradas durante mucho tiempo (15-20 min), si se compara con lo que ocurre con los ostiones los cuales pueden permanecer cerrados de 19 a 22 horas.

Figura 13.1. Organismos adultos de *Argopecten ventricosus*



El método de prueba con la almeja *A. ventricosus* presentado en este documento es una propuesta para realizar pruebas de toxicidad aguda o subletal con compuestos químicos o sedimentos contaminados, utilizando larvas “D” ($90.5 \pm 7.7 \mu\text{m}$) o juveniles ($4 \pm 1 \text{ mm}$) de esta especie, en bioensayos con recambio de agua de 48 y 96 horas de duración (agudos) o de semanas o meses de exposición (pruebas subletales). El costo de estas pruebas es moderado si se dispone de instalaciones que cuenten con tomas de aire, temperatura y fotoperíodo controlado, suministro de agua marina de buena calidad y materiales como tinas de cultivo de fibra de vidrio o plástico de diferentes volúmenes, acuarios de 20 a 60 L, equipo para control de parámetros, cristalería, balanzas de precisión y microscopios de disección.

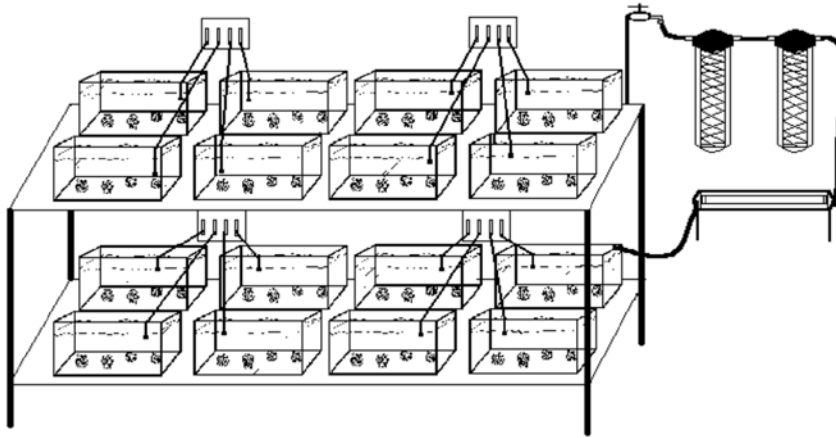
INFRAESTRUCTURA EN EL LABORATORIO

Para la realización de los ensayos se requiere la siguiente infraestructura:

- Área de laboratorio húmedo (figura 13.2) con control de temperatura y fotoperíodo. Tomas de aire. Tanques de aclimatación y cuarentena de 50 a 100 L, elaborados con fibra de vidrio o plásticos, inertes y resistentes a la corrosión.
- Para el mantenimiento de los organismos se debe usar agua marina (36 a 37 ‰ de salinidad) de buena calidad (sin contaminantes), filtrada por una

serie de cartuchos de diferentes diámetros (15, 10, 5 y 1 μm) para eliminar el material particulado, esterilizada con luz UV y aireación continua.

Figura 13.2. Sistema de mantenimiento de organismos juveniles de almeja catarina



MATERIAL

Tinas de fibra de vidrio o plástico de 10, 50, 150 y 1,500 L de capacidad; acuarios de 60; cubetas de 20 L; cribas con malla de 50 μm de abertura; vasos de precipitados de 50, 500 y 1,000 ml; matraces aforados de 100 y 1000 ml; cristalizadores de vidrio Pyrex o vasos de precipitados con capacidad de 400 y 600 mL; pipetas de vidrio graduadas (5 y 10 mL); varillas de vidrio; pipetas automáticas de 10 a 100 μL y 100 a 1,000 μL con puntas estériles; pipetas Pasteur; papel (Parafilm) transparente; manguera de acuario; hemocítmetro o cámara Neubauer; cámara Sedgwick-Rafter; termómetro y placas multipozos de 36 pozos (marca NUNC).

EQUIPO

Microscopio de disección; microscopio óptico; medidor de oxígeno disuelto; refractómetro o salinómetro; potenciómetro; balanza analítica; bombas de acuario; lámpara de luz UV (para esterilización); sistema de filtración de agua con cartuchos de 15, 10, 5 y 1 μm ; sistema purificador de agua (deionizador, sistema *Milli-q*) o una fuente de abastecimiento de agua destilada; homogeni-

zador de tejidos; parrilla de calentamiento con temperatura controlada; cámara de electroforesis; fuente para electroforesis; espectrofotómetro; procesador de tejidos y micrótopo.

REACTIVOS

Todos los reactivos deben tener calidad analítica o al menos un 99% de pureza. Para la preparación de soluciones se utiliza agua destilada o deionizada (*Millipore Super Q*). Los compuestos tóxicos se suministran en los experimentos por medio de soluciones patrón, que se elaboran con reactivos grado analítico (99% de pureza) y agua deionizada, siguiendo las recomendaciones de APHA (1994) y FAO, (1982, 1986). Las concentraciones de las soluciones patrón deben ser comprobadas por algún método validado (espectrofotometría de absorción atómica, cromatografía de gases o HPLC), según la sustancia de la que se trate.

Nitrato de sodio (NaNO_3); fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); cloruro de amonio (NH_4Cl); silicato de sodio ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$); sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); cloruro de zinc (ZnCl_2); cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); cloruro de manganeso ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); manganato de sodio $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; cloruro de hierro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); ácido etilendiaminotetracético disódico (EDTA Na_2); biotina; cyanocobalamina U.S. de 1000 mg/mL (solución inyectable); tiamina HCl; hidróxido de sodio (NaOH); tris-HCl; bromuro de etidio; cloruro de potasio (KCl); cloruro de sodio (NaCl); fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4); agarosa (de bajo punto de fusión); triton X; dimetil sulfóxido (DMSO); ácido tricloroacético; ácido tiobarbitúrico y ácido clorhídrico

ORGANISMOS DE PRUEBA

Los organismos que se utilizan para realizar los bioensayos se pueden obtener por colecta manual con los pescadores, en los sitios donde se ubican los bancos naturales de almejas, localizados en Bahía Concepción y Bahía Magdalena B.C.S., o se pueden comprar en las granjas de producción de semilla (Laboratorio de Cultivo de Moluscos, de la Universidad Autónoma de Baja California Sur; Planta productora de moluscos UNISON, unidad Guaymas; CIBNOR, granja experimental de cultivos de moluscos ubicada en Rancho Nuevo, B.C.S.).

OBTENCIÓN DE LARVAS

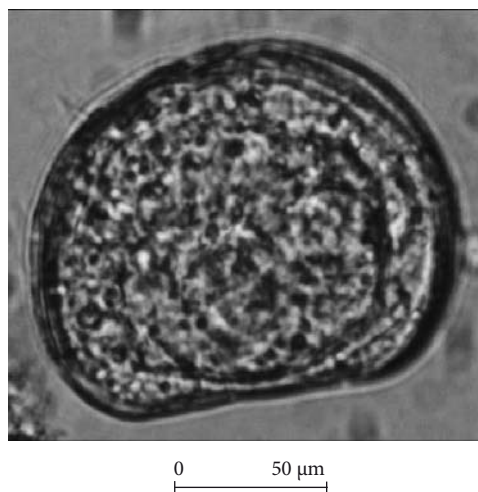
En el laboratorio se pueden obtener larvas “D” de almeja catarina con el siguiente procedimiento (Cáceres-Martínez, 1998 com. per.; Cortés, 1998 comunicación personal):

Se realiza una inspección visual de los organismos adultos de *A. ventricosus* (5 ± 1 cm), provenientes de los bancos de explotación o cultivo, para seleccionar a los individuos “maduros”, que son aquellos que muestran una gónada evidente de color anaranjado y blanco (estos organismos desarrollan gametos femeninos y masculinos). Los adultos maduros se someten a estimulación térmica para inducir el desove, este proceso denominado por Loosanoff y Davis (1963) como “choque térmico”, consiste en someter a los organismos a cambios de temperatura, pasándolos de agua a 18 °C, donde se mantienen por 20 o 30 minutos, a agua a 29 °C, (el procedimiento se repite 2 veces). Después de la inducción, 14 ± 2 organismos se colocan en canastas de plástico (canastas Nestier), mismas que se sumergen en tanques de fibra de vidrio con capacidad de 1500 L, con agua marina filtrada (15, 10, 5 y 1 μm) e irradiada con luz UV. Después de 12 ± 2 horas la estimulación se retiran los reproductores de los tanques de cultivo. Los procesos de desove, fecundación y desarrollo del primer estadio larval (trocófora) y del segundo (larvas veliger “D”) ocurren después de las 18 horas del choque térmico.

Otro método para obtener las larvas es colocar a las almejas individualmente en acuarios o recipientes de vidrio de 5 L de capacidad, con agua marina filtrada e irradiada, con una temperatura de 18 °C, donde se les deja durante 25 a 35 minutos. Posteriormente, los organismos se pasan a otro recipiente que contenga agua a 29 °C, donde permanecen otros 25 a 35 minutos. Este procedimiento se repite 2 o 3 veces.

Cuando las almejas desovan la primera expulsión es de óvulos, y la segunda, que generalmente ocurre de 10 a 15 minutos después de la primera, es de espermatozoides. Entonces, para obtener por separado los gametos, se debe retirar al adulto del recipiente donde se recibió a los óvulos, para pasarlo a un segundo recipiente donde se pueden obtener los espermatozoides; una vez obtenidos estos últimos retirar inmediatamente al adulto y observar al microscopio los gametos.

La fecundación se realiza mezclando óvulos y espermatozoides en una relación 1:5, moviéndolos suavemente. Después de efectuada la fecundación, los óvulos fecundados se colocan en contenedores de 20 a 50 L de volumen con agua de mar filtrada e irradiada y con aireación moderada.

Figura 13.3. Larvas "D" de *Argopecten ventricosus*

Entre 18 a 24 horas después de haber efectuado la fecundación, las larvas en estadios veliger "D" (85 a 96 μm de altura) (figura 13.3), se concentran por medio de una malla de 50 micras a un volumen de 1 L. Se toma 1 mL de esta suspensión para realizar un conteo por quintuplicado en una cámara Sedgwick-Rafter, para determinar el número de larvas obtenidas.

CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS

Las larvas "D" se colocan en estanques de fibra de vidrio o plástico con agua marina filtrada e irradiada con luz UV, a una densidad de 5 larvas/mL (Cortés, 1998 com. per.), bajo las siguientes condiciones: 36 ‰ de salinidad, 20 ± 2 °C de temperatura, fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y con suministro diario de alimento. Este último consiste en una mezcla de microalgas: *Isocrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans*, cultivadas con medio F/2 Guillard (Stein, 1973), a densidades de 80,000 a 120,000 células/mL. Las larvas deben permanecer de 2 a 4 días en aclimatación (APHA, 1994) antes de ser utilizadas en los ensayos.

Los juveniles se deben mantener en acuarios de 20 L (20 a 25 organismos por acuario) con agua de mar filtrada y estéril, con salinidad de 36 ± 1 ‰, a 20 ± 1 °C de temperatura, fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y con alimentación consistente una mezcla de las microalgas *Tetraselmis* sp. y

Chaetoceros sp., a una densidad de 700,000 a 900,000 células/mL. Diariamente se deben aspirar los residuos de comida del fondo de los acuarios y se deben realizar recambios de por lo menos el 40% del volumen de agua cada 48 horas (tabla 13.1). El período de aclimatación puede durar de 4 a 5 días (APHA, 1994; FAO, 1982, 1986). Veinticuatro horas antes del inicio de los ensayos se suspende la alimentación.

Tabla 13.1. Condiciones para el mantenimiento de los juveniles de almeja catarina

Temperatura	20 ± 2 °C
Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
Intensidad luminosa	600-1000 lux en la superficie del líquido
Fotoperíodo	12 horas luz :12 horas oscuridad
Recipientes de mantenimiento	Acuarios con 20 L de agua marina filtrada e irradiada con luz UV
Número de organismos por recipiente	De 20 a 25 organismos por acuario
Alimentación	Mezcla de <i>Isocrysis galbana</i> y <i>Chaetoceros calcitrans</i> a densidades de 80,000 a 120,000 células/mL El alimento es suministrado diariamente
Limpieza	Diariamente se deben retirar los residuos de alimentos y excretas del fondo de los acuarios. Cada 48 horas se debe realizar recambios de por lo menos el 40% del volumen de agua.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

PREPARACIÓN DEL MATERIAL PARA LOS BIOENSAYOS

Para los ensayos con juveniles se utilizan recipientes de vidrio de borosilicato, como vasos de precipitado o cristalizadores de 400 a 600 mL de capacidad.

PRUEBAS AGUDAS CON LARVAS “D” DE ALMEJA CATARINA

Para evaluar el efecto tóxico de sustancias químicas, agua intersticial o elutriados de sedimentos marinos en la supervivencia de las larvas veliger “D” se efectúan microbioensayos, siguiendo las recomendaciones de Hunt *et al.*, (1998). Se recomienda usar placas multipozos (36 pozos) de policarbonato y colocar 10 larvas en cada pozo en un volumen de 3 mL. Se deben probar 5 concentraciones del compuesto con 5 a 10 replicas por concentración, además de un control negativo.

Cada 24 horas se evalúa el número de organismos vivos y muertos por medio de observaciones directas, con la ayuda de un microscopio de disección.

Con los datos obtenidos, se calcula la CL_{50} (Concentración Letal Media) a 24 y 48 horas, por medio del método gráfico (APHA, 1994) o por el método Probit (Finney, 1971).

ENSAYOS EXPLORATORIOS

Se debe realizar una prueba exploratoria con duración de 24 horas y por lo menos 5 concentraciones del contaminante en escala logarítmica, para determinar el orden de magnitud del intervalo de las concentraciones entre las cuales se debe realizar el ensayo definitivo (Rodríguez y Esclapés, 1995).

PRUEBAS AGUDAS CON JUVENILES DE ALMEJA CATARINA

Estos ensayos se llevan a cabo utilizando 5 juveniles de 4 ± 1 mm de altura por contenedor. Se recomienda el uso de cristalizadores de vidrio Pyrex con capacidad de 500 mL para los ensayos de agua y vasos de precipitado de 600 mL para los ensayos con sedimentos. En éstos últimos se colocan los sedimentos y el agua marina en una relación 1:4 (Burton, 1992; ASTM, 1994). Los contenedores deben permanecer cerrados (con Parafilm transparente) durante el desarrollo del experimento para evitar la evaporación del agua y efectuar recambios de agua cada 48 horas (FAO, 1982; 1986; APHA, 1994).

Se prueban un mínimo de 5 concentraciones de la sustancia tóxica y un control negativo, con un mínimo de 4 réplicas. El tiempo de duración de las pruebas es de 96 horas o más, dependiendo de los objetivos de la investigación. El agua marina que se utilizará en todos los bioensayos, se debe de filtrar (5 y 1 μm) e irradiar con luz UV. Los parámetros durante los bioensayos deben ser similares a los registrados en el período de aclimatación (tabla 13.2).

Cada 24 horas se registra el número de organismos vivos y muertos en cada contenedor. La muerte se reconoce por la carencia de movilidad en los cilios localizados en la parte externa del manto o por la ausencia de ritmo cardiaco.

Expresión de resultados

Con los datos de sobrevivencia y mortalidad se determina la CL_{50} a 24, 48, 72 y 96 horas, por el método gráfico (APHA, 1994) ó por el método⁵⁰ Probit (Finney, 1971).

Tabla 13.2. Condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad aguda con juveniles de *Argopecten ventricosus*

Tipo de bioensayo	Con recambios de agua cada 48 horas
Temperatura	20 ± 2°C
Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
Intensidad luminosa	600-1000 lux en la superficie del líquido
Fotoperíodo	12 horas luz :12 horas oscuridad
Volumen del recipiente	Cristalizadores de 500 mL Pyrex (muestras líquidas) Vasos de precipitado de 600 mL para pruebas con sedimentos en relación 1:4 (1 parte de sedimento por 4 partes de agua marina)
Volumen de la solución de prueba	400 mL de agua marina filtrada y esterilizada con luz UV y saturada de O ₂
Organismos	Juveniles de 4 ± 1 mm de altura
Densidad de organismos	5 organismos por recipiente
Número de réplicas	Cuatro a cinco
Duración de la prueba	96 horas
Efecto medido	Letalidad. La muerte se reconoce por la carencia de movilidad en los cilios localizados en la parte externa del manto o por la ausencia de ritmo cardiaco
Aceptabilidad de los resultados	La mortalidad en el control negativo no debe exceder el 10%

El método de análisis Probit ajusta los datos de mortalidad a valores de probabilidad para realizar una estimación de la CL₅₀ con una distribución logarítmica de tolerancias. El porcentaje de mortalidad se transforma a unidades Probit. Esta transformación permite el ajuste a una relación lineal, en la cual la concentración perteneciente al Probit 0.5 corresponde a la cantidad de sustancia capaz de causar efecto letal en la mitad de la población (Finney, 1971, Díaz *et al.*, 2004).

Una de las restricciones del método es que para el cálculo de la CE₅₀ o CL₅₀ deben obtenerse valores intermedios entre 0 y 100% de mortalidad.

Aceptabilidad de los resultados

Esta prueba será válida cuando: la mortalidad en el control negativo no exceda el 10%. (FAO, 1982; 1986; APHA, 1994).

PRUEBAS DE EFECTOS SUBLETALES

Evaluación de la tasa de crecimiento de juveniles expuestos a compuestos tóxicos

Con juveniles de 3 ± 0.5 mm de altura, expuestos a xenobióticos durante 30 a 40 días, se evalúa el efecto sobre su crecimiento, por medio de bioensayos con recambio de agua (cada 96 a 120 horas).

Se prueban 5 concentraciones del compuesto tóxico, además de un control negativo, por triplicado, exponiendo 60 organismos en cada concentración, los cuales se mantienen en acuarios de 30 L (20 almejas por acuario). Durante el experimento, las almejas son alimentadas diariamente con una mezcla de microalgas *Tetraselmis* sp. y *Chaetoceros* sp, con una densidad de $600,000 \pm 750,000$ (Avilés-Quevedo, 1990). Las condiciones de los experimentos son similares a las mantenidas en el período de aclimatación (tabla 13.1).

Al inicio y término del experimento los especímenes se miden para determinar su altura, con un microscopio de disección provisto de una reglilla graduada y calibrada en μm .

La tasa de crecimiento se calcula mediante la relación propuesta por Stromgren (1982):

$$T.C. = \frac{h_{\text{final}} - h_{\text{inicial}}}{t}$$

donde:

T.C. = Tasa de crecimiento (mm/día)

h_{final} = Altura de los organismos en el tiempo final de observación (mm)

h_{inicial} = Altura de los organismos al inicio del experimento (mm)

t = tiempo en días.

El aumento de la biomasa de los juveniles se determina por la diferencia del peso seco de los especímenes al inicio y al final del experimento.

Treinta organismos de cada tratamiento se extraen de su concha y se pesan en una balanza analítica (± 0.01 mg) para determinar su peso húmedo. Posteriormente se colocan en una caja Petri y se secan en un horno a $60-70$ °C por un lapso de 12 horas o hasta alcanzar peso constante. Después las muestras se colocan en un desecador durante una hora e inmediatamente se pesan para determinar tanto el peso seco como su porcentaje de humedad.

Con los datos obtenidos se determina la CE_{50} (concentración efectiva cincuenta), que es la concentración de compuesto tóxico que produce una disminución del 50% en la tasa de crecimiento en comparación con el testigo (APHA, 1994).

Evaluación de la tasa de consumo de oxígeno en juveniles de A. ventricosus

La tasa de consumo de oxígeno se determina siguiendo las recomendaciones de Baber y Blake (1985), mediante cámaras cerradas (sistemas estáticos) de volumen conocido (figura 13.4), las cuales contienen en solución la concentración de la sustancia tóxica al que se expone a los organismos. Los niveles de oxígeno al inicio ($O_{2\text{ini}}$) y al final ($O_{2\text{f}}$) del tiempo de permanencia de los especímenes en estos dispositivos, se determinan mediante un oxímetro de 0.1 ppm de lectura mínima, con corrección para salinidad.

En los ensayos se colocan 10 organismos en recipientes de 400 mL de capacidad, con por lo menos tres réplicas, además de un control sin compuesto tóxico y otra cámara sin organismos. Se realizan 3 mediciones, con un lapso de 2 horas entre cada medición.

Para determinar el consumo de oxígeno se aplica la relación descrita por Cech (1990):

$$\text{Consumo de } O_2 = \frac{([O_{2\text{f}}] - [O_{2\text{ini}}]) * V}{t}$$

donde:

$[O_{2\text{f}}]$ = Concentración de oxígeno (mg/L) al final del tiempo de observación

$[O_{2\text{ini}}]$ = Concentración de oxígeno (mg/L) al inicio del tiempo de observación

V = Volumen de la cámara (L)

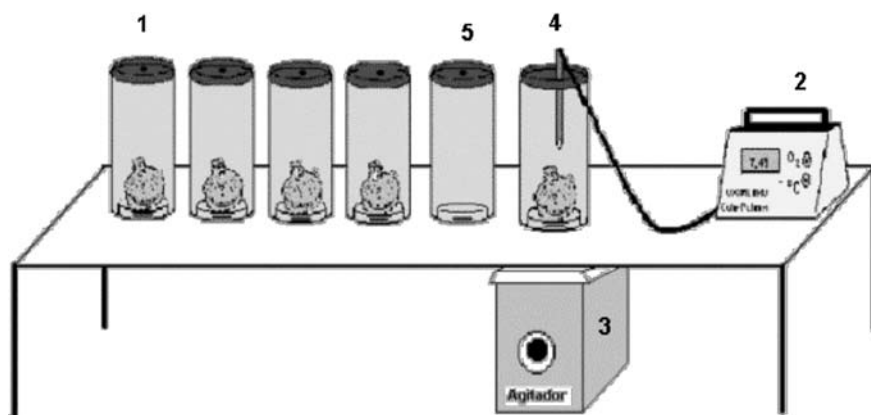
t = Tiempo transcurrido entre cada medición (horas).

Los valores de consumo de oxígeno se corrigen con los datos obtenidos en la cámara sin organismos.

La tasa de consumo de oxígeno se calcula al normalizar el consumo de oxígeno con el peso seco de las almejas y se expresa en mg O_2 /h/g (peso seco).

Con los valores obtenidos se calcula la CE_{50} , que es la concentración de xenobiótico en la cual disminuye el 50% la tasa de consumo de oxígeno, en comparación con lo observado en el testigo (APHA, 1994).

Figura 13.4. Dispositivo construido para realizar las evaluaciones de consumo de oxígeno en el ensayo con *Argopecten ventricosus*. 1) cámara hermética, 2) oxímetro, 3) agitador magnético, 4) electrodo para la lectura de oxígeno y 5) cámara testigo sin organismos



Evaluación de la tasa de excreción de juveniles de Argopecten ventricosus expuestos a compuestos tóxicos

La tasa de excreción se evalúa paralelamente en los bioensayos donde se realizan determinaciones de consumo de oxígeno.

En las cámaras herméticas se cuantifica el contenido de NH_3-N en el agua al inicio y término de los experimentos. Para ello se toman muestras de 50 mL que se fijan con fenol 5% (0.5 mL) y se almacenan a 5 °C. Posteriormente, se analizan alícuotas de 10 mL, por triplicado, mediante la microtécnica descrita por Solórzano, modificada por Lind (1985).

Los valores de excreción de amonio se corrigen con los datos obtenidos en la cámara control sin organismos y se normalizan con el peso seco de las almejas, para obtener la tasa de excreción de NH_3-N expresada en $\mu g NH_3-N / h/g$ (peso seco).

Evaluación del efecto de los metales y sus mezclas sobre la tasa de aclaración

La tasa de aclaramiento (tasa de filtración) se estima de manera indirecta por medio de la remoción de partículas (microalgas *Chaetoceros* sp.) de una suspensión con volumen y densidad conocidas. Se usa un inóculo de 498,079 células/mL, mismo que se determinó como el más adecuado, ya que no se observa la formación de pseudoheces (Griffiths y King, 1979).

Los juveniles se exponen a 5 concentraciones de sustancias tóxicas y un control, por triplicado, además de una cámara sin organismos, que se utiliza para determinar el porcentaje de sedimentación de las microalgas.

Las pruebas se realizan en recipientes de 400 mL de capacidad, con burbujeo constante, donde se colocan 20 organismos. Después de aplicar el inóculo de microalgas, se toman muestras (10 mL, por triplicado) cada hora hasta obtener 3 alícuotas, las cuales se fijan con formalina al 5%, para ser analizadas posteriormente.

En las muestras se cuenta el número de células presentes, con la ayuda de un hemocitómetro. El cálculo de la tasa de filtración se realiza mediante la ecuación de Griffiths y King (1979).

$$T.A. = \frac{V * (h[C_i] - h [C_f])}{t}$$

donde:

T. A. = Tasa de aclaramiento(L/hora)

V = Volumen de la cámara (L)

h [C_i] = Concentración inicial de células (células/L)

h [C_f] = Concentración final de células (células/L)

t = Tiempo (horas)

Con los datos obtenidos se calcula la CE₅₀, que corresponde a la concentración de compuesto tóxico que causa una disminución del 50% en la tasa de filtración en comparación con el testigo (APHA, 1994).

BIOMARCADORES

Determinación de niveles de lipoperoxidación en glándula digestiva y branquia

La formación y el efecto de radicales libres, originados por la acción de los contaminantes, se evalúa por medio de la técnica desarrollada por Buege y Aust (1978). Este análisis se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico para identificar la presencia de malondealdehídos (MDA), que son el producto de la actividad de los radicales libres sobre las membranas.

Se toman alícuotas de 1 mL de homogenizados de la branquia y de la glándula digestiva (los cuales se obtienen previamente macerando completamente el tejido en frío, en buffer de fosfatos en una relación 1:5 (w/v) e incubando a 90 °C con una mezcla de ácido tiobarbitúrico (15%), ácido tricloroacético (0.375%) y ácido clorhídrico (0.25 M) durante 20 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugan (150 rpm) y se analizan en un espectrofotómetro a 535 nm.

Para el cálculo de la concentración de MDA presente en la muestra se utiliza la fórmula de Buege y Aust (1978):

$$C = \frac{A}{\epsilon * P}$$

donde:

C = Concentración de MDA (nM de MDA)

A = Absorbancia de la muestra

ϵ = Coeficiente de extinción 1.56×10^5 moles/cm

P = Grosor de la fotocelda (1 cm)

Los valores obtenidos se expresan en nM de MDA/g (peso seco).

Evaluación de daño genético en el tejido de la branquia

El daño genético en las células del tejido de la branquia se evalúa con la técnica de electroforesis unicelular conocida también como ensayo cometa (Singh *et al.*, 1988).

Este método consiste en la evaluación de la integridad del material genético de una muestra de por lo menos 100 células, las cuales se lisan bajo condi-

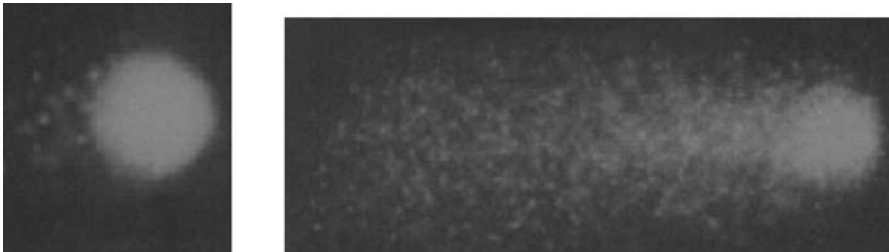
ciones alcalinas y con los núcleos se realiza una electroforesis. La migración del núcleo forma una cauda similar a la cola de un cometa, con el material genético dañado. La longitud de la cauda o cola de cometa es proporcional al grado de daño que tiene la célula (figura 13.5).

La branquia de los organismos expuestos a xenobióticos durante 48 horas (como tiempo mínimo) se extrae y se pesa en una balanza analítica; posteriormente, se disgrega en forma manual. Del disgregado se toman 20 μL , colocándolos sobre una capa de agarosa soportada en un portaobjetos esmerilado.

Los portaobjetos con las muestras (dos por cada organismo) se colocan en una solución (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% Tritón X100 y 10% DMSO), durante 1 hora, para romper las células y obtener los núcleos. Después los portaobjetos se colocan en la cámara de electroforesis y se les agrega buffer (10 N NaOH, 200 mN NaCl), permaneciendo en etapa de desdoblamiento durante 20 minutos. Posteriormente, se inicia la electroforesis, la cual tiene una duración de 20 minutos, a 25 voltios y 300 amperios. Al término de este proceso, las laminillas con las muestras se neutralizan con una solución de tris-HCl (0.4 M), se tiñen con 75 μL de bromuro de etidio y se analizan en un microscopio de epifluorescencia con un filtro de 560 nm.

Se evalúa la frecuencia de núcleos con y sin cauda, así como el tamaño de las caudas en una muestra de 100 núcleos. Se aplica la prueba estadística de "t" de student, para determinar la existencia de diferencia entre los lotes de células expuestas al compuesto tóxico y las no expuestas.

Figura 13.5. Evaluación de daño genético con la técnica de electroforesis unicelular en células de *Argopecten ventricosus*. A) Núcleo sin daño y B) Núcleo con daño genético, se observa el desarrollo de la cauda o cola de cometa



BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association (APHA). 1994. *Métodos estándar para el examen de aguas y aguas de desecho*. 64ª edición. Interamericana, México, 690 pp.
- American Society of Testing and Materials (ASTM). 1994. *Standart guide for collection, storage, characterization and manipulation of sediments for toxicological testing*. ASTM, Filadelfia, 21 pp.
- Avilés-Quevedo, M. A. 1990. Crecimiento de la almeja catarina (*Argopecten circularis*) en función del alimento, con anotaciones sobre su biología y desarrollo. Tesis Maestría CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S., 81 pp.
- Baber, B.J. y N.J. Blake. 1985. Substrate catabolism related to reproduction in the bay scallop *Argopecten irradians concentricus*, as determined by O/N and R/Q physiological indexes. *Marine Biology* 87: 13-18.
- Buege, J. A. y S. D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymology* 51: 302-306.
- Burton, G. A. 1992. Sediment collection and processing: Factors affecting realism. En: G.A. Burton, (ed.) *Sediment Toxicity Assessment*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, pp. 15-37.
- Cech, J. J. 1990. Respirometry. En: C.B. Schreck y P.B. Moyle. (eds.) *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, EE.UU., pp. 332-362.
- Díaz Báez M. C., Y. Pica Granados y, A. Ronco. 2004. Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna* En: G. Castillo (ed.). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IDRC-IMTA, México, pp. 52-63.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 1982. *Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. parte 6. Ensayos de toxicidad*. FAO Doc. Tec. Pesca (185), Roma, 25 pp.
- . 1986. *Manual of methods in aquatic environment research. Part 10. Short-term static bioassays*. FAO Fisheries Technical Paper, (247), Roma, 62 pp.
- Félix-Pico, E. 1978. *Cultivo de la almeja catarin*. Informe Técnico anual. Oficina de Desarrollo de Acuacultura. Depto de Pesca. La Paz, B.C.S. México 34 pp.
- Finney, D. J. 1971. *Probit Analysis*. Tercera edición. Cambridge Univ. Press, Londres, 234 pp.
- Griffiths C. L. y J. A. King. 1979. Some relationships between size, food, availability and energy balance in the ribbed mussel *Aulacomya ater*. *Marine Biology* 51: 141-149.
- Hunt, J. W., B. S. Anderson y B. M. Phillips. 1998. Recent advances in microscale toxicity testing with marine molluscs. En: P. G. Well, K. Lee y Ch. Blaise (eds.).

- Microscale testing in aquatic toxicology*. CRC Press, Boca Raton, EE.UU., pp. 423-436.
- Keen, A. M. 1971. *Sea shell of tropical West America*. Stanford University Press, Stanford, California, 1,064 pp.
- Lind, O. 1985. *Handbook of common methods in Limnology*. Kendal & Hunt, U.S. 199 pp.
- Loosanoff, V. L. y H. C. Davis. 1963. Rearing of bivalve molluscs. *Advances Marine Biology* 1: 1-136.
- Monsalvo, S.P. 1998. Estudios sobre el cultivo de larvas y juveniles de almeja catarina *Argopecten ventricosus* (= *circularis*) (Sowerby II, 1842) en el Laboratorio. Tesis de maestría CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S., 90 pp.
- Rodríguez, J. y M. Esclapés. 1995. *Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas. Versión 1.0*. Gerencia General de Tecnología. Departamento de Ecología y Ambiente. INTEVEP, PDVSA, Venezuela, 109 pp.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2003. *Anuario Estadístico de Pesca*. Conapesca, México, 265 pp.
- Secretaría de Pesca. 1984. *Cultivo de la almeja catarina*. Departamento de Acuicultura de la Delegación Federal de Pesca en B.C.S., México, 25 pp.
- Singh, N. P., D. B. Banner, R. R. Tice y E. L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cellular Research* 184: 123-130.
- Sobrino-Figueroa, A. 2001. Efecto de los metales Cd, Cr, Pb y sus mezclas en la almeja catarina *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1842) (Bivalvia, Pectinidae). Tesis de Doctorado. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas- IPN (CICIMAR-IPN) La Paz, B.C.S, México, 180 pp.
- Stein, J. R. 1973. *Handboock of phycological methods*. University Press, Cambridge, 448 pp.
- Stromgren, L. M. 1982. Effects of heavy metals (Zn, Hg, Cu, Cd, Pb, Ni) on the length, growth of *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 72: 69-72.

Tercera parte

Pruebas en suelos

ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON LA LOMBRIZ DE TIERRA *EISENIA ANDREI*

*María del Carmen Cuevas Díaz,
Ronald Ferrera Cerrato, Adriana Roldán Martín
y Refugio Rodríguez Vázquez*

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: E

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Los bioensayos con lombrices son ampliamente reconocidos como prueba para evaluar la toxicidad de suelos contaminados (Dorn *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2002).

La lombriz más utilizada ha sido *Eisenia* en sus especies *foetida* y *andrei*, las cuales pertenecen a la familia Lumbricidae. Estas especies de lombriz son exógenas en México, pero de amplia distribución, fácil manejo y cultivo (Fragoso, 2002). Su principal característica morfológica es la presencia de segmentos externos e internos en su cuerpo, son hermafroditas y cuando son adultas se observa una protuberancia epidérmica denominada clitelo, en el que se forman los capullos en los cuales son depositados los huevos (Santamaría, 1996). Esta especie se desarrolla bien en pH de 5 a 7, a temperaturas de 20 a 28 °C (Kaplan *et al.*, 1980). La lombriz a utilizar es *E.*

andrei porque su desarrollo y reproducción es mayor que el de *E. foetida* (Domínguez *et al.*, 2005).

Este ensayo incluye dos clases de pruebas toxicológicas: 1) prueba por contacto con papel filtro y 2) prueba con suelo artificial y muestras de suelo contaminado.

La prueba por contacto en papel filtro puede ser utilizada como preliminar para determinar las concentraciones correspondientes a las que se tiene que llevar a cabo la prueba con suelo, siendo esta última más detallada. La prueba de contacto es fácil de realizar y da resultados reproducibles. El suelo artificial y el suelo contaminado son representativos de la exposición de la lombriz al compuesto analizado.

El presente ensayo se basa en lo descrito en la guía 207 de la OECD para la evaluación de sustancias (OCDE, 1984) y la publicación 96-327 del Departamento de Ecología del Estado de Washington (WSDE, 1996), así como en las experiencias obtenidas a nivel laboratorio (Cuevas *et al.*, 2006).

La prueba por contacto en papel filtro involucra la exposición de las lombrices a sustancias prueba sobre un papel filtro húmedo con la finalidad de identificar el potencial del compuesto tóxico presente en el suelo. Esta prueba tiene una duración de 48 a 72 horas.

El uso de suelo artificial involucra colocar las lombrices en un suelo artificial aplicando una serie de concentraciones de la sustancia prueba. Cuando se desea evaluar la toxicidad del suelo contaminado de un sitio en estudio o de un suelo restaurado, la prueba se puede realizar directamente con éste; la mortalidad de las lombrices es evaluada a los 7 y a los 14 días.

Para la prueba de contacto la sustancia problema se expresa en mg/cm², mientras que para suelo artificial y muestras de suelo contaminado se expresa en mg/kg (base seca).

Para que una prueba sea considerada como válida, la mortalidad en el control no debe exceder el 10% al final del período de exposición. Asimismo, es recomendable el uso de un control positivo con un compuesto de referencia como 2-cloroacetamida, para asegurarse que las condiciones utilizadas en la prueba fueron adecuadas y no presenta ningún cambio significativo.

Este ensayo se ha realizado utilizando como medio de prueba suelo artificial, suelo control y suelo contaminado y como sustancias problema a los hidrocarburos totales de petróleo (TPH), benzo[a]pireno y pireno.

MATERIAL

Frascos de vidrio de 0.5 L o 1 L; frascos de vidrio (diámetro de 4.5 cm y altura de 7 cm); pipetas volumétricas clase A de 1 a 100 mL; pipetas serológicas de 1 a 10 mL graduadas; micropipeta de 200 a 1000 μ L; termómetro; espátula de acero inoxidable; pinzas; guantes; papel filtro y malla 2 a 2.36 mm.

EQUIPO

Potenciómetro; balanza analítica con capacidad para pesar lombrices de 0.1 g; bBalanza con capacidad para pesar muestras de suelo de 1.0 g; baño o cuarto con control de temperatura 20 ± 2 °C con intensidad luminosa de 400 a 800 lux y base de agitación o vórtex.

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Todos los reactivos utilizados deben tener al menos 99% de pureza. Para la preparación de soluciones se emplea agua destilada. Soluciones amortiguadoras para pH 4, 7 y 10; 2-cloroacetamida (99% pureza) y agua destilada o desionizada tipo II.

SUELO ARTIFICIAL

El suelo artificial tiene una composición de: 10% musgo (materia orgánica), 20% arcilla y 70% arena. Se utiliza CaCO_3 para ajustar el pH a 7.0 ± 0.5

MUESTRA DE SUELO

Se necesitan cuando menos 1100g de suelo, ya que se prepara un mínimo de 4 réplicas de 200 a 250g de suelo contaminado. Los 100 a 200 g del remanente se utilizan para realizar las determinaciones de pH, humedad y concentración del compuesto; pero si se requiere caracterizar la muestra es necesaria la recolección de mayor cantidad de suelo. Los recipientes deben ser llenados en su totalidad. Si el análisis no se realiza de inmediato, las muestras deben ser selladas, empacadas y almacenadas a 4 °C en la oscuridad, para minimizar la pérdida de compuestos volátiles. De preferencia, la evaluación de la toxicidad se debe realizar en un lapso de 24 horas; de no ser posible se debe procurar

hacerlo en un plazo no mayor a 14 días, ya que la toxicidad pudiera no ser representativa por degradación o pérdida del contaminante.

ORGANISMOS DE PRUEBA

Se utilizan lombrices adultas de al menos 2 meses de edad (cliteladas) del mismo cultivo y la misma especie. Estos organismos pueden desarrollarse en diferentes residuos animales, especialmente en estiércol de caballo, aunque puede prepararse una mezcla 50:50 de estiércol y residuos vegetales. El pH debe mantenerse alrededor de 7 ± 0.5 y la conductividad debe ser menor de 6.0 miliSiemens. Para asegurar una buena producción de lombrices se debe tener 20 kg de residuos por 1 kg de lombrices.

CONTROL DEL CULTIVO

El control con 2 cloroacetamida (control positivo) sirve como una referencia para determinar la sensibilidad del organismo. Por lo que cada vez que haya un cultivo nuevo, se debe realizar este control. Esta parte de la prueba debe llevarse a cabo previo a la exposición de la lombriz a la sustancia de prueba. Para el control positivo se requieren cuando menos tres concentraciones diferentes con cloroacetamida. Se sugiere utilizar las siguientes concentraciones: 19.25, 38.5 y 77.0 mg/kg de compuesto tóxico de referencia (WSDE, 1996).

A continuación se presentan los cálculos para determinar la cantidad a preparar de una solución patrón de 2-cloroacetamida a adicionar a 600 g de suelo artificial (200g c/u). Usando la concentración de 38.5 mg/kg.

$$T = W * F * C$$

donde:

T = Cantidad de compuesto tóxico de referencia a adicionar (mg)

W = Peso de la muestra (g)

F = Factor de conversión (1kg/1000g)

C = Concentración del compuesto tóxico de referencia (mg/kg)

Ejemplo:

$$W = 600 \text{ g}, C = 38.5 \text{ mg/kg}$$

$$T = (600 \text{ g}) (1\text{kg}/1000\text{g}) (38.5 \text{ mg}/\text{kg}) = 23.1 \text{ mg}$$

En este caso, 23.1 mg es lo que se necesita para 600 g de suelo, pero es necesario preparar una solución patrón usualmente de 22.5 mg de 2-cloroacetamida/mL de agua (se puede utilizar cualquier concentración, tratando de evitar residuos). Si se utiliza la solución patrón propuesta 22.5mg/mL (pesar 4.5 g y disolver en 200 mL de agua), realizar el siguiente cálculo:

$$V = \frac{R}{S}$$

donde:

V = volumen de la solución patrón a adicionar (mL)

R = cantidad del compuesto de referencia a adicionar (mg)

S = concentración de la solución patrón (mg/mL)

Ejemplo

$$R = 23.1 \text{ mg}, S = 22.5\text{mg}/\text{mL}$$

$$V = (23.1 \text{ mg})/(22.5 \text{ mg}/\text{mL}) = 1.03 \text{ mL}$$

Se debe recordar que es necesario hidratar el suelo en 45%, lo que equivale a adicionar 270 mL de agua. Si se considera que la 2-cloroacetamida de la solución patrón está disuelta en agua entonces se tendría $270 - 1.03 = 269$ mL de agua por adicionar. Los 269 mL de agua y 1.03 mL de la solución patrón se mezclan en un matraz agitando y se adicionan a los 600 g de suelo. Se mide también el pH y la humedad.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Se calcula la humedad inicial para adicionar el agua de hidratación necesaria. Para determinar la humedad se toma una alícuota de 25 g de la muestra de suelo, se coloca en una cápsula de porcelana, previamente preparada a peso constante, y se pesa. Se seca a 103-105 °C durante 24 horas y posteriormente se coloca en un desecador para enfriar. Una vez fría se pesa. La diferencia de pesos nos da el peso seco final (WSDE, 1996).

Opcionalmente, se puede utilizar una balanza del tipo de Kern MB-3 con capacidad de 50 g para determinar humedad, para lo cual se utiliza 1 g de suelo y 10 minutos más tarde se tiene el resultado en por ciento.

Para determinar la humedad del suelo se utiliza la siguiente ecuación:

$$HS = \left[\frac{(A-B)}{C-(A-B)} \right] * 100$$

donde:

HS = humedad de la muestra en %

A = peso inicial de la muestra + cápsula (g)

B = peso seco final de la muestra + cápsula (g)

C = peso de la alícuota inicial (g)

Ejemplo:

A = 77.168 g, B = 76.448 g, C = 25.078 g

HS = (77.168-76.063)/[25.024-(77.168-76.063)]*100

HS = 4.61%

HIDRATACIÓN DE LA MUESTRA DE SUELO

Las muestras se pueden hidratar de 35 a 45%, correspondiente al peso del suelo utilizado en la prueba (WSDE, 1996). Para ello se utiliza la siguiente fórmula:

$$HA = T - HS$$

donde:

HA = hidratación necesaria (%)

T = humedad que se quiere obtener (%)

HS = humedad del suelo (%)

Ejemplo

T = 45%, HS = 4.6%

HA = 45% - 4.6% = 40.4%

Para determinar la cantidad de agua a adicionar se utiliza la siguiente fórmula:

$$V = \left[\frac{W * HA}{100} \right] * F$$

donde:

V = cantidad de agua a adicionar (mL)

W = peso de la muestra (g)

HA = hidratación necesaria (%)

F = factor de conversión (1 mL/1g)

Ejemplo:

HA = 40.4%, W = 250 g

V = (250 g * 40.4%/100)*(1 mL/1g) = 101 mL

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

PRUEBA DE CONTACTO EN PAPEL FILTRO PRELIMINAR A LA PRUEBA DE 14 DÍAS

Para esta prueba se deben lavar los contenedores de vidrio (diámetro de 4.5 cm y altura de 7 cm) con agua caliente y detergente, se deben enjuagar y dejar secar. Cortar papel filtro con 4 cm de ancho por 15 cm de longitud según el frasco y depositarlo en él, no debe exceder del borde del frasco.

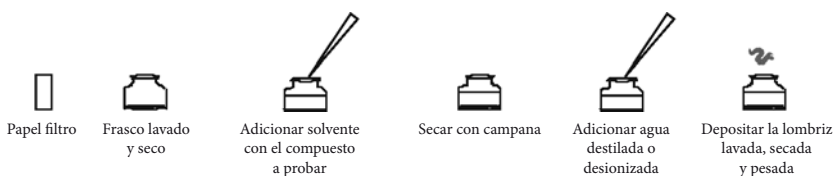
Se debe realizar una prueba de humedad con papel filtro, para lo cual se preparan cuando menos 5 viales con diferentes cantidades de agua (1 a 5.5 mL) y se deposita una lombriz en cada uno de ellos. La cantidad de agua a adicionar, previo a la prueba, será la correspondiente a la mínima cantidad de agua en donde la mortalidad corresponda a 0.

La sustancia problema se disuelve en agua o en un disolvente orgánico (acetona o diclorometano) para dar una concentración conocida. Se deposita 1 mL de esta solución problema en el papel filtro (con micropipeta), cuidando que se distribuya homogéneamente, y se seca por rotación del frasco con papel filtro (figura 14.1).

Los controles son: papel filtro con agua deionizada o destilada y papel filtro impregnado del disolvente seleccionado y secado.

Después de secado el papel filtro, se adiciona en cada vial de 1 a 5.5 mL de agua deionizada o destilada (de acuerdo a los resultados de humedad del papel filtro explicado previamente), cada vial es tapado con tela (organza) y con papel aluminio que se ha perforado para obtener orificios que permitan preservar la humedad y facilitar el intercambio de aire.

Figura 14.1. Secuencia general de la prueba con papel filtro con lombriz de tierra



EJEMPLO

Concentraciones a utilizar:

Cantidad aplicada al papel filtro (mg/cm ²)	Concentración de la solución aplicada (g/mL)
1.0	7 x 10 ⁻²
0.1	7 x 10 ⁻³
0.01	7 x 10 ⁻⁴
0.001	7 x 10 ⁻⁵
0.0001	7 x 10 ⁻⁶

En este ejemplo $70 \text{ mg} / 70 \text{ cm}^2 = 1.0 \text{ mg} / \text{cm}^2$, el área depende del tamaño del papel y del frasco, al igual que la concentración.

Las concentraciones a emplear no deben ser menos de cinco. Para cada tratamiento o nivel de concentración se preparan 10 réplicas. Una lombriz se coloca en cada frasco, depositándola sobre el papel filtro húmedo.

Antes de ser colocadas en los viales, las lombrices son depositadas por tres horas en papel filtro humedecido, con la finalidad de vaciar sus intestinos; después son lavadas y secadas. Los viales son colocados en forma horizontal

en la oscuridad, a una temperatura de 20 ± 2 °C, durante un período de 48 horas, y opcionalmente hasta 72 horas. Las lombrices se consideran muertas cuando no responden a ningún estímulo mecánico. Cualquier síntoma patológico se reporta. Esta prueba es rápida y nos indica las concentraciones a utilizar en la prueba de 14 días.

Para adicionar la sustancia problema al papel filtro, se realiza previamente una extracción de la misma del suelo contaminado, determinando su concentración y procediendo a realizar diluciones si es necesario, tomando como solución madre a la concentración inicial del suelo.

PRUEBA CON SUELO CONTAMINADO Y SUELO ARTIFICIAL

Se determina la humedad del suelo contaminado, se pesan 250 g y se depositan en un frasco de vidrio, ajustando la humedad; se preparan un total de 4 réplicas. La duración de la prueba es de 14 días, realizando una evaluación a los 7 días. La temperatura debe mantenerse a 20 ± 2 °C, con luz continua, con la finalidad de asegurarse que las lombrices se encuentran en todas partes del medio.

La mortalidad se evalúa después de 7 días, por vaciamiento del medio en un recipiente de vidrio, separando las lombrices y observando sus reacciones a los estímulos mecánicos: Posteriormente, se vuelven a depositar en su contenedor hasta su evaluación final a los 14 días. Para cuantificar la mortalidad se analiza cada contenedor, contándose las lombrices. Por ejemplo: en el contenedor de la concentración 1, réplica 1, se depositan 10 lombrices al inicio de la prueba, si al final se cuentan 5 lombrices, se anota el resultado; a continuación, se cuentan las 4 réplicas siguientes y para calcular CL_{50} se utiliza el siguiente software: www.igv.kvl.dk/download/software. Al término de la prueba se determina la humedad y el pH.

Control

El control puede consistir en suelo no contaminado de la misma textura que la muestra, al que se ajusta la humedad de la misma forma en que se procedió para la muestra. También se puede utilizar como control suelo artificial, previo ajuste de humedad y pH. En cualquiera de los dos casos se colocan 4 réplicas, cada una de 250 g. Se adicionan 10 lombrices libres de alimento, para lo cual 3 horas antes se colocan en un contenedor de vidrio cubierto con papel filtro humedecido con agua destilada o desionizada. Las lombrices se lavan, se secan y pesan.

Al igual que a la muestra, a los controles también se les determina la humedad y el pH al finalizar la prueba.

Suelo artificial

La OECD (1984) describe una prueba con suelo artificial de la misma composición que la proporcionada en el listado de reactivos y soluciones. Éste puede ser utilizado para suelos muy arcillosos en los que el movimiento de la lombriz se dificulte por la textura del suelo. En este caso se utiliza el extracto del suelo contaminado. Como controles se tienen, además del suelo humedecido, un suelo al que se le ha adicionado el disolvente utilizado en la extracción (acetona, diclorometano, etc.) con la finalidad de corroborar el efecto del disolvente sobre el organismo prueba.

Prueba de toxicidad directa

La determinación denominada directa se puede utilizar para suelos contaminados y aquellos que se encuentran sujetos a bioremediación, para lo cual se pesan 200g de suelo problema, se ajusta con 10% de tierra de hoja y 15% de arena de río. Se ajusta la humedad y el pH de la manera descrita anteriormente (previamente se ha determinado humedad y pH). Se colocan cuando menos 5 contenedores de vidrio, depositando en cada uno de ellos 10 lombrices cliteladas, con el intestino limpio, lavadas, secadas y pesadas. Las lombrices se dejan a 20 ± 2 °C (también pueden dejarse a una temperatura de 24 ± 2 °C, sin que se observe efecto por la temperatura). El control puede ser suelo artificial sin contaminante o suelo cercano al sitio de recolección de la muestra, que no contenga el contaminante. Se revisa al día 7 y al día 14, las lombrices se sacan, cuentan, lavan, secan y pesan.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

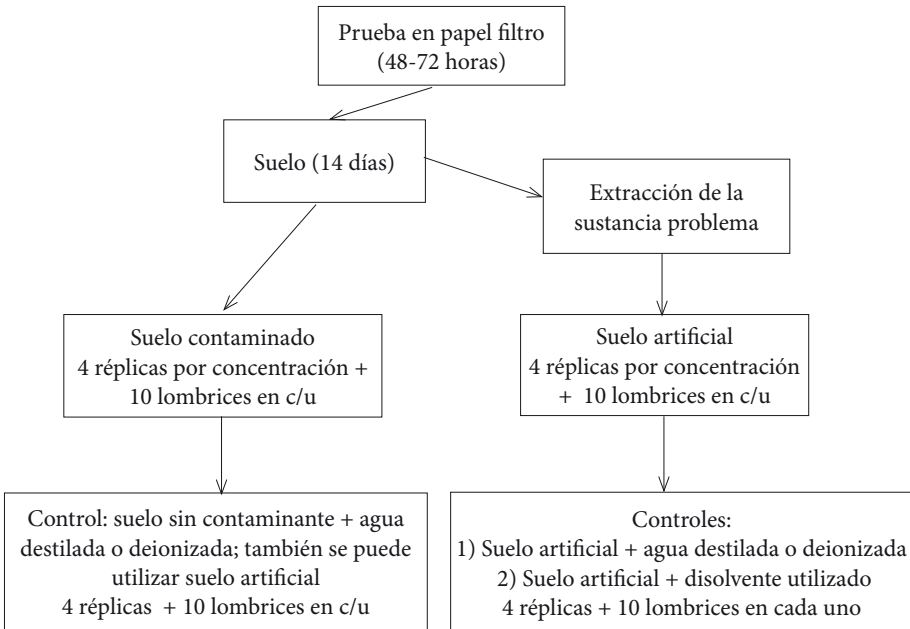
Los datos de concentración/mortalidad se utilizan para calcular la concentración letal media o CL_{50} , la cual se puede determinar por el método Probit o Trimmed-Spearman, según sea el caso. Para ello, se puede utilizar el software proporcionado por la USEPA.

REPORTE DE LA PRUEBA

En el reporte del ensayo debe incluirse la siguiente información:

- Los datos del compuesto que se probó
- Las características del organismo de prueba, incluyendo la edad, condiciones de cultivo, fuente de alimento, número de lombrices utilizadas por réplica
- Las condiciones de la prueba, así como cualquier variación de las condiciones de la misma.
- La preparación del medio. Esto es, si hay alguna variación en la forma de preparación del suelo artificial o de la muestra de suelo contaminado, así como si existe variación en la cantidad de suelo
- Los resultados del peso promedio de los organismos al inicio y final de la prueba. Así como una descripción de cambios físicos o patológicos observados en los organismos

Figura 14.2. Diagrama de flujo del ensayo de toxicidad aguda con *Eisenia andrei*



- Los valores de humedad y pH del suelo y control, al inicio y final de la prueba
- El método usado para calcular la CL_{50} , incluyendo los datos y resultados de la prueba. Los valores de mortalidad en el control y en las muestras tratadas con la sustancia de prueba. La concentración más alta que no causa mortalidad y la concentración más baja que ocasiona 100% de mortalidad.

Tabla 14.1. Condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad aguda con *Eisenia andrei*

Duración del bioensayo	14 días
Temperatura	20 ± 2 °C
Fotoperíodo	24 horas, usando luz ambiental(400 luxes)
Contenedores	Frascos de vidrio
Cantidad requerida de muestra de suelo	1000 g
Cantidad requerida por réplica	200 – 250 g
Humedad del suelo	35 – 45 %
Organismo prueba	<i>Eisenia andrei</i>
Edad del organismo	> 2 meses (clitelada)
Número de organismos por réplica	10
Número de réplicas	4
pH del suelo	5 – 9, no realizar la prueba si el rango no es aceptable
Régimen de alimentación	No alimentar durante la prueba
Respuesta a medir	Supervivencia, alteraciones morfológicas
Control positivo	2-cloroacetamida
Control negativo	Suelo artificial o suelo blanco no contaminado

BIBLIOGRAFÍA

- Cuevas, D. M. C., C. Ferrera, L. E. Ríos y V. R. Rodríguez. 2006. Respuesta de *Eisenia andrei* a TPH's y pireno en pruebas agudas. En: *Congreso de Ecotoxicología y Química Ambiental*. Memorias. 24-28 abril 2006. Puebla, pp. 78.
- Domínguez, J., A. Velando y A. Ferreiro. 2005. Are *Eisenia fétida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouche (1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species? *Pedobiologia* 49: 81-87.

- Dorn, P. B., T. E. Vipond J. P. Salanitro y H. L. Wisniewski. 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soil using earthworms, microtox and plants. *Chemosphere* 37(5):845-860.
- Fragoso, G. C. 2002. Las lombrices de tierra en México: diversidad, distribución y manejo. II Simposium Internacional y Reunión Nacional Lombricultura y abonos orgánicos.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C. y Thurson, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science. Technology* 11(7): 714-719
- Kaplan, D. L., R. Hartenstein, E. F. Neuhauser y M. R. Maleckit. 1980. Physicochemical requirements in the environment of the earthworm *Eisenia foetida*. *Soil Biology and Biochemistry* 12: 347-352.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 1984. Earthworm, acute toxicity tests. Guideline for testing of chemicals N° 207 (adoptado en abril de 1984). OCDE, París, 9 pp.
- Rida, A. M. y M. Bouché. 1997. Earthworm toxicology: from acute to chronic test. *Soil Biology Biochemistry* 29(3, 4): 669-703.
- Ronco, A. y M. C. Díaz Baez. 2004. Interpretación y manejo de resultados En: G. Castillo (ed.). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. IDRC Books, Canadá. pp 141-149. Disponible en: http://www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html.
- Santamaría, R. S. 1996. Aspectos biotecnológicos del proceso de vermicomposteo y su aplicación agronómica. Tesis para obtener el título de de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Veracruzana, México.
- Santamaría, R. S. y C. R. Ferrera. 2002. Dinámica Poblacional de *Eisenia andrei* (Bouche 1972) en diferentes residuos orgánicos. *Terra* 20(3): 303-310.
- Washington State Department of Ecology (WSDE). 1996. Publication No. 96-327. Earthworm Bioassay protocol for soil toxicity screening.
- Wilson, J. J., J. Hathcer y J. S. Goudey. 2002. Ecotoxicological endpoints for contaminated site remediation. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanità* 38(2): 143-147.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD AGUDA CON CELOMOCITOS DE LA LOMBRIZ DE TIERRA *EISENIA FOETIDA*

Raúl Uribe Hernández

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: E

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Los organismos vivos integran el efecto tóxico causado por la exposición a diferentes xenobióticos o contaminantes, y responden de manera integral en sus diferentes niveles de organización (subcelular, celular, tejidos, órganos y sistemas) al efecto adverso de compuestos o mezclas de ellos. Los bioensayos proveen una medida más directa de la toxicidad ambiental relevante en los sitios contaminados que los análisis químicos, ya que integran la respuesta de los factores ambientales y de los compuestos tóxicos.

La citotoxicidad de los compuestos puede ser abordada a través de pruebas cuyo fundamento es la absorción de colorantes supravitales. Tal es el caso de la aplicación de la prueba de citotoxicidad con Rojo Neutro-50 (Babich y Borenfreund, 1992). Las pruebas de citotoxicidad con este colorante supravital y modelo biológico han sido utilizadas ampliamente en la evaluación de

diversas sustancias, como los plaguicidas y metales pesados (Reinecke *et al.*, 2002).

Este ensayo se basa en la detección de los daños que producen los compuestos tóxicos sobre la integridad de la membrana de los lisosomas en las células y sobre el control del flujo del colorante a través de la misma. La acumulación del Rojo Neutro ocurre por entrapamiento de la forma protonada del colorante dentro del ambiente ácido del lisosoma o por unión del Rojo Neutro a cargas ácidas fijas, tales como polisacáridos ácidos dentro de la matriz del lisosoma. Como respuesta se observa una disminución en la capacidad de las células para asimilar y retener al colorante Rojo Neutro en el interior de los lisosomas, la cual es indicadora de la viabilidad celular.

MATERIAL

Cajas Petri de 110 mm; frascos de vidrio con tapón de rosca de 100 mL; jeringa desechable de 10 mL; matraces Erlenmeyer de 100 y 250 mL; matraces Erlenmeyer con tapón de rosca de 50 y 125 mL; micropipetas de 10, 50, 500 y 1000 μ L; pipetas graduadas de 1,5 y 10 mL; pipetas Pasteur; probetas de 50 y 100 mL; tubos con tapón de rosca de 120 mm; tubos de centrifuga de 15 mL con tapón de rosca; tubos de ensayo de 13 X 100 mm y vasos de precipitados de 50 y 100 mL.

EQUIPO

Agitador vórtex; balanza analítica; cámara Neubauer; campana de flujo laminar; centrifuga; espectrofotómetro de UV-Visible; incubadora hasta 60 °C; microscopio de contraste de fases; balanza analítica y campana de extracción.

REACTIVOS

2-Cloroacetamida; ácido acético; Rojo Neutro 50 μ g/mL en solución amortiguadora de fosfatos; azul de tripano al 0.4%; dimetilsulfóxido (DMSO); etanol absoluto; formol al 40%; cloruro de calcio; medio RPMI-1640; solución de sales LBSS (NaCl 71.5 mM, KCl 4.8 mM, CaCl₂ 3.8 mM, KH₂PO₄ 0.4 mM, Na₂CO₃ 4.2 mM, MgSO₄ 1.1 mM, Na₂HPO₄ 0.3 mM), ajustada a pH 7.3.

ORGANISMOS DE PRUEBA

Como material biológico se emplean celomocitos obtenidos de organismos adultos de la lombriz de tierra *E. foetida* con clitelo en la parte anterior del cuerpo y con peso entre 300 y 600 mg.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

OBTENCIÓN DE LOS CELOMOCITOS

Cada lombriz se lava en una solución de NaCl al 4% y se coloca sobre papel filtro humedecido con la misma solución (figura 15.1). Se le aplica un masaje suave en los últimos segmentos de la región posterior del cuerpo y posteriormente se coloca en una caja Petri sobre un trozo de hielo, durante 2 minutos.

Se le practica una incisión superficial a nivel de la región abdominal, posterior al segmento donde se encuentra el clitelo. El fluido celómico se extrae por medio de una pipeta Pasteur y se coloca en tubos de vidrio con 5 mL de solución LBSS. Posteriormente, el fluido se lava con solución LBSS, centrifugando a 2000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Finalmente, el botón celular se resuspende en 1 mL de solución LBSS.

Figura 15.1. Lombriz adulta de la especie *Eisenia foetida*



CUENTA CELULAR Y DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD

La suspensión celular (0.1 mL) se mezcla en un tubo de ensayo con 0.02 mL de azul de tripano al 0.4 % y se agita. Después de 3 minutos de reposo, se colocan 20 μ L de la mezcla en la cámara Neubauer con un cubre objetos sobrepuesto. Se cuenta el número de células teñidas de azul en el cuadrante del centro y en los cuatro de las orillas. El número de células por mL es calculado multiplicando el promedio de los cuadrantes por el factor de dilución y por el volumen de la cámara (10^4). La viabilidad se calcula dividiendo el número de células viables entre el total y multiplicado por 100.

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{\text{Número de células no teñidas}}{\text{Número de células totales}} * 100$$

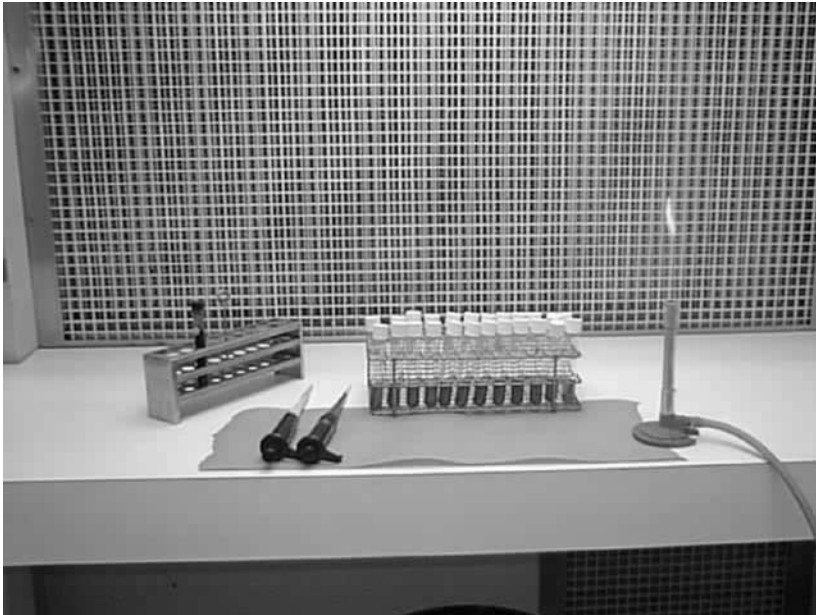
ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CON ROJO NEUTRO

En tubos de ensayo se preparan las diluciones de la muestra problema en una serie logarítmica. En la campana de flujo laminar se adicionan 50 μ L de la suspensión celular en cada uno de los tubos y se agregan 1 mL del medio de cultivo RPMI 1640. Todos los tubos se incuban a 22 °C por 24 horas en una atmósfera de CO₂ al 5% (figura 15.2).

La mezcla de cada tubo se centrifuga a 2,500 rpm por 5 minutos para eliminar los compuestos tóxicos. Las células se resuspenden en una solución amortiguadora de fosfatos y se vuelven a centrifugar. El botón celular se resuspende nuevamente en 1 mL de una solución del colorante Rojo Neutro (50 μ g/mL). Posteriormente, todos los tubos son incubados por 3 horas en las mismas condiciones descritas anteriormente. El colorante se elimina por centrifugación a 2,500 rpm durante 5 minutos y el botón celular se resuspende rápidamente en una solución de amortiguadora de fosfatos. A cada tubo se le agregan 1.3 mL de solución de ácido acético al 1% y etanol al 50% y se dejan reposar a temperatura ambiente por 15 minutos.

La absorbancia de las muestras se lee en un espectrofotómetro de luz visible a 540 nm. El porcentaje de viabilidad se calcula con la absorbancia obtenida, tomando como referencia al testigo con 100 % de viabilidad (Pérez-Zapata et al., 1998). Se calcula la concentración letal cincuenta efectuando una regresión lineal entre las concentraciones y los porcentajes de viabilidad transformados

Figura 15.2. Preparación de diluciones para la prueba de citotoxicidad en celomocitos de lombriz de tierra



a logaritmo. El resumen general de las condiciones de la prueba se presenta en la tabla 15.1.

Para las pruebas definitivas se utiliza un intervalo de concentraciones más reducido (en serie geométrica), seleccionando aquellos tratamientos en los que se observaron efectos adversos, para insertar entre alguno de ellos este nuevo intervalo de concentraciones (por ejemplo: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 %). Se elabora la curva dosis-respuesta de las diferentes concentraciones siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

En cada ensayo de debe incluir un control del disolvente agregando a las muestras, un control positivo con 2-cloroacetamida y un control negativo en el que se adiciona medio RPMI-1640.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La prueba de citotoxicidad aguda en celomocitos de lombriz de tierra determina el potencial de toxicidad letal en el cultivo, expresado como la concentra-

Tabla 15.1. Condiciones recomendadas para las pruebas de citotoxicidad con celomonitos de lombriz de tierra

Tipo de ensayo	<i>In vitro</i>
Temperatura	22 ± 1 °C
Calidad de luz	Oscuridad
Volumen del recipiente	Tubos de 3 o 5 mL
Volumen de la solución de prueba	1.0 mL
Edad del cultivo usado como inóculo	24 horas
Densidad celular inicial	104 a 105 células/mL
Número de réplicas	Tres
Incubación	Con CO ₂ al 5 %
Medio de cultivo	RPMI-1640
Factor de dilución	10
Duración de la prueba	24 horas
Respuesta evaluada	Viabilidad celular
Resultado final	CL ₅₀
Criterios de aceptación de la prueba	Viabilidad celular igual o >90 % del control
Control positivo	2-cloroacetamida a 35 mg/L

Fuentes: USEPA, 1996; OECD, 1984

ción letal media (CL₅₀). Se utiliza el método Probit, también conocido como método de unidades probabilísticas, para evaluar la relación dosis-respuesta de un contaminante sobre un organismo en términos de la CL₅₀ y su precisión o intervalo de confianza. Para ello se asigna el valor Probit de tablas correspondiente al porcentaje de mortalidad obtenido para cada concentración (Loomis, 1978). Después se efectúa una regresión lineal mediante el método mínimos cuadrados, y utilizando los valores obtenidos de la ecuación de la recta se calcula la CL₅₀, considerando el valor de la “y” a la mitad del número de individuos utilizados en cada lote o tratamiento. Finalmente se calcula el intervalo de confianza al 95% por medio de la desviación estándar y el valor de tablas del estadístico de “t” de student.

BIBLIOGRAFÍA

- Babich, H. y E. Borenfreund. 1992. Neutral Red Assay for Toxicology *in vitro*. En: Ronald R. Watson (editor). *In vitro Methods of Toxicology*. Handbooks in Pharmacology and Toxicology. CRC Press, Boca Raton, EE.UU.
- Loomis, T. A. 1978. Fundamentos de Toxicología. Primera edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 274 pp.

- Organization for Economical Cooperation and Development (OECD). 1984. Earthworm acute toxicity test. Guideline for Testing of Chemicals 207. OCDE, París 8 pp.
- Pérez-Zapata, A. J., M. L. Vega-Barrita y R. Uribe-Hernández. 1998. Estudio in vitro del efecto del plomo en la biosíntesis de porfirinas. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* 44: 127-139.
- Reinecke, S.A., B. Helling y A. Reinecke. 2002. Lysosomal response of earthworm (*Eisenia foetida*), coelomocytes to the fungicide copper oxychloride and relation to life-cycle parameters. *Environmental Toxicology Chemistry* 21: 1026-1031.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. Earthworm sub-chronic toxicity test. Ecological Effects Test Guidelines. 712-C-96-167. OPPTS 850.6200, Washington DC., EE.UU. 11 pp.

ENSAYO DE GENOTOXICIDAD CON LA LOMBRIZ DE TIERRA *EISENIA ANDREI*

*Diana Corona Vadillo, Silke Cram Heydrich
y Emilio Rojas del Castillo*

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: E

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

En este ensayo se presenta una prueba para la evaluación genotóxica utilizando lombrices composteras como organismos de prueba; así como una estrategia para la caracterización ecotoxicológica de suelos contaminados.

Los métodos de pruebas estandarizadas para la evaluación de compuestos tóxicos en suelos se han desarrollado desde los años 80 y muchos de ellos se han basado en la prueba desarrollada en 1984 por la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD) (Jänsch *et al.*, 2005; Callahan, 2006). Dentro de estos trabajos, los organismos de prueba que más se han utilizado para evaluar efectos agudos y crónicos de los compuestos tóxicos en suelos son: lombrices, enquitreidos (nemátodos), colémbolos (cochinillas) y ácaros predadores. De igual forma, se ha propuesto la caracterización ecotoxicológica de suelos basada en la evaluación de los efectos de los compuestos

tóxicos sobre diferentes niveles tróficos, en donde se recomienda utilizar un organismo detritívoro, un productor, un consumidor primario y un consumidor secundario (ISO, 2001).

Se considera que las lombrices son organismos de prueba útiles para monitorear la toxicidad que provocan varios compuestos o xenobióticos (Fent, 1996), incluyendo metales pesados, plaguicidas, contaminantes orgánicos, mezclas complejas y desconocidas de contaminantes en suelos (Edwards y Bohlen, 1996; Callahan, 2006).

Las especies de lombriz comúnmente utilizadas son *Eisenia fetida* Savigny, 1826 y *Eisenia andrei* Bouché, 1972. Éstas son lombrices composteras que requieren un alto contenido de materia orgánica, son de fácil manejo y crianza y actualmente son cosmopolitas. Los efectos causados por compuestos en *E. fetida* y *E. andrei*, son relativamente bien conocidos, dado que se han realizado pruebas con estas lombrices por más de dos décadas para el registro de productos para protección de las plantas (PPPs) (Jänsch *et al.*, 2005).

Existen especies nativas de lombrices en campo como *Lumbricus terrestris*, *L. rubellus* o *Aporrectodea longa* que, por la dificultad de su cultivo, manejo y variabilidad de respuesta, son utilizadas en menor proporción que las lombrices composteras (Jänsch *et al.*, 2005). Por tanto, *E. fetida* y *E. andrei* se convirtieron en invertebrados detritívoros modelo para evaluar efectos de xenobióticos en suelos (Spurgeon *et al.*, 2003).

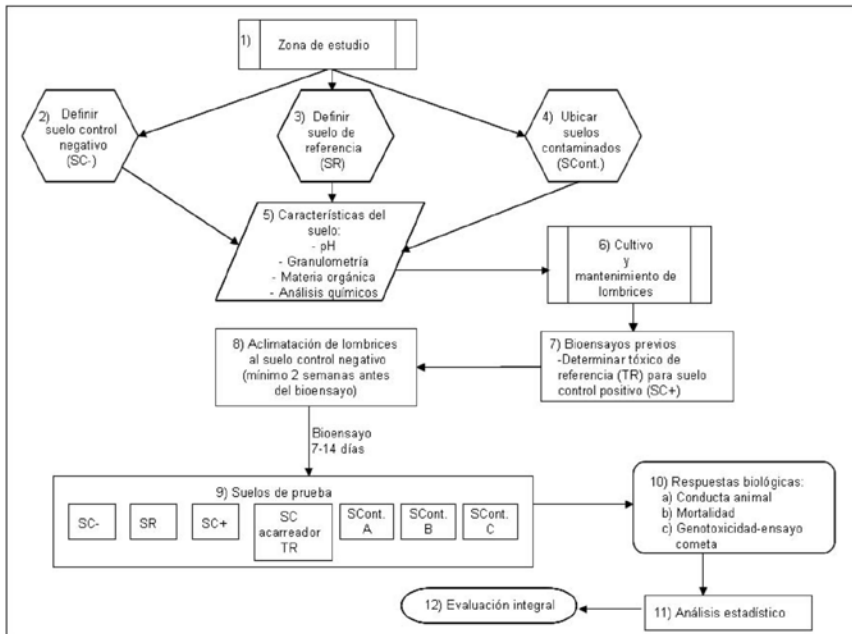
El suelo artificial (20% arcilla, 10% turba, 68% arena, 0-2% CaCO₃) es el sustrato de preferencia en las pruebas de toxicidad de suelos, principalmente por razones de estandarización y comparación de las metodologías empleadas (OECD, 1984; USEPA, 1996; ISO, 2001). Sin embargo, esta aproximación hoy en día no es suficiente, ya que es difícil extrapolar los resultados obtenidos en pruebas con suelo artificial en laboratorio hacia situaciones reales en campo, en donde los suelos difieren en términos de textura, estructura, características químicas y por ende en su funcionamiento.

La tendencia actual es tratar de utilizar suelos control negativos no contaminados en campo, provenientes de una zona similar a la de estudio de donde se obtienen los suelos contaminados o muestras problema. En caso de no ubicar un suelo control negativo en campo, puede optarse por el uso de suelo comercial no contaminado ó un suelo artificial, para entonces llevar a cabo la caracterización ecotoxicológica.

En la prueba que a continuación se detalla las respuestas que se evalúan son: la mortalidad, el comportamiento de los organismos y el daño al ácido desoxiribonucléico (fragmentación al ADN) que muestren las células del

sistema inmune de la lombriz (celomocitos). Este último es un indicador de la presencia de sustancias genotóxicas en los suelos (Salagovic *et al.*, 1996; Cotellet y Féraud, 1999), tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Martin *et al.*, 2005), plaguicidas (Zang *et al.*, 2000) y algunos metales pesados (Reinecke y Reinecke, 2004) (figura 16.1).

Figura 16.1. Metodología general del ensayo de toxicidad aguda con lombriz compostera *Eisenia andrei* en suelos contaminados



PRINCIPIO DE LA TÉCNICA DEL ENSAYO COMETA

El ensayo cometa, también conocido como electroforesis en gel de una sola célula, es capaz de estimar el aumento en el nivel de fragmentaciones en la molécula de ADN (1×10^{10} Da) (Gadik *et al.*, 1992) de células eucarióticas individuales de cualquier organismo, como resultado de la exposición a sustancias genotóxicas (agentes alquilantes o intercalantes), radiaciones UV y daño oxidativo (Steinert *et al.*, 1998 a y b; Cotellet y Féraud, 1999; Collins, 2004). Este ensayo se ha probado en organismos tales como plantas de frijol ancho (*Vicia faba*), poliquetos (*Nereis virens*), lombrices (*E. fetida*), mejillones

(*Mytilus edulis*), ostiones (*Crasostrea virginica*), peces (*Onchorynchus mykiss*), ranas (*Rana clamitans*), ratas y ratones (Cotelle y Férard, 1999). El ensayo inicialmente fue desarrollado para llevarse a cabo en células de mamíferos (ratas), enfocado hacia toxicología humana (Singh *et al.*, 1988; Collins, 2004).

En esta técnica se puede observar claramente un efecto dosis–respuesta, inclusive en la presencia de niveles bajos de genotóxicos en el ambiente (Mitchellmore y Chipman, 1998; Rojas *et al.*, 1999) y tiene la capacidad de medir el daño acumulativo al ADN causado por la mezcla de contaminantes genotóxicos a los cuales se ven expuestos los organismos (Rajaguru *et al.*, 2003). El ensayo cometa se basa en el hecho de que el ADN en condiciones normales se encuentra enrollado en el núcleo, mientras que al estar dañado o roto y ser sometido a un campo electromagnético, éste migrará más que un ADN sin daño. En condiciones alcalinas la técnica es capaz de evidenciar rompimientos de una sola hebra, sitios retardados de reparación y sitios alcali lábiles; mientras que a un pH neutro, la técnica es capaz de evaluar rompimientos de doble hebra en el ADN. La imagen que se puede observar después de exponer las muestras a una electroforesis asemeja a un cometa, en donde la cabeza representa el ADN sin dañar, mientras que la cola del mismo es el ADN dañado o fragmentado.

Es un método que bien puede ser utilizado rutinariamente en células obtenidas de organismos en laboratorio o *in situ*, debido a su sencillez y rapidez (Wilson *et al.*, 1998). De hecho, es un método que ya se utiliza para probar la genotoxicidad de nuevos compuestos antes de ser liberados al mercado, para detectar la presencia de contaminantes genotóxicos en el ambiente (Steinert *et al.*, 1998 a y b; Cotelle y Férard, 1999; Avishai *et al.*, 2002; PEEIR, 2004), para el biomonitoreo humano y la epidemiología molecular (Wojewódzka *et al.*, 1999), así como para investigación básica del daño al ADN y sus sistemas de reparación (Mitchellmore y Chipman, 1998).

INFRAESTRUCTURA EN EL LABORATORIO

PARA EL CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE ORGANISMOS

Mueble incubadora o un cuarto con temperatura e iluminación controlada.

PARA EL ENSAYO COMETA

Cuarto oscuro y con iluminación amarilla (para evitar dañar las células) para la observación al microscopio de fluorescencia y manejo de células. Este cuarto

debe estar apartado, para controlar la contaminación con bromuro de etidio de otros espacios y materiales dentro del laboratorio.

PARA PROCESAR MATERIAL CONTAMINADO

Área exclusiva para limpiar material con residuos de compuestos tóxicos y evitar contaminación de otros materiales.

MATERIAL

Materiales generales (los instrumentos marcados con un * son útiles para la extracción de células y el ensayo cometa): micropipetas de 1-5 mL (2 unidades), 100-1000 μ L (1 unidad), 20-200 μ L (2 unidades), 0.5-10 μ L (2 unidades)*; puntas para micropipetas de 1-5 mL, 100-1000 μ L, 20-200 μ L y 0.5-10 μ L*; vasos de precipitado; picetas; pinzas de metal de punta chata*; termómetros; charolas rectangulares de preferencia de aluminio; algodón; guantes de látex; guantes de nitrilo y escurridor de laminillas.

EQUIPO

Centrífuga refrigerada (4 °C, 3,000 g); plancha con agitación; potenciómetro; potenciómetro para suelos; autoclave; cámaras de electroforesis (chica o mediana), libres de bromuro de etidio; cámara óptica o digital adecuada para el microscopio; fuente de poder; baño maría o Termoblock; deionizador de agua (mOsm); refrigerador; balanza (mg); microscopio de fluorescencia (con objetivos 10X, 20X, 40X, 60X); filtro para microscopio de fluorescencia y computadora conectada al microscopio.

El filtro empleado en el microscopio debe dejar pasar una longitud de onda de 600-660 nm, en la cual se puede detectar el color rojo que emite el bromuro de etidio. El filtro debe tener las siguientes indicaciones: excitación (EX) 528-553 nm, dicróico (DM) 565 nm y emisión (BA) 600-660 nm.

Existen numerosos paquetes de cómputo que registran los parámetros de fluorescencia para medir las imágenes de los cometas (por ejemplo Scion Image program, Komet 3.0-5.0 (Kinetic Imaging), VisComet Imaging). Algunos de estos paquetes en ocasiones se encuentran disponibles en internet en la página de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (National Institutes of Health-NIH) (<http://www.ks.uiuc.edu/Development/biosoftdb/>, <http://www.comet.itrcindia.org/downloads.htm>).

Si no se cuenta con un programa para la computadora, es posible realizar los conteos de los cometas visualmente en el microscopio de fluorescencia. *No existen diferencias significativas* entre el análisis de imágenes en computadora y el conteo visual (Collins, 2004).

PARA EL CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS

Recipientes de cultivo: contenedores de polietileno rectangulares (50 x 39 x 13 cm), 3 para el cultivo de lombrices y 1 para transportar el estiércol; anotador de datos (Datalogger) para registrar las condiciones de humedad ambiental, luminosidad, temperatura ambiental y de la composta (máx/min); contador de tiempo; papel estraza; toallas de papel; cuchara o pala de madera; tela de malla, con ancho de malla pequeño; silicón y segueta.

PARA LA EXTRACCIÓN DE CÉLULAS

Viales de vidrio o de polietileno que tengan capacidad para 6 ml, con tapa de rosca de plástico; cajas de Petri (5 mínimo); hielera; hielo molido; ligas y tubos de centrífuga de polietileno (15 mL, 3,000 g, estériles).

PARA LA PRUEBA

Recipientes de prueba: contenedores de vidrio de 900 mL. La cantidad de recipientes se define a partir del diseño experimental, con un mínimo de 12 a 15 contenedores.

PARA EL ENSAYO COMETA

Porta objetos con un borde esmerilado (76 x 26 mm/31 pulgadas); cubre objetos (24 x 50 mm); vasos Coplin de polietileno opaco con capacidad para 10 laminillas con tapa de rosca; cámara Neubauer o hemocitómetro; vórtex; caja para colocar laminillas; tubos Eppendorf; rack para tubos Eppendorf; reloj de tiempos múltiples y contador múltiple (minutos, 6 teclas).

PARA EL MANEJO DE RESIDUOS

Envases de vidrio de preferencia de un galón y cubetas con tapa.

REACTIVOS

Generales (los reactivos marcados con * son útiles para la extracción de células y ensayo cometa; ** para el ensayo cometa y los bioensayos; *** para los bioensayos): etanol al 100 % (J.T. Baker o Sigma Aldrich)*; acetona (Reactivo analítico) (J.T. Baker o Sigma Aldrich)**; agua deionizada 18 mΩ/destilada; solución salina amortiguadora de fosfato - PBS 10X; cloruro de sodio (NaCl) (J.T. Baker o Sigma Aldrich); fosfato de potasio (KH_2PO_4) (J.T. Baker o Sigma Aldrich); cloruro de potasio (KCl) (J.T. Baker o Sigma Aldrich); fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) (J.T. Baker o Sigma Aldrich); dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich)**; hidróxido de sodio (NaOH) (J.T. Baker o Sigma Aldrich)*; ácido clorhídrico (HCl) (J.T. Baker o Sigma Aldrich)*.

PARA LA EXTRACCIÓN DE CÉLULAS

Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}_2$) (Sigma Aldrich); sulfato de magnesio (MgSO_4) (J.T. Baker o Sigma Aldrich); fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) (J.T. Baker o Sigma Aldrich); bicarbonato de sodio (NaHCO_3) (J.T. Baker o Sigma Aldrich) y agente mucolítico guaiacol gliceril éter (GGE) (Sigma Aldrich).

PARA EL ENSAYO COMETA

Hidróxido de sodio 10N; EDTA disódico 200 mM, pH 10; Tris-Base (Sigma Aldrich) 0.4 M, pH 7.5; triton X-100 (Sigma Aldrich); agarosa regular (Sigma Aldrich); agarosa de bajo punto de fusión (LMA) (Sigma Aldrich); bromuro de etidio (20 mg/mL) (Sigma Aldrich). Opcionalmente se puede usar yoduro de propidio (2.5 mg/mL) o Hoechst 33258 (0.5 mg/mL) (Collins, 2004); peróxido de hidrógeno (H_2O_2) comercial y azul de tripano al 0.04 % (Sigma Aldrich).

PARA LA LIMPIEZA DE ENVASES

Ácido nítrico al 2 % (HNO_3) (Fluca reactivo analítico al 65 %) y jabón Extran (Merck).

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

PARA EL LAVADO DE MATERIAL

Solución de ácido nítrico al 2 %

Disolver el ácido nítrico en el agua destilada, de acuerdo a la cantidad que se requiera para lavar el material. En un recipiente de plástico se deja remojando el material durante 24 horas o una noche como mínimo, posteriormente se seca en estufa a 40 °C. El material debe conservarse a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) y tapado con papel de estraza por un tiempo máximo de un mes.

Reactivos	Volumen de la solución	
	(1 L)	(5 L)
HNO ₃	30.76 mL	153.8 mL
H ₂ O destilada/desionizada	969.24 mL	4.846 mL

PARA LA EXTRACCIÓN DE CELOMOCITOS

Reactivos	Volumen de la solución
	(1 L)
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g
H ₂ O destilada/desionizada	800 mL

Solución salina amortiguadora de fosfato - PBS 10X

Disolver todos los reactivos, ajustar el pH a 7.4 con HCl antes de aforar a 1 L con agua destilada/deionizada 18 mΩ. Esta solución debe esterilizarse en autoclave por 20 minutos y mantenerse a temperatura ambiente. El tiempo máximo de conservación es de un mes.

Solución salina amortiguadora de fosfato – PBS 1X (libre de calcio y magnesio)

Reactivos	Volumen de la solución (1 L)
Solución PBS 10X	100 mL
H ₂ O destilada/desionizada	900 mL

Diluir la solución de PBS 10X con agua destilada/deionizada 18mΩ en una proporción 1:10. Para preparar 1 L de solución PBS 1X, tomar 100 mL de la solución PBS 10X y aforar con 900 mL de agua destilada/deionizada 18 mΩ. Una alícuota de la solución PBS 1X se mantiene en refrigeración (4 °C), el resto se puede mantener a temperatura ambiente. El tiempo máximo de conservación es de 1 mes.

Solución salina balanceada lumbricus - LBSS (ajustada a 300 mOsm)

Reactivos	Volumen de la solución (1 L)	Concentración final (mM)
NaCl	4.18 g	71.5
KCl	0.36 g	4.8
MgSO ₄	0.13241g	1.1
KH ₂ PO ₄	0.054 g	0.4
NaH ₂ PO ₄	0.046 g	0.3
NaHCO ₃	0.353 g	4.2

Preparar esta solución con la ayuda de un agitador magnético a temperatura ambiente con agua destilada/deionizada a 18 mΩ. Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 1 M antes de aforar la solución a 1 L. Una vez preparada debe mantenerse en refrigeración (4 °C) por un tiempo máximo de un mes. Antes de su uso, una parte de la solución (50 mL) debe sacarse del refrigerador para alcanzar la temperatura ambiente.

Solución salina

Reactivos	Volumen de la solución (100 mL)
NaCl	0.85 g
H ₂ O destilada/desionizada	100 mL

Disolver el reactivo en agua destilada/deionizada 18 mΩ y aforar a 100 mL. Conservar a temperatura ambiente por un tiempo máximo de un mes.

Solución de extrusión con etanol

Reactivos	Volumen de la solución (250 mL)	Concentración final
Etanol	12 mL (etanol al 100%)	5%
Solución salina (0.85 g NaCl en 100 ml H ₂ O)	2.12 g	95%
EDTA	625 mg	2.5 mg/mL
GGE	2.5 g	10 mg/mL

Antes de colocar el etanol en la solución, es indispensable disolver los demás reactivos en agua destilada/deionizada 18 mΩ, incluyendo al agente mucolítico guaicol glicerol éter-GGE. Se debe tapar y calentar la solución entre 80-90 °C; una vez disueltos los reactivos *enfriar gradualmente* la solución con agua corriente de la llave. Es importante que *no se agite, ni se mueva excesivamente la solución*, debido a que se precipitan los reactivos y se tendrían que disolver nuevamente. Una vez que la solución alcanza la temperatura ambiente, se le agrega el etanol al 100 %. Posteriormente, se debe ajustar el pH a 7.3 con NaOH 1 M, antes de aforar la solución a 250 mL. Para ajustar el pH es necesario agitar muy lentamente la solución para evitar la precipitación de los reactivos disueltos. Una vez preparada debe mantenerse en refrigeración (4 ° C) por un tiempo máximo de 1 mes.

PARA EL ENSAYO COMETA

Los reactivos marcados con un * deben ser preparados inmediatamente antes de su uso.

Solución de hidróxido de sodio 10 N

Reactivos	Volumen de la solución	
	(500 mL)	(1 L)
NaOH	200 g	400 g

Disolver el reactivo en agua destilada/deionizada 18 mΩ y aforar al volumen deseado. Esta solución se debe almacenar a temperatura ambiente en frasco ámbar por un tiempo máximo de 2 semanas.

Solución de neutralización Tris-base 0.4 M, pH 7.5

Reactivos	Volumen de la solución (1 L)	
Tris-base	48.5 g	
H ₂ O destilada/desionizada 18 mΩ	800 mL	

Disolver el reactivo en el agua destilada/deionizada 18 mΩ, ajustar el pH a 7.5 con HCl concentrado antes de aforar a 1 L. Esta solución debe almacenarse a temperatura ambiente en frasco ámbar por un tiempo máximo de 2 semanas.

Solución madre de lisis

Reactivos	Volumen de la solución	
	(500 mL)	(1 L)
NaCl	146.1 g	73.05 g
EDTA disódico	18.6 g	37.2 g
Tris-base	0.6 g	1.2 g

Disolver los reactivos en agua destilada/deionizada 18 mΩ, ajustar el pH a 10 con aproximadamente 12 g de NaOH en hojuelas y aforar a 1 L. Esta solución se debe almacenar en un envase de vidrio ámbar a temperatura ambiente por un tiempo máximo de 2 semanas.

*Solución de lisis para vaso Coplin (Köplin)**

Reactivos	Volumen para un vaso Coplin (49.4 mL)
Solución Madre de Lisis pH 10	45 mL
DMSO	4 mL
Triton X-100	400 μ L

Se debe preparar la siguiente cantidad de solución por cada vaso, los cuales tienen una capacidad de 10 a 12 laminillas. Mezclar con cuidado todos los reactivos ya que se produce una reacción exérgica. Antes de colocar las laminillas en la solución, ésta se debe enfriar 4 °C, por lo menos 20 minutos antes de su uso. Se recomienda usar vasos Coplin de un material opaco (plástico) o cubrirlos con papel aluminio, para proteger las muestras de la luz. La cantidad de solución que se prepare depende del número de laminillas que se vayan a procesar. Cuando se requieran varios vasos Coplin, se puede preparar el total de solución madre de lisis para vaso Coplin y posteriormente colocarla en cada vaso, verificando de antemano que el pH sea de 10.

Solución EDTA disódico 200 Mm, pH 10

Reactivos	Volumen de la solución (1 L)
EDTA disódico	74.4 g
H ₂ O destilada/deionizada (18m Ω)	1 L

Disolver el reactivo en agua destilada/deionizada 18m Ω , ajustar el pH a 10 con NaOH 1M antes de aforar la solución a 1 L. Esta solución se debe almacenar a temperatura ambiente por tiempo máximo de 2 semanas.

*Solución de desenrollamiento y electroforesis**

Agregar los reactivos y aforar con agua destilada/deionizada 18 m Ω . Es necesario utilizar solución nueva con cada corrida de la electroforesis.

Reactivos	Volumen de la solución	
	Cámara chica (~15 laminillas) (1 L)	Cámara grande (~24 laminillas) (1.5 L)
NaOH 10 N	30 mL	45 mL
EDTA 200 mM, pH 10	5 mL	7.5 mL

Solución de agarosa regular al 0.5 %

Reactivos	Volumen de la solución (25 mL)
Agarosa regular	125 mg

Para preparar la agarosa se debe utilizar agua destilada/deionizada 18 mΩ. Los viales en los que se guarde deberán ser previamente esterilizados. La agarosa se disuelve calentándola, ya sea en un horno de microondas durante 20 segundos, sobre una plancha a baño María o en un Termoblock subiendo la temperatura a 90 °C y posteriormente manteniéndola a 37 °C. La solución que no se emplee de inmediato debe conservarse en refrigeración (4 °C) por un tiempo máximo de un mes.

Solución de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5 % - LMA

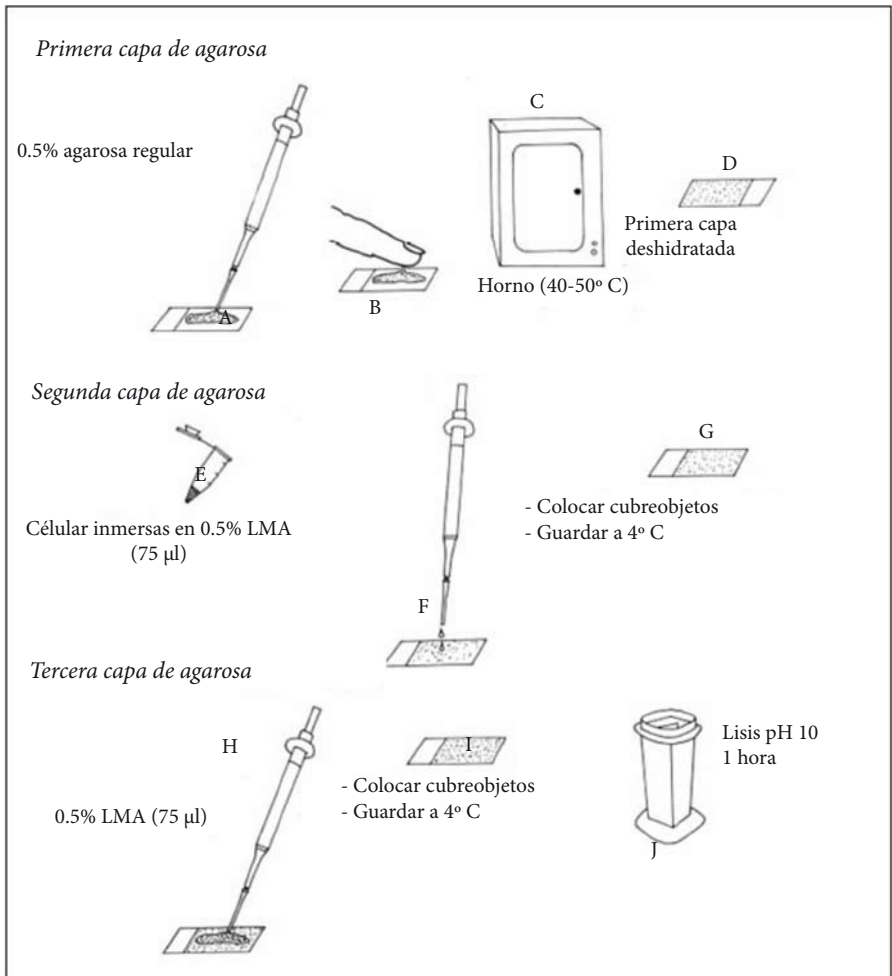
Reactivos	Volumen de la solución (25 mL)
Agarosa de bajo punto de fusión	125 mg

Para preparar la agarosa se debe utilizar agua destilada/deionizada 18 mΩ. Los viales en los que se guarde deberán ser previamente esterilizados. La agarosa se disuelve calentándola, ya sea en un horno de microondas durante 20 segundos, sobre una plancha a baño María o en un Termoblock subiendo la temperatura a 90 °C y posteriormente manteniéndola a 37 °C. La solución que no se emplee de inmediato debe conservarse en refrigeración (4 °C) por un tiempo máximo de un mes.

Preparación de laminillas

A una laminilla esmerilada se le agregan 150 μL de agarosa regular al 0.5% por el lado sin esmeril y con el dedo limpio se cubre inmediatamente toda la superficie. Las laminillas se dejan secar en forma horizontal en un horno a 40 °C durante 15 minutos mínimo. (figura 16.2).

Figura 16.2. Preparación de laminillas para el ensayo cometa con células de lombriz
(Tomado de Rojas *et al.*, 1999)



PARA VIABILIDAD CELULAR

Solución de azul de tripano al 0.4 % (10X)

Disolver el reactivo en agua destilada/deionizada 18 mΩ y guardar a temperatura ambiente en un tubo Eppendorf de 1.5 mL por un tiempo máximo de un mes.

Reactivos	Volumen de la solución (1 mL)
Azul de tripano	0.004 g

Solución de trabajo de azul de tripano

Reactivos	Volumen de la solución (1 mL)
Azul de tripano al 0.4%	20 μL
Solución PBS 1X	980 μL

Para preparar esta solución sólo deben mezclarse bien los reactivos. Esta solución debe usarse de inmediato y no almacenarse.

Solución de bromuro de etidio 1X (20 mg/mL)

Reactivos	Volumen de la solución (50 mL)
Bromuro de etidio	0.01 g
H ₂ O destilada/desionizada 18 mΩ	50 mL

Disolver el reactivo en el agua destilada /desionizada 18 mΩ. Esta solución se debe almacenar en un frasco ámbar, a temperatura ambiente y apartado de los demás reactivos, por un tiempo máximo de un mes.

Solución de jabón Extran al 2%

Reactivos	Volumen de la solución (50 mL)
Extran	20 mL
H ₂ O destilada/desionizada 18 mΩ	880 mL

Para preparar esta solución sólo deben mezclarse los reactivos.

ORGANISMO DE PRUEBA

ORIGEN DE LOS ORGANISMOS DE PRUEBA

Los organismos pueden conseguirse comercialmente donde se produce lombricomposta o puede obtenerse pie de cría y cultivarse en el laboratorio. Es muy importante que los organismos sean correctamente identificados con una clave taxonómica, para ello puede consultarse Blakemore (2002). En caso de no poder hacerlo con claves taxonómicas será necesario contactar a un taxónomo.

CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS

Recipientes

Los recipientes de cultivo deben tener tapas que permitan la aireación, para lo cual se les hace un corte rectangular con una segueta. La abertura se cubre con tela de malla pegada con silicón. De esta manera, la tapa permite el paso del aire y de la luz.

Se recomienda colocar en cada recipiente una densidad de aproximadamente 1,000 a 1,500 individuos.

Medio de cultivo

El suelo preparado para el mantenimiento de los organismos debe contener: 28% de tierra preparada para macetas (mezcla de tierra de hoja, tierra de monte y musgo), sin plaguicidas, envasada comercialmente; 20% de estiércol de caballo (no medicado) seco o pasteurizado; 20% de musgo; 30% de bagazo de zanahoria y 2% de CaCO₃. Para los bioensayos se puede preparar opcional-

mente suelo artificial con la siguiente composición (en peso seco): 20% arcilla, 10% turba, 68% arena, 2% de CaCO_3 (OECD, 1984; USEPA, 1996).

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Obtención de estiércol fresco

El estiércol debe provenir de preferencia de caballos; sin embargo, también puede usarse estiércol de puerco, borrego, vaca, etc., dependiendo de lo que se tenga a la mano. En cualquier caso el estiércol debe provenir de animales que no estén medicados y no estar contaminado con orina.

Al obtener el estiércol, éste se debe mantener en refrigeración por lo menos una noche para bajar la actividad bacteriana que se encuentra desintegramiento la materia orgánica y liberando nitrógeno del estiércol. Transcurrida la noche, el estiércol debe limpiarse de cualquier residuo que pueda traer, como aserrín colocado en las caballerizas. Si se va a dejar secar se deja directo al sol o en estufa a una temperatura entre 25 y 30 °C. El tiempo de secado dependerá de la cantidad a secar, generalmente se requieren 12 horas. Si se va a utilizar el estiércol fresco debe sujetarse a un proceso de pasteurización. Para ello, se envuelve en una tela de malla para colocarlo dentro de una autoclave abierta a una temperatura de 70 °C durante 3 minutos, este tiempo es suficiente para destruir organismos patógenos. Durante este proceso debe monitorearse que la temperatura no suba más allá de los 70 °C. Al transcurrir los 3 minutos, se saca inmediatamente el estiércol y se coloca en un envase con hielo, para bajar la temperatura, durante 5 minutos. Finalmente, el estiércol se guarda en un envase y se mantiene en refrigeración. Previo a su uso se saca del refrigerador hasta que alcance la temperatura ambiente para así deshacerlo en moronas.

En uno de los contenedores rectangulares se mezclan todos los componentes del medio de cultivo, ajustando las proporciones de acuerdo a la cantidad de mezcla a preparar. Esta mezcla se homogeniza y se coloca en los contenedores con las lombrices. Se *humedece adecuadamente* con agua deionizada o destilada, de tal manera que no se sobrepase la capacidad de campo del suelo (no agregar agua hasta que se forme lodo y evitar agregar muy poca agua).

EVALUACIÓN DE AUSENCIA DE EFECTOS SOBRE LOS ORGANISMOS

Los organismos se deben encontrar dentro del suelo formando galerías y túriculos o pedazos de suelo en forma de pequeños churros, los cuales son los residuos que los organismos liberan al terminar de alimentarse. Así mismo, las lombrices deben mantener una coloración rojiza y ser renuentes al tacto.

CARACTERÍSTICAS DE LOS ORGANISMOS PARA INICIAR EL CULTIVO O LA PRUEBA

Los organismos al inicio de la prueba deben ser adultos, por lo menos de dos a tres meses de edad y con el clitelo bien formado (OECD, 1984; USEPA, 1996) (figura 16.3). El clitelo es un anillo de mayor grosor que el resto del cuerpo, presente en el tercio anterior, que alberga juntos a los dos órganos reproductores de las lombrices. El peso individual de cada lombriz debe estar dentro del intervalo de 300-600 mg.

CONDICIONES DEL CULTIVO

Temperatura de 25 ± 3 °C; fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Opcionalmente se pueden usar 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Intensi-

Figura 16.3. Clitelo de una lombriz compostera adulta



dad luminosa de 400 a 800 luxes. Humedad relativa entre 80 a 85% de humedad atmosférica. Esto se puede lograr colocando recipientes abiertos con agua cerca de los contenedores de cultivo. Humedad en el suelo del 35% y pH de 6.5 ± 5 .

ALIMENTACIÓN

Cada semana o cada semana y media se debe preparar nuevo medio de cultivo como alimento. La mezcla nueva se agrega al cultivo, revolviendo con mucho cuidado y agregando agua para humedecer el sustrato. El estiércol puede ser conservado en refrigeración por un tiempo máximo de un mes.

MODO DE TRANSFERENCIA O MANEJO DE ORGANISMOS

Las lombrices se mantienen en las capas más cercanas a la superficie entre los 2 y los 20 cm de profundidad del nivel de la materia orgánica, por ello se requieren preferentemente recipientes rectangulares de poca profundidad. La mejor manera de mantener una población activa, en constante crecimiento y continua reproducción, es dividiendo sistemáticamente la población cada mes o cada mes y medio, transfiriéndola de uno de los recipientes y colocándola en el doble de la superficie original. En un período de 3 a 4 meses, en condiciones favorables, se pueden alcanzar reproducciones de hasta 8 veces el valor de la cantidad inicial de lombrices (Capistrán *et al.*, 2001). Con ayuda de los anotadores de datos (Datalogger) se pueden monitorear diariamente las condiciones de temperatura, luminosidad y humedad atmosférica en las que se desarrolla la población.

COMPUESTO TÓXICO DE REFERENCIA PARA EL CONTROL DEL CULTIVO

Dentro de la evaluación genotóxica en lombrices composteras expuestas a suelos contaminados con hidrocarburos aún *se encuentra en desarrollo la búsqueda del compuesto tóxico de referencia*; sin embargo, existen evidencias de que el Benzo[a]pireno a una concentración de 0.1 ppm es capaz de producir daños genotóxicos en los celomocitos de lombriz *A. longa* después de 7 días de exposición de los organismos a este contaminante (Martin *et al.*, 2005). En general la USEPA (1996) y la OECD (1984) sugieren utilizar cloracetamida como compuesto tóxico de referencia para los bioensayos donde se evalúa mortalidad, más no para evaluar una respuesta genotóxica en las lombrices.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

PREPARACIÓN DEL MATERIAL ANTES DE LA PRUEBA

Lavado de cristalería y otros instrumentos generales

El lavado de material y cristalería debe hacerse con solución de jabón Extran al 2%. Para ello se debe limpiar y enjabonar muy bien el material y cristalería, enjuagar 4 veces con agua corriente y posteriormente enjuagar como mínimo 2 veces con agua destilada/deionizada (18 mΩ). El material y cristalería se deja secar en estufa a una temperatura aproximada de 40 °C. Finalmente se tapan los envases con papel aluminio.

Preparación de material para extracción de células y ensayo cometa

Una vez secos los tubos Eppendorf, tubos de centrifuga, viales, puntas para micropipetas y tapas, todos deben ser enjuagados con alcohol al 70%. Las puntas para micropipetas y tubos Eppendorf deben colocarse en envases de vidrio tapados con papel estroza. Los viales de vidrio o tubos de polietileno deben envolverse en papel estroza para esterilizarse.

Lavado de los envases para los bioensayos

Los envases de vidrio para los bioensayos, una vez lavados como anteriormente se indica, deben remojar en la solución de ácido nítrico al 2 % durante 24 horas. Posteriormente, se dejan secar en estufa a 40 °C y se tapan con papel aluminio. Estos envases no pueden ser manipulados por dentro con ningún material de plástico, sólo vidrio o metal.

Esterilización del material

El material se esteriliza envuelto en aluminio dentro de una autoclave durante 20 minutos.

Calibración de equipos

Antes de comenzar los bioensayos debe verificarse que la centrifuga enfríe hasta 4 °C, alcance a centrifugar a una velocidad de 3000 g y que los tubos

de polietileno de centrífuga soporten la velocidad máxima que se maneja en la técnica (3,000 g).

Preparación de las muestras

Antes de procesar los suelos, se debe conocer *la humedad a capacidad de campo* (Reya, 1996), para así poder conocer a cuántos mL equivale el 35 % de agua para cada suelo problema. Para ello se debe tomar una muestra de suelo de aproximadamente 60 g y colocar en una maceta o vaso desechable con perforaciones en la base, evitando pérdidas de suelo. Posteriormente, se añade agua hasta que el suelo se humedezca completamente y se deja drenar el agua sobrante. Se deja reposar 2 a 3 días para continuar con el procedimiento.

En un crisol previamente tarado se colocan 10 g de muestra del suelo, de preferencia no tomada de la superficie, y se pesa. Este proceso se realiza por triplicado. Los crisoles se colocan en la estufa a 105 °C, por lo menos 24 horas. Posteriormente, se vuelven a pesar los crisoles con suelo. Con los valores de peso inicial y final se calcula el porcentaje de humedad a capacidad de campo (% HCC), de la siguiente manera:

$$\% \text{ HCC} = \frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}}{\text{Peso seco}} \times 100$$

Del resultado de la resta del peso húmedo con el peso seco, se obtiene la cantidad de agua disponible en el suelo, por lo tanto al hacer una regla de tres entre la cantidad de agua en el suelo y el 35% requerido en 100 g, se obtiene la cantidad de agua requerida para cualquiera que sea la cantidad de suelo a utilizar.

Para los bioensayos debe utilizarse 200 g de suelos por envase para cada tratamiento, los cuales se colocan en los envases de vidrio de 900 mL previamente lavados. Cada tratamiento se realiza mínimo por triplicado, pero se recomienda hacerlo por cuadruplicado.

Las muestras problema pueden almacenarse por un tiempo indefinido mientras el suelo se encuentre seco, siempre y cuando no contenga contaminantes volátiles cuyos efectos se quieran evaluar. El secado del suelo puede hacerse a la sombra a temperatura ambiente (25 °C), protegiéndolo de cualquier inclemencia del tiempo por un período máximo de una semana. También es posible secar el suelo en una estufa a 35 °C, el tiempo de secado depende de la cantidad de suelo a secar.

Antes de realizar los bioensayos deben determinarse los parámetros físico-químicos iniciales del suelo, incluyendo la materia orgánica, granulometría y pH. Para los suelos contaminados con hidrocarburos se recomienda determinar las concentraciones de los 16 HAP considerados prioritarios por la USEPA (naftaleno (Nap), acenaftileno (Acv), acenafteno (Ace), fluoreno (Flu), antraceno (Ant), fenantreno (Phe), fluoranteno (Fla), pireno (Pvr), benzo[a]antraceno (BaA), criseno (Crv), benzo[b]fluoranteno (BbF), benzo[k]fluoranteno (BkF), benzo[a]pireno (BaP), dibenzo[a,h]antraceno (DahA), benzo[g,h,i]perileno (BghiP) e indeno[1,2,3-cd]pireno (Ind)).

SUELOS A UTILIZAR

Suelo control negativo

Es un suelo libre de contaminantes que es necesario para evaluar la aceptabilidad de la prueba (Burton *et al.*, 2003). Este suelo puede ser *una sola opción* de las siguientes: 1) un suelo comercial sin contaminantes, 2) un suelo de campo no contaminado *proveniente de una zona alterna y similar al área de estudio*, previamente conocida como una zona *sin contaminantes* o 3) un suelo artificial (arena 68 %, arcilla 20 %, turba 10 % y CaCO₃ de 0-2 %). Debido a que se desconoce la posibilidad de obtener en México suelo comercial sin contaminantes, se recomiendan las opciones 2 y 3 (figura 16.4). Es importante recalcar que la opción 2, suelo de campo no contaminado, funciona como suelo control negativo solamente cuando se ha corroborado la limpieza del mismo. *Se sugiere usar el suelo artificial sólo cuando no se cuente con: a) un suelo de campo no contaminado y b) un suelo de referencia.*

Una vez ubicado el suelo control negativo debe ser llevado al laboratorio con 2 o 3 semanas de anticipación a los bioensayos para aclimatar a los organismos a él. Como metodología de muestreo de suelos se recomienda ver la guía de la USEPA, 2001. El *bioensayo no es válido* si el suelo control negativo presenta una *mortalidad mayor al 20 %* (OECD, 1984; USEPA, 1996).

Suelo de referencia

Es un suelo que *proviene de la misma zona de estudio* que las muestras problema, pero que *está libre de contaminantes o se conoce de antemano que tiene una concentración muy baja de contaminantes*. Este suelo se utiliza para mantener las características físico-químicas de los suelos en el bioensayo lo

en cada uno de los envases de vidrio a utilizar. Posteriormente, los envases se colocan bien cerrados en un homogenizador durante una noche. Al salir se abren y se dejan reposar en la oscuridad durante las 24 horas previas al bioensayo, para permitir la evaporación del disolvente acarreador.

Suelo control negativo con el disolvente acarreador

Es el suelo control negativo seleccionado al cual se *le adiciona solamente la cantidad de disolvente acarreador requerida para transportar el compuesto tóxico de referencia* (figura 16.1) *en el suelo control positivo*. Este suelo se usa con la finalidad de observar *si el disolvente acarreador causa alguna interferencia en los organismos durante el bioensayo*. El procedimiento para su preparación es la misma que el suelo control positivo.

DESARROLLO DE LA PRUEBA

Condiciones de la prueba

Temperatura de 25 ± 3 °C; fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Opcionalmente se pueden emplear 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad; intensidad luminosa entre 400 y 800 luxes; humedad atmosférica relativa de 80 a 85%; humedad en el suelo de 35% y pH de 6.5 ± 5 .

Prueba exploratoria

La prueba exploratoria debe durar 7 días. Se sugiere utilizar benzo[a]pireno a concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm, las cuales han sido probadas en la lombriz *A. longa* (Martin *et al.*, 2005). *Esta etapa del ensayo donde se busca el daño genotóxico de los hidrocarburos con la lombriz compostera E. andrei se encuentra en desarrollo.*

Para estas pruebas exploratorias se recomienda encontrar un suelo control negativo, con características físico-químicas similares a la de las muestras problema a evaluar.

Uno de los requisitos más importantes que debe de cumplir el suelo control negativo es que debe permitir el buen desarrollo de las lombrices. *Si no se llegase a encontrar un suelo control negativo en campo, se tendría que preparar suelo artificial.*

De la misma forma, también *se debe encontrar la concentración y el compuesto tóxico de referencia* para poder incorporarlo en el suelo control

negativo y así preparar el suelo control positivo que permita activar o inhibir las respuestas biológicas a evaluar en los organismos, según sea el caso. Esto permite corroborar que el compuesto tóxico está causando efectos visibles a través de los biomarcadores seleccionados.

Prueba definitiva

Antes de la prueba definitiva, debe humedecerse el suelo al 35 % con 24 horas de anticipación, para permitir una buena homogenización de la humedad. Para ello, el suelo puede mezclarse con una varilla de vidrio o colocarse en un homogenizador durante 1 hora.

La prueba definitiva tiene una duración de 7 a 14 días. En ella se utilizan organismos adultos de 300-600 mg con un clitelo bien formado. Los organismos se deben aclimatar bajo las mismas condiciones que se contemplan para la prueba, lo que implica que deben de ser colocados en el suelo control negativo por lo menos una semana antes del bioensayo (de preferencia dos semanas antes) y para el inicio de la prueba deben de seleccionarse estos mismos organismos con dos o tres días de anticipación. Para este respecto, se debe de considerar el total de lombrices a utilizar, ya que se colocan 10 organismos por envase.

Antes del comienzo del bioensayo se debe tener muy claro su diseño para conocer las diferentes cantidades y volúmenes de los diversos materiales que se necesitarán a lo largo de éste. Todos los suelos problema durante el bioensayo, así como los suelos control negativo, control positivo y control negativo con el disolvente acarreador, deben realizarse mínimo por *triplicado*, pero de *preferencia por cuadruplicado*.

Es necesario identificar claramente los envases de vidrio para cada suelo y colocar correspondientemente 200 g del mismo en cada uno de ellos. Dependiendo de la consistencia del suelo se tendrá un volumen aproximado de 600 mL. Es muy importante que durante la prueba la relación suelo-agua se mantenga en 35%, tal como se indica anteriormente en la preparación de las muestras. Asimismo, cerca de los envases se deben colocar recipientes abiertos con agua para mantener la humedad ambiental en aproximadamente 80-85 %.

Una vez que los recipientes están preparados con sus suelos correspondientes y se incorporan los organismos en ellos, se cubre la boca del envase con papel aluminio, tela de malla y una liga. Posteriormente se colocan al *azar* los envases dentro de la incubadora, dando así inicio al bioensayo.

El bioensayo no es válido si en el suelo control negativo se presenta una mortalidad mayor al 20% (OECD, 1984; USEPA, 1996).

Debido a que es una prueba corta, los organismos no deben ser alimentados durante la misma. Las características seleccionadas de los organismos son específicas para que éstos se encuentren en *buenas condiciones al iniciar el bioensayo*. Cada semana se debe vaciar el contenido de los recipientes en charolas de metal para verificar las condiciones en las que se encuentran los organismos y evaluar mortalidad. Diariamente se registra la conducta de los organismos. Al inicio y final del bioensayo se deben evaluar las propiedades físico-químicas del suelo (materia orgánica, pH y cantidad de contaminantes, específicamente los 16 HAP seleccionados por la USEPA para suelos contaminados con hidrocarburos). Es recomendable considerar la posibilidad de evaluar además la presencia de metales pesados, contaminantes orgánicos persistentes y plaguicidas en las muestras problema, dependiendo de la procedencia de las mismas.

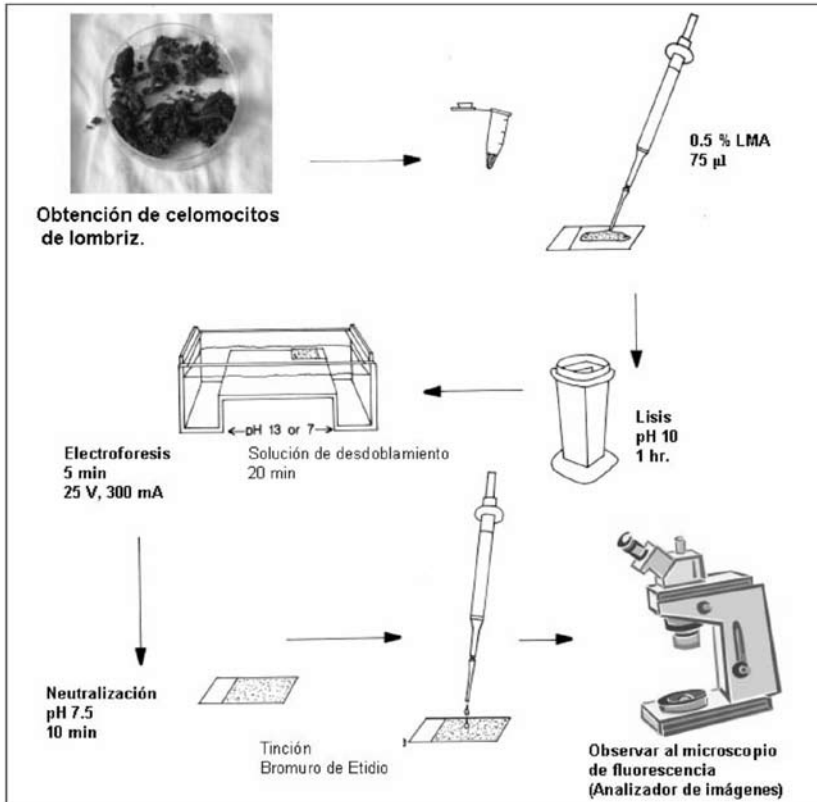
ENSAYO COMETA

Esta técnica consiste en preparar laminillas embebiendo células en agarosa para darles soporte. Posteriormente, las laminillas se sumergen en una solución de lisis, la cual tiene un alto contenido de detergentes y sales para lisar las membranas celulares. Consecutivamente, las laminillas se sumergen en una solución amortiguadora por un determinado tiempo para permitir que se desenrolle la doble hélice del ADN de las células. Al término de este proceso, las laminillas se exponen a una corriente eléctrica y dependiendo del grado de daño o fragmentación del ADN, se observará una mayor o menor migración del mismo. Después de exponer las laminillas a la corriente eléctrica, se neutraliza la solución de electroforesis con una solución amortiguadora de pH 7.5. Finalmente las laminillas se tiñen con un fluorocromo (bromuro de etidio) para poder analizarlas en el microscopio de fluorescencia. El ADN fragmentado migra al ser expuesto a la corriente eléctrica, por ello las células, al ser observadas al microscopio, asemejan un “cometa”, con una cabeza altamente fluorescente (ADN enrollado) y una “cola” (ADN fragmentado) que incrementa su longitud dependiendo del ensayo cometa del daño presente (Singh *et al.*, 1988) (figura 16.5).

Procedimiento

El procedimiento que aquí se presenta es una técnica modificada de Singh *et al.*, 1988; Rojas *et al.*, 1999; Corona-Vadillo, 2005 y Carrisoza-Valenzuela, 2006. Para

Figura 16.5. Método para realizar el ensayo cometa para analizar celomocitos de lombriz de tierra (modificado de Rojas *et al.*, 1999)



la obtención de celomocitos de lombriz se siguió el método modificado de Eyambe *et al.*, 1991; Zang *et al.*, 2000 y Hendawi *et al.*, 2004. Los pasos marcados con un * deben ser preparados con anticipación, de preferencia uno o dos días antes de su aplicación.

- 1) Limpiar las laminillas o porta objetos nuevos o pre-lavados*.
- 2) Con las manos limpias, tomar con cuidado la laminilla por el lado esmerilado y en la parte central (sin esmeril) colocar 150 µL de solución de agarosa regular 0.5% (figura 16.2)*.
- 3) Extender inmediatamente con el dedo la agarosa por la laminilla (*primer capa de agarosa*). Es importante notar que si la agarosa no se mantiene

extendida homogéneamente en toda la laminilla, esto indica que se está enfriando. En ese caso, la agarosa debe volver a calentarse y colocar otros 150 μ L en una laminilla limpia.

- 4) Colocar la laminilla con agarosa sobre una charola en forma horizontal y secarla en una estufa de preferencia a 40 °C, durante 15 minutos mínimo.
- 5) Una vez deshidratada la agarosa, se rotulan las laminillas con lápiz del lado donde se encuentra el esmerilado, para así indicar la superficie donde se encuentra colocada la agarosa.
- 6) Las laminillas pueden ser usadas de inmediato o pueden guardarse en una caja para protegerlas del polvo y humedad*.
- 7) Seleccionar lombrices con un clitelo bien formado (*E. andrei*) de preferencia entre 300-600 mg (OECD, 1984; USEPA, 1996)*
- 8) Dejar a las lombrices seleccionadas de 24 a 48 horas en purga, en frascos o cajas Petri de vidrio limpias, con toallas de papel que estén bien humedecidas. Las toallas deben de ser cambiadas y humedecidas por lo menos cada 12 a 24 horas para evitar que los restos desechados por las lombrices sean consumidos nuevamente.
- 9) Después de purgar las lombrices, colocar con mucho cuidado cada lombriz en un envase con 1 mL de solución LBSS a temperatura ambiente. Esto ayuda a que la lombriz expulse cualquier desecho restante en su tracto digestivo.
- 10) Secar con una toalla de papel y con mucho cuidado a las lombrices para evitar que suelten los celomocitos prematuramente debido a la manipulación.
- 11) Verificar que no quedo contenido estomacal.
- 12) Pesarlas y devolverlas a su envase individual con LBSS. Tratar de realizar este paso lo más rápido posible.
- 13) Colocar a cada lombriz en un envase de 15 mL con 3 mL de solución de extrusión fría (4 °C) y en hielo durante 2 a 4 minutos hasta que la solución se vuelva turbia de un color amarillo. A partir de este paso todo *debe realizarse en hielo*.
- 14) Extraer las lombrices y colocarlas en un envase aparte con una toalla de papel húmedo.
- 15) La solución se centrifuga a 380 g a una temperatura de 4 °C por 3 minutos. Al finalizar la centrifugación, se debe observar un pellet color amarillo, si no es el caso, puede volverse a centrifugar por 2 minutos más.
- 16) Con cuidado quitar 2.5 mL de sobrenadante y resuspender el pellet con 6 mL de solución LBSS fría (4 °C).
- 17) Centrifugar a 380 g a una temperatura de 4 °C por 3 minutos.

- 18) Desechar 5.5 mL de sobrenadante y resuspender con 3 mL de solución LBSS fría.
- 19) Centrifugar a 380 g a una temperatura de 4 °C por 3 minutos.
- 20) Obtener con mucho cuidado 3 mL de sobrenadante y resuspenderlo en 3 mL de solución PBS 1X fría.
- 21) Centrifugar a 3,000 g a una temperatura de 4 °C por 3 minutos.
- 22) Obtener aproximadamente 3.0 mL de sobrenadante.
- 23) Mantener las células en el mL restante de la solución PBS 1X, resuspenderlas y dejarlas en hielo y en la oscuridad.
- 24) *Preparar células control positivo con peróxido de hidrógeno.* Para ello se deben colocar en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, 50 µL de celomocitos con 50 µL de solución de PBS 1X con 200 µL de H₂O₂. Se deja reposar en hielo y en la oscuridad durante 20 minutos. Esta muestra se debe preparar una vez que se vaya a concluir con la extracción de todas las demás células del resto de las lombrices, para evitar sobre exponer estas células en el peróxido de hidrógeno por más de 30 minutos.
- 25) Derretir la agarosa de bajo punto de fusión (LMA) a 90 °C, posteriormente bajar la temperatura y mantenerla a 37 °C en baño María. Si se cuenta con un Termoblock, es recomendable usarlo para mantener mejor controlada la temperatura de la agarosa.
- 26) Preparar la solución de lisis y mantenerla en refrigeración.
- 27) *Viabilidad celular.* Colocar en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, 10 µL de células, incorporar 5 µL de solución de azul de tripano 0.4 % y mezclar con cuidado. Montar la solución sobre una cámara Neubauer o hemocitómetro y observar al microscopio óptico. La cámara Neubauer consta de cinco campos ópticos: a) esquina superior izquierda, b) esquina superior derecha, c) esquina inferior izquierda, d) esquina inferior derecha y e) cuadro central. El conteo puede realizarse de dos maneras en el microscopio óptico: con aumento de 10X contando el número de células presentes en los 4 campos visuales de las esquinas (a, b, c y d) o con aumento de 40X contando únicamente *dentro del cuadro central* (e) el número de células ubicadas en los cinco campos ópticos: ea) esquina superior izquierda, eb) esquina superior derecha, ec) esquina inferior izquierda, ed) esquina inferior derecha y ee) cuadro central.
- 30) *Obtención de viabilidad celular y densidad celular.* El azul de tripano es un coloide que se introduce en las células que presentan la membrana rota. Este método indica la integridad de la membrana celular, de tal forma que células con membrana celular dañada se tiñen de color azul

y, por el contrario, las células con membrana íntegra se observan blancas o brillantes. El cálculo de la viabilidad y densidad celulares se realiza de la siguiente forma (Carrisoza, 2006):

Para el conteo con aumento de 10X: el número de células por mL se obtiene dividiendo el total de células contadas entre el número de cuadrantes contados (4). Este resultado se multiplica por el factor de dilución, que en este caso es de 2 y por 1×10^4 .

$$\text{Viabilidad} = \left(\frac{\Sigma \text{ células viables}}{\Sigma \text{ células totales}} \right) \times 100$$

$$\text{Densidad celular} = \left(\frac{\Sigma \text{ células viables}}{\text{N}^\circ \text{ de áreas}} \right) * \text{factor de dilución} * 1 \times 10^4 = \frac{\text{Células}}{\text{mL}}$$

Para conteo con aumento de 40X. El número de células por mL se obtiene dividiendo el total de células contadas entre el número total de cuadrantes contados (5) en el área central. Este resultado se multiplica por el factor de dilución, que en este caso es de 2 y por 1×10^4 .

$$\text{Viabilidad} = \left(\frac{\Sigma \text{ células viables}}{\Sigma \text{ células totales}} \right) \times 100$$

$$\text{Densidad celular} = \left(\frac{\Sigma \text{ células viables}}{\text{N}^\circ \text{ de áreas}} \right) * \text{factor de dilución} * 1 \times 10^4 = \frac{\text{Células}}{\text{mL}}$$

Los pasos 26 y 27 pueden omitirse una vez que la viabilidad de las células con las que se está trabajando se ha evaluado constantemente y su resultado es consistente, obteniéndose una viabilidad igual o mayor al 70%.

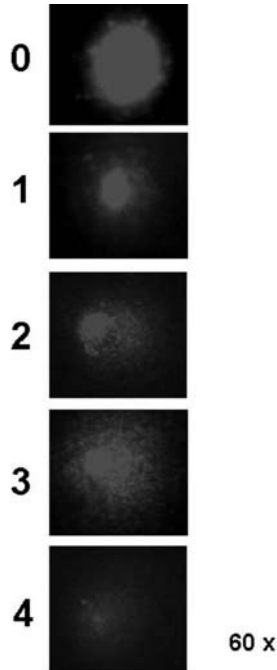
- 28) Colocar 75 μL de solución de agarosa LMA al 0.5% en un tubo Eppendorf por separado. Este paso se prepara una vez que se tiene las células a emplear.
- 29) Inmediatamente después, obtener 10 μL del botón de células (paso 23) e incorporarlos al tubo Eppendorf con los 75 μL de la solución de agarosa LMA al 0.5%. (La concentración ideal de células es aproximadamente

- de 1×10^5 células/mL). Este paso debe realizarse lo más rápido posible para evitar que la agarosa se solidifique.
- 30) Mezclar cuidadosamente los 10 μ L de suspensión celular con los 75 μ L de la solución de agarosa LMA y colocarlos con cuidado en el portaobjetos, evitando hacer burbujas, (*segunda capa de agarosa*). Es importante tener las laminillas previamente identificadas con lápiz para su uso.
 - 31) Colocar un cubreobjetos (nuevo o pre-lavado) encima de la mezcla de agarosa y células, con cuidado para evitar hacer burbujas y guardar en el refrigerador a 4 °C por unos 3 o 5 minutos hasta que solidifique bien la agarosa.
 - 32) Retirar cuidadosamente el cubreobjetos deslizándolo hacia un lado. Agregar 75 μ L de solución de agarosa LMA en la parte central del portaobjetos, volver a colocar el cubreobjetos encima y refrigerar durante 5 minutos hasta que solidifique la agarosa, (*tercer capa de agarosa*).
 - 33) Una vez solidificada la agarosa, quitar el cubreobjetos deslizándolo hacia un lado y con unas pinzas tomar la laminilla del lado esmerilado para sumergirla en forma vertical en la solución de lisis, previamente fría en los vasos Coplin, por lo menos durante 1 hora a 4 °C. Es necesario tener mucha precaución de que no se vaya a pegar el lado donde se encuentra la agarosa de una laminilla contra otra o que se vaya a golpear con la esquina de alguna laminilla al meterla en el vaso, porque la muestra que va inmersa en la agarosa se puede desprender o rasgar.
 - 34) Preparar la solución de desenrollamiento y electroforesis. Mantenerla a 4 °C.
 - 35) La cámara de electroforesis debe estar en frío a 4 °C. Verificar que se encuentre en posición totalmente horizontal. Es importante mantener la solución de electroforesis en frío, así como realizar la misma electroforesis en refrigeración, ya que esto permite mantener un voltaje y amperaje más homogéneo.
 - 36) Sacar las laminillas de la solución de lisis, escurrirlas y transferirlas a la cámara de electroforesis colocándolas en forma horizontal, cuidando que el esmeril quede de un mismo lado. Es importante anotar la posición de las laminillas ya que por el manejo se puede ir borrando la nomenclatura de las mismas.
 - 37) Añadir suficiente solución de desenrollamiento y electroforesis para cubrir las muestras. Esto depende del tamaño de la cámara de electroforesis utilizada (una cámara chica requiere aproximadamente 300 mL y una cámara mediana 650 mL).

- 38) Dejar las muestras en la solución de desenrollamiento y electroforesis durante 20 minutos a 4 °C.
- 39) Al término de los 20 minutos, conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder para corroborar un voltaje de 20-25 V (volts) (según la fuente de poder). Generalmente es de 25 V y se verifica que la corriente sea de 300 mA.
- 40) Una vez ajustados estos parámetros encender la fuente de poder e iniciar un conteo de 5 minutos. Durante este tiempo, la cámara de electroforesis sigue estando en refrigeración (4 °C), para evitar que la solución se caliente durante el proceso. Hay que tomar en cuenta que se debe ajustar el tiempo de electroforesis para cada tipo celular, ya que éste puede variar.
- 41) Apagar la fuente de poder, retirar las laminillas cuidadosa y rápidamente de la cámara de electroforesis, colocándolas en una charola en forma horizontal con la agarosa hacia arriba.
- 42) Agregar cuidadosamente 1 mL de solución amortiguadora Tris base a pH 7.5 sobre la agarosa de las laminillas. Dejarlas con la solución durante 5 minutos.
- 43) Escurrir la solución Tris base de la laminilla y volver a colocar 1 mL más de la misma solución sobre las laminillas. Dejarlas con la nueva solución durante otros 5 minutos. Esta solución neutraliza el pH alcalino de la solución de desenrollamiento y electroforesis.
- 44) Escurrir la solución amortiguadora de la laminilla y con una piceta se agrega cuidadosamente etanol al 100 % (absoluto), dejar reposar durante 10 minutos para deshidratar la agarosa.
- 45) Colocar las laminillas recargadas en forma vertical sobre una pared o en un escurridor para laminillas, hasta que sequen completamente. Una vez secas, guardar las laminillas en una caja protegiéndolas del polvo y humedad, hasta su evaluación.
- 46) Usando guantes y bata, agregar 20 µL de solución de bromuro de etidio 1X sobre la laminilla y se coloca un cubreobjetos.
- 47) Leer las laminillas en un microscopio con una lámpara de fluorescencia 20X y 40X. Las fotos pueden tomarse en un ocular 60X para mejor resolución. Colocar la laminilla sobre la platina, abrir el filtro de fluorescencia que detecta el bromuro de etidio y enfocar la laminilla con la ayuda de los tornillos macro y micrométricos. El filtro de excitación debe ser de 528-553 nm. La luz que se observa que sale del filtro es de color verde esmeralda; sin embargo, de la muestra se tiene una emisión

- de longitud de onda de 600-660 nm, lo que permite observar el color rojo que emite el bromuro de etidio.
- 48) Contar 100 células por muestra de una manera sistemática. Por cada muestra se tienen 2 laminillas y cada una de ellas se cuentan 50 células. La nomenclatura de las laminillas por tratamiento debe ser dada con una clave para evitar influenciar los conteos; consecuentemente, la lectura de las laminillas debe ser al *azar*.
 - 49) Con la ayuda de un contador múltiple se obtienen los datos de clasificación de daño del ADN, que de menor a mayor daño corresponde a los niveles: 0, 1, 2, 3 y 4. Esta clasificación se estableció con base a la distancia que migra el ADN hacia fuera del núcleo de la célula, formando una cola, como la de un cometa. El nivel 0 corresponde a células con una cola no detectable, y conforme se aumenta el nivel de daño en las células, el tamaño de la cola aumenta, hasta llegar al nivel 4 donde todo el ADN se encuentra fuera del núcleo, como una nebulosa o nube y donde el núcleo no es visible (figura 16.6). También se puede hacer uso del conteo y clasificación con mediciones explicado en Reinecke y Reinecke, 2004.
 - 50) El conteo visual debe ser realizado por un observador previamente entrenado para distinguir los diferentes niveles de daño de las células. De esta forma se garantiza que los conteos serán comparativos entre los distintos tratamientos. De igual forma, el conteo debe ser realizado con un contador múltiple.
 - 51) Al terminar el conteo, retirar la laminilla de la platina del microscopio. Con cuidado retirar el cubreobjetos y colocarlo en una superficie plana con la cara que estuvo en contacto con la laminilla y el bromuro de etidio hacia arriba. Esto es con el fin de utilizar nuevamente el mismo cubreobjetos y evitar contaminación en exceso de más material con bromuro de etidio.
 - 52) La laminilla revisada se coloca en un vaso Coplin con etanol al 100 % durante 3 a 5 minutos para desactivar el bromuro de etidio. El alcohol con bromuro de etidio y todos los utensilios contaminados con bromuro deben de ser desechados aparte y ser dispuestos como residuos peligrosos.
 - 53) Transcurrido el tiempo, sacar la laminilla y colocarla de manera vertical recargándola contra una superficie plana o un escurridor de laminillas.
 - 54) Una vez secas las laminillas se pueden guardar en una caja.

Figura 16.6. Clasificación de los diferentes niveles de daño del ADN en celomocitos de lombriz compostera *Eisenia andrei* mediante la técnica del ensayo cometa y tinción con bromuro de etidio. Imagen comparativa de los diferentes niveles de daño del ADN donde el nivel 0 representa células sin daño, mientras que el nivel 4 representa las células con mayor daño. Fotos tomadas con un aumento de 60X en microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800



EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Para realizar el análisis estadístico y evaluar el daño causado a los celomocitos de la lombriz compostera *E. andrei* entre los diferentes tratamientos, es necesario convertir los conteos de las células a unidades arbitrarias (UA), las cuales representan la media de la clasificación visual dada por las réplicas en cada tratamiento.

OBTENCIÓN DE UNIDADES ARBITRARIAS (UA)

Al terminar el conteo de las 100 células por muestra, se hace una sumatoria del total de células en cada nivel de daño y se multiplica por su mismo nivel de daño, para finalmente obtener la sumatoria de éstas multiplicaciones. Por ejemplo, si se obtiene en el conteo de una muestra:

Total = 100 células	
30 células x nivel 0 =	0
23 células x nivel 1 =	23
20 células x nivel 2 =	40
17 células x nivel 3 =	51
10 células x nivel 4 =	4
	$\Sigma = 154 \text{ UA}$

La clasificación de daño por medio de unidades arbitrarias se encuentra en un intervalo de 0 a 400, siendo 0 el menor daño y 400 el mayor daño. Si se obtuvieran 100 células en el nivel 0, la multiplicación consiste en 100 células x 0, dando un total de 0 UA, lo cual corresponde a células intactas, sin daño. Mientras que un valor de 400 UA, corresponde a células completamente dañadas, proviniendo de la multiplicación de 100 células x nivel 4. Un nivel de 154 UA significaría un nivel medio-bajo (modificado por Horváthova *et al.*, 1998; Avishai *et al.*, 2002; Collins, 2004; García, 2004).

Los resultados entre tratamientos se comparan estadísticamente a través de un análisis de varianza (ANOVA), con su respectiva comparación Múltiple de Holm-Sidak (Sokal y Rolf, 2001). Este análisis puede ser llevado a cabo en cualquier programa estadístico, como el SIGMASTAT[®] 2003, seguido de la asignación de grupos homogéneos y la representación gráfica de las Unidades Arbitrarias. Se pueden presentar las fotografías de las células sin daño y la clasificación de daño del ADN cuando se trate de una especie nueva de lombriz o de cualquier otro organismo, para tener un registro de las células de los organismos sometidos a bioensayos y estudiados bajo esta técnica.

RESPUESTAS MEDIDAS

Mortalidad

Cada semana se evalúa la mortalidad al vaciar el suelo en una charola de metal tocando a las lombrices; si no responden al tacto, se considera que están muertas. Al mismo tiempo, se hace un barrido minucioso del suelo contando las lombrices restantes, es fácil perderlas de vista por estar bien integradas en el suelo y si han muerto sus cuerpos son rápidamente desintegrados y son prácticamente imperceptibles. Estos últimos resultados se deben presentar como porcentaje de mortalidad o sobrevivencia.

Conducta animal diaria

Se debe observar la creación de galerías, si los organismos se encuentran dentro o fuera del suelo y la presencia o ausencia de turrículos.

Daño en el ADN de los celomocitos

Se presentan los resultados obtenidos en el ensayo cometa.

CONSIDERACIONES ADICIONALES Y FINALES

Para obtener una clara clasificación de los niveles de daño al ADN de las células evaluados por el ensayo cometa, se tienen que someter las células extraídas de los organismos a peróxido de hidrógeno o radiación ultravioleta, como un agente control positivo interno de la técnica. En este caso se sugiere utilizar peróxido de hidrógeno; sin embargo, todavía es necesario hacer más pruebas para determinar cual de los tratamientos es el mejor para obtener buenos resultados.

Es importante seleccionar adecuadamente el suelo control negativo que se utilizará en el diseño experimental, ya que es con el que se establecerá la línea base de daño que presentan las lombrices. Esta selección depende en gran medida del objetivo del bioensayo. Si se quiere evaluar la ecotoxicidad combinada de todos los contaminantes biodisponibles presentes en suelos o sustratos contaminados en el marco de una caracterización ecotoxicológica del suelo, entonces lo ideal es contar con un suelo de referencia (suelo de la zona de estudio no contaminado) que se podría utilizar como suelo control negativo (figura 16.4).

Tabla 16.1. Condiciones recomendadas para las pruebas de genotoxicidad con *Eisenia andrei*

Tipo de ensayo	Estático
Matriz de prueba	Suelos de campo
Temperatura	23-25 ± 3 °C
Humedad atmosférica relativa	80-85%
Humedad en el suelo	35%
pH	6.5 ± 5
Fotoperíodo	16 horas luz: 8 horas oscuridad; 12 horas luz: 12 horas oscuridad
Intensidad luminosa	400-800 luxes
Cantidad de suelo de prueba	200 g
Estadio de organismos	Adulto; clitelo bien formado
Peso por organismo	300-600 mg
Aclimatación	2 semanas de anticipación al bioensayo; mínimo 1 semana
Número de lombrices por réplica	10 organismos
Número de réplicas	Mínimo 3, preferentemente 4
Duración de la prueba	7-14 días
Alimentación	No
Efectos medidos	Fragmentación del ADN en celomocitos (células el sistema inmune) a través del ensayo cometa, conducta animal y mortalidad de las lombrices
Resultado final	Presencia de genotóxicos en los suelos y mortalidad del organismo
Control positivo	0.1, 1 y 10 ppm de benzo[a]pireno en la lombriz <i>Aporrectodea longa</i> (Martin <i>et al.</i> , 2005). En desarrollo
Aceptabilidad de los resultados	Mortalidad ≤ 20% en el control negativo

En la extracción de celomocitos de lombriz se han detectado tres tipos de células y hace falta evaluar con qué tamaño de célula, de los tres tipos, se trabajará. En este bioensayo se cuantifica el daño en las células de mayor tamaño. Asimismo, se requiere de la obtención del nivel base del daño al ADN que presentan los celomocitos, manteniendo a los organismos bajo condiciones controladas y expuestos en suelos libres de contaminantes.

En la literatura se ha utilizado benzo[a]pireno como compuesto tóxico de referencia en el suelo control positivo (Martin *et al.*, 2005), el suelo a caracterizar está contaminado con hidrocarburos. Pero todavía queda por evaluar qué compuesto tóxico de referencia es mejor para activar la respuesta genotóxica del ensayo cometa en la lombriz compostera *E. andrei*. De

hecho es necesario verificar la sensibilidad y especificidad de la respuesta genotóxica de este organismo a algunos hidrocarburos, metales pesados y plaguicidas ya que se ha sugerido que pueden tener efectos genotóxicos (Martin *et al.*, 2005; Reinecke y Reinecke, 2004 y Zang *et al.*, 2000).

Finalmente, un esquema ideal para la caracterización ecotoxicológica de un sitio contaminado es utilizar una batería de pruebas de toxicidad que abarque varios organismos (niveles ecológicos), pero esto es sumamente caro y lo que se recomienda es hacer las pruebas al menos con un proceso microbiológico, una especie del reino vegetal y una especie del reino animal (especie saprófaga o detritívora) (ISO, 2001).

Las pruebas recomendadas en fauna son la toxicidad aguda en lombrices, el efecto en reproducción de lombrices, la evaluación de la reproducción de enquitreidos y los efectos sobre reproducción de colémbolos. En flora del suelo son la inhibición de crecimiento de raíces, y los efectos sobre germinación y crecimiento de diferentes semillas. Con microorganismos se recomienda medir parámetros de la biomasa microbiana (actividad enzimática, respiración microbiana, curvas de respiración del suelo) y evaluar la influencia de los contaminantes sobre la mineralización y nitrificación.

BIBLIOGRAFÍA

- Avishai, N., C. Rabinowitz, E. Moiseeva y B. Rinkevich. 2002. Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay. *Mutation Research* 518: 21-37.
- Blakemore, R. 2002. Cosmopolitan earthworms: an eco-taxonomic guide to the peregrine species of the world. *VermEcology*, Australia, 506 pp.
- Burton, Jr., A. G., D. L. Denton, K. Ho y S. Ireland. 2003. Sediment toxicity testing: issues and methods. En: D. J. Hoffman, B. A. Rattner, A. G. Burton Jr. y J. Cairns Jr. (eds.). 2003. *Handbook of Ecotoxicology*. Segunda edición. CRC Press, Florida, EE.UU. Pp. 111-150.
- Callahan, C. A. 2006. Comunicación personal. Acting Supervisor, Site Discovery Assessment and Remediation Department, Hawaii, E.U.A. Correo-e: clarence.callahan@doh.hawaii.gov.
- Capistrán, F., E. Aranda y J. C. Romero. 2001. *Manual de reciclaje, compostaje y lombricompostaje*. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, México. 150 pp.
- Carrisoza-Valenzuela, Ma. G. 2006. Manual: electroforesis en gel de células individuales. Tesis de licenciatura. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, B.C.S., México, 20 pp.

- Chapman, P. 2006. Principal, Senior Environmental Scientists, Golder Associates Ltd, Vancouver, Canadá. Correo-e: pmchapman@golder.com.
- Collins, A. R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology* 26: 249-26.
- Cotelle, S. y J. F. Féraud. 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34: 246-255.
- Corona-Vadillo, D. 2005. Evaluación de alteraciones biológicas en cangrejo violinista *Uca princeps* (Smith, 1870) expuesto a contaminados. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Mazatlán, Sinaloa, México, 116 pp.
- Edwards, C. A. y P. J. Bohlen. 1996. *Biology and Ecology of Earthworms*. Tercera edición. Chapman & Hall, Gran Bretaña, 426 pp.
- Eyambe, G.S., A. J. Goven, L. C. Fitzpatrick, B. J. Venables y E. L. Cooper. 1991. A noninvasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. *Laboratory Animal* 25: 61-67.
- Fent, K. 1996. Ecology of organotin compounds. *Critical Review in Toxicology* 26:1-117.
- Gadik, C.M. S. W. Ewen y A. R. Collins. 1992. Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *International Journal of Radiation Biology* 62: 313-320.
- García, O. 2004. Comunicación Personal. Francisco García Lima del Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones (CPHR), La Habana, Cuba. Corero-e: omar@phr.edu.cu.
- Hendawi, M., S. Sauvé, M. Ashour, P. Brousseau y M. Fournier. 2004. A new ultrasound protocol for extrusion of coelomocytes cells from the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 17-22.
- Horváthová, E., D. Slameňová, L. Hlinčíková, T. Kumar, A. Gábelová y A. R. Collins. 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research* 409: 163-171.
- International Organization for Standardization (ISO). 2001. Soil quality-guidance on the ecotoxicological characterization of soils and soil materials. Draft International Standard ISO/DIS 15799; ISO/TC 190/SC 7, 30 pp.
- Institutos Nacionales de Salud (National Institutes of Health), Instituto Beckman para la Ciencia y Tecnología Avanzada (Beckman Institute for Advanced Science and Technology), Grupo de Biofísica Teórica y Computacional, obtenido en septiembre, 2006. Disponible en : <http://www.ks.uiuc.edu/Development/biosoftdb>.
- Instituto de Investigación Industrial en Toxicología (Industrial Toxicology Research Center), Foro Ensayo Cometa (Comet Assay Forum), obtenido en septiembre, 2006. Disponible en: <http://www.comet.itrcindia.org/downloads.htm>.

- Jänsch, S.; M. J. Amorim y J. Römbke. 2005. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. *Environmental Reviews* 13(2): 51-82.
- Martin, F.L., G. T. Pearce, A. Hewer, D. H. Phillips y K. T. Semple. 2005. A biomarker model of sublethal genotoxicity (DNA single-strand breaks and adducts) using the sentinel organism *Aporrectodea longa* in spiked soil. *Environmental Pollution* 138: 307-315.
- Mitchelmore, C.L. y J. K. Chipman. 1998, DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research* 399: 135-147.
- Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). 1984. Earthworm, acute toxicity tests. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 207. 9 pp.
- Pacific Estuarine Ecosystem Indicator Research Consortium (PEEIR), obtenido en septiembre, 2004. Disponible en: www.bml.ucdavis.edu/peeir/annualrep.html.
- Rajaguru, P., S. Suba, M. Palanivel y K. Kalaiselvi. 2003. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41: 85-91.
- Reinecke, S.A. y A. J. Reinecke. 2004. The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46: 208-215.
- Reya Jaramillo, I. 1996. *Fundamentos teórico-prácticos de temas selectos de la ciencia del suelo*. Parte 1. Universidad Autónoma Metropolitana, México. 115 pp.
- Rojas, E., M. C. Lopez y M. Valverde. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B* 722: 225-254.
- Salagovic, J., J. Gilles, L. Verschaeve y I. Kalina. 1996. The comet assay for the of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. *Folia Biologica (Praha)* 42(1-2): 17-21.
- Singh, N.P., M. T. McCoy, R. Tice y L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191.
- Sokal, R. y F. J. Rohlf. 2001. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. Séptima edición. W.H. Freeman and Company, Nueva York.
- Steinert, S.A., R. Streib-Montee, J. M. Leather y D. B. Chadwick. 1998a. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutation Research* 399: 65-85.
- Steinert, S.A., R. Streib y M. P. Sastre. 1998b. Influence of sunlight on DNA damage in mussels exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* 46(1-5): 355-358.

- Spurgeon, D.J., J. M. Weeks y C. A. Van Gestel. 2003. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. *Pedobiologia* 47:588-606.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. Ecological effects test guidelines: OPPTS 850.6200, Earthworm subchronic toxicity test. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7104), USEPA 712-C-96-167, Washington, EE.UU. 11 pp.
- . 2001. Methods for collection, storage and toxicological analyses: technical manual. USEPA-823-B-01-002, Washington, EE.UU., p. 4-1_5-15.
- Wilson, J.T., P. L. Pascoe, J. M. Parry y D. R. Dixon. 1998. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutation Research* 399: 87-95.
- Wojewódzka, M., M. Kruszewski, T. Iwaneko, A. R. Collins e I. Szumiel. 1999. Lack of adverse effect of smoking habit on DNA strand breakage and base damage as revealed by the alkaline comet assay. *Mutation Research* 440:19-25.
- Zang, Y., Y. Zhong y Z. M. Kong. 2000. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* 108: 271-278.

ENSAYO DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA CON LA LOMBRIZ DE TIERRA *EISENIA ANDREI*

Con experiencia

*María del Carmen Cuevas Díaz, Ronald Ferrera Cerrato,
Adriana Roldán Martín y Refugio Rodríguez Vázquez*

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: E

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Los ensayos con lombrices son ampliamente reconocidos como pruebas para evaluar la toxicidad de suelos contaminados (Dorn *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2002). Cuando se tienen concentraciones subletales que pueden afectar el crecimiento o reproducción de la lombriz (como representante de los organismos del suelo), esta respuesta puede ser empleada como un centinela de procesos destructivos que pudieran presentarse en el suelo (Neuhauser y Callahan, 1990).

Lombrices adultas son expuestas al menos a cinco concentraciones diferentes de un compuesto, ya sea que se encuentre mezclado con el suelo o se aplique superficialmente (plaguicidas). Los efectos letales sobre los organismos se observan en un plazo de 8 semanas. En las lombrices adultas la mortalidad y los efectos sobre el crecimiento se determinan después de 4 semanas. Por su

parte, en las lombrices juveniles se realiza un recuento a las 8 semanas. Esta prueba se basa en el documento USEPA-712-C-96-167 (USEPA, 1996).

DEFINICIONES

Concentración letal media (CL_{50}): es la concentración de un compuesto que ocasiona la muerte de la mitad de los organismos durante el período de prueba. La CL_{50} se expresa en unidades de masa de la sustancia por masa seca de suelo (mg/kg) o masa de la sustancia por unidad de área de suelo (mg/cm²).

Concentración en la que no se observa efecto (NOEC): corresponde al tratamiento de concentración más alto de la sustancia de prueba que no muestra una diferencia estadística de efecto sobre una población específica del organismo de la prueba en relación al control; también es la concentración que se encuentra inmediatamente por debajo de la LOEC.

Concentración más baja en la que se observa efecto (LOEC): es la concentración más baja de la prueba que tiene un efecto significativo sobre la reproducción ($p < 0.05$), expresado en función del número de lombrices juveniles producidas durante el período de exposición, comparado con el control. Todas las concentraciones por encima de la LOEC deben tener un efecto que es estadísticamente diferente del control. Cualquier desviación por encima de lo anterior debe ser justificada en la prueba.

Concentración efectiva (CE_x): es la concentración de la sustancia de prueba que resulta en x% de reducción en el número de lombrices juveniles producidas durante un período de exposición, cuando se compara con el control. Las unidades se expresan como masa de la sustancia de prueba por masa del suelo seco (mg/kg).

Estimación de la reproducción o densidad poblacional: se refiere al número de lombrices juveniles producidas por tratamiento durante el período de la prueba, para el reporte se puede emplear la metodología de Santamaría y Ferrera, 2002.

INFRAESTRUCTURA EN EL LABORATORIO

Cuarto con control de temperatura a 20 ± 2 °C e intensidad luminosa de 400 a 800 luxes.

MATERIAL

Frascos de vidrio de 0.5 L o 1 L. Los contenedores deben permitir el intercambio gaseoso, para lo cual se puede colocar una tela (organza) recubierta

con papel aluminio o un plástico al que se le perforan pequeños orificios. Si el número de lombrices aumenta, la cantidad de suelo también debe aumentar en forma proporcional. Pipetas volumétricas clase A de 1 a 100 mL. Pipetas serológicas de 1 a 10 mL graduadas. Micropipeta de 200 a 1000 μ L. Termómetro. Espátula de acero inoxidable. Pinzas. Guantes. Papel filtro. Malla de 2 a 2.36 mm (organza).

EQUIPO

Potenciómetro, balanza analítica con capacidad para pesar lombrices de 0.1 g., balanza con capacidad para pesar muestras de suelo de 500 g., base de agitación o vórtex y rotavapor o campana de extracción.

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Todos los reactivos utilizados deben tener calidad ACS o, al menos, 99% de pureza. Para la preparación de soluciones se emplea agua destilada o deionizada tipo II. Soluciones amortiguadoras para pH 4, 7 y 10, Carbenzamida 99% pureza y carbonato de calcio (CaCO_3).

SUSTANCIA DE REFERENCIA

La NOEC o CE_x de una sustancia de referencia se debe determinar con la finalidad de garantizar que la prueba se realiza en condiciones adecuadas y verificar que la respuesta del organismo no ha cambiado con el tiempo. Se recomienda el uso de carbendazima, ya que se ha demostrado que afecta la reproducción (Neuhauser and Callahan, 1990).

SUELOS A UTILIZAR

SUELO ARTIFICIAL

El suelo artificial tiene una composición de: 10% musgo (materia orgánica), 20% arcilla y 70% arena. Se utiliza CaCO_3 para ajustar el pH a 7.0 ± 0.5 . Para el ensayo se deben pesar de 250 a 500 g de suelo artificial, con 4 réplicas por cada concentración.

SUELO CONTAMINADO

Se necesitan cuando menos 1,100g de suelo, ya que se preparan un mínimo de 4 réplicas de 200 a 250g de suelo contaminado. Los 100 a 200 g del remanente se utilizan para realizar las determinaciones de pH, humedad y concentración del compuesto tóxico; pero si se requiere caracterizar la muestra es necesaria la recolección de mayor cantidad de suelo. Los recipientes deben ser llenados en su totalidad. Si el análisis no se realiza de inmediato, las muestras deben ser selladas, empacadas y almacenadas a 4 °C en la oscuridad, para minimizar la pérdida de compuestos volátiles. De preferencia, la evaluación de la toxicidad se debe realizar en un lapso de 24 horas; de no ser posible se debe procurar hacerlo en un plazo no mayor a 14 días, ya que la toxicidad pudiera no ser representativa por degradación o pérdida del compuesto.

DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD EN EL SUELO

Antes de realizar la prueba, se debe calcular la humedad inicial del suelo para adicionar el agua de hidratación necesaria. Para ello se toma una alícuota de 25 g de la muestra de suelo y se coloca en una cápsula de porcelana, previamente preparada a peso constante. Se pesa la cápsula con muestra y se seca a 103-105 °C durante 24 horas, para posteriormente dejarla enfriar en un desecador. Una vez fría se pesa nuevamente. La diferencia de pesos nos da el valor del peso seco final. (WSDE, 1996).

De forma alternativa, se puede usar una balanza térmica depositando 1.0 g de suelo problema y 10 minutos más tarde se tiene el resultado en por ciento.

ORGANISMOS DE PRUEBA

Se utilizan lombrices adultas del género *Eisenia* en su especie *andrei*, de al menos 2 meses de edad (cliteladas). Esta especie puede tener como fuente de alimento estiércol de caballo o alfalfa (USEPA, 1996).

Previo a su uso, las lombrices seleccionadas deben ser aclimatadas durante 1 a 7 días en el suelo artificial, con el mismo alimento a usar en la prueba.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

PREPARACIÓN DE LAS LOMBRICES

Se vacían los intestinos de las lombrices aclimatadas, colocándolas sobre papel filtro humedecido de 3 a 8 horas antes de la prueba. Posteriormente son lavadas, secadas y pesadas en grupos de 10. Cada grupo de lombrices se coloca en un contenedor de vidrio con 250 a 500 g de suelo.

CONCENTRACIÓN DE LA SUSTANCIA PRUEBA

Para determinar la NOEC se preparan 5 concentraciones con un factor de diferencia entre ellas no mayor de 2; por ejemplo, 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 mg/kg. Si se desea además determinar la LOEC, se preparan 10 concentraciones diferentes bajo el mismo esquema anterior.

PREPARACIÓN DEL SUELO CON LA SUSTANCIA DE PRUEBA

Antes de adicionar la sustancia de prueba se agrega de 4 a 8% del alimento en relación al suelo (10 a 20 g de estiércol de caballo o alfalfa). Para la adición al suelo se emplean dos métodos en función de la sustancia a probar:

Si se trata de compuestos en general, se mezcla la sustancia en el suelo. Si se trata de un plaguicida, se aplica en la superficie del suelo (USEPA, 1996).

La sustancia de prueba puede ser soluble en agua o en disolventes orgánicos. En el caso de ser soluble en agua, se prepara la cantidad necesaria para ajustar la humedad (35 a 50% de máxima capacidad de campo), y la solución es mezclada con el suelo antes de ser colocada en los contenedores.

Si el compuesto es insoluble en agua, pero soluble en un disolvente orgánico, se disuelve en un mínimo de disolvente (por ejemplo, acetona). El disolvente se puede remover posteriormente colocando el suelo en una campana de extracción y mezclando continuamente (1 a 6 horas) o utilizando un rotavapor. Después de la evaporación del disolvente, se ajusta la humedad del suelo a máxima capacidad de campo y se coloca en los contenedores.

Se utilizan 4 réplicas por concentración, considerando un mínimo de 5 concentraciones por sustancia problema. Asimismo, se preparan dos controles: uno libre de contaminante y otro con el disolvente empleado para valorar el efecto del mismo; en ambos casos, también se preparan 4 réplicas (Kula y Larink, 1997).

APLICACIÓN DE LAS LOMBRICES

Una vez que se tiene el suelo preparado con el compuesto y los controles, se adicionan 10 lombrices por contenedor, tapando con la tela para permitir el intercambio gaseoso (figura 17.1).

Figura 17.1. Frasco con tela para la prueba de toxicidad subcrónica con lombriz de tierra



CONDICIONES DE LA PRUEBA

Los contenedores se mantienen a 20 ± 2 °C y en un régimen de 16 horas en luz y 8 horas en la oscuridad. Los contenedores se abren a los 7, 14, 21 y 28 días para la evaluar a las lombrices. También se evalúa la humedad y se ajusta cuando es necesario. Al final de la prueba, no debe haber una diferencia mayor de 10% en relación a la humedad inicial.

DURACIÓN DE LA PRUEBA Y MEDICIONES

A los 7 días se revisan los contenedores para evaluar el movimiento o muerte de las lombrices; la mortalidad también se determina a los 14 días. A los 28 días (4 semanas) se hace una evaluación más detallada de las lombrices; las adultas son pesadas y contadas y se revisa su morfología, cualquier anomalía debe anotarse. Las lombrices adultas son separadas y los capullos o lombrices juveniles son contados, dejándolas en el contenedor 28 días (4 semanas) más bajo las mismas condiciones, adicionando alimento sólo al inicio de esta fase. Al final de estas 4 semanas los capullos y lombrices juveniles se cuentan para determinar su viabilidad.

LÍMITES DE LA PRUEBA

Si no se observan efectos en la concentración más alta (ejemplo 1000 mg/kg), la prueba de reproducción puede ser considerada como un límite, usando una concentración de 1,000 mg/kg para demostrar que la NOEC o CE_{10} para la reproducción es mayor que este valor.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Para la reproducción, correspondiente al número de juveniles, se calcula la media aritmética y la varianza por tratamiento y por control. La media y varianza son usadas para el análisis de varianza (ANOVA) utilizando técnicas tales como t-Student, Dunnet o Williams o un software como SAS, para obtener el intervalo de confianza de 95%.

Se determina la NOEC y la CE_x . La CL_{50} y la CE_x se pueden determinar por los métodos Probit, Logit o Spearman-Trimmed Karber.

CONDICIONES PARA VALIDAR LA PRUEBA

Para que una prueba se considere válida, cada réplica (10 adultos) del control debe presentar un coeficiente de variación de la reproducción $\leq 30\%$, además la mortalidad a las 4 semanas de la prueba debe ser $\leq 10\%$ (Kula, 1997).

REPORTE DE LA PRUEBA

El reporte de la prueba debe incluir la siguiente información:

- Nombre del técnico, investigador principal y datos de la prueba (nombre de la sustancia prueba, tipo de prueba).
- Para el caso de compuestos se debe incluir el número CAS, nomenclatura IUPAC, pureza, composición (identificación y concentración de los principales ingredientes e impureza), número de lote y propiedades físicas y químicas. Asimismo, se debe mencionar la forma en que se ha adicionado y mezclado la sustancia en el suelo.
- Género y especies de los organismos de prueba, así como detalles de cultivo de lombrices (condiciones de cultivo y forma de alimentación).
- Condiciones de la prueba

- Cambios en los pesos de las lombrices adultas al inicio y al término de la prueba de 28 días (Santamaría y Ferrera, 2002)
Resumen estadístico
- pH, temperatura y humedad del suelo al principio y final de la prueba (0 y 8 semanas).

Tabla 17. 1 Condiciones recomendadas para la prueba de toxicidad subcrónica con la lombriz de tierra *Eisenia andrei*

Duración del bioensayo	28 días (4 semanas)
Temperatura	20 ± 2 °C
Contenedores	Frascos de vidrio
Cantidad requerida de muestra de suelo	1100 g
Cantidad requerida por réplica	200–250 g
Humedad del suelo	35–45 %
Organismo prueba	<i>Eisenia andrei</i>
Edad del organismo	> 2 meses (clitelada)
Número de organismos por réplica	10
Número de réplicas	4
pH del suelo	5 – 9, no realizar la prueba si el rango no es aceptable
Alimentación	Adicionar de 4-8% de estiércol de caballo
Efectos medidos	Supervivencia en 14 días, reproducción en 28 días y viabilidad a los 56 días (8 semanas)
Control positivo	Carbenzamida
Control negativo	Suelo artificial o suelo blanco no contaminado

BIBLIOGRAFÍA

- Dorn, P.B., T.E. Vipond, J.P. Salanitro y H.L. Wisniewski. 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soil using earthworms, microtox and plants. *Chemosphere* 37(5): 845-860.
- Fragoso, G. C. 2002. Las lombrices de tierra en México: diversidad, distribución y manejo. II Simposium Internacional y Reunión Nacional Lombricultura y abonos orgánicos.
- Hamilton, M. A., R. C. Russo y R.V. Thurson. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology* 11(7): 714-719.
- Kaplan, D. L., R. Hartenstein, E. F. Neuhauser y M. R. Maleckit. 1980. Physicochemical requirements in the environment of the earthworm *Eisenia foetida*. *Soil Biology and Biochemistry* 12: 347-352.

- Kula, C. 1997. Endpoints in laboratory testing with earthworms experience with regard to regulatory decisions for plant protection products. En: S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup y L. Posthuma (eds.). *Advances in earthworm ecotoxicology*. SECTAC Press. Pp. 3-14.
- Kula, H. y O. Larink. 1997. Development and standardization of test methods for the prediction of sublethal effects of chemicals on earthworms. *Soil Biology and Biochemistry* 29(3/4): 635-639.
- Neuhauser, E.F. y C. A. Callahan. 1990. Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to sublethal concentrations of organic chemical. *Soil Biology and Biochemistry* 22(2): 175-179.
- Norton, D. 1996. *Earthworm Bioassay protocol for soil toxicity screening*. Disponible en: <http://www.ecy.wa.gov/biblio/96327.html>.
- Rida, A.M. y M. Bouché. 1997. Earthworm toxicology: from acute to chronic test. *Soil Biology and Biochemistry* 29(3, 4): 669-703.
- Ronco, A. y M. C. Díaz Báez. 2004. Interpretación y manejo de resultados. En: G. Castillo (comp.). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. Pp. 141-149.
- Santamaría, R. S. y C. R. Ferrera. 2002. Dinámica Poblacional de *Eisenia andrei* (Bouche 1972) en diferentes residuos orgánicos. *Terra* 20(3): 303-310.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. *Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.6200. Earthworm subchronic toxicity test*. USEPA 712-C-96-167. http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/zx850-6200.pdf.
- Washington State Department of Ecology (WSDE). 1996. Publication No. 96-327.35 pp. <http://www.ecy.wa.gov/pubs/96327.pdf>.
- Wilson, J.J., J. Hathcer y J.S. Goudey. 2002. Ecotoxicological endpoints for contaminated site remediation. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanità* 38(2): 143-147.

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA GERMINACIÓN Y DEL ALARGAMIENTO RADICULAR EN SEMILLAS DE CEBOLLA *ALLIUM CEPA* Y SOYA *GLYCINE MAX*

Con experiencia

Raúl Uribe Hernández

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: E

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

En los bioensayos de toxicidad aguda con semillas se evalúan los efectos adversos de un compuesto puro o de una mezcla compleja en el proceso de germinación y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como respuesta se determina la inhibición en la germinación y de la elongación de la radícula y del hipocótilo. Es importante destacar que durante la germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir, alterando la supervivencia y desarrollo normal de las plántulas.

Una de las etapas más importantes del desarrollo de una planta es la germinación de las semillas y la emergencia del primer cotiledón. En la germinación ocurren cuatro procesos: la imbibición o toma física de agua, la formación

de los sistemas enzimáticos e inicio de la síntesis de proteínas y de RNA, la emergencia de la radícula y la iniciación del crecimiento.

La activación de la semilla es inhibida ante la presencia de compuestos tóxicos, afectando la germinación de la misma. La división celular de los meristemos radiculares puede afectarse, retardando el proceso de mitosis o alterando el proceso de alargamiento radicular, por lo que la fitotoxicidad de un compuesto puede ser determinada a través de la medición de éste parámetro.

MATERIAL

Papel filtro Whatman de fibra de vidrio, frascos de vidrio de 250 mL, cajas Petri de 210 mm, papel aluminio, parafilm, micropipetas (10-1,000 μ L), pipetas serológicas de 1, 5 y 10 mL, regla o Bernier y probetas de 50 y 100 mL.

EQUIPO

Cámara ambiental o incubadora, balanza analítica y campana de extracción.

REACTIVOS

Diclorometano grado HPLC (frasco con 4 L), 2-cloroacetamida, hipoclorito de sodio 5% y agua destilada.

ORGANISMOS DE PRUEBA

Semillas certificadas de cebolla *Allium cepa* (monocotiledonea) y de soya *Glycine max* (dicotiledonea), con viabilidad probada mayor del 95% y libres de plaguicidas.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

PRUEBAS EXPLORATORIAS O DE TAMIZ

Estas pruebas se realizan con el extracto del suelo contaminado o con una solución del compuesto tóxico, desde una concentración al 100%. Para ello, se seleccionan y escarifican las semillas con hipoclorito de sodio al 5% durante 15 minutos y luego se enjuagan con agua de la llave y con agua destilada durante

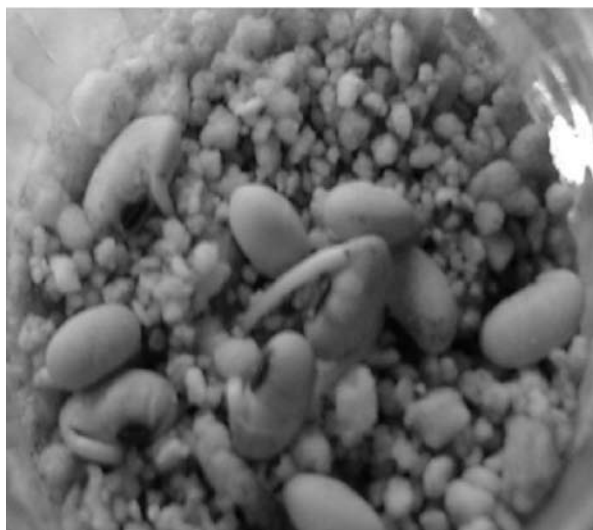
10 minutos. Se colocan discos de papel filtro Whatman de fibra de vidrio dentro de la caja Petri de 110 mm. Estos discos deben ser proporcionales al diámetro de la caja (aproximadamente 9 cm). Sobre el papel filtro se adicionan 2 mL de cada una de las disoluciones preparadas del extracto original del compuesto tóxico, en un intervalo de concentraciones amplio (en serie logarítmica), distribuyéndolo de forma homogénea. Como control del disolvente se utiliza una caja a la que se le agregan 2 mL de diclorometano o del disolvente utilizado para la extracción. Además, se utiliza un control positivo de 2-cloroacetamida a una concentración 35 mg/L y un control negativo de agua destilada. Se deja evaporar el disolvente durante 10 minutos dentro de la campana de extracción y luego se colocan 10 semillas por cada caja, distribuyéndolas aleatoriamente y de tal forma que se permita un adecuado crecimiento. Se preparan 3 réplicas por tratamiento. Las semillas se incuban dentro de una cámara ambiental con temperatura controlada (22 ± 2 °C) y en total oscuridad, hasta que el 65% de las semillas del testigo negativo haya germinado. Después de ese período, se registra el número de semillas germinadas, siguiendo como criterio de germinación una longitud de radícula mayor de 5 mm (figura 18.1). Adicionalmente, se registra el crecimiento o alargamiento de la radícula, como un posible efecto tóxico adicional, por medio de la medición de la longitud al término de la prueba (figura 18.2).

PRUEBAS DEFINITIVAS

Las pruebas definitivas se llevan a cabo utilizando un intervalo de concentraciones más reducido (en serie geométrica), seleccionando aquellos tratamientos en los que se observe efecto adverso, para insertar entre alguno de ellos este nuevo intervalo de concentraciones (por ejemplo 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125%). Al final se elabora la curva dosis-respuesta de las diferentes concentraciones en un intervalo reducido y se calculan los valores de CI_{50} (concentración inhibitoria media), por medio del método Probit.

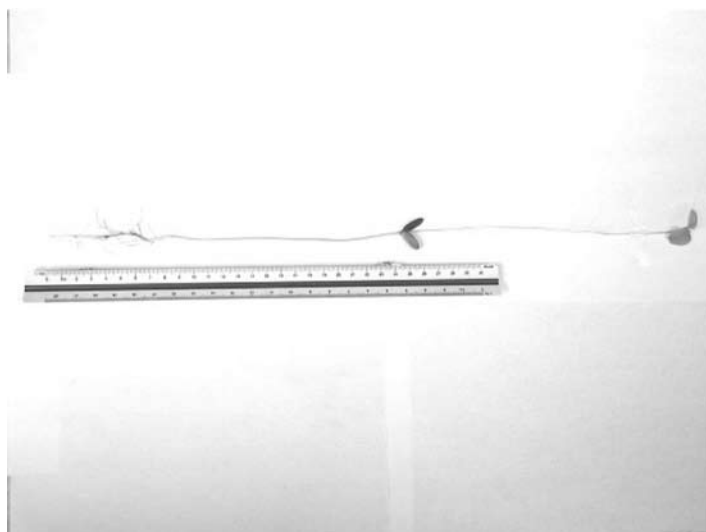
EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La prueba de inhibición de la germinación en plantas superiores determina el potencial de toxicidad agudo en el cultivo, expresado como la concentración inhibitoria del cincuenta por ciento de los individuos utilizados en la prueba (CI_{50}) y su precisión o intervalo de confianza. Se utiliza el método Probit, también conocido como método de unidades probabilísticas, para evaluar la relación

Figura 18.1. Germinación y brote radicular de *Glycine max*Tabla 18.1. Condiciones recomendadas para las pruebas de inhibición de la germinación con semillas de *Allium cepa* y *Glycine max*

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	22 ± 2 °C
Calidad de luz	Oscuridad
Tamaño del recipiente	Cajas petri de 110 mm
Volumen de la solución de prueba	2.0 mL
Edad del cultivo usado como inóculo	Semillas certificadas
Número de individuos	10 semillas por frasco
Número de réplicas	3
Incubación	Con 60 % de humedad relativa
Medio de cultivo	Agua destilada
Factor de dilución	Según la dilución
Duración de la prueba	Hasta la germinación de 65% del control
Efecto medido	Inhibición de la germinación (< 5 mm de radícula)
Resultado final	CI ₅₀
Criterios para la aceptación de la prueba	Germinación en el testigo > 90 %
Control positivo	2- Cloroacetamida a 35 mg/L

USEPA, 1996; OECD; 1984; ISO, 1993.

Figura 18.2. Medición del crecimiento del sistema radicular de *Glycine max*

de dosis-respuesta de un contaminante sobre un organismo. Se asigna el valor Probit de tablas a los porcentajes de mortalidad obtenido para cada concentración (Loomis, 1978), para posteriormente efectuar el análisis de regresión lineal mediante el método de mínimos cuadrados, y utilizando los valores obtenidos de la ecuación de la recta se calcula la CI_{50} , considerando el valor de la “y” a la mitad del número de individuos utilizados en cada lote o tratamiento. Finalmente, se calcula el intervalo de confianza del 95% por medio de la desviación estándar y el valor de tablas del estadístico “t” de student.

BIBLIOGRAFÍA

- International Organization for Standardization (ISO). 1993. *Soil Quality- Determination of the effects of Pollutants on Soil Flora. Part 1. Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth*. 9 pp.
- Loomis, TA, 1978. *Fundamentos de Toxicología*. 1era edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 274 pp.
- Organization of Economical Co-operation and Development (OECD). 1984. *Terrestrial Plants, Growth test*. Guideline for Testing of Chemicals 2081. 15 pp.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. USEPA 712-C-96-154. OPPTS 850.4200. 17 pp.

ENSAYOS DE METABOLISMO MICROBIANO EN SUELO: ACTIVIDAD DESHIDROGENASA Y TASA DE MINERALIZACIÓN DEL NITRÓGENO

Con experiencia

Martha Barajas Aceves

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: E

ACTIVIDAD DESHIDROGENASA

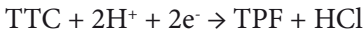
PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La oxidación biológica de compuestos orgánicos se realiza generalmente mediante procesos de deshidrogenación y se lleva a cabo por enzimas denominadas deshidrogenasas. La actividad deshidrogenasa de los suelos está determinada por diferentes sistemas de deshidrogenasas, las cuales se caracterizan por presentar una alta especificidad a sustratos. Todos los sistemas de deshidrogenasas son parte integral de los microorganismos, por lo que la medida de actividad deshidrogenasa ha sido propuesta como un indicador de la actividad microbiana del suelo (Casida, 1977).

La actividad deshidrogenasa se ha utilizado para comparar suelos naturales y de cultivos, para evaluar la incorporación de residuos frescos al suelo y para

evaluar suelos degradados y suelos contaminados por metales pesados, plaguicidas y lluvia ácida (Cochran *et al.*, 1989; Reddy y Faza, 1989; García *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 1971; Chander y Brookes, 1991; Ohlinger, 1986; Schaffer, 1993).

El método está basado en la suposición de que en ausencia de O₂ el cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolium (TTC) actúa cuantitativamente como el aceptor terminal de H para el sistema dehidrogenasa con la formación del rojo de trifeniltetrazoliumformazan (TPF).



Cuando esta prueba se aplica a suelos, las condiciones son hechas anaeróbicas, tanto para la deshidrogenasa anaeróbica como para la deshidrogenasa aeróbica y se se asume que usan el TTC como aceptor de H.

MATERIAL

Tubos de ensayo de 16 x 150 mm, Vórtex, estufa de incubación ajustable a 37 °C, espectrofotómetro, papel filtro Whatman No. 42.

REACTIVOS

Acetona o metanol grado analítico, carbonato de calcio (CaCO₃), solución TTC: 3% (peso/volumen) de 2, 3,5-cloruro de trifeniltetrazolium en agua destilada, solución TPF estándar para la curva de calibración: se disuelven 100 mg de TPF en 80 mL de acetona (1,000 µg TPF/mL) y se aforan con acetona a 100 mL.

PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE TPF

Para preparar la curva se pipetea 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mL de la solución estándar de TPF en un matraz volumétrico (50 mL), se adicionan 8.3 mL de buffer tris (pH 7.6) y se afora a 50 mL con acetona para obtener las siguientes concentraciones: 0, 10, 20, 40, 60 y 80 µg TPF/mL.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Se pesan tres porciones de suelo húmedo (equivalentes a 6 g de suelo seco) en tubos de ensayo de 16 x 150 mm a cada tubo se adicionan 67 mg CaCO₃,

1 mL de la solución de TTC y 2.5 mL de agua destilada. Los contenidos son mezclados en el vórtex para excluir el aire atrapado tanto como sea posible. Los tubos son incubados por 24 horas a 37 °C. Al finalizar la incubación, el trifenílformazan (TPF) formado por la reducción de TTC se extrae agitando a mano en un embudo de separación con 10 mL de acetona por 5 minutos y filtrando. Este paso se repite de 7 a 8 veces para asegurar una extracción completa del TPF. El filtrado se diluye con acetona a un volumen final de 50 mL. Se leen las muestras a una absorbancia de 485 nm usando acetona como blanco.

La actividad deshidrogenasa en suelos se expresa en μg TPF producido por gramo de suelo en 24 horas. La absorbancia se compara con una curva estándar de TPF en acetona, construida con concentraciones entre 0 y 1000 mg/L. Los blancos se utilizan con extractos acetónicos o metanólicos de suelo sin TTC o TPF.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La lectura de las concentraciones ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de la curva de calibración se debe corregir por los valores control y calculados. Para calcular la actividad deshidrogenasa (μg de TPF/g de suelo seco * día) se usa la siguiente fórmula:

$$\text{actividad deshidrogenasa} = \frac{[\text{TPF}] * 40}{Dwt}$$

donde:

[TPF] = es la concentración de TPF en $\mu\text{g}/\text{mL}$

Dwt = es el peso en g del suelo en base seca de 1 g de suelo húmedo

40 = es el volumen de la solución adicionada (acetona) a la muestra de suelo en el ensayo.

Tabla 19.1. Condiciones recomendadas para las pruebas de la actividad deshidrogenasa en suelo

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura de incubación	37 °C
Humedad de las muestras con tratamiento y controles	40 a 50 % de la capacidad de retención de agua

(Continúa)

Tabla 19.1. Condiciones recomendadas para las pruebas de la actividad deshidrogenasa en suelo (*continúa*)

Número de réplicas por tratamiento	3
Duración de la incubación de la prueba	24 horas
Volumen de la solución extractora	46.5 mL de acetona grado analítico
Almacenamiento de los extractos antes de su análisis	En la oscuridad, se recomienda no almacenarla
Efectos medidos	Producción de TPF
Resultado final	µg de TPF por gramo de suelo por día
Control negativo	Suelos sin tratamiento

TASA DE MINERALIZACIÓN DEL NITRÓGENO

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La estimación de la velocidad de mineralización de nitrógeno se puede usar como un criterio cuantitativo de actividad microbiana en suelos y se ha usado para estudiar la influencia de contaminantes y factores ambientales en este medio (Greaves *et al.*, 1980; Somerville y Graves, 1987).

Tanto las plantas como los microorganismos dependen del nitrógeno combinado para su nutrición. El nitrógeno combinado, en la forma de amonio, nitratos o compuestos orgánicos, es a menudo el factor limitante para los procesos biológicos del suelo (Haynes y Goh, 1978). Por esta razón, el ciclo de la transformación de la materia orgánica nitrogenada es de gran importancia en el recambio total de este elemento en el suelo. La mineralización del nitrógeno consiste en dos procesos importantes: la amonificación de compuestos orgánicos por un gran número de microorganismos heterótrofos y la oxidación del amonio liberado a nitritos y nitratos (nitrificación), principalmente por bacterias autótrofas.

La mineralización del nitrógeno orgánico depende principalmente de la temperatura, humedad, aireación, tipo de nitrógeno orgánico y pH.

El nitrógeno inorgánico producido por mineralización está sujeto a la inmovilización y fijación por las arcillas. También se puede transferir a la atmósfera por desnitrificación o a los mantos acuíferos por lixiviación.

Este método está basado en la incubación de suelo húmedo (ajustado entre un 40 a 50 % de capacidad de retención de agua) a 25 °C, seguido por la determinación de amonio, nitratos y nitritos extraídos con una solución sulfato de potasio (K_2SO_4) 0.5 M.

REACTIVOS Y SOLUCIONES

PARA EXTRACCIÓN

Solución extractora de sulfato de potasio (K_2SO_4) 0.5 M

Se pesan 871.35 g de K_2SO_4 y se diluyen a 10 L con agua destilada. La solución se mezcla y agita por 2 horas a 75 rpm en una agitadora transversal.

PARA LA DETERMINACIÓN DE AMONIO

Acido bórico al 4 %, óxido de magnesio, ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.02 N, rojo de metilo, azul de metileno, etanol 95%, sulfato de amonio (NH_4SO_4).

Solución indicadora

Se pesan 200 mg de rojo de metilo y se aforan a 100 mL con etanol al 95%. Además, se pesan 100 mg de azul de metileno y se disuelven en 50 mL de etanol al 95%. Se combinan las dos soluciones. El tiempo máximo de conservación de esta solución es de 1 mes.

Solución de ácido bórico

Se pesan 40 g de ácido bórico y se disuelven en 900 mL de agua destilada. Se aforan a 1 L. Diez mL de esta solución se adicionan a la solución indicadora.

Solución stock de sulfato de amonio (1,000 μ g/mL)

Se pesan 3.66 g de NH_4SO_4 , se disuelven y se aforan a 1000 mL con agua destilada.

Solución de trabajo de sulfato de amonio (10 μ g/mL)

Se toma una alícuota de 10 mL de la solución stock y se afora a 1,000 mL con agua destilada.

PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATOS

Ácido sulfúrico (H_2SO_4). Hidróxido de potasio (KOH) 12N, nitrato de potasio (KNO_3), fenol blanco.

Solución de ácido fenol disulfónico

Se pesan 25 g de fenol blanco puro en 150 mL de H_2SO_4 fumante (15% de SO_3 libres). Se agitan bien y se calientan por 2 horas en baño María. La solución se enfría y se guarda en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

Solución ácido sulfúrico 1N

Se disuelven 28 mL de H_2SO_4 concentrado en 1 L de agua destilada.

Solución madre de nitratos

Se pesan 7.223 g de nitrato de amonio y se disuelven en 1000 mL de agua destilada, para dar una concentración de $\text{NO}_3\text{-N}$ de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Veinticinco mL de esta solución madre se diluyen a 500 mL con agua destilada. La concentración final que se obtiene es de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de $\text{NO}_3\text{-N}$.

Curva de calibración de nitratos

Se toma volúmenes (en mL) de la solución madre de nitratos de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, para preparar diluciones con concentraciones finales en μg $\text{NO}_3\text{-N}$ de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50.

PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS

Clorhidrato de L-Naftilamina, ácido sulfanílico EDTA disódico, acetato de sodio, nitrito de sodio (NaNO_2), hidróxido de sodio (NaOH) 6N.

Solución de ácido sulfanílico

Se pesan 0.6 g de ácido sulfanílico y se disuelven en 70 mL de ácido clorhídrico. Se afora a 100 mL con agua destilada.

Solución EDTA disódico

Se pesan 0.5 g de EDTA y se disuelven en 100 mL de agua destilada.

Solución clorhidrato de L-naftilamina

Se pesan 0.6 g de clorhidrato de L-naftilamina y se les adiciona 1 mL de ácido clorhídrico. Se disuelven con agua destilada y se aforan a 100 mL. Esta solución debe mantenerse en refrigeración. Se debe evitar inhalación o el contacto de la piel con esta solución.

Solución amortiguadora de acetato de sodio 2M

Se pesan 16.4 g de acetato de sodio y 27.2 g de acetato de sodio trihidratado. Se aforan a 100 mL con agua destilada libre de nitritos.

Solución de hidróxido de sodio 6N

Se disuelven 240 g de NaOH en 1000 mL de agua destilada.

Solución madre de nitritos

Se pesan 1.232 g de nitrito de sodio (NaNO_2) en 1000 mL agua destilada y se adiciona 1 mL de cloroformo. Esta solución tendrá una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ de $\text{NO}_2\text{-N}$. Cincuenta mL de la solución madre se diluyen a 250 mL con agua destilada para dar una concentración final de la solución intermedia de 50 $\mu\text{g/mL}$ de $\text{NO}_2\text{-N}$.

Solución patrón de nitritos

Se toman 10 mL de la solución intermedia (50 $\mu\text{g/mL}$ de $\text{NO}_2\text{-N}$) y se diluyen a 1,000 mL para dar una concentración final de 0.50 μg .

Curva de calibración de nitritos

Se toma volúmenes (en mL) de la solución patrón de nitritos de 0, 1, 2, 3, 5, 10, 10, 15, 20, para preparar diluciones con concentraciones finales en μg de 0, 0.50, 1.0, 1.50, 2.50, 5, 7.50, 10.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de suelos húmedos (25 g en base seca) se pesan (por triplicado) en frascos de vidrio de 100 mL y se colocan dentro de botellas de vidrio de 1 L, de boca ancha de color ámbar. Tres muestras de suelo húmedo se congelan inmediatamente (control) a -20°C . En el fondo de la botella de 1 L se colocan 10 mL de agua destilada para evitar la deshidratación y un vial con 20 mL de NaOH 1N para atrapar el CO_2 desprendido durante la incubación. Se tapan las botellas de 1 L con tapas de rosca, perfectamente selladas y se incuban de 7 a 30 días a 25°C .

EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS

A las muestras pesadas (25 g) por triplicado, en los recipientes de plástico limpios y secos se les adiciona el K_2SO_4 0.5 M en una proporción 4:1 (4 mL de sulfato de potasio por 1 g de muestra seca) y se agita a 200 rpm a temperatura ambiente por 30 minutos. Terminada la agitación, se filtran inmediatamente a través de papel Whatman # 42 a un recipiente de plástico limpio y seco. Los extractos se guardan en congelación ($< 5^{\circ}\text{C}$) hasta su análisis.

DETERMINACIÓN DE AMONIO

El nitrógeno orgánico (ejemplo, proteínas y ácidos nucleicos) es convertido por la descomposición microbiana a amonio. La primera etapa de la hidrólisis de las proteínas, por ejemplo, es la liberación de aminoácidos, los cuales son hidrolizados bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Jenkinson y Ladd 1981). La velocidad de amonificación depende en la relación C/N de los compuestos orgánicos, altas tasas de amonificación generalmente ocurren a una relación baja de C/N (Alef y Kleiner, 1986a; Alef y Kleiner, 1986b; Nannipieri *et al.*, 1990). Excepto para la hidrólisis de urea por ureasa extracelular, la amonificación es enlazada al metabolismo de las células activas.

El amonio y el nitrato de la solución del suelo se pueden destilar directamente sin ninguna preparación de la muestra. La transformación de amonio a amoniaco, el cual es colectado en el destilado, se logra con la adición de MgO (Keeney y Nelson, 1982).

Para la determinación de amonio se toma una alícuota de 10 mL de la muestra extraída con la solución de K_2SO_4 0.5M en un tubo de destilación de 500

mL y se le adicionan 10 mL de agua deionizada y 0.2 g de óxido de magnesio. El tubo se inserta en el aparato de destilación. El destilado es colectado en 10 mL de ácido bórico al 4 %, recibiendo 100 mL del destilado. Esta muestra se titula con H_2SO_4 0.02 N

Se toma una alícuota de 10 mL de la solución de trabajo de sulfato de amonio y se repite todo el procedimiento descrito anteriormente. Este procedimiento se repite de 4 a 5 veces y se calcula el promedio del gasto de H_2SO_4 0.02 N.

DETERMINACIÓN DE NITRATOS

La conversión de amonio a nitratos se lleva a cabo a través de la actividad de dos grupos de bacterias altamente especializadas: las quimioautótrofas y las aeróbicas obligadas. La nitrificación ocurre en dos etapas: primeramente el amonio es oxidado a nitrito y después el nitrito es oxidado a nitrato. El amonio, más que el nitrato, se puede adsorber en los coloides orgánicos e inorgánicos del suelo.

Esta determinación se basa en la cuantificación de NO_3^- con el ácido 2,4 fenol-fenoldisulfónico en un medio ácido, que al añadir el KOH desarrolla el color amarillo de la sal potásica del ácido nitrofenoldisulfónico.

Para la determinación de nitratos se toma una alícuota de 10 mL de muestra en un vaso de precipitado de 100 mL y se evapora en una parrilla de calentamiento con temperatura controlada. Luego se adicionan 2 mL de ácido fenoldisulfónico y se deja reposar por 10 minutos. La muestra se disuelve con 15 mL de agua destilada. Se adicionan lentamente 7 mL de solución de hidróxido de potasio (KOH) 12 N hasta desarrollar color. Se aforan a 100 mL con agua destilada y se lee la absorbancia a 410 nm. El color es estable por varias horas y las lecturas se pueden hacer más tarde si es necesario.

DETERMINACIÓN DE NITRITOS

El contenido de nitritos en suelo normalmente es muy pequeño. Sin embargo, en suelos abonados con fertilizantes nitrogenados se pueden acumular cantidades apreciables. El nitrito se determina por la formación de un colorante azo púrpura rojizo, producido a pH de 2.0 a 2.5 por acoplamiento de sulfanilamida diazotizada con diclorohidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (diclorohidrato de NED) (Primo Yúfera y Carrasco, 1973).

Para la determinación de nitritos se toman 10 mL de muestra y se diluyen en 40 mL de agua destilada. Se agrega 1 mL de naftilamina y se agita. Luego se

adiciona 1 mL de ácido sulfanílico y 1 mL de la solución de EDTA. La mezcla se deja reposando por 10 minutos. Se adicionan nuevamente 1 mL de naftilamina y 1 mL de acetato de sodio. Se deja reposar 30 minutos y finalmente se leen las muestras a una absorbancia de a 520 nm.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La tasa de mineralización de nitrógeno se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$Nmin \left(\frac{\mu g}{g_{sueloseco} * día} \right) = \frac{(NH_{4(tx)} + NO_{3(tx)} - NO_{2(tx)}) - (NH_{4(t0)} + NO_{3(t0)} + NO_{2(t0)})}{t * PS}$$

donde:

$NH_{4(tx)}$ = concentración del NH_4 después de la incubación

$NO_{3(tx)}$ = concentración de NO_3 después de la incubación

$NO_{2(tx)}$ = concentración de NO_2 después de la incubación

$NH_{4(t0)}$ = concentración de NH_4 del control

$NO_{3(t0)}$ = concentración de NO_3 del control

$NO_{2(t0)}$ = concentración de NO_2 del control

t = tiempo de incubación

PS = peso en base seca del suelo húmedo

La concentración de amonio se calcula con la siguiente fórmula:

$$NH_4^+ \left(\frac{\mu g}{suelo(g)} \right) = \frac{H_2SO_4 \cdot gastados (mL) * 100 * Y}{10 * 25}$$

donde:

100 = mL de K_2SO_4 0.5 M usados para extracción

Y = factor de conversión ($\mu g NH_4SO_4$ destilados de la alícuota de la solución patrón/mL promedio del gasto de H_2SO_4 0.02 N).

10 = volumen de la alícuota de la muestra destilada

25 = g de suelo en base seca usados para la extracción

La concentración de nitratos se calcula con la siguiente fórmula:

$$NO_3 - N \left(\frac{\mu g}{suelo(g)} \right) = \frac{Abs * Fc * 100}{25 * 10}$$

donde:

Abs = absorbancia leída a 410 nm

Fc = factor de conversión, que es la inversa de la pendiente de la curva de calibración

100 = mL de sulfato de potasio usados para la extracción del suelo

25 = g de suelo en base seca

10 = mL de la alícuota tomada para la determinación de nitratos

La concentración de nitritos se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$NO_2 - N \left(\frac{\mu g}{suelo(g)} \right) = \frac{Abs * Fc * 100}{25 * 10}$$

donde:

Abs = absorbancia leída a 520 nm

Fc = factor de conversión, que es la inversa de la pendiente de la curva de calibración

100 = mL de sulfato de potasio usados para la extracción del suelo

25 = g de suelo en base seca

10 = mL de la alícuota tomada para la determinación de nitritos

Tabla 19.1. Condiciones recomendadas para las pruebas de la tasa de mineralización del nitrógeno en suelo

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura de incubación	25 °C
Humedad de las muestras con tratamiento y controles	40 a 50 % de la capacidad de retención de agua
Número de réplicas por tratamiento	3
Duración de la incubación de la prueba	De 7 a 30 días
Volumen de la solución extractora	4:1 solución extractora:suelo, (vol. mínimo recomendable 100 mL)

(Continúa)

Tabla 19.1. Condiciones recomendadas para las pruebas de la tasa de mineralización del nitrógeno en suelo (*continúa*)

Almacenamiento de los extractos antes de su análisis	Congelación a 5 °C
Efectos medidos	Concentraciones de amonio, nitratos y nitritos
Resultado final	µg del Nitrógeno mineralizado por gramo de suelo por día
Control negativo	Suelos sin tratamiento

BIBLIOGRAFÍA

- Alef, K. y D. Kleiner. 1986a. Arginine ammonification, a simple method to estimate microbial activity potentials in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 18: 233-135.
- . 1986b. Arginine ammonification in soils samples. En: *The application of enzymatic and microbiological methods in soil analysis*. Veroff Landwirtsch-Chem. Bundesanstalt Linz/Donau 18, 163-168.
- Casida, L. E. Jr., 1977. Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations. *Applied and Environmental Microbiology* 34: 630-636.
- Chander, K., y P.C. Brookes. 1991. Is the dehydrogenase activity assay invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated soils? *Soil Biology and Biochemistry* 23: 909-915.
- Cochran V. L., L. F. Elliot y C. E. Lewis. 1989. Soil microbial biomass and enzyme activity in subarctic agricultural and forest soils. *Biology and Fertility of Soils* 7: 283-288.
- García C., T. Hernández y F. Costa. 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. Communication. *Soil Science and Plant Analysis* 28: 123-134.
- Greaves M. P., N. J. Poole, K. H. Domsch, G. Jagnow y W. Verstraete. 1980. Recommended test for assessing the side effect of pesticides on soil microflora. Technical Report Research Council, Weed Research Organization. No 59: 1-15.
- Haynes R.J., y K.M. Goh. 1978. Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biological Reviews* 53: 465-510.
- Jenkinson D. S. y J. N. Ladd. 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. En: E. A. Paul y J. N. Ladd (eds). *Soil Biochemistry*. Vol. 5. Marcell Dekker. New York. Pp. 415-471.
- Keeney D. R., y D. W. Nelson. 1982. Nitrogen inorganic forms. En: A. L. Page, R. H. Miller y D. R. Keeney (eds). *Methods of Soil Analysis*. Part 2. Segunda edición. American Society of Agronomy, Madison, Washington D.C. Pp. 643-698.

- Klein D.A., T.C. Loh y R.L. Goulding. 1971. A rapid procedure to evaluate the dehydrogenase activity of soils low in organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 3: 385-387.
- Nannipieri, P., S. Grag y B. Ceccanti. 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. En: Bollag, J.M., y G. Stotzky (eds). *Soil Biochemistry*. Vol. 6. Marcel Dekker, Nueva York. Pp. 293-355.
- Ohlinger R. 1986. Effects of stimulated acid rain on soil and young Norway spruce plants in a pot experiment. Part 2. Study of some soils enzyme activities. *Central bl. Gasample Forstwes* 103: 79-89.
- Primo Yúfera, E. y J.M. Carrasco. 1973. *Química Agrícola*. Tomo I. Editorial Alambra, España.
- Reddy, G.B. y A. Faza. 1989. Dehydrogenase activity in sludge amended soil. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 327-336.
- Schaffer, A. 1993. Pesticides effects on enzyme activities in the soil ecosystem. En: *Soil Biochemistry*. Vol 8 J.M. Bollarg and G. Stotzky. pp. 273-340.
- Somerville, L. y M. O. Graves. 1987. Pesticide effects on soil microflora. En: L. Somerville y M. P. Graves (eds.). *Pesticide Effects on Soil Microflora*. Taylor and Francis, Londres y Nueva York. Pp. 115-132.

Cuarta parte

*Ensayos aplicables
a más de una matriz*

ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON LA BACTERIA *VIBRIO FISCHERI* (*PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*)

Yolanda Pica Granados y Gissel Trujillo Domínguez

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: AE

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Vibrio fischeri es una bacteria marina luminiscente, gram-negativa, anaerobia facultativa. En condiciones ambientales favorables estas bacterias emiten luz naturalmente, requiriendo para esto oxígeno en concentraciones por encima de 0.5 mg/L.

El empleo de estas bacterias con fines de monitoreo de la contaminación ambiental se inició en los años 60 y hacia los años 70 se emplearon en la determinación de toxicidad en aguas, sedimentos y productos diversos. Posteriormente, estos métodos fueron estandarizados e incluidos como protocolos normalizados como DIN (norma 38412 parte 34), ISO (norma 11348 parte 1 y SCOFI (NOM NMX-AA-112) en México.

La prueba se basa en la medición de la luminiscencia emitida por las bacterias *V. fischeri* después de su exposición a una muestra problema por un período

de 5 a 30 minutos. La intensidad de la luz emitida por las bacterias expuestas a la muestra problema se compara con la emitida por bacterias que permanecen en las condiciones óptimas del sistema control.

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

Este ensayo es aplicable en estudios de toxicología acuática; control legal de descargas agrícolas, industriales y municipales; evaluación de procesos de tratamiento y estudios integrales de contaminación, donde para el análisis de toxicidad se requiera manejar una concentración inicial de la muestra del 100%. Este método puede emplearse también para el análisis de extractos orgánicos y elutriados de suelos y sedimentos o sustancias puras líquidas o sólidos solubilizables.

DEFINICIONES

Las siguientes definiciones han sido adecuadas a las necesidades de la prueba.

Agua deionizada: es el agua a la que se le han removido los iones en solución, pasándola a través de columnas de resina o de un sistema de ósmosis inversa.

Análisis replicado: es la prueba realizada a una muestra en dos o más ocasiones durante la misma sesión de trabajo.

Bioluminiscencia: fenómeno en donde los organismos vivos emiten luz como resultado de procesos enzimáticos ligados a la respiración.

Blanco: es usado indistintamente con la palabra control.

Blanco de pretratamiento: deberá entenderse como blanco de pretratamiento aquel que se prepara de la misma forma que las muestras, pero sin contener a la muestra. Se realiza cuando las muestras son tratadas previamente al análisis de toxicidad y se elabora para evaluar en qué medida el pretratamiento contribuye a la toxicidad de la muestra.

Compuesto tóxico de referencia: sustancia pura utilizada en ensayos de toxicidad para determinar la sensibilidad de los organismos de prueba y validar las mediciones de toxicidad.

Concentración efectiva media (CE_{50}): es la concentración estimada de material que causa un efecto no letal detectado por la reducción del 50% de la intensidad luminosa generada por una población de 10^6 bacterias.

Control: lote o tratamiento dentro de un diseño experimental que replica todos

los factores que puedan afectar el resultado, excepto la condición que está siendo investigada (sinónimo de control negativo).

Cultivo: conjunto de plantas o animales que se mantienen bajo condiciones definidas y controladas, para producir organismos saludables.

Efecto tóxico agudo: es aquel que es inducido y observado en un período corto, que puede ser de 5 a 30 minutos para el caso de *V. fischeri*. Este período de respuesta óptimo está definido a partir de estudios previos basados en el conocimiento de biología bacteriana, en conjunto con la química de los compuestos tóxicos. Se ha observado la existencia de procesos que facilitan el paso de los compuestos tóxicos al interior de las células bacterianas, siendo más ágiles y rápidos los relacionados a compuestos orgánicos que los de incorporación de elementos metálicos (Bulich, 1979; Bulich *et. al.*, 1981; Kauser, 1984; Bulich, 1988).

Liofilizado: congelado y deshidratado al vacío; es aplicado a la bacteria usada en la prueba Microtox, la cual se comercializa.

Porcentaje (%): es una concentración expresada en partes por ciento. Representa una unidad o parte del material (por ejemplo efluente o agua receptora) diluida con agua a un total de 100 partes. Las concentraciones pueden ser preparadas en volumen-volumen o peso-peso y son expresadas como un porcentaje de material de prueba en la solución final.

Prueba de toxicidad: también denominada bioensayo o ensayo de toxicidad, la cual consisten en la exposición de organismos vivos a soluciones preparadas o muestras naturales con el fin de evaluar en ellas la presencia de algún compuesto tóxico a través de alteraciones de la vitalidad o funcionamiento metabólico de los organismos de prueba.

Toxicidad: es la capacidad o potencialidad inherente de un material para causar efectos adversos en los organismos. El efecto puede ser letal o subletal.

MATERIAL

Hielera, hielo o geles refrigerantes, pipetas automáticas de 250, 500 y 1,000 μL (de volumen fijo o ajustable), pipeta automática de 10 μL o de repetición ajustable a mediciones de 10 μL , puntas para micropipetas, jeringas de 0.6 mL para pipeta de repetición y celdillas de vidrio de borosilicato.

EQUIPO

Sistema Microtox® Modelo 500 constituido por: fotosensor (Luminómetro); pozos de incubación con temperatura controlada de 15 °C; pozo para reac-

tivo reconstituido con temperatura controlada de 5 °C (pozo activación) y congelador a una temperatura de -20° C. Sistema de cómputo con *software* acoplado a sistema Microtox®, Probit u otro que sea de utilidad, y con hoja de cálculo.

REACTIVOS

Reactivo liofilizado (bacteria liofilizada), solución diluyente (solución de cloruro de sodio (NaCl) al 2%), solución de ajuste osmótico (solución de cloruro de sodio (NaCl) 22 %), solución de reconstitución (agua deionizada).

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Este ensayo es una versión ampliada y modificada por el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, basada en MICROBICS (1992) y en la Norma Mexicana NMX-A-112-1995-SCFI (SECOFI, 1995).

OBTENCIÓN, MANEJO Y TRANSPORTE DE LA BACTERIA

La bacteria *V. fischeri* en forma liofilizada puede ser obtenida a través de la representación en México de Microtox® o en su defecto cultivada, siguiendo la metodología descrita por Knie y Lopes (2004). Durante su traslado debe conservarse siempre en congelación, de preferencia a una temperatura de -20 ± 4 °C. El inadecuado manejo de las bacterias afecta la sensibilidad de estos microorganismos y por consecuencia la confiabilidad de los resultados.

Para el transporte de las bacterias se deben utilizar hieleras con geles refrigerantes, hielo o hielo seco, para mantener una temperatura de 4 ± 2 °C. De esta forma las bacterias liofilizadas pueden permanecer hasta 8 horas. En caso de traslados breves puede emplearse bandejas con hielo o geles fríos.

REACTIVACIÓN DE LA BACTERIA LIOFILIZADA

Encender el equipo Microtox® y permitir la estabilización automática de las temperaturas en los pozos de incubación (15 ± 1 °C) y de activación (5 ± 1 °C). El tiempo requerido es de aproximadamente 15 minutos, lo cual se verifica al apagarse la señal de termómetro en la pantalla del equipo.

Colocar 5 celdillas en los pozos de incubación del sistema Microtox® (figura 20.1).

Colocar un vial en la celdilla del pozo de activación o de reactivo del sistema Microtox®.

Agregar a la celdilla del pozo de activación 1 000 µL de solución de reconstitución. Dejar estabilizar por un tiempo aproximado de 5 a 10 minutos para que ésta alcance una temperatura de 5 ± 1 °C, la cual es controlada internamente por el equipo.

Sacar un frasco de bacteria liofilizada del congelador, manejar en frío hasta que se vacíe en ella la solución de reconstitución, mantenida en el pozo de activación a 5 ± 1 °C, y disolver. Estas acciones deben efectuarse rápidamente para evitar un efecto de choque osmótico a las bacterias. Transferir la mezcla nuevamente a la celdilla de activación y continuar su incubación a 5 ± 1 °C. Mezclar la bacteria, ya sea con ayuda de una pipeta automática, aspirando y eyectando la mezcla en la celdilla, o por medio de agitación suave generando un efecto ligero de vórtice. Dejar reposar por un tiempo aproximado de 15 minutos con el propósito de que la bacteria se hidrate y revitalice.

PREPARACIÓN DE LA PRUEBA

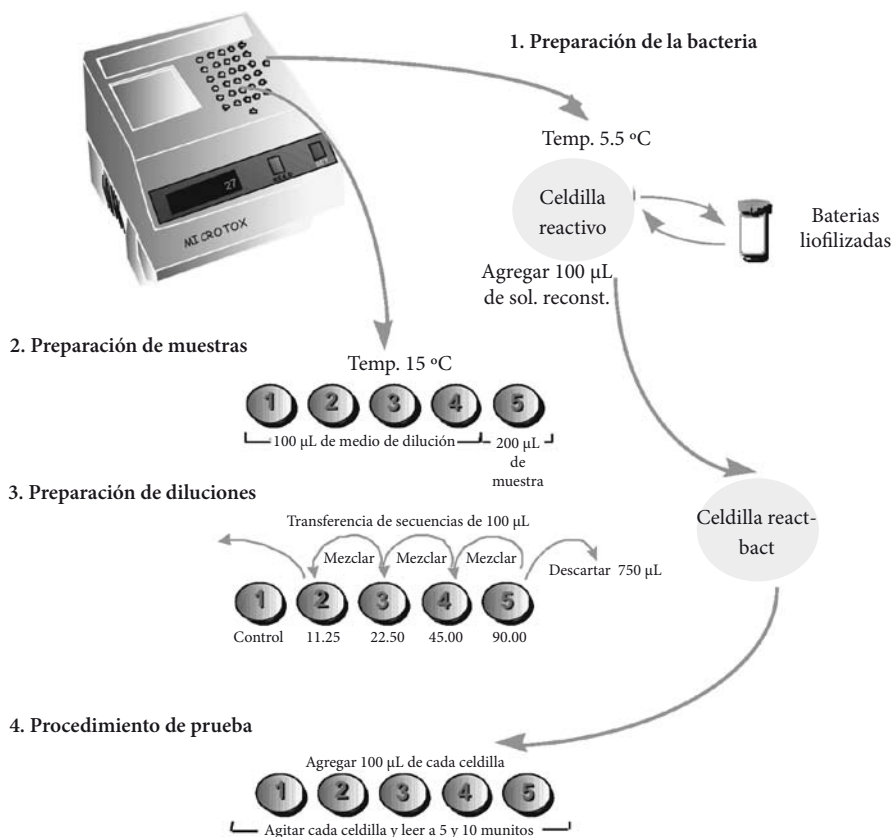
Para el análisis de agua epicontinental, el sistema se prepara de la siguiente manera (tabla 20.1):

Agregar 1,000 µL de solución diluyente en las celdillas 1, 2, 3 y 4.

Agregar 250 µL de solución de ajuste osmótico y 2500 µL de la muestra problema en la celdilla 5. Mezclar por pipeteo, absorbiendo y eyectando la solución tres veces con ayuda de la pipeta de 1 000 µL.

Para análisis de agua marina y salobre se requieren preparar dos sistemas de prueba, uno igual al de muestras de agua epicontinental, conteniendo 250 µL de solución de ajuste osmótico y 2500 µL de la muestra problema del agua salina por analizar y otro preparado sin la solución de ajuste osmótico, es decir 2750 µL de la muestra problema.

El empleo del análisis de la muestras con y sin ajuste osmótico ayuda a elegir el método de trabajo adecuado para las muestras problema, ya que cuando la adición de la solución de ajuste osmótico representa un exceso de sales para la bacteria, los niveles de luminosidad adquieren valores significativamente más elevados que los del control negativo, datos que denotan interferencia por exceso de sales en el sistema de prueba y no pueden ser empleados para la obtención de la concentración efectiva media (CE_{50}). Cuando esto sucede, el sistema preparado en ausencia de la solución de ajuste osmótico generalmente provee de lecturas útiles para los cálculos de la CE_{50} .

Figura.20.1. Procedimiento de prueba para el ensayo con *Vibrio fischeri*

PREPARACIÓN DEL CONTROL DE PRUEBA

En forma paralela, se prepararán muestras replicadas y blancos de procedimiento (cuando esto aplique) consideradas para el control de calidad analítico, así como un control positivo y otro negativo.

El control positivo corresponde a una prueba efectuada con una solución de fenol, que es el compuesto tóxico de referencia para la prueba con *V. fischeri*. A través de él es posible verificar la adecuada sensibilidad y el estado fisiológico de los microorganismos liofilizados antes de iniciar el análisis de muestras problema. Alternativamente, pueden ser empleados otros compuestos cuya respuesta sea bien conocida, tal es el caso del Zn(II).

Es necesario elaborar una solución de prueba de aproximadamente 100 µg/mL (ppm). La solución de fenol deberá ser valorada de forma regular (por lo menos una vez cada tres meses), empleando el método de titulación con tiosulfato en su apartado de valoración de solución madre de fenol, al que se hace mención en la NOM-AA-050 de la SCFI (SECOFI, 2001).

La solución de fenol debe mantenerse en frascos ámbar o protegidos de la luz con cubierta de papel aluminio a 4 ± 2 °C (refrigeración). En estas condiciones, la solución de prueba podrá preservarse por un promedio de 20 días. Se puede continuar su empleo siempre y cuando el valor de CE_{50} no exceda los límites del ámbito de respuesta preestablecido para el compuesto tóxico de referencia, que es de 13 a 26 µg/mL después de 5 minutos de exposición y cuya concentración, verificada a través de la valoración, no indique cambios relevantes.

A partir de la solución de fenol mencionada, se prepara una serie de cuatro diluciones a las que se expondrán (por cinco minutos) a los microorganismos y cuyo efecto medido permitirá la determinación de la CE_{50} correspondiente.

El control negativo se prepara con una solución de agua deionizada libre de compuesto tóxicos, adicionada con solución diluyente al 2%. Los valores de luminosidad en la celda del control negativo deben ser siempre superiores al valor de 90.

En caso de que los valores de CE_{50} para el control positivo o los de luminosidad para el control negativo excedan los intervalos establecidos, la prueba deberá repetirse para verificar la alteración de la respuesta. Si esta alteración persiste entonces la bacteria o las soluciones diluyentes o de ajuste osmótico deberán desecharse y sustituirse o, en su defecto, preparar nuevamente la solución del compuesto tóxico de referencia y verificar la respuesta.

PREPARACIÓN DE DILUCIONES

Elaborar una serie de diluciones transfiriendo 1,000 µL de la celdilla 5 a la 4, de la 4 a la 3 y de la 3 a la 2, mezclando cada vez. Efectuar la transferencia en el orden indicado, con una pipeta automática de 1,000 µL.

Desechar 1000 µL de la celdilla 2 y 750 µL de la celdilla 5 con el objetivo de uniformizar volúmenes a 1,000 µL. La celdilla 1 será considerada como control negativo. Para la preparación de las diluciones mencionadas se debe emplear pipetas automáticas para volúmenes de 1,000, 500 y 250 µL.

Dejar estabilizar la temperatura de las diluciones por espacio de 5 minutos con el fin de que alcancen una temperatura de 15 ± 1 °C. Para ello, las celdillas deben permanecer en el interior de los pozos del equipo Microtox®.

PREPARATIVOS PARA CAPTURAR LOS DATOS

Una vez preparado el sistema experimental de prueba, se deben disponer las herramientas de captura de datos. Con este fin, puede emplearse el sistema en línea de captación automática por software o cualquier otro de utilidad. De no ser posible el empleo del software integrado a la tecnología Microtox[®], se puede efectuar la toma de datos directa de la pantalla de dicho equipo y registrarlos en una bitácora o en una hoja de cálculo electrónico. La corrección de los valores de luminiscencia a porcentaje de efecto se explica más adelante.

En el caso de haber empleado la opción de toma directa de datos, los valores pueden ser posteriormente ingresados de forma manual al software que acompaña a la tecnología Microtox[®], al programa Probit o a cualquier otro de utilidad para el cálculo de la CE_{50} . De efectuarse la toma de datos de forma manual es importante el uso de un cronómetro o reloj que permita el control del término del tiempo de exposición (por ejemplo 5 o 15 minutos), para dar inicio a la lectura de cada celdilla.

INOCULACIÓN Y LECTURA DE PRUEBA

Una vez revitalizada la bacteria en el pozo de activación, preparadas las diluciones y listo el sistema de captura de datos, iniciar la adición de 10 μ L de la bacteria reconstituida a cada una de las celdillas del sistema experimental (por ejemplo de la 1 a la 5) y de forma simultánea activar el cronómetro programado al tiempo de exposición seleccionado que puede ser 5, 10 o 30 minutos.

Al término del tiempo de exposición se debe realizar la lectura de las celdillas. Para ello, colocar la celdilla 1 (control negativo) en el pozo de lectura y efectuar la autocalibración, presionando el botón identificado con la palabra SET (aparecerán en la pantalla del equipo valores entre 90-100). Posteriormente, oprima el botón READ. La lectura de la celdilla 1 aparecerá en la pantalla y deberá ser registrada en la bitácora, en el software o en la hoja de cálculo, en el sitio asignado para las lecturas de las celdillas control negativo.

Retire la celdilla 1 (control negativo) y continúe con la lectura de las celdillas restantes o experimentales (por ejemplo 2, 3, 4 y 5), iniciando con la de menor concentración. Oprima el botón READ con cada celdilla. Ingrese una nueva celdilla para lectura de forma inmediata a la expulsión de la anterior, registrando los datos que aparecen en la pantalla del equipo.

Tabla 20.1. Condiciones recomendadas para la prueba de toxicidad aguda con *Vibrio fischeri*

Tipo de ensayo	Estático
Organismo de prueba	<i>Vibrio fischeri</i> , cepa NRRL B-11177 liofilizada
Equipamiento	Fotómetro Microbioccs (Microtox [®])
Temperatura	15 ± 0.3 °C
Recipientes de prueba	Viales de 2 mL
Volumen de la solución de prueba	1 mL
Número de organismos por recipientes	Aproximadamente 1 x 10 ⁶ bacterias
Número de réplicas	No requiere réplicas
Número de diluciones	≥ 4
Agua de dilución	Agua destilada con NaCl al 2%
Factor de dilución	0.3 o 0.5
Duración de la prueba	5 o 15 minutos u otro tiempo (< 1 hora) que resulte apropiado a los objetivos
Efecto medido	Inhibición de la emisión luminosa
Resultado final	IC ₅₀ o EC ₅₀
Aceptabilidad de los resultados	La emisión luminosa en el control negativo debe ser > 90
Control positivo	Solución de fenol

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados se expresan a través de la CE₅₀ y las unidades pueden estar en porcentaje, mL/L, mg/L, eq. mg/mL o cualquier otra unidad acorde con el tipo y manejo de muestra que se analice.

Los cálculos para la determinación de la CE₅₀, así como la elaboración de la curva asociada, pueden ser realizados a través de diversas herramientas como los software MTX 7 o la versión más reciente, ambos producidos por el fabricante de Microtox[®] para el registro automático de datos. Estos programas despliegan la información en pantalla y si se desea puede ser impresa.

De no contarse con estos programas, también puede emplearse el programa Probit (versión USEPA 1.5) o cualquier otro que pueda efectuar dicho análisis. En caso de emplear el Probit será necesario hacer la conversión de los valores de luminiscencia a porcentajes de efecto los cuales deberán ser capturados en el programa Probit en los espacios correspondientes al número de organismos afectados para cada dilución. Para efectuar la corrección deberá realizar los siguientes pasos:

Tomar el valor de luminiscencia del control (si es sólo uno) o promediar el valor de los controles (si se cuenta con más de uno) y hacerlo equivalente a 100%. Tomar el valor de luminiscencia de cada dilución para obtener su valor en equivalencia respecto al control, a través de una regla de tres.

Ejemplo de una dilución:

Luminiscencia del control	96	100%
Luminiscencia de la dilución	70	X
Resultado		X= 72.91

Restar de 100 cada valor de dilución obtenido de la corrección:
 $100 - 72.91 = 27.09$

El valor de 27.09 es el porcentaje de efecto que deberá ingresarse al Probit como el número de organismos afectados. Realizar este ajuste a cada una de las distintas diluciones.

INTERFERENCIAS

- Color en la muestra original y diluida. Si se sospecha de interferencia por color, hacer la corrección de la lectura de acuerdo a los pasos que se indican en el manual Microtox (Microbics Corporation, 1992).
- Turbiedad en las muestras diluidas. Dejar sedimentar la muestra y emplear el sobrenadante.
- Compuestos volátiles. En caso de que la muestra contenga compuestos volátiles, es factible que la pérdida continua de estos agentes sea un factor de variabilidad que afecte la estabilidad de la respuesta y puede generar, en caso de análisis replicados, resultados poco consistentes. Para evitar dicha alteración se sugiere correr en paralelo a la muestra original muestras aireadas, de modo que los resultados de toxicidad que así se obtengan corresponderán a la fracción soluble y no volátil de la muestra. Si se requiere conocer la toxicidad de muestras con carga volátil sin que ésta sea removida, la única prueba factible de ser aplicada con *V. fischeri* es una con una corta duración (5 minutos), manejando la muestra en frío y en sistemas parcialmente cerrados. Estas condiciones, manejadas por técnicos con experiencia, pueden permitir la obtención de lecturas analíticamente confiables; sin embargo, esta clase de análisis no deben realizarse rutinariamente y deben ser protocolizados como investigaciones

o procesos especiales dada la complejidad de su manejo y la necesidad de ser interpretadas por especialistas.

BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association (APHA). 1992., *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 18th ed. American Public Health Association, Ap. 8010G. pag. 8-20-8-23.
- Bulich, A. A. 1979. Use of luminiscent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. En: L. L. Markings y R. A. Kimerle (eds.). *Aquatic Toxicology*. ASTM 667. American Society for Testing Materials. Pp. 98-106
- Bulich, A. A., M. W. Greene y D. L. Isenberg. 1981. Reliability of the bacterial luminescence assay for determination of the toxicity of pure compounds and complex effluents, En: D. R. Branson y K. L. Dickson (eds.). *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 4th Conference*. ASTM STP 737. American Society of Testing and Materials. Pp. 338-347.
- Bulich, A. 1988. Analytical application of the MICROTOX system. Analytical Techniques and Residuals Management En: *Water Pollution Control Federation Specialty Conference*, Abril 19-20, Atlanta.
- Environment Canada. 1992. *Biological test method: Toxicity test using luminiscent bacteria (Photobacterium phosphoreum)*. Environmental protection Series. EPS 1/RM/24 de noviembre de 1992.
- Kauser, K. L. E. 1984., Organic contaminants in the environment: Research Progress and Needs. *Environment International* 10: 241-250.
- Knie, J. L. W. y E. W. Lopes. 2004. *Testes ecotoxicológicos, Métodos, técnicas e aplicações*. FATMA, GTZ . 289 pp.
- Microbics Corporation. 1992. *Manual Microtox*. Carlsbad, California, U.S.A. Part No. 55H550-1-5.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. (SECOFI). 1995. Norma Mexicana NMX-AA-112- SCOFI. Análisis de agua y sedimentos. Evaluación de toxicidad aguda con *Photobacterium phosphoreum*. Método de pruebas DGN. 36 pp.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. (SECOFI). 2001 Norma Mexicana NMX-AA-050-SCOFI. Análisis de Agua. Determinación de fenoles totales en aguas naturales potables , residuales y residuales tratadas. Método de prueba de la DGN. 24 pp.

ENSAYO DE MUTAGENICIDAD CON LA BACTERIA *SALMONELLA TYPHIMURIM*. PRUEBA DE AMES

Ana María Sandoval Villasana

CLASIFICACIÓN DEL ENSAYO: AE

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba utiliza cepas de *Salmonella typhimurium*, construidas por ingeniería genética, capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por dislocamiento del cuadro de lectura (*frameshift*) o por sustitución de pares de bases del ADN. Para la detección de sustancias promutagénicas, se incluye el ensayo de fracción microsomal de hígado de rata, un sistema de activación metabólica, que permite la evaluación de metabolitos de la muestra problema.

Diferentes cepas de *S. typhimurium* auxotróficas a histidina son expuestas a una muestra con y sin activación metabólica y plaqueadas en agar medio mínimo con histidina/biotina. Dada la composición del medio de cultivo, se forman colonias con las células prototróficas a histidina (*his-*), procedentes de mutaciones espontáneas u originadas de mutaciones provocadas por la muestra problema. Después de 66 horas de incubación a 37°C, las colonias

revertantes son contadas. El valor igual o mayor a dos, de la expresión obtenida de dividir el número de revertantes en las placas de prueba entre el número de revertantes de las placas control, indica la presencia de actividad mutagénica en la muestra problema.

Una modificación a la prueba de Ames original fue sugerida, donde se prueba directamente la muestra que pasa previamente por un proceso de filtración por membrana, modificándose las concentraciones de agar, en el agar de superficie. El método directo, como se denomina, aumenta la sensibilidad del ensayo, permitiendo una concentración *in situ* de la muestra en alrededor de 10 a 20 veces; es decir, que la muestra problema adicionada presenta una mayor respuesta al análisis en función del aumento de compuestos genotóxicos como consecuencia del proceso de filtración de la muestra problema (Cornell Institute for Medical Research, 1986).

Este método también tiene la ventaja de poder ser utilizado en muestras problema que presentan alta viscosidad; en estos casos puede ser utilizada la técnica de pre-incubación (Maron y Ames, 1983).

La prueba de Ames método directo se utiliza en la evaluación de mutagenicidad de muestras problema (agua, aire, lixiviados de residuos sólidos, extractos acuosos, etc.). Asimismo, es considerada parte esencial de las pruebas toxicológicas para la detección y localización de fuentes que generen un daño potencial por la presencia de compuestos genotóxicos.

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

Auxótrofico: organismo mutante (bacteria) que no crece en un medio mínimo, pues necesita de la presencia de algún factor de desarrollo.

c.s.p.: cantidad suficiente para.

Mutación: mecanismo biológico universal que promueve modificaciones genéticas en los organismos. A nivel molecular, hay una alteración de la molécula de ADN, resultando en la formación de proteínas alteradas o ausentes en el organismo que sufre una mutación.

Mutación rfa: mutación que causa modificaciones en la capa de lipopolisacáridos de la membrana celular bacteriana, propiciando una mayor permeabilidad de la célula a moléculas grandes.

Mutación uvrB: mutación causada por la delección de los genes responsables por la reparación de excisión, que impide a una bacteria reparar algunos tipos de daños causados al ADN, tornándose más sensible a agentes muta-

génicos. Por razones técnicas, una delección del gene *uvrB* se extendió hasta el gen de biotina y, consecuentemente, las cepas se tornaron auxótroficas para biotina (bio-).

Mutágeno o agente mutagénico: agente químico o físico que se integra con el ADN, causando mutaciones.

Operón: conjunto de genes que controlan la biosíntesis de una proteína.

p.a.: para análisis (o grado reactivo).

Plásmido: fragmento circular de ADN que se encuentra separado del ADN cromosómico.

Plásmido pAQ1: plásmido que contiene un gene para resistencia a tetraciclina y contiene una mutación *hisG428*

Plásmido pKM101: plásmido que contiene un gen para resistencia a ampicilina.

Su presencia confiere una bacteria con mayor sensibilidad a mutágenos.

Prototrófico: organismo de tipo silvestre.

MATERIAL

Matraces para la preparación de medios de cultivo de borosilicato (Pyrex) o de vidrio neutro, con capacidad de 100, 250, 500 y 1,000 mL; frascos para soluciones de borosilicato (Pyrex) o de vidrio neutro, con tapa de rosca, no tóxica; pipetas bacteriológicas de 1 mL, 5 mL y 10 mL con graduación de 1/10; tubos de ensaye de borosilicato (Pyrex) o de vidrio neutro, de medidas aproximadas de 13 X 100 mm y 15 X 150 mm, con tapón de polipropileno de material no tóxico; cajas Petri desechables, deben ser de plástico de buena calidad y deben medir 100 mm de diámetro por 15 mm de altura. Es necesario que su esterilización se realice por un proceso de radiación gama. En caso de no tener acceso a este proceso deben ser esterilizadas en horno de microondas al 100% de capacidad durante 14 minutos. No deben utilizarse cajas esterilizadas por procesos químicos; asas de inoculación con una longitud de 7 a 8 cm de diámetro de 0.5 mm; tubos criogénicos de polipropileno esterilizables en autoclave, con tapas apropiadas para congelar a -80°C (ultracongelador) o -195°C (nitrógeno líquido) para volúmenes máximos de 2 mL; mechero Bunsen; gradillas; filtros para esterilización del tipo swinnex, de polipropileno con diámetro de 13 mm o del tipo unidades de filtración, con diámetro de 47 mm; cinta indicadora de esterilidad; lámpara germicida (UV) de 15 W; guantes quirúrgicos; membranas de filtración estériles de acetato de celulosa, con poros de 0.45 μm y 0.22 μm ; micropipetas con capacidad para medir volúmenes de 10 a 100 μL , 100 a 1,000 μL ; papel filtro; papel Kraft; parafilm;

pipeteador; pinzas; porta-pipetas de acero inoxidable y jeringas desechables esterilizadas con capacidad de 5, 10 y 20 mL.

EQUIPO

Agitador tipo vórtex; autoclave; balanza analítica; balanza granataria; baño seco; campana de seguridad biológica (cámara de flujo laminar vertical); congelador; contador de colonias; microscopio estereoscópico; incubadora bacteriológica; incubadora con agitación orbital; microscopio óptico; parrilla de calentamiento; potenciómetro; refrigerador y ultracongelador a -80°C .

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Los reactivos deben ser grado p.a. o bacteriológicos y de procedencia idónea, no deben presentar olor, color y consistencia alterada, deben estar libres de elementos bacteriostáticos inespecíficos, por ejemplo, carbohidratos inespecíficos:

2-aminoantraceno (2AA); 2-aminofluoreno; ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) p.a.; ácido picrolónico; azida de sodio (NaN_3); bacto agar; β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP); D-biotina; caldo nutritivo N° 2 (OXOID); cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) p.a.; cloruro de potasio (KCl) p.a.; cloruro de sodio (NaCl) p.a.; cristal violeta; dimetilsulfóxido (DMSO); fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) p.a.; fosfato de sodio monobásico (KH_2PO_4) p.a.; fosfato de sodio y amonio ($\text{NaNH}_4\text{PO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) p.a.; fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) p.a.; fosfato de potasio monobásico (NaH_2PO_4) p.a.; fracción S9 – homogeneizado de hígado de rata, inducido con Aroclor 1254, congelado, proveniente del Instituto de Investigaciones Biomédicas – UNAM; glucosa; glucosa-6-fosfato; L-histidina HCl; metil nitrosoguanidina (MNNG) y sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) p.a.

SOLUCIÓN DE AGAR

Reactivo	Volumen o peso
Bacto agar	7.5 g
Agua destilada	300 mL

Pesar el agar y adicionar el agua destilada fría. Agitar frecuentemente hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

SOLUCIÓN DE GLUCOSA

Reactivo	Volumen o peso
Glucosa	10 g
Agua destilada	100 mL

Pesar la glucosa y adicionar el agua destilada fría. Agitar inmediatamente hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

MEDIO DE VOGEL-BONNER “E” 50X Y 10X

Reactivo	Volumen o peso
Sulfato de magnesio heptahidratado	10 g
Ácido cítrico monohidratado	100 g
Fosfato de potasio dibásico anhidro	500 g
Fosfato de sodio y amonio tetrahidratado	175 g
Agua destilada	1000 mL

Pesar las sustancias mencionadas en las cantidades especificadas y disolver en el agua destilada fría. Distribuir en un frasco color ámbar y mantener a temperatura ambiente.

A partir de la solución preparada de Vogel-Bonner “E” (50X) tomar 10 mL y adicionarlos a 90 mL de agua destilada, obteniéndose una solución de Vogel-Bonner “E” 10X. Agitar inmediatamente hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

SOLUCIÓN DE HISTIDINA/BIOTINA

Reactivo	Volumen o peso
L-histidina HCl	0.117 g
D-biotina	0.138 g
Agua destilada	1000 mL

Pesar los componentes y disolverlos en el agua destilada caliente (temperatura de ebullición). Distribuir volúmenes de 100 mL en frascos cubiertos con aluminio. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Los frascos que contienen la solución histidina/biotina son almacenados en refrigeración (2 a 8 °C) durante un período de máximo de 45 días.

AGAR MEDIO MÍNIMO

Reactivo	Volumen (mL)
Agar	300
Solución de glucosa	100
Medio de Vogel-Bonner "E" 10X	100
Solución de histidina/biotina	5

Juntar asépticamente las soluciones de agar, glucosa, Vogel-Bonner "E" 10X e histidina/biotina en las cantidades especificadas, homogeneizar suavemente y distribuir volúmenes de aproximadamente 24 mL en cajas de Petri esterilizadas, con ayuda de un pipeteador semiautomático. Las placas con agar mínimo son almacenadas en refrigeración (2 a 8 °C) durante un período de 30 días.

CALDO NUTRITIVO OXOID

Reactivo	Volumen o peso
Caldo nutritivo N° 2 (OXOID)	2.5 g
Agua destilada	100 mL

Pesar el caldo nutritivo y disolverlo en el agua destilada fría. Distribuir alícuotas de 5 mL en tubos de ensaye de 15 mm X 150 mm, con tapa de rosca. Posteriormente esterilizar a 121 °C durante 15 minutos, almacenar en refrigeración (4 ± 2 °C) durante un período de 30 días.

AGAR NUTRITIVO

Reactivo	Volumen o peso
Caldo nutritivo No. 2 (OXOID)	25.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Pesar los componentes y adicionar el agua destilada fría, dejar en reposo durante 15 minutos. Agitar hasta una completa homogeneización de los ingredientes. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El pH final de la solución después de la esterilización debe ser de 7.0. Después de esterilizar, estabilizar el medio a una temperatura de 50 °C. Con todos los cuidados de asepsia, distribuir aproximadamente 24 mL en cajas Petri esterilizadas. Las cajas Petri que contienen agar nutritivo son almacenadas en refrigeración (4 ± 2 °C) durante un período de 14 días.

AGAR DE SUPERFICIE (“TOP AGAR”)

La composición del agar de superficie utilizado en el método directo se presenta en la tabla 21.1. Las cantidades de los componentes de este medio de cultivo fueron modificadas, para permitir que la concentración del agar sea la misma conforme se varíe el volumen de la muestra por tubo (Cornell Institute for medical Research, 1986).

Tabla 21.1. Composición del agar de superficie para la prueba de Ames

Componentes	Concentración del agar de superficie				
	1.0X	1.5X	2.0X	2.5X	3.0X
Bacto agar	6.0 g	7.2 g	9.0 g	12.0 g	18.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g	6.0 g	7.5 g	10.0 g	15.0 g
Agua destilada	1000 mL				

Fuente: Cornell Institute for Medical Research, 1986.

Pesar los componentes y adicionar el agua destilada fría. Agitar frecuentemente hasta una completa homogeneización de los ingredientes. Dejar reposar 15 minutos y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El pH final del medio deber ser de 7.0. Después de esterilizar, estabilizar el medio a una temperatura de 48 ± 2 °C en incubadora. Si es posible preparar este medio un día antes de su utilización. En caso de que sobre después de su uso, este medio se debe almacenar en refrigeración (2 a 8 °C) durante un período máximo de 30 días. Si este medio está solidificado el día que se use, debe fundirse en un horno de microondas a 100% de su potencia durante 6 minutos.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA A

Reactivo	Volumen o peso
Fosfato de sodio dibásico	2.84 g
Agua destilada	100 mL

Disolver el fosfato de sodio dibásico en el agua destilada fría. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Mantener en refrigeración (2 a 8 °C) durante un período máximo de 60 días.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA B

Reactivo	Volumen o peso
Fosfato de sodio monobásico	2.76 g
Agua destilada c.s.p.	100 mL

Disolver el fosfato de sodio monobásico en el agua destilada fría. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Mantener en refrigeración (2 a 8 °C) durante un período máximo de 60 días.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 0.2 M

Reactivo	Volumen (mL)
Solución amortiguadora A	81
Solución amortiguadora B	19

Cuando se lleva a cabo el experimento juntar la solución amortiguadora A con la solución amortiguadora B. El pH final de la solución debe ser de 7.4.

SOLUCIÓN DE CLORURO DE POTASIO 1.65 M

Reactivo	Volumen o peso
Cloruro de potasio	12.3 g
Agua destilada c.s.p.	100 mL

Disolver el cloruro de potasio en el agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Los frascos con solución de cloruro de potasio son almacenados en refrigeración (2 a 8 °C) durante un período máximo de 60 días.

SOLUCIÓN DE CLORURO DE MAGNESIO 0.4 M

Reactivo	Volumen o peso
Cloruro de magnesio	8.14 g
Agua destilada c.s.p.	100 mL

Disolver el cloruro de magnesio en el de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Los frascos de la solución de cloruro de magnesio son almacenados en refrigeración (2 a 8 °C) durante un período máximo de 60 días.

SOLUCIÓN DE GLUCOSA-6-POSFATO 1M

Reactivo	Volumen o peso
Glucosa-6-fosfato	1.41 g
Agua destilada c.s.p.	5 mL

Disolver la glucosa-6-fosfato en el agua destilada esterilizada. Esterilizar por membrana filtrante (0.45 µm) en un vial desechable previamente esterilizado. Los tubos que contienen una solución de glucosa-6-fosfato deben ser almacenados en congelador (-20 ± 2°C) durante un período máximo de 60 días.

SOLUCIÓN DE β-NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEÓTIDO FOSFATO 0.1 M

Reactivo	Volumen o peso
β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP)	0.07654 g
Agua destilada	10 mL

Disolver el NADP en el agua destilada esterilizada. Esterilizar por membrana filtrante (0.45 µm) en un vial con tapa de rosca previamente esterilizado.

Esta solución debe prepararse el mismo día y en el volumen necesario que se va a requerir para el experimento.

FRACCIÓN S9

La fracción S9 es un homogeneizado de hígado de rata, inducido con Aroclor 1254, congelado, proveniente del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Es mantenido en viales congelados a $-80 \pm 2^\circ\text{C}$ en ultracongelador o a -195°C en tanque de nitrógeno líquido durante tres años. Cuando éste se va a requerir para un experimento, únicamente se descongela la cantidad de viales necesaria. Si sobra volumen de esta fracción, se desecha. Para emplearlo en la mezcla S9, éste debe ser esterilizado por membrana filtrante ($0.45 \mu\text{m}$) en un vial con tapa de rosca previamente esterilizado. Esta solución debe prepararse el mismo día del experimento.

MEZCLA (S9) 4%

La combinación de la fracción S9 y los cofactores se denomina mezcla S9.

Reactivo	Volumen (μL)
Agua destilada	375
Solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M	500
Solución de glucosa-6-fosfato	5
Solución de NADP	40
Solución de cloruro de potasio 1.65 M	20
Solución de cloruro de magnesio 0.4 M	20
Fracción S9	40

Esta mezcla debe ser preparada en una campana de flujo laminar y todos los componentes se deben mantener en baño de hielo. Adicionar los componentes asépticamente en tubos con tapón de rosca o matraces según el volumen que se vaya a preparar, teniendo cuidado de que al adicionar los componentes en el orden presentado arriba (S9 al último) y manteniendo la solución final en baño de hielo o refrigerador a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta el momento de ser utilizado en la prueba.

Al mismo tiempo, se debe hacer el control de esterilidad de cada solución tomando $10 \mu\text{L}$ de cada solución con una micropipeta para distribuir el volumen sobre una placa de agar nutritivo, dejando que la gota se absorba en el

agar. Esta placa de agar nutritivo debe estar marcada previamente en la parte del fondo de la caja, con el nombre de cada una de las soluciones. Incubar las placas en forma invertida durante 24 horas a 37 ± 2 °C.

SOLUCIÓN DE AZIDA DE SODIO

Reactivo	Volumen o peso
Azida de sodio	1 mg
Agua destilada estéril	1 mL

Pesar la azida de sodio, con mascarilla de protección respiratoria para compuestos tóxicos y con guantes quirúrgicos. Colocarla en viales desechables estériles. Adicionar, bajo condiciones asépticas, el agua destilada estéril. Almacenar los viales en el congelador a -20 ± 2 ° por tiempo indefinido.

SOLUCIÓN DE 2-AMINOANTRACENO

Reactivo	Volumen o peso
2-aminoantraceno	1 mg
Dimetilsulfóxido	1 mL

Pesar el 2-aminoantraceno, utilizando mascarilla de protección respiratoria para compuestos tóxicos y guantes quirúrgicos desechables. Colocarlo en viales desechables. Adicionar el dimetilsulfóxido bajo condiciones asépticas. Almacenar a -20 ± 2 °C por 18 meses. Las alícuotas de esta solución sólo se descongelan el día de la prueba.

SOLUCIÓN DE N-METIL-N'-NITRO-N-NITROSGUANIDINA

Reactivo	Volumen o peso
N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina	1 mg
Dimetilsulfóxido	1 mL

Pesar la metilnitrosoguanidina, utilizando mascarilla de protección respiratoria para compuestos tóxicos y con guantes quirúrgicos desechables. Colocarla

en viales desechables. Adicionar el dimetilsulfóxido bajo condiciones asépticas. Almacenar a -20 ± 2 °C hasta por 18 meses. Las alícuotas de esta solución sólo se descongelan el día de la prueba.

SOLUCIÓN DE 2,4,7,-TRINITRO-9-FLUORENONA

Reactivo	Volumen o peso
2,4,7,-trinitro-9-fluorenona	1 mg
Dimetilsulfóxido	1 mL

Pesar el 2,4,7,-trinitro-9-fluorenona, utilizando mascarilla de protección respiratoria para compuestos tóxicos y con guantes quirúrgicos desechables. Colocarlo en viales desechables. Adicionar 1 mL de dimetilsulfóxido bajo condiciones asépticas. Almacenar a -20 ± 2 °C por 18 meses. Las alícuotas de esta solución sólo se descongelarán el día de la prueba.

AGUA DESTILADA ESTÉRIL

Reactivo	Volumen o peso
Agua destilada	1,000 mL

Distribuir el agua en frascos de dilución en cantidades adecuadas para que el volumen final, después de la esterilización, sea de 100 mL \pm 2 mL.

Tapar los frascos sin apretar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El pH final del agua debe ser de pH 7.4. Una vez fríos, apretar las tapas y almacenar a temperatura ambiente o en refrigeración a 4 ± 2 °C.

Para todos los medios de cultivo y soluciones se debe realizar una prueba de esterilidad de la siguiente manera:

Después de ser preparadas, y antes de ser usadas, las soluciones y medios de cultivo deben probarse de manera rutinaria en cuanto a la presencia de hongos o bacterias. La prueba consiste en que inmediatamente después de haber sido esterilizados se dejan estabilizar hasta temperatura ambiente. Posteriormente son incubados a 37 ± 2 °C durante 24 a 48 horas.

Constituye una evidencia de la presencia de microorganismos cualquier turbidez en el caso de medios de cultivo líquidos o semisólidos, así como en soluciones. Para el caso de medios sólidos, hay contaminación cuando crecen colonias en el agar. Si ocurre esto desechar y volver a preparar nuevamente el material. La contaminación puede ocurrir debido a fallas en el proceso de esterilización o en el manejo después de la esterilización.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

INTERFERENCIAS Y MANEJO DE LA MUESTRA

La prueba debe realizarse lo más rápido posible y las muestras deben ser siempre mantenidas en refrigeración (4 ± 2 °C) hasta el momento de realizarla. El recipiente debe llenarse completamente para evitar la pérdida de compuestos volátiles.

Se debe verificar el pH de la muestra problema. En caso de que se presenten valores menores que 5.0 o mayores de 8.0, ajustar el pH a 7.0 antes de proceder a filtración de la muestra problema.

Generalmente la muestra trae presencia de sólidos suspendidos y microorganismos, por lo que se debe proceder a la filtración de la muestra problema en membranas de acetato de celulosa de 0.45 μm , para obtener su esterilidad. En caso de que las muestras problema presenten mucho material particulado, es recomendable una pre-filtración con pre-filtro.

Se debe verificar la esterilidad de la muestra en placas de agar nutritivo, inoculando 200 μL e incubándolas por 24 horas a 37 ± 2 °C. En caso de que la muestra problema presente contaminación, repetir el proceso de filtración.

PRECAUCIONES

Entre las personas que trabajan en el laboratorio, aquellas que tienen menor tiempo de entrenamiento y las que están más directamente asociadas a las maniobras con el material contaminado, son aquellas que presentan mayores posibilidades de ser contaminadas accidentalmente. Una inhalación de los aerosoles, una aspiración de las soluciones contaminadas a través de pipetas y otros accidentes deben prevenirse por el uso de protectores faciales adecuados, pipeteadores y por la obediencia a las normas específicas relativas al trabajo y al uso del equipo.

El uso de protector facial y máscaras de protección contra gases y compuestos tóxicos debe ser obligatorio, en forma conjunta con los guantes adecuados, durante la preparación de soluciones de ácidos que son utilizados en el lavado

de materiales, la preparación de soluciones de compuestos mutagénicos y la manipulación de disolventes.

CUIDADOS EN LA MANIPULACIÓN DE CEPAS *S. TYPHIMURIUM*

S. typhimurium puede causar diarreas e intoxicación alimenticia cuando es ingerida. Todas las cepas de *S. typhimurium* presentan alta virulencia; sin embargo, las cepas que se usan en esta prueba presenta una baja virulencia debido a la presencia de la mutación *rfa*.

Como precaución rutinaria, se debe esterilizar en autoclave cualquier material contaminado, antes de lavar o desechar. No se debe mantener ningún tipo de alimento en el interior de los refrigeradores, o donde se encuentran las cepas almacenadas.

MANEJO DE LA MUESTRA PROBLEMA

Se lleva a cabo el método de extracción-concentración de una muestra problema cuando ésta proviene de una planta de tratamiento de agua potable, cuando es de agua superficial aparentemente limpia o cuando, a pesar de que se considere que es un agua de tipo residual, ésta no presente un olor que indique la presencia de compuestos como aceites o disolventes.

Cuando se va a trabajar con muestras problema de efluentes industriales, residuales o municipales altamente contaminadas, las muestras deben filtrarse antes de su análisis.

PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS DE *S. TYPHIMURIUM* EMPLEADOS EN LA PRUEBA

Sembrar, con la ayuda de un asa de inoculación, una pequeña cantidad del crecimiento del cultivo de la placa “maestra” en un matraz que contenga 30 mL de caldo nutritivo estéril. El cultivo de la placa “maestra” se ha sometido a una serie de análisis para verificar que la cepa cuenta con las características específicas de la misma y así poder tener la certeza que la bacteria utilizada está en las mejores condiciones.

Incubar a 37 ± 2 °C durante 16-18 horas, con agitación suave (125-150 r.p.m.) para obtener una densidad de 2×10^9 bacterias/mL, evitando la generación de espuma (CETESB, 1994). Después de este tiempo de incubación, sacar el cultivo de la incubadora con agitación y mantenerlo en refrigeración durante el período en que no esté siendo utilizada.

PREPARACIÓN DE LA MEZCLA S9

Preparar la cantidad adecuada de la mezcla S9, inmediatamente antes del inicio de la prueba. Mantener la mezcla en baño de hielo o refrigeración (4 ± 2 °C) por no más de cinco horas. Observar los cuidados de asepsia durante la preparación y la manipulación de la mezcla S9.

CONTROLES NEGATIVOS

Los controles negativos consisten en un inóculo de la propia cepa, en placas de agar medio mínimo con histidina, cuando la prueba se realiza sin activación metabólica. En presencia de activación metabólica se adiciona la propia cepa más la mezcla S9. A través de los controles negativos se verifica la tasa de reversión espontánea.

Tabla 21.2. Reversión espontánea en cepas de *Salmonella typhimurium* que detectan mutágenos que causan desfaseamiento en el cuadro de lectura del ADN

Cepa	Punto de mutación	Maron, 1983		Mortelmans, 2000		Genotipo (Ames <i>et al.</i> , 1975; Maron y Ames, 1983)
		Sin S9	Con S9	Sin S9	Con S9	
TA 1537	CG	—	—	5 - 20	5-20	his C3076, rfa, uvrB, bio-.
TA 1538	CG	—	—	5 - 20	5 - 20	his D3052, rfa, uvrB, bio-.
TA 97a	CG	98-180	—	75 - 200	75 - 200	his D6610, rfa, uvrB, bio-, pKM101(ApR)
TA 98	CG	30 - 50	—	20 - 50	20 - 50	his D3052, rfa, uvrB, bio-, pKM101(ApR)

Tabla 21.3. Reversión espontánea en cepas de *Salmonella typhimurium* que detectan mutágenos que causan sustitución de pares de bases en el ADN

Cepa	Punto de mutación	Maron, 1983		Mortelmans, 2000		Genotipo
		Sin S9	Con S9	Sin S9	Con S9	
TA 1535	CG	—	—	5 - 20	5 - 20	his G46, rfa, uvrB, bio-.
TA 100	CG	120-200	—	75 - 200	75 - 200	his G46, rfa, uvrB, bio-, pKM101(ApR),
TA 102	AT	240-320	—	100 - 300	100 - 300	his G428, rfa, bio-, pKM101(ApR), pAQ1(TtR)

La cepa TA 97a es sensible a altas concentraciones de glucosa, por eso, es recomendable usar placas de agar mínimo modificado conteniendo 0.4% de glucosa, en lugar de 2% como es usual.

CONTROLES POSITIVOS

Todo ensayo debe ser realizado incluyendo controles positivos para confirmar las características específicas de reversión de cada cepa, como parámetro de certeza para una buena eficiencia del sistema de activación. Se recomienda el uso de las sustancias estándar descritas. Se pueden emplearse otros controles positivos en las concentraciones adecuadas.

CONTROL DE TOXICIDAD

La toxicidad de una muestra problema o sustancia puede ser verificada a través de un análisis rutinario de la presencia de “crecimiento de fondo” en las cajas de prueba de agar medio mínimo. En los casos de la presencia de toxicidad (“crecimiento de fondo” ausente o reducido) reducir las concentraciones de las muestras o sustancias probadas.

CONTROL DE VIABILIDAD

Se realiza el análisis de viabilidad de un cultivo fresco (incubado la noche anterior al análisis). Con base en esto, los resultados son obtenidos y evaluados después de una dilución de 10^7 células/mL en placas de agar nutritivo.

El siguiente procedimiento debe ser realizado para obtener una concentración de 1 a 2×10^9 células/mL:

Transferir asépticamente $100 \mu\text{L}$ del cultivo de una noche a un frasco conteniendo 100 ± 2 mL de agua destilada estéril, preparando así una dilución de 1000 veces.

Homogeneizar la dilución al menos 25 veces, inclinando el frasco y formando un ángulo de aproximadamente 45° entre el brazo y el antebrazo y transferir, asépticamente, $100 \mu\text{L}$ de la dilución a un frasco conteniendo 100 ± 2 mL de agua destilada estéril.

Volver a homogeneizar como se indicó anteriormente y transferir, asépticamente y por duplicado, $100 \mu\text{L}$ de la dilución obtenida a una placa de agar nutritivo.

Con una varilla de vidrio en forma de “L” (Asa de Drigalski), debidamente flameada y fría, tocar levemente la superficie del agar nutritivo conteniendo

él inóculo y ejecutar movimientos circulares en forma de ocho, hasta que el inóculo se distribuya y se fije de manera uniforme en la superficie del agar.

Incubar las placas invertidas a 37 ± 2 °C por 24 horas . Al terminar el tiempo de incubación, para el cálculo del número de bacterias por mL, deberá multiplicarse el promedio de los contenidos obtenidos en las dos placas por 10^7 . El resultado será expresado en número de colonias/mL. Ese valor deberá estar entre 0.5 a 2×10^9 /mL.

Las soluciones de los compuestos mencionados deben ser manipuladas con máximo cuidado para evitar cualquier contacto con el operador.

Tabla 21.4. Controles positivos empleados en la prueba de Ames

Prueba	Compuesto	Disolvente	Concentración por placa	Cepas
Sin activación (-S9)	Metil nitroso guanidina	DMSO*	10 µg	TA100
	2,4,7,-Trinitro-9-fluorenona	DMSO*	0.1 µg	TA1537, TA1538, TA98
	Azida de sodio	Agua destilada	5 µg	TA1535, TA100
	Mitomicina C	Agua destilada	1 µg	TA102
Con activación (+S9)	2-aminofluoreno	DMSO*	10 µg	TA1537, TA1538, TA98, TA100
	Benzo[a]pireno	DMSO*	10.0 µg	TA1537, TA1538, TA98, TA100

*DMSO: dimetilsulfóxido (Claxton *et al.*, 1991; Maron y Ames, 1983; Mortelmans y Leiger, 2000).

DESARROLLO DE LA PRUEBA

El método de la prueba de Ames modificado es el método directo, el cual se realiza como se describe a continuación:

- Antes de iniciar cualquier operación, desinfectar la campana de flujo laminar, usando alcohol 70%. Trabajar siempre en campana de flujo laminar.
- Colocar los tubos de ensayo (13 X 100 mm, con tapa de polipropileno), en un número suficiente para realizar las pruebas por triplicado, en baño seco regulando la temperatura a 48 ± 2 °C.
- Fundir el agar de superficie de varias concentraciones (tabla 21.5) y estabilizar a 48 ± 2 °C.
- Adicionar a cada tubo de ensayo estéril (por triplicado): 0.1, 0.5, 1.0, 1.5. 2.0 mL de la muestra directa (Cornell Institute for Medical Research, 1986),

0.1 mL de cultivo (de una noche) de *S. typhimurium* y 0.5 mL de mezcla S9 (solamente para la prueba con activación metabólica).

- Incubar con agitación suave durante 30 minutos a 37 °C para realizar el proceso de pre-incubación.
- Posteriormente, adicionar el volumen de agar de superficie de acuerdo con los volúmenes descritos en la tabla 21.5.
- Agitar cada tubo levemente por 3 segundos con ayuda de un vórtex a baja velocidad y verter su contenido en cada placa de agar medio mínimo (Maron y Ames, 1983; Mortelmans y Zeiger, 2000 y Sandoval, 1998).
- Inmediatamente realizar movimientos circulares a la placa, de forma que el agar de superficie se distribuya uniformemente sobre el medio de cultivo. Dejar que se solidifique en una superficie plana.
- Incubar las placas en forma invertida a 37 ± 2 °C por 66 horas.

El método para extractos emplea la prueba de Ames, se realiza como se describe a continuación:

- Adicionar 10, 25, 50 y 100 µL del extracto, cuyo disolvente es dimetilsulfoxido, a cada tubo de ensaye estéril, por triplicado.
- Ajustar cada volumen a 100 µL con dimetilsulfoxido.
- Adicionar 0.1 mL de cultivo (de una noche) de *S. typhimurium*
- Adicionar 0.5 mL de mezcla S9 (solamente para la prueba con activación metabólica).
- Incubar con agitación suave durante 30 minutos a 37 °C para realizar el proceso de pre-incubación (Maron y Ames, 1983; Mortelmans y Zeiger, 2000 y Sandoval, 1998)
- Posteriormente, adicionar el volumen de agar de superficie de concentración 1X para todos los volúmenes, descrito en la tabla 21.5.
- Agitar cada tubo levemente por 3 segundos con ayuda de un vórtex a baja velocidad y verter su contenido en cada placa de agar medio mínimo.
- Inmediatamente realizar movimientos circulares a la placa, de forma que el agar de superficie se distribuya uniformemente sobre el medio de cultivo. Dejar que se solidifique en una superficie plana.
- Incubar las placas en forma invertida a 37 ± 2 °C por 66 horas.

Realizar los controles negativos y positivos (utilizarlos de acuerdo con las cepas que se emplearán en el experimento). Para ambos casos se emplea agar de superficie de concentración 1.0X. A los controles negativos únicamente se

Tabla 21.5. Concentración de agar de superficie con sus volúmenes correspondientes de muestra por tubo

Concentración de agar de superficie	Volumen de agar de superficie por tubo (mL)	Volumen de muestra por tubo (mL)
1.0 X	3.0	0.1 o 0.2
1.5 X	2.5	0.5
2.0 X	2.0	1.0
2.5 X	1.5	1.5
3.0 X	1.0	2.0

les adiciona 0.1 mL de cultivo bacteriano de una noche y 0.5 mL de la mezcla S9, mientras que para los controles positivos debe adicionarse un volumen adecuado del control específico (tabla 21.4), 0.1 mL de cultivo bacteriano de una noche y 0.5 mL de la mezcla S9 (cuando sea con activación metabólica).

Incubar en placas en forma invertida a 37 ± 2 °C por 66 horas.

Proceder al conteo del número de colonias revertantes prototróficas por placa con ayuda de un contador semiautomático tipo Quebec o un estereoscopio. El uso de uno u otro dependerá del tamaño de las colonias. Los valores obtenidos son anotados en el formato que se anexa en este procedimiento. Cabe mencionar que la morfología de las colonias de *S. typhimurium* es muy característica: son blancas, translúcidas, con superficie lisa y bordes regulares. La presencia de colonias con morfología diferente indica contaminación, por lo que la placa debe ser desechada.

Durante el conteo de las colonias revertantes en las placas se verifica la presencia del “fondo de la placa” en las placas control negativo y la frecuencia de reversión espontánea, así como la eficiencia del control positivo. El ensayo deberá repetirse si el “fondo de la placa” está ausente o alterado. La ausencia indica que la concentración de la muestra es sumamente tóxica o si la tasa de reversión espontánea estuviera fuera de lo esperado o si los controles positivos no tuvieran actividad mutagénica frente a las cepas de prueba.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Calcular el promedio aritmético de las tres placas de cada cepa de cultivo y de cada dosis de muestra probada. La tasa de reversión espontánea deberá estar dentro de los límites presentados en las tablas 21.2 y 21.3 de CAHB-22.

$$X = \frac{X_1 + X_2 + X_3}{n}$$

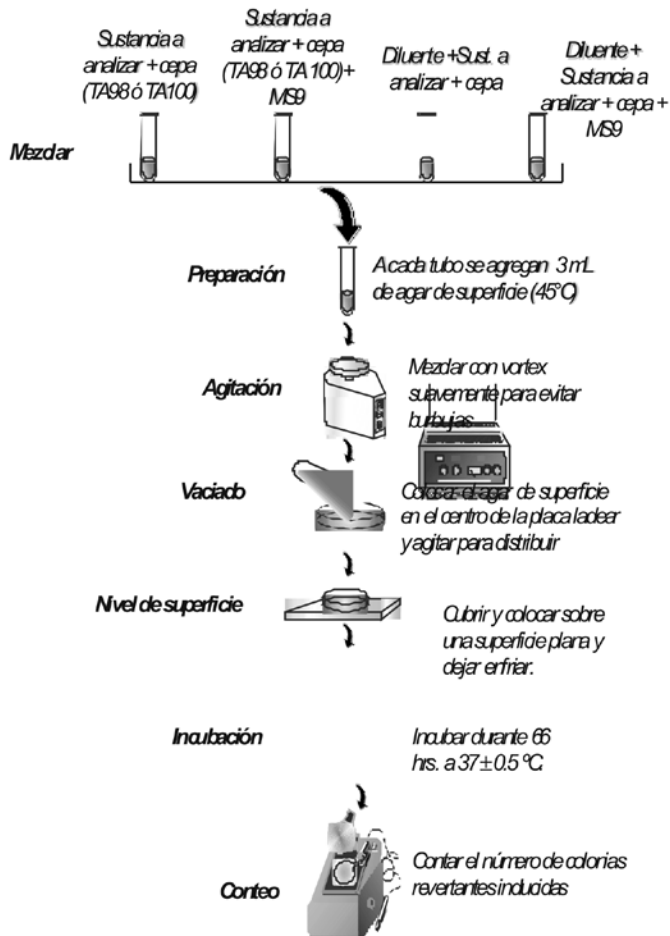
donde:

X = Media geométrica

X_1, \dots, X_3 = Conteo de colonias por placa

n = Numero de placas

Figura 21.1. Procedimiento de la prueba de Ames



Los resultados son expresados cuantitativamente a través del número de revertantes por mL de muestra en la placa. Los resultados son también expresados a través de la razón de mutagenicidad (RM) que es una razón entre el número de revertantes de la placa de prueba (revertantes espontáneos inducidos) y el número de revertantes en la placa control (revertantes espontáneos).

$$RM = \frac{RI}{RE}$$

donde:

RM = Razón de mutagenicidad

RI = Revertantes inducidos

RE = Revertantes espontáneos

Los resultados se expresan gráficamente a través de una curva dosis respuesta, colocando en la abcisa las concentraciones de la muestra probada y en la ordenada el número de revertantes inducidos en cada dosis.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Una muestra es considerada positiva cuando existe una relación dosis-respuesta entre las concentraciones probadas y el número de revertantes inducidas en por lo menos una dosis, considerando que la razón de mutagenicidad (RM) es mayor o igual a 2. El factor debe ser usado apenas como una guía, pues cuando la cepa presenta una tasa de reversión espontánea baja, como en el caso de TA1535, TA1537 y TA1538, la razón de mutagenicidad debe ser igual o superior a 3, a fin de asegurar una significancia de la prueba.

EVALUACIÓN DE LA PRUEBA

Los resultados positivos indican que, con base en las condiciones de la prueba, una muestra induce mutaciones de punto por sustitución de bases o del tipo "frameshift" en el genoma de estos microorganismos.

Los resultados negativos indican que, con base en las condiciones de la prueba, la muestra no presenta actividad mutagénica frente a las cepas probadas de *S. typhimurium*.

REPORTE DE LA PRUEBA

El reporte de la prueba debe incluir la siguiente información: tipos de cepas empleadas; sistema de activación metabólica empleado; controles positivos y negativos; resultados de la prueba (curva-dosis respuesta); interpretación de los resultados; método empleado; nombre y firma del responsable de los análisis.

Una vez que se hayan contado totalmente el número de placas Petri que constituyeron el experimento, los resultados se deben vaciar a los formatos sugeridos en el anexo 21.1.

Tabla 21.6. Condiciones recomendadas para las pruebas de gentoxicidad con *Salmonella typhimurium*

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	37 °C
Recipientes	Tubos de ensayo de 1.3 X 10 cm diámetro
Número de réplicas	3 por volumen a analizar
Material biológico	Cepas de <i>S. typhimurium</i> TA98 y TA100
Condición de las cepas	Cumplir con las características genéticas específicas para cada cepa
Agua de dilución	Agua destilada, pH 7.0 a 7.4
Número de concentraciones	4
Duración de la prueba	66 horas
Efecto medido	Inducción de colonias revertantes
Control negativo	Cepa de <i>S. typhimurium</i> TA98 O TA100
Control positivo	Selección de acuerdo a la tabla 21.4
Resultado final	Revertantes/Placa; razón de mutagenicidad (RM)

RECOMENDACIONES

Para un análisis de rutina de la actividad mutagénica de una muestra, se recomienda el uso de las cepas TA98 y TA100, ya que se ha demostrado su eficiencia en la detección de un gran número de mutágenos ambientales; dependiendo de la muestra, el objetivo, y de las condiciones del volumen de la muestra disponible para prueba, también se pueden utilizar otras cepas (por ejemplo, TA102, TA104, TA97a, TA1535, TA1538, TA1537).

Deben tenerse cuidados especiales con relación a la estandarización de la metodología, la verificación de las características genéticas de las cepas empleadas, la actividad de la fracción S9 y el control de calidad de los reactivos,

medios de cultivo y cristalería utilizados en la prueba, a fin de asegurar la confiabilidad de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association (APHA). 1996. Standard methods for the examination of water and wastewater. Décimonovena edición. Washington, APHA, AWWA, WPCF.
- Ames, B.N., J. McCann y E. Yamasaki. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenesis test. *Mutation Research* 31: 347-364.
- Claxton D. L., S. V. Houk, G. L. Monteith, E. L. Myers y J. T. Hughes. 1991. Assessing the use of known mutagens to calibrate the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay: I. Without exogenous activation.
- Cornell Institute for Medical Research. 1986. Department of Microbiology. Camden. New Jersey 08103. Ames *Salmonella* mutagenicity assay protocol.
- Compañía de Tecnología de Saneamiento Ambiental Brasil (CETESB). 1994. Mutación génica reversa en *Salmonella typhimurium*. Prueba de Ames. Método directo. Norma CETESB L5.621. Sao Paulo.
- Maron, D. M. y B. N. Ames, 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research* 11: 173-215.
- Mortelmans, K. y Zeiger E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research* 455: 29-60.
- Sandoval Villasana, A. M. 1998. Estandarización de dos técnicas analíticas para la determinación de mutágenos empleando *Salmonella typhimurium*. Tesis de Maestría. Facultad de estudios superiores de Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. 83 pp.

Anexo 21.1. Formatos para el registro de resultados de la prueba de Ames

CONTROLES PARA LA PRUEBA DE AMES

Número de control		Fecha:				
Método de análisis						
		Incubación en Placa	Pre-incubación	Tiempo:	Min	
Resultados						
Movilidad						
Cena	Factor de Dilución	C1	C2	\bar{x}	$\times 10^3$	
TA 98	10^{-3}					
TA 98	10^{-5}					
TA 100	10^{-3}					
TA 100	10^{-5}					
Controles Negativos (Reversión espontánea)						
	$\mu\text{l. Por Placa}$	C1	C2	C3	\bar{y}	
TA 98 - S9	100					
TA 98 + S9	100					
TA 100 - S9	100					
TA 100 + S9	100					
Control del solvente (DMSO)						
	$\mu\text{l. Por Placa}$	C1	C2	C3	\bar{x}	
TA 98 - S9	100					
TA 98 + S9	100					
TA 100 - S9	100					
TA 100 + S9	100					
Controles Positivos						
	Compuesto	$\mu\text{g Por Placa}$	C1	C2	C3	\bar{x}
TA 98 - S9	2,4,7-trinitro-9-fluoreno na					
TA 98 + S9	2-amino fluoreno					
TA 100 - S9	Ázida de sodio					
TA 100 + S9	2-amino fluoreno					
Observaciones:						
Analista:		Signatario:				
Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:			

Quinta parte

*Procedimientos
complementarios*

ASEGURAMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD

*María Consuelo Díaz Báez, Yolanda Pica Granados
y María Cecilia Sobrero*

CAMPO DE APLICACIÓN

Un elemento importante en el muestreo y análisis de muestras ambientales es utilizar métodos aprobados y estandarizados; sin embargo, este hecho por si solo no es suficiente para lograr resultados analíticos exactos y confiables. Interferencias de la matriz utilizada, fallas de equipos y errores de los analistas pueden llevar a inexactitudes en los resultados. En el caso de las pruebas de toxicidad, la calidad analítica es un reto complejo porque no sólo los factores mencionados anteriormente afectan la confiabilidad de los resultados, sino que además otra serie de factores como la variabilidad natural de las poblaciones de prueba, el estado fisiológico de los individuos o las condiciones ambientales mantenidas durante las determinaciones, pueden contribuir a aumentar la variabilidad de los resultados.

Este capítulo apareció publicado originalmente en G. Castillo (ed.). 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IDRC, IMTA, Canadá. 202 pp. Se reproduce con la autorización de la editorial.

Pese a ello, es necesario contar con resultados confiables y reproducibles, por lo que los laboratorios deben desarrollar programas de control de calidad que aseguren la exactitud de los datos obtenidos. La validación y aprobación de los resultados obtenidos en bioensayos requieren de un programa de aseguramiento y control de calidad (ACC) bien diseñado y aplicado regularmente. Este programa debe generar valores que puedan probarse técnicamente y defenderse legalmente.

En el presente capítulo se definen los procedimientos de control de calidad y las actividades obligatorias que deben realizarse durante las pruebas de toxicidad. Estas actividades son de dos tipos, unas de manejo y otras de funcionamiento. Las primeras se refieren a los planes operativos donde se especifican los procedimientos estandarizados y los resultados reportados con un alto nivel de confianza, y las segundas al conjunto de medidas que se toman durante la aplicación de los protocolos de análisis. Estos procedimientos permiten un adecuado aseguramiento y establecen la calidad de las determinaciones del laboratorio a través de evaluaciones internas y externas de control. Esto último incluye el análisis del comportamiento de las muestras evaluadas, así como la comparación de los resultados entre laboratorios y la realización de auditorías.

PROGRAMAS DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

Un programa de aseguramiento de calidad, no sólo es necesario para la producción de datos, sino además debe ser la guía de operación del laboratorio. El programa debe concretarse en el diseño de un plan de trabajo, consignado en un manual operativo. El plan debe ser suficientemente extenso para que pueda aplicarse a la mayoría de las actividades que se llevan a cabo y a su vez suficientemente flexible para permitir cambios ocasionales cuando sea necesario. En él se debe incluir la organización del laboratorio, los objetivos de calidad en relación a precisión y exactitud, los procedimientos de muestreo y custodia de las muestras, los protocolos de prueba, los procedimientos de calibración (especificando los métodos utilizados para determinar la precisión y exactitud de los resultados, validación y reporte de los resultados) y los sistemas de auditoría.

PROTOCOLOS DE PRUEBA

Uno de los problemas relacionados con los programas de control de calidad de pruebas de toxicidad es la existencia de un gran número de pruebas, mu-

chas de las cuales no han sido estandarizadas. Sólo algunas de ellas han sido aprobadas y validadas por organizaciones como las Agencias de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) y Canadá (*Environment Canada*) que cuentan con metodologías que pueden ser incorporadas al trabajo de rutina de cualquier laboratorio.

Aunque varios de los ensayos recomendados en este documento no han sido incorporados oficialmente por las mencionadas agencias, en el presente capítulo se definen algunos elementos de control necesarios para su aplicación a muestras de agua potable, aguas de poro de sedimentos, suelos y lodos, aguas superficiales y subterráneas, aguas residuales industriales y domésticas.

Varios de los métodos recomendados por la USEPA para análisis toxicológicos de muestras de agua se consignan en los siguientes documentos: *Methods for measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms*, EPA 600/4-90/027F, 1993, cuarta edición. *Short Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*, EPA 600/4-91-002, 1994, tercera edición. También, la *American Society for Testing Materials* (ASTM) ha publicado un gran número de métodos de aplicación en ecotoxicología, y la International Organization for Standardization (ISO) y la Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), de la cual forman parte muchos países de Europa y Norteamérica, han publicado un gran número de métodos de aplicación en ecotoxicología desde los primeros años de la década de los ochenta.

En general, los trabajos realizados por estas agencias han permitido concluir que “los análisis de toxicidad son herramientas que, al ser usadas conjuntamente con las mediciones químicas y ecológicas, permiten identificar, cuantificar y generar criterios para el control de la descarga de contaminantes tóxicos”.

Países como Canadá han incorporado dentro de sus regulaciones la aplicación de ensayos de toxicidad. Entre las principales se pueden mencionar: el Acta de Pesca (*Fisheries Act*), el Acta de Protección Ambiental [*Canadian Environmental Protection Act* (CEPA)], el Acta para Transporte de Productos Peligrosos (*Transportation of Dangerous Goods Act*), el Acta para los productos usados en el Control de Plagas (*Pest Control Products Act*), así como muchas otras actas del gobierno federal.

CALIBRACIÓN DE INSTRUMENTOS Y SOLUCIONES EN EL LABORATORIO

Un elemento importante en los programas de control de calidad es contar con instrumentos confiables. Por ello, debe mantenerse un programa de mantenimiento, calibración y verificación periódica para todos los equipos en uso.

Cuando se utilizan equipos o instrumentos en los que se requieren soluciones de referencia, pesas u otros artefactos para su calibración, es necesario que estos medios de calibración sean certificados.

En el caso de emplear estándares de referencia, la solución patrón debe ser previamente valorada con referencia a una solución o reactivos certificados.

MATERIALES Y REACTIVOS DEL LABORATORIO

Material de vidrio

En el comercio es posible encontrar diferentes calidades de material de vidrio, por lo que es importante tener en cuenta el tipo y grado requerido para cada una de las actividades que se van a desarrollar. Igualmente, como en muchas de las pruebas se realizan diluciones, es necesario contar con material volumétrico clase A calibrado, que asegure la medición de los volúmenes medidos en forma precisa.

Además del cumplimiento de las características requeridas del material de vidrio, debe contarse con procedimientos adecuados de limpieza, que en muchos casos dependen de los parámetros a determinar. Por esta razón, el laboratorio deberá contar con procedimientos detallados para la limpieza, almacenamiento y protección del material.

Reactivos

A nivel comercial existe un gran número de reactivos que son fabricados con diferentes grados de pureza. Por ello, la selección cuidadosa del grado requerido de los reactivos a utilizar en este tipo de pruebas es de gran importancia. En el desarrollo de pruebas de toxicidad se recomienda utilizar reactivos que cumplan los requerimientos establecidos por la *American Chemical Society* para reactivos analíticos, grado ACS.

Los reactivos empleados como compuestos tóxicos de referencia deberán ser de uso exclusivo para la preparación de una solución patrón, tener un grado de pureza de cuando menos 99.5%, con certificado.

La mayoría de las pruebas de toxicidad y el mantenimiento de cultivos, requiere, de agua Tipo I, (APHA, 1998) la cual no contiene compuestos o elementos en concentraciones detectables.

Compuestos tóxicos de referencia

Un compuesto tóxico de referencia es una sustancia orgánica o inorgánica utilizada en pruebas de toxicidad con fines de control de calidad analítica de los organismos a utilizar en las pruebas.

Para ello, en la etapa inicial del montaje de un método de prueba, debe seleccionarse un compuesto soluble, de pureza igual o mayor al 99%, al cual se le realicen pruebas de toxicidad para una especie determinada, con el fin de establecer el intervalo de concentración del compuesto seleccionado que produce el efecto esperado. Una vez definido el patrón de la relación dosis-respuesta para el compuesto elegido, puede ser empleado como compuesto tóxico de referencia.

El registro histórico de la respuesta al compuesto tóxico de referencia, expresada a través de los valores de $CL_{50}/CI_{50}/CE_{50}$, es de utilidad para el control del estado fisiológico de los organismos empleados y sirve de evidencia para demostrar la estabilidad de su respuesta biológica.

En la literatura se mencionan muchos compuestos que pueden emplearse como compuestos tóxicos de referencia. La USEPA (1993), cita el empleo de cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de cadmio ($CdCl_2$), sulfato de cobre ($CuSO_4$), dodecil sulfato de sodio (SDS) y dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$). Otras agencias como *Environment Canada* recomienda al Zinc(II) como compuesto tóxico de referencia inorgánico y al fenol para sustancias orgánicas; sin embargo, estos compuestos pueden sustituirse por otros dependiendo de la especie de prueba, la matriz utilizada y los puntos finales medidos.

La precisión de los resultados de las pruebas de toxicidad en el laboratorio es calculada a través de la confección de cartas o gráficas de control. Estas gráficas son una herramienta que permite determinar la variabilidad de los resultados y en consecuencia definir la aptitud de un laboratorio para obtener resultados confiables.

Cartas de control de calidad

La carta control es la herramienta de registro que brinda los elementos de juicio para establecer los intervalos aceptables de variación de la respuesta de los

organismos de prueba a un compuesto tóxico de referencia, con un margen de confianza del 95%. Esta carta es el medio de referencia para evidenciar el control de la sensibilidad de la especie empleada, de la estabilidad de la respuesta biológica y de la repetibilidad (exactitud) de los resultados obtenidos.

La carta control se genera a partir de los resultados de pruebas sucesivas con el compuesto tóxico de referencia seleccionado, para el cual se obtiene el valor de la concentración de efecto medio ($CL_{50}/CI_{50}/CE_{50}$). Inicialmente ésta puede ser construida con un mínimo de cinco datos y posteriormente se debe continuar realizando ensayos con el compuesto tóxico para ingresar mensualmente nuevos valores hasta completar una serie de veinte resultados.

Los valores se van integrando a manera de puntos en un gráfico que relaciona el número de ensayo, ubicado en el eje X o abscisa, y el valor de la concentración de efecto medio ($CL_{50}/CI_{50}/CE_{50}$), en el eje Y u ordenada (figura A.1). Posteriormente, los valores son empleados para el cálculo del valor promedio y la desviación estándar (σ) de la población de datos. Con estos parámetros estadísticos se calculan los valores límite (superior e inferior) que definen el intervalo de variación aceptable o intervalos de confianza (95%) en el que deberán encontrarse los valores de $CL_{50}/CI_{50}/CE_{50}$ obtenidos para futuros ensayos con el compuesto tóxico de referencia.

Los valores del límite superior e inferior se obtienen al adicionar o sustraer, respectivamente, del promedio dos desviaciones estándar de acuerdo a:

$$\text{Concentración límite superior} = \text{Promedio} + 2\sigma$$

$$\text{Concentración límite inferior} = \text{Promedio} - 2\sigma$$

Para la elaboración de las cartas control se debe preparar una solución estándar del compuesto tóxico de referencia seleccionado, empleando reactivos con pureza mínima del 99.5% y material volumétrico clase A calibrado.

Con la solución estándar del compuesto tóxico, se preparan diluciones para obtener una serie de concentraciones de manera que se logre obtener al menos dos valores de efecto mayores al 50 % y dos más menores a dicho porcentaje. En general, es de esperar que la serie de concentraciones utilizada produzca a través del tiempo la misma respuesta en cada concentración. Se procede a calcular el punto final de la prueba ($CL_{50}/CI_{50}/CE_{50}$) utilizando cualquiera de las técnicas estadísticas recomendadas. La carta control es utilizada para evaluar la tendencia de los resultados, por lo que el promedio acumulado y los límites de confianza son recalculados con cada nuevo dato obtenido. Después de dos años de colección de datos, o de 20 evaluaciones,

la carta control se mantiene usando solamente los 20 datos más recientes. En general, se recomienda realizar pruebas mensuales con los compuestos tóxicos seleccionados; sin embargo, algunos laboratorios prefieren llevar a cabo ensayos con mayor frecuencia.

Los valores de la $CL_{50}/CI_{50}/CE_{50}$ fuera del intervalo establecido son indicativos de algún cambio en la consistencia metodológica o de alteración de la sensibilidad de los organismos. En el caso de análisis de puntos finales como la CL_{50} , CI_{50} , y la CE_{50} se espera que por azar y con una probabilidad asociada de $P_{0.05}$, sólo uno de los veinte ensayos caiga fuera de los límites establecidos.

Si en más de un ensayo con los compuestos tóxicos de referencia el valor cae fuera de los límites, los resultados de las pruebas efectuadas deben considerarse provisionales y sujetos a confirmación. Si el problema persiste y el valor de $CL_{50}/CI_{50}/CE_{50}$ del compuesto tóxico de referencia se aleja significativamente del intervalo esperado, deberá realizarse una revisión de la sensibilidad de los organismos de prueba y eliminar los datos generados bajo estas circunstancias.

En este caso, se debe revisar cuidadosamente el procedimiento y repetir las pruebas con un nuevo lote de organismos.

El comportamiento de las gráficas de control puede cambiar en el tiempo, reduciéndose los intervalos de variación en la medida en que se adquiere habilidad en el manejo de los procedimientos de prueba. Bajo este esquema también es factible que se obtengan valores fuera de los nuevos límites; sin embargo, la incidencia de estos casos no deberá ser mayor del 5%.

Considerando lo anterior es responsabilidad de cada laboratorio demostrar, a través de la generación de estos gráficos, su capacidad para obtener resultados confiables, antes de llevar a cabo pruebas con muestras de aguas o efluentes. En este sentido, la precisión intra-laboratorio de cada procedimiento de prueba se debe expresar en términos del coeficiente de variación (CV%), calculado a partir de:

$$CV = \left[\left(\frac{\sigma}{\text{media}} \right) \right] * 100$$

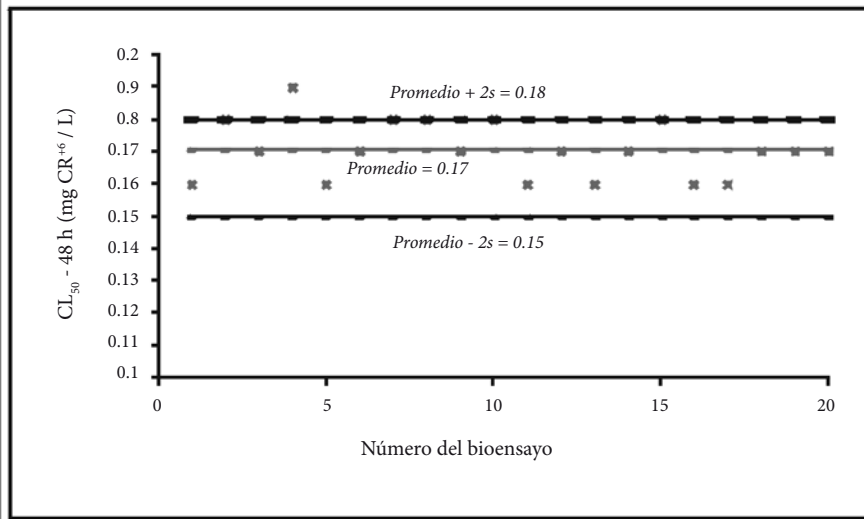
Este valor se establece realizando un mínimo de cinco o más ensayos con diferentes lotes de organismos, el mismo compuesto tóxico de referencia, iguales concentraciones, las mismas condiciones y el mismo análisis de datos.

En la tabla A.1 se presenta un ejemplo para la elaboración de una carta control (figura A.1) para pruebas con *Daphnia magna* utilizando como compuesto tóxico de referencia al cromo (VI).

Tabla A.1. Resultados de CL_{50} obtenidos a 48 horas con *Daphnia magna* utilizando cromo (VI) como compuesto tóxico de referencia

Número de	CL_{50-48h} bioensayos (mg Cr(VI)/L)	Límites de confianza al 95% (mg Cr(VI)/L)
1	0.16	0.15 – 0.18
2	0.18	0.16 – 0.19
3	0.17	0.16 – 0.19
4	0.19	0.18 – 0.20
5	0.16	0.15 – 0.17
6	0.17	0.16 – 0.19
7	0.18	0.17 – 0.19
8	0.18	0.16 – 0.19
9	0.17	0.16 – 0.18
10	0.18	0.17 – 0.19
11	0.16	0.15 – 0.18
12	0.17	0.16 – 0.18
13	0.16	0.15 – 0.17
14	0.17	0.16 – 0.19
15	0.18	0.16 – 0.19
16	0.16	0.15 – 0.17
17	0.16	0.15 – 0.18
18	0.17	0.15 – 0.18
19	0.17	0.16 – 0.18
20	0.17	0.16 – 0.18
Promedio	0.1705	
Desviación estándar	0.0089	
CV (%)	5.20	

Figura A.1. Carta control para *Daphnia magna* usando cromo (VI) como compuesto tóxico de referencia



PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE CONTROL

Control positivo

Generalmente, como control positivo se utiliza una solución del compuesto tóxico de referencia con una concentración cercana a la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$. Para su elaboración, se prepara inicialmente una solución estándar con una alta concentración, a partir de la cual se preparan soluciones menos concentradas, utilizando como diluyente agua dura reconstituida (USEPA, 1993) o el medio recomendado para cada prueba. En todos estos procedimientos se debe emplear para la preparación de los compuestos tóxicos de referencia reactivos con pureza mínima del 99.5% y material volumétrico clase A calibrado. Estas diluciones deben prepararse hasta obtener una concentración cercana al valor promedio de la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ obtenida en cada laboratorio.

Preparación de las soluciones para determinación de la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ del compuesto tóxico de referencia

Cada laboratorio debe conocer el patrón de respuesta de sus organismos al compuesto tóxico de referencia, lo cual permitirá determinar las concentraciones óptimas para elaborar la curva dosis-respuesta.

Para determinar el volumen de solución estándar necesario para la preparación de la concentración de interés, puede emplearse la siguiente regla:

$$V_i * C_i = V_f * C_f$$

donde:

V_i y V_f = volúmenes iniciales y finales

C_i y C_f = concentraciones iniciales y finales

Se recomienda hacer verificaciones periódicas de la concentración del compuesto tóxico, dado que fenómenos de volatilización, evaporación, etc., pueden afectar la concentración del compuesto en la solución.

Preservación de las soluciones del compuesto tóxico de referencia

Las soluciones del compuesto tóxico de referencia deben mantenerse en frascos ámbar o protegidos de la luz con cubierta de papel aluminio, a una temperatura de 4 ± 2 °C (refrigeración). En estas condiciones de preservación, la solución de prueba puede perdurar por más de 45 días y la solución estándar por más de 6 meses. Mientras no se detecten resultados fuera de los límites normales de respuesta indicado por la carta control del compuesto tóxico de referencia, los patrones podrán usarse por un prolongado período de tiempo. Sin embargo, se sugiere efectuar su renovación a los 45 días y 6 meses, respectivamente. Es importante también, realizar la valoración química de la solución de prueba.

Preparación del control negativo

El control negativo corresponde a una solución del medio de cultivo del organismo, o puede utilizarse agua reconstituida con las características de

pH, dureza y alcalinidad óptimas para el desarrollo de los organismos o agua salina, como en el caso de *Vibrio fischeri*. Cualquiera que sea la solución seleccionada existe un porcentaje de efecto máximo que no debe ser superado durante las pruebas. Para la preparación de estos controles se debe seguir los procedimientos recomendados en cada una de las pruebas.

Blanco de procedimiento

Cuando las muestras son sometidas a un proceso de extracción o concentración previo a un análisis de toxicidad, se recomienda incluir un blanco de procedimiento por cada lote de muestras. La preparación del blanco depende del método aplicado; sin embargo, se debe seguir todo el protocolo establecido para la muestra. La toxicidad resultante en este blanco no debe exceder el 10% (APHA, 1998), en caso contrario los resultados quedan invalidados, pues la respuesta estaría indicando interferencias producto del procesamiento de la muestra.

REPLICABILIDAD Y SENSIBILIDAD

La sensibilidad de las pruebas depende del número de réplicas por concentración, el nivel de significancia establecido y el tipo de análisis estadístico que se lleve a cabo. Por esta razón, cuando la variabilidad permanece constante, la sensibilidad de la prueba puede incrementarse aumentando el número de réplicas. Sin embargo, el mínimo número de réplicas variará con los objetivos de la prueba y el método estadístico seleccionado para el análisis de los datos.

Existen muchos factores que pueden afectar el éxito y la precisión de un ensayo de toxicidad, los más importantes son: experiencia y habilidad del analista; edad, condición y sensibilidad de los organismos de prueba; calidad del agua de dilución; control de temperatura y calidad de alimento suministrado a los organismos.

Por tanto, los resultados dependen del origen y tipo de las especies utilizadas y de las condiciones bajo las cuales se llevan a cabo las pruebas, tales como temperatura, oxígeno disuelto, alimento y calidad del agua de dilución. Igualmente, la replicabilidad y precisión serán función del número de organismos utilizados por concentración.

La capacidad del personal del laboratorio para obtener resultados consistentes y precisos debe demostrarse con el compuesto tóxico de referencia, antes de llevar a cabo pruebas con muestras. La precisión para cada prueba debe establecerse por lo menos con cinco ensayos con el tóxico de referencia.

MUESTRAS DUPLICADA

Las muestras duplicadas corresponden a muestras colectadas al mismo tiempo en una misma fuente. Cuando se colectan menos de cinco muestras no es necesario tomar duplicados. Cuando el número de muestras está entre 5 y 10 se debe tomar una muestra por duplicado; si son más de 10 se debe tomar el 10% del total de muestras como duplicados. Cada muestra duplicada debe procesarse y ensayarse bajo las mismas condiciones de las otras muestras.

Los resultados de $CE_{50}/CL_{50}/CI_{50}$ obtenidos de muestras duplicadas de una muestra deben ser analizados mediante una prueba estadística para establecer si las diferencias observadas son o no estadísticamente significativas (APHA, 1992). Este análisis puede efectuarse de forma manual siguiendo el desarrollo siguiente.

Cálculo de factores

Réplica 1

$$F_1 = \frac{CE_{50\ 1}}{\text{Min } IC_1}$$

Réplica 2

$$F_2 = \frac{CE_{50\ 2}}{\text{Min } IC_2}$$

donde:

F = Factor para establecer los límites del valor de CE_{50} , con un 95% de confianza

CE_{50} = valor de CE_{50} en el reporte impreso de la prueba en caso de emplear los programas de cálculo automáticos

Min IC = límite inferior del intervalo de confianza

Relación de factores

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

Relación entre los valores de CE_{50} de las réplicas de acuerdo a:

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

Significancia

A partir de los cálculos anteriores, si la resultante de $CE_{50 \max}/CE_{50 \min}$ excede el valor obtenido para $F_{1,2}$, 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.

PUNTOS FINALES

El objetivo de un ensayo de toxicidad en una muestra de agua, efluente o compuesto puro es estimar la concentración segura o concentración a la cual no se observa efecto; sin embargo, este término es más un concepto biológico que un resultado estadístico, por lo que los resultados aquí utilizados serán: la concentración más alta a la cual no se observa efecto (NOEC); la concentración más baja a la que se observa efecto (LOEC); la concentración efectiva (CE), la cual corresponde a una estimación de la concentración del compuesto tóxico que puede causar un efecto adverso observable mediante una respuesta discreta en un porcentaje dado de organismos; la concentración letal (CL), la cual corresponde a la concentración del compuesto tóxico o efluente o muestra que causa la muerte a un determinado porcentaje de la población expuesta, y concentración inhibitoria (CI), la cual corresponde a la concentración del compuesto tóxico, muestra o efluente que puede producir una reducción de una respuesta biológica en una población expuesta.

El valor de la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ se debe obtener tanto para el compuesto tóxico de referencia como para las muestras simples o duplicadas. Para el cálculo de la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ se puede utilizar técnicas de estimación de punto como los métodos Probit, Spearman-Kärber, Gráfico, etc., para lo cual se puede utilizar programas computacionales especialmente diseñados. Un ejemplo es la versión de la USEPA Probit 1.5.

BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association (APHA). 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Décimo octava edición. Washington D.C.. Ap. 8010G. pp. 8-20-8-23.
- . 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Vigésima edición. APHA, Washington D.C.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1993. *Methods for Measu-*

ring the Acute Toxicity of Effluent and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Cuarta edición. Weber, C.I., Ed., EPA-600/4-90-027.

———. 1994. *Short Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*. Tercera edición. EPA 600/4-91-002.

LAVADO DE MATERIAL PARA ENSAYOS DE TOXICIDAD

*Alma Socorro Sobrino Figueroa
y Yolanda Pica Granados*

CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento complementario de lavado de material es útil para todos los ensayos de toxicidad en los que se utilice cristalería.

PROCEDIMIENTO

- El material de cristalería se lava con detergente neutro libre de fosfatos y se enjuaga dos veces con agua de la llave.
- Para eliminar residuos metálicos se enjuaga con ácido nítrico (HNO_3) al 30% y con agua deionizada. Luego se pone a escurrir.
- Para eliminar residuos orgánicos se enjuaga con acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) y agua deionizada (3 veces) y se deja secar completamente.
- Esta serie de lavados debe llevarse a cabo de 24 a 48 horas antes de la realización de los ensayos de toxicidad.
- Cuando el material no esté en uso, se debe proteger del polvo.

En el caso de los ensayos en los que se emplee agua reconstituida, el material debe enjuagarse con este tipo de agua antes de utilizarlo para contener a los organismos.

BIBLIOGRAFÍA

American Public Health Association (APHA). 1994. *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. APHA AWWA WPCF. Interamericana, Madrid, España.

MEDICIÓN DE pH Y DUREZA

Isabel Romero Terán

MEDICIÓN DE pH

CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento complementario es útil para todos los ensayos de toxicidad que requieran medir el pH en muestras de agua o soluciones acuosas.

DEFINICIONES

Potencial de hidrógeno (pH): es el logaritmo negativo de la concentración del ión hidrógeno en una solución acuosa o el logaritmo del recíproco de la concentración de iones hidrógeno. El valor del pH es la acidez o alcalinidad de una sustancia expresada en términos de la relación entre la fuerza electromotriz (E) expresada en volts, entre un electrodo de vidrio y uno de referencia cuando se sumergen en el agua, y la fuerza electromotriz (Es)

expresada en volts, entre los mismos electrodos cuando se sumergen en una solución reguladora de referencia.

$\text{pH} = -\text{Log} [\text{H}^+]$

Acidez: es la capacidad cuantitativa del agua para reaccionar con los iones hidroxilos.

Alcalinidad: es la capacidad cuantitativa del agua para reaccionar con los iones de hidrógeno.

MATERIAL

Vasos de precipitados 250 mL; pizetas de 500 mL; cepillo pequeño de cerdas suaves y barras de agitación magnéticas.

EQUIPO

Medidor de pH capaz de medir el pH en el intervalo de 0 a 14 por medio del empleo de un electrodo de vidrio y otro de referencia o un electrodo combinado, de preferencia con compensación de temperatura; electrodo de bajo error en sodio y parrilla de agitación.

REACTIVOS

Todos los productos químicos usados en este procedimiento deben ser grado analítico, a menos que se indique otra cosa. El agua utilizada debe ser deionizada; ácido clorhídrico; detergente líquido neutro libre de fosfatos; solución interna para electrodo de referencia de cloruro de potasio (KCl) 3.33M.

MATERIALES DE REFERENCIA

Se usarán soluciones amortiguadoras, con trazabilidad a un organismo autorizado. Las soluciones amortiguadoras utilizadas deben cubrir el intervalo de medición en el que se trabaja. Estas soluciones se pueden deteriorar por el crecimiento de hongos o por contaminación, por lo cual se recomienda que se conserven bien tapadas y en refrigeración.

PROCEDIMIENTO

CALIBRACIÓN

Para calibrar el equipo se deben elegir dos soluciones amortiguadoras a temperatura ambiente que cubran el intervalo de trabajo. Para el primer punto de calibración, se coloca la punta del electrodo en la primera solución amortiguadora y se procede de acuerdo al manual del equipo para calibrar. Luego se enjuaga el electrodo con agua, se seca y se procede a la calibración con la segunda solución amortiguadora, siguiendo el mismo procedimiento. Siempre se debe calibrar con soluciones amortiguadoras frescas.

MEDICIÓN DEL pH

Antes de leer las muestras, éstas se deben poner a temperatura ambiente. No deben diferir por más de 2 °C con respecto a la solución amortiguadora. En caso de que esta condición no se cumpla, el potenciómetro cuenta con compensador de temperatura, pero se debe tomar la temperatura con un termómetro calibrado.

En un vaso de precipitado se vacía un volumen de 50 mL de cada muestra, se agrega una barra de agitación y se pone en una parrilla de agitación. Se introduce el electrodo en la muestra de manera que no toque el fondo para permitir la agitación. Esta medición se repite con otro volumen igual de muestra. Las lecturas no deben diferir por más de 0.1 unidades de pH. Finalmente, se registran y anotan los valores del pH junto con la temperatura de las muestras.

CONTROL DE CALIDAD

Para una adecuada medición del pH se recomienda la siguiente secuencia de análisis:

- 1) Calibrar el equipo en el intervalo de medición adecuado
- 2) Leer el lote de muestras
- 3) Leer una muestra por duplicado por cada 10 muestras
- 4) Leer una solución amortiguadora de pH conocido por cada 10 muestras, para verificar la calibración del potenciómetro
- 5) Terminar el análisis leyendo una solución amortiguadora de pH conocido

PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN

Para evitar la contaminación cruzada de muestras, se debe enjuagar muy bien el electrodo con agua y secar. Las soluciones amortiguadoras deben mantenerse en refrigeración para evitar el crecimiento biológico.

INTERFERENCIAS

Los errores debidos al sodio a niveles de pH mayores de 10 pueden ser reducidos o eliminados utilizando un electrodo para bajo error en sodio, el cual puede funcionar a temperaturas elevadas y medir valores de pH superiores a 10.

Las variaciones de la temperatura pueden causar errores en la medición por lo que siempre se debe indicar la temperatura a la cual se ha medido el pH.

Puede haber errores de lectura si el electrodo se recubre con algún material grasoso que no se remueva fácilmente con los enjuagues, por lo que el electrodo se puede limpiar con detergente y enjuagar varias veces con agua. También se recomienda dejarlo remojar en una solución 1:10 HCl, de tal forma que la tercera parte baja del electrodo esté sumergido, y después enjuagar con agua en abundancia.

DETERMINACIÓN DE DUREZA

CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento complementario es útil para todos los ensayos de toxicidad que requieran medir la dureza en muestras de agua naturales, residuales y residuales tratadas.

DEFINICIONES

Dureza: concentración total de iones de calcio y magnesio expresada como su equivalente en carbonato de calcio (CaCO_3).

MATERIAL

Matraces Erlenmeyer de 250 mL, pipetas volumétricas de diferentes capacidades clase A, bureta de 25 o 50 mL clase A, vasos de precipitado y matraces aforados de diferentes volúmenes.

EQUIPO

Balanza analítica con precisión de 0.1 mg.

REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados deben ser grado reactivo analítico. El agua utilizada debe ser deionizada; cloruro de amonio (NH_4Cl); hidróxido de amonio concentrado (NH_4OH); EDTA de magnesio; EDTA de sodio; indicador negro de eriocromo T (sal sódica del ácido 1-(1-hidroxy-2-naftilazo)-5 nitro-2 naftol- 4 sulfónico) (mezcla seca pulverizada); clorhidrato de hidroxilamina (NH_2OHHCl); cloruro de sodio (NaCl); carbonato de calcio (CaCO_3); ácido clorhídrico (HCl); rojo de metilo.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA

Puede prepararse por cualquiera de los procedimientos siguientes:

- 1) Disolver 16.9 g de cloruro de amonio (NH_4Cl) en 143 mL de hidróxido de amonio concentrado (NH_4OH), agregar 1.25 g de sal de EDTA de magnesio y diluir a 250 mL con agua
- 2) En ausencia de la sal de magnesio de EDTA, disolver 1,79 g de la sal disódica de EDTA y 0,78 g de $\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ o 0,644 g de $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de agua destilada. Disolver 16.9 g de NH_4Cl en 143 mL de NH_4OH concentrado. Mezclar ambas soluciones y aforar a 250 mL con agua. Esta solución debe guardarse en un recipiente de plástico o de vidrio resistente, herméticamente cerrada para evitar pérdida de NH_3 o entrada de CO_2 . Debe renovarse mensualmente o cuando al añadir 1 o 2 mL a la muestra el pH sea menor de 10.0 ± 0.1 .

SOLUCIÓN VALORADA DE EDTA

Pesar 3.723 g de EDTA de sodio, disolver en agua destilada y aforar a 1 L.

INDICADOR DE ROJO DE METILO

Disolver 0.1 g de sal de sodio de rojo de metilo y diluir a 100 mL con agua

SOLUCIÓN DE ÁCIDO CLORHÍDRICO 1:1

Mezclar un volumen de ácido clorhídrico concentrado con un volumen igual de agua.

SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE AMONIO 3N

Diluir a 1 L de agua 240 mL de hidróxido de amonio (NH_4OH).

SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE CALCIO

Secar el carbonato de calcio anhidro (CaCO_3) en polvo (bajo en metales pesados, álcalis y magnesio) a 200 °C durante toda la noche. Pesar 1.0 g de carbonato de calcio en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Colocar un embudo en el cuello del matraz y agregar poco a poco, solución de ácido clorhídrico 1:1 hasta que todo el carbonato se disuelva. Agregar 200 mL de agua y hervir por unos minutos para eliminar el CO_2 . Enfriar y agregar unas cuantas gotas del indicador rojo de metilo. Ajustar a un color intermedio anaranjado, por adición de hidróxido de amonio 3N o ácido clorhídrico 1:1. Aforar a un litro en un matraz aforado. Esta solución es equivalente a 1.0 mg de CaCO_3 por 1.0 mL.

PROCEDIMIENTO

VALORACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE EDTA

Para valorar la solución de EDTA se deben tomar 10 mL de la solución estándar de carbonato de calcio y diluirlos a 50 mL con agua en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Posteriormente, se agregan de 1 a 2 mL de la solución amortiguadora para llevar la solución a un pH de 10 ± 0.1 . Luego se adicionan de 1 a 2 gotas o una cantidad adecuada del indicador en polvo de negro de eriocromo T y se titula lentamente con la solución de EDTA, empleando agitación continua hasta observar un vire a color azul. La titulación se debe repetir al menos tres veces para calcular el factor F.

CÁLCULO DEL FACTOR F

Para calcular el factor F se utiliza la siguiente fórmula:

$$F = \frac{\text{CaCO}_3 \text{ (mg) en la solución titulada}}{\text{Volumen de la solución de EDTA empleada en la titulación}}$$

DETERMINACIÓN DE DUREZA

Primero se deben tomar 50 mL de muestra o una alícuota de la muestra llevada a 50 mL con agua deionizada. Se ajusta el pH a 10 ± 0.1 de la muestra, adicionando el volumen necesario de solución amortiguadora (generalmente de 1 a 2 mL) y luego se agregar una cantidad adecuada de negro eriocromo T (0.2g). Se titula con la solución de EDTA valorada 0.01 M, agitando constantemente hasta que desaparezcan los últimos matices rojizos. Al final se añaden las últimas gotas a intervalos de 3 a 5 segundos hasta observar el color azul.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

El cálculo de la dureza total se determina utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Dureza total de CaCO}_3 \text{ (mg/L)} = \frac{(A-B) * 1,000 * C}{d}$$

donde:

A = mL de solución de EDTA gastados en la titulación.

B = mL de solución de EDTA gastados en la titulación del blanco.

C = factor obtenido en la valoración de la solución de EDTA.

D = mL de muestra utilizados.

CONTROL DE CALIDAD

Las muestras deben ser analizadas por duplicado.

INTERFERENCIAS

El EDTA forma complejos con hierro, manganeso, cobre, zinc, plomo, cobalto, níquel, bario, estroncio y algunos otros metales. En la titulación de calcio y magnesio, los estados altos de oxidación del manganeso reaccionan rápidamente con el indicador para formar productos de oxidación incoloros.

En presencia de aluminio en concentraciones mayores a 10 mg/L, el color azul que indica el punto final de la titulación puede aparecer y en poco tiempo después puede regresar a rojizo.

La materia orgánica coloidal o en suspensión también puede interferir en el punto final.

MEDIDAS DE SEGURIDAD

Cuando se trabaje con cualquiera de los compuestos químicos descritos en este procedimiento, se debe usar equipo de seguridad como bata, guantes de látex y lentes de seguridad

BIBLIOGRAFÍA

NMX-AA-008-SCFI-2000 Determinación de pH en Agua.

NOM-AA-072-SCFI-2001. Determinación de Dureza Total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.

American Public Health Association (APHA). 1998. Standard Methods for the Examination of water. Vigésima edición. American Public Health Association, EE.UU.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2002. Método 9040 C. Medición electrométrica de pH Revisión 3, Agosto 2002.

PROCEDIMIENTO PARA LA GENERACIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS Y ELUTRIADOS DE SUELOS Y SEDIMENTOS PARA SU ANÁLISIS EN ENSAYOS DE TOXICIDAD

Yolanda Pica Granados y Gissel Trujillo Domínguez

CAMPO DE APLICACIÓN

La toxicidad medida a través de los ensayos con organismos como *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata* y algunos otros, está referida a los efectos causados por compuestos en la fase soluble o solubilizados, de tal modo que en el caso de matrices sólidas es necesario llevar a esta fase los materiales contaminantes contenidos en los sólidos que se desean analizar (por ejemplo sedimentos, suelos y productos industriales), aplicando un procedimiento controlado que permita el análisis de su toxicidad empleando diversas especies de organismos de prueba sin la generación de falsos positivos, causados por la interferencia del tratamiento de las muestras.

Este procedimiento es aplicable en el análisis de matrices sólidas (por ejemplo suelos, sedimentos, productos químicos, etc.) con el objetivo de extraer los compuestos tóxicos solubilizables en los disolventes de extracción seleccionados por su posibilidad de aplicarse en volúmenes controlados, para el desarrollo de pruebas de toxicidad.

Los resultados de toxicidad que surjan de esta clase de manejo de muestra ya sea por medio de elutriados, de extractos orgánicos o ambos, pueden ser aplicables para comparaciones de dosis-efecto cuando se comparan con el contenido de contaminantes (en casos en que las propiedades de polaridad de los disolventes empleados sea consistente para ambos), así mismo es de utilidad para zonificar los gradientes de afectación en un sitio (por ejemplo suelos o sedimentos) o, en su defecto, para el seguimiento del comportamiento en el tiempo de un material que se sospecha tóxico (por ejemplo suelo, sedimento o materiales diversos), entre otros. La aplicación de esta herramienta en estudios ambientales más amplios también puede ser utilizada con fines de investigación ya que brinda información sobre el potencial tóxico; sin embargo, su interpretación requerirá de conjuntar otras variables acordes a los objetivos de cada proyecto, de modo que la integración y las implicaciones de dicha información deberán ser manejada por especialistas en el tema.

DEFINICIONES

Estas definiciones han sido adecuadas a las necesidades del procedimiento.

Elutriado: extracto acuoso.

Blanco: es usado indistintamente con la palabra control.

Control negativo o blanco de procedimiento: se asigna este término al lote o tratamiento, dentro del diseño experimental, que replica las condiciones que afectan al conjunto de tratamientos, excepto la sustancia o mezcla de ellas que son investigadas en la prueba.

Control positivo: se asigna este término a una muestra, dentro del diseño experimental del procedimiento de trabajo, cuya respuesta (CE_{50}) y su variabilidad ha sido previamente evaluada y calibrada a través de pruebas de toxicidad. Ésta se prepara tomando como muestra materiales empleados como referencia.

MATERIAL

Sistema de extracción Soxhlet; vaso pp. 250 o 500 mL; conos de papel filtro No.1 purificados; pipetas Pasteur; viales cromatográfico de 5 mL con tapa de rosca; viales aforados de 5 mL; tubos de centrifuga plástico, desechables, estériles y de fondo cónico de 50 mL con tapa; tamiz de No. 60; morteros y mano de mortero.

EQUIPO

Balanza analítica; parrilla de extracción; evaporador rotatorio Buchi; horno de secado (40 ± 5 °C); plancha de calentamiento o dispensador de nitrógeno; refrigerador a temperatura de 4 ± 2 °C; pipetas automáticas de 1,000 μ L; centrifuga y baño ultrasónico.

REACTIVOS

Metanol calidad HPCL, plaguicida o nanogrado y agua destilada o desionizada.

PROCEDIMIENTO

Para el análisis de materiales sólidos (por ejemplo suelos, sedimentos u otros) se maneja el material con base en peso seco para la producción de extractos orgánicos. Para la generación de elutriados puede emplearse el material en su estado original (base húmeda o seca).

PREPARATIVOS

Para muestras de suelo y sedimentos, y en otros casos en que esto se aplique, el material es secado a temperatura ambiente o, en su defecto, con ayuda de un horno de secado a una temperatura de 40 ± 5 °C.

Posteriormente el material se disgrega y se muele en mortero hasta que éste logre su paso por un tamiz de malla del No. 60 (equivalente a 2mm de apertura de malla).

En caso de productos químicos o manufacturados cuya presentación sea en polvos, éstos se procesan en su forma original sin molido o tamizado previo.

Una vez listo el material, se pesan idealmente 20 g; sin embargo, de no haber muestra suficiente puede emplearse cantidades de 10 g en adelante o incluso menores (5 g), sólo si se sospecha que la muestra podría contener carga elevada de compuestos tóxicos.

El material para la producción de los extractos orgánicos se pesa llenando un cono de papel filtro del No. 1 (12.5 cm.), donde quedarán empacados. El papel filtro se purifica con días de anticipación, empleando la extracción en Soxhlet en los mismos términos del manejo indicado para muestras y dejándose secar a temperatura ambiente.

En el caso de la producción de elutriados, el material se pesa llenando un tubo de centrífuga de 50 mL de material plástico esterilizado en el que se efectuará el elutriado.

Para ambos casos, extractos orgánicos o elutriados, el peso correspondiente deberá registrarse en la bitácora del analista.

EXTRACCIÓN SOXHLET (EXTRACTO ORGÁNICO)

La muestra contenida en el cono de papel filtro se introduce en el vaso del sistema Soxhlet y se monta junto con el refrigerante y el matraz de bola. El volumen del disolvente en el matraz de bola puede variar dependiendo de la capacidad del sistema Soxhlet en uso, requerirá de 250 mL para el más pequeño o hasta 350 mL para uno de mayor volumen.

Ajuste el volumen del disolvente considerando que al condensarse e ir goteando en el interior del vaso del Soxhlet debe llegar al codo de vaciado sin que el matraz de bola se vacíe. En él debe quedar siempre un excedente para evitar que el extracto se queme.

Montar el sistema Soxhlet en la parrilla de extracción. En el caso del uso de metanol como disolvente de extracción, encender cada parrilla colocando el indicador de temperatura en el número 5 o 6, conectar simultáneamente el sistema de enfriamiento a una temperatura de 10 a 18 °C, cuanto más frío la condensación será más eficiente.

En el caso de uso de metanol, la extracción debe mantenerse en funcionamiento por un tiempo de alrededor de 20 horas, que es equivalente a aproximadamente 10 o 12 ciclos de renovación. En caso del uso de otro disolvente, el tiempo de extracción puede variar, en cuyo caso deberán hacerse los ajustes de tiempo, temperatura y ciclos adecuados correspondientes.

Al término del período apagar las parrillas y dejar enfriar aún con el flujo de enfriamiento en funcionamiento.

Desmontar los sistemas de extracción

Recuperar en el matraz de bola el disolvente aún contenido en el vaso.

Cubrir con papel aluminio la boca de los matraces de bola que contienen los extractos orgánicos y mantener en refrigeración hasta que se proceda a la evaporación y concentración del extracto. Por cada lote de muestras prepare un blanco y un control positivo.

EVAPORACIÓN

Llene el baño María del equipo de evaporación a un nivel que cubra los matraces de bola una vez inmersos en él. Si el extracto es con base en metanol, caliente el baño a 40 ± 5 °C y conecte la fuente de enfriamiento del refrigerante, cuidando que se logre una temperatura de 10 a 18 °C.

En caso de la concentración de extractos metabólicos, acoplar una bomba de vacío conectada al refrigerante del evaporador rotatorio.

Colocar el matraz de bola conteniendo el extracto, ajustar el seguro de la boca de evaporador y girar a cierre la válvula de alivio del condensador del evaporador rotatorio. Encienda la bomba de vacío y ajústela a una presión de 30 a 40 psi, simultáneamente gire la perilla de rotación del equipo evaporador para que el matraz de bola empiece a girar. Elija una velocidad media.

Ajuste su sistema de evaporación a fin de optimizar el proceso de concentración. Para ello ajuste la presión, la temperatura del baño María y de la fuente de enfriamiento tomando como base la siguiente información. Cuanto menor es la presión que se emplea se requiere manejar la temperatura del baño en el límite máximo aceptable (45 °C) y la de enfriamiento en los niveles más bajos, mientras que cuando la presión es mayor podemos emplear una menor temperatura en el baño y un enfriamiento de temperatura media dentro del ámbito óptimo señalado.

Cuando el volumen del disolvente sea alrededor de 2 mL, detenga la rotación de la bola, apague la bomba de vacío y gire la válvula de alivio del condensador para abrirla y liberar el vacío. Una vez hecho lo anterior podrá retirar el matraz de bola y colocar el siguiente.

TRASVASADO

Enjuague los viales de 5 mL con metanol y deje secar.

Transfiera el concentrado contenido en el matraz de bola a un vial de 5 mL empleando una pipeta Pasteur (no las reutilice). Tome volúmenes adicionales de disolvente limpio (por ejemplo metanol) para limpiar las paredes del matraz, recupérela y adiciónelo también al vial junto con el concentrado previamente trasvasado.

Reduzca los volúmenes del concentrado del extracto colocando los viales sobre una parrilla tibia, logre la temperatura idónea sólo encendiendo la parrilla sin seleccionar niveles de calor (aproximadamente 30- 45 °C). También puede hacerse uso de flujo de nitrógeno para su concentración. Cuando el nivel del

volumen en el vial se reduzca a la mitad de su capacidad, podrán adicionarse los nuevos volúmenes que resulten de los enjuagues posteriores del matraz de extracción. Enjuague este recipiente hasta que las paredes queden limpias, siempre incorporando el disolvente al vial con el concentrado. Una vez terminada la limpieza del matraz deje reducir el volumen del concentrado contenido en el vial hasta alcanzar aproximadamente 3 mL.

Cubra y guarde los viales en refrigeración hasta su análisis en pruebas de toxicidad.

PREPARATIVOS PARA PRUEBAS DE TOXICIDAD DE EXTRACTOS ORGÁNICOS

Transfiera el volumen de los viales conteniendo el concentrado a viales aforados. Emplee enjuagues al vial original usando disolvente limpio (por ejemplo metanol), adicione al vial aforado hasta alcanzar el nivel de 4 mL.

Para preparar su sistema de prueba emplee como volumen máximo del extracto orgánico, un volumen menor o igual a la concentración de disolvente (% v/v) correspondiente al nivel de efecto no observable (NOEC), el cual deberá haber sido previamente determinado. Dentro del sistema de prueba, la manera de demostrar una adecuada selección de los volúmenes de disolvente a niveles que no generan falsos positivos, es a través de la respuesta obtenida del análisis de toxicidad del blanco de procedimiento, el cual no deberá presentar efecto en las pruebas de toxicidad o, en su defecto, éste no deberá ser mayor al efecto observado en el control negativo.

Para el caso del metanol, la concentración máxima de este disolvente en el sistema de prueba que se establece como recomendable para *D. magna*, *V. fischeri* e *Hydra attenuata*, debe ser $\leq 1.2\%$. En caso de *P. subcapitata* éste debe ser $\leq 0.1\%$.

Tomando como ejemplo el sistema de prueba con *V. fischeri*, cuyo volumen final en el preparado de la concentración inicial es de 2,750 μL , que se logra al adicionar 250 μL de solución de ajuste osmótico (MOAS) y 2,500 mL de la muestra, entonces se tendría que hacer el siguiente preparado:

Adicionar los 250 μL de MOAS a la celdilla que contendrá la máxima concentración. Posteriormente, adicionar 2,500 μL de agua de reconstitución. Mezclar con ayuda de la micropipeta de 1,000 μL , succionando y eyectando el líquido tres veces. Con ayuda de una micropipeta de volumen variable ajustada a 30 μL , succionar ese volumen de la celdilla en preparación, de modo que quede su llenado a 2,720 μL .

Posteriormente, restituir el volumen, nuevamente a 2,750 μL , adicionando 30 μL del concentrado del extracto orgánico.

Bajo este esquema de preparación de la muestra se logra una concentración de metanol en el sistema de prueba de 1.09% (v/v), menor al máximo recomendado.

Para efectuar los cálculos de la concentración inicial del sedimento en el sistema de prueba ver la sección de manejo de resultados de este procedimiento.

ELUTRIADOS

El material contenido en los tubos de centrifuga deberá asentarse al fondo del recipiente. Esto se logra golpeando ligeramente la base del tubo sobre una superficie. Al terminar mida el volumen que ocupa el material leyendo en la escala que presentan los tubos. Anote el dato en la bitácora junto con el registro del peso correspondiente.

Mezclar el sedimento con agua destilada en una relación máxima de 1:4 (una parte de sedimento por cuatro de agua), haciendo uso de la lectura del volumen que ocupa el material de la muestra para establecer las proporciones. Puede elegir el uso de relaciones de volumen menores, tal como 1:2 o 1:3. Considere que la limitante será la capacidad del tubo a 50 mL.

Cierre los tubos y agite vigorosamente a fin de mezclar homogéneamente el material en el agua y anote el volumen adicionado junto con los datos anteriormente señalados.

Posteriormente, puede colocar los tubos en una parrilla de agitación o, en su defecto, emplear un baño ultrasónico.

En caso de usar baño ultrasónico, llene la tina a la capacidad correspondiente, introduzca los tubos y cúbralos, manteniéndolos sumergidos en el agua hasta el nivel de la base de su tapa.

Ajuste el baño ultrasónico para su funcionamiento por 60 minutos sin calentamiento, tiempo que los tubos deberán permanecer en su interior.

Al término de una hora de agitación o sonicación apague los instrumentos y saque los tubos. Déjelos reposar en posición vertical dentro de un refrigerador para su sedimentación.

Por cada lote de muestras o número de control, monte un blanco y un control positivo.

Previo al desarrollo de pruebas de toxicidad, coloque los tubos en centrifugación por un tiempo de 15 minutos a una velocidad de 2,000 a 4,000 rpm, hasta que aparezca el sedimento.

Detenga la centrifugación y emplee el sobrenadante acuoso (elutriado) para el desarrollo de pruebas de toxicidad, obteniendo los volúmenes necesarios succionando el líquido sin resuspender el sedimentado.

Debido a que el elutriado es un extracto acuoso, el procedimiento de prueba podrá desarrollarse de la misma forma en que se llevan a cabo las pruebas de toxicidad rutinarias.

Para efectuar los cálculos para determinar la concentración inicial emplee las guías correspondientes indicadas en la sección de manejo de resultados de este procedimiento, haciendo los ajustes de volúmenes y pesos que correspondan.

PRECAUCIONES

Cuidar que los materiales empelados en la producción de extractos o elutriados estén siempre libres de tóxicos.

Cuidar que a lo largo del procedimiento para la elaboración de extracto orgánico, no se adicione a éste agua que puede incorporarse por condensación en los refrigerantes del sistema Soxhlet o por un inadecuado secado de la muestra.

Cuidar que durante la extracción, la cantidad de disolvente siempre sea la suficiente para alcanzar el nivel de vaciado del vaso del Soxhlet, a fin de que se mantengan los ciclos de renovación de extracción funcionando, de otra manera se quemará el extracto contenido en el matraz de bola. En caso de que éste no alcance el nivel necesario puede adicionarse más disolvente al matraz de bola, cuidando de apagar la parrilla y dejar enfriar previamente.

Cuidar que la temperatura del agua empleada para enfriar los refrigerantes se mantenga en un intervalo adecuado para promover la condensación del disolvente. En el caso de metanol se recomienda manejar una temperatura de 10- 18 °C. De emplearse otro disolvente deberá ajustarse a la temperatura que convenga de acuerdo a su volatilidad, evitando siempre la pérdida del disolvente de extracción. Para el enfriamiento puede emplearse un baño de recirculación de agua o en su defecto agua directa de la toma.

Cuidar que al término o al inicio de cada lote extraído o por extraer en el sistema Soxhlet, se efectúe un enjuague con acetona (grado HPLC, nanogrado o plaguicidas) y posteriormente con metanol (grado HPLC, nanogrado o plaguicida) con el objetivo de evitar contaminación cruzada.

Cuidar que mientras el sistema Soxhlet no esté en uso, se protejan las entradas de los refrigerantes con papel aluminio para aislarlas de polvos.

Cuidar que durante el uso del evaporador rotatorio se maneje un balance de las variables de presión y temperatura del baño María a fin de evitar que el extracto de la muestra se proyecte en el interior del condensador y lo contamine, o en su defecto, se provoque la pérdida del extracto.

Cuidar que durante la reducción de volúmenes durante el trasvasado de la muestra a los viales de 5 mL, si emplea parrilla de calentamiento, ésta se encuentre sólo tibia, de lo contrario el concentrado se proyectará y la muestra se perderá.

En el caso de la producción de elutriados, etiquete los tubos escribiendo directamente sobre la pared o la tapa del mismo, con plumón indeleble, ya que las etiquetas de papel pueden desintegrarse en el baño ultrasónico.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

CONSIDERACIONES PARA LOS CÁLCULOS DE CONCENTRACIÓN

Tomando en cuenta que en el caso de la producción de extractos orgánicos, el volumen de concentrado que se emplea para el análisis de toxicidad será sólo una porción del concentrado, deberemos hacer los ajustes y cálculos necesarios para expresar adecuadamente el resultado.

Continuando con el ejemplo de la prueba con *V. fischeri*, en el que se empleó una proporción de 30 µL de un volumen total del concentrado de 4 mL, obtenidos a partir de un peso inicial de la muestra que para fines del ejemplo será de 20 g, entonces podemos decir que la concentración inicial, expresada con mg Eq/mL, en la máxima concentración preparada sería de 54.54 mg Eq/mL, a partir de los siguientes cálculos:

$$\frac{20 \text{ g}}{4,000 \text{ } \mu\text{L}/30\mu\text{l}} * 1,00 = \frac{150\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$\frac{150\mu\text{g}/ \text{mL}}{2,750 \text{ mL}} = \frac{54.54 \text{ mgEq}}{\text{mL}}$$

donde:

20 g = Peso inicial del material extraído

4,000 μL = Volumen del concentrado del extracto

30 μL = Volumen del concentrado del extracto adicionado al sistema. de prueba para análisis de toxicidad

2,750 mL = Volumen total de la solución en el sistema de prueba.

La concentración obtenida debe ser expresada anteponiendo el término “Equivalentes”, que se expresa como Eq. (54.54 mg Eq/mL). Se introduce esta modalidad ya que debe considerarse que la concentración obtenida está referida a una cantidad de material que fue extraída, de modo que en realidad los organismos de prueba se exponen al material soluble o extractado, cuya cantidad no es posible determinar; sin embargo, ésta es relativa al peso medido del material trabajado. Las concentraciones de las diluciones subsecuentes tendrán que afectarse por el factor de dilución empleado para su preparación.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de la prueba del concentrado del control negativo o blanco de procedimiento, proveen información útil para detectar la posibilidad de falsos positivos, ya que a través de su análisis se determina la contribución que el proceso de manejo de muestras, ya sea por producción de extractos o elutriados, tiene sobre la respuesta tóxica obtenida en pruebas de toxicidad, así como la del posible efecto que pueda causar la adición de volúmenes de disolvente en el sistema de prueba.

Con fines de aceptación de los resultados, las pruebas de toxicidad del blanco de procedimiento deberán demostrar que no hay efecto, o que éste no es mayor al efecto observado en el control negativo. Esto indicará que el proceso de manejo de muestra, así como el volumen de disolvente adicionado al sistema de prueba no contribuye a la toxicidad ni a la generación de falsos positivos.

El control positivo permitirá controlar la efectividad del proceso de extracción, de tal manera que la respuesta de la prueba de toxicidad del concentrado o elutriado deberá encontrarse en una concentración previamente determinada para el material de referencia, tanto en el caso del elutriado como del extracto orgánico.

BIBLIOGRAFÍA

- Ho, T. Y. H. y G. J. Quinn. 1993. Physical and chemical parameters of sediment extraction and fractionation that influence toxicity as evaluated by Microtox. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12: 615-625.
- Hong Do, C. L., K. Becker-van Stooten, S. Jean-Jacques, T. Lam Minh y J. Tarradellas. 2000. Toxicity of sediments from the Ho Chi Minh city canals and Saigon River, Viet Nam. *Environmental Toxicology* 15: (5): 469-475.
- Jonson T. y E. R. Long. 1998. Rapid toxicity assessment of sediments from estuarine ecosystems, a new tandem in vitro testing approach. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (6) 1099-1106.
- Pica-Granados Y., R.I. Huerto-Delgadillo, D. G. Trujillo, S. H. Hernández y O.U. Bucio. 1998. Control integral de lirio acuático e implicaciones toxicológicas en el lago de Chapala. Proyecto CONACyT 0768P-B. Subcoordinación de Hidrobiología y Evaluación Ambiental. Coordinación de Tratamiento y Calidad del Agua. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México. Vol II. 58pp.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI). 1995. Norma Mexicana NMX-AA-112- SCOFI. Análisis de agua y sedimentos. Evaluación de toxicidad aguda con *Photobacterium phosphoreum*. Método de pruebas DGN. 36 pp.
- Sveson A., T. Vikor y M. Remberger. 1997. Toxicity of elemental sulfur in sediments 1998. *Environmental Toxicology* 13: (3): 217-224.
- United States Army Corps of Engineers, 1976. *Ecological evaluation of proposed discharge of dredge or fill material into navigable waters*. COE D-76-17 Final Report U.S Army Engineer Water Ways Experiment Station Vicksburg. MS.
- Wang C., Y. Wang, Z. Mo y Z. Wang. 2003. Ecotoxicological examination of sediment extracts of Huaihe River, China by in vitro bioassay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71: 782-790.

EXTRACCIÓN DE CONSTITUYENTES TÓXICOS PARA LAS ENSAYOS DE TOXICIDAD

Isabel Romero Terán

CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento complementario describe el método recomendado para llevar a cabo la extracción de constituyentes tóxicos para las pruebas de toxicidad. Es aplicable a muestras con una concentración mayor a 0.5 % de sólidos a las que una vez extraídas se les realizará una prueba de toxicidad aguda o crónica.

DEFINICIONES

Prueba de extracción: procedimiento de laboratorio que permite determinar la movilidad de los constituyentes de un residuo, que lo hacen peligroso por su toxicidad al ambiente.

MATERIAL

Filtros de fibra de vidrio, sin aglutinantes, con un tamaño efectivo de poro de 0.6 a 0.8 μm ó equivalente; vasos de precipitado o matraces Erlenmeyer de vidrio de 500 mL; vidrio reloj de diámetro adecuado para cubrir el vaso de precipitado o el matraz Erlenmeyer; agitador magnético; termómetro de 0 a 100 °C.

EQUIPO

Equipo de agitación rotatorio. Este aparato de agitación debe ser capaz de hacer girar el vaso o recipiente de extracción a 30 ± 2 r.p.m.

Recipientes de extracción. Se necesitan frascos con suficiente capacidad para contener la muestra y el reactivo de extracción. No es necesario que estos frascos queden completamente llenos y pueden ser de diferentes materiales como vidrio de borosilicato o plástico de politetrafluoroetileno (PTFE). Los recipientes de extracción y los equipos de filtración deben ser de materiales inertes que no lixivien o absorban los componentes del residuo.

Equipo de filtración. Se puede utilizar cualquier unidad de filtración capaz de sostener un filtro de fibra de vidrio y resistir la presión para llevar a cabo la separación. Estas unidades de filtración deben tener un volumen interno mínimo de 300 mL y deben estar adaptadas para acomodar un filtro de 47 mm de diámetro como mínimo. Se recomienda una unidad de filtración que tenga una capacidad interna de 1.5 L ó más y que esté equipada para dar cabida a filtros de 142 mm de diámetro.

Medidor de pH que cubra el intervalo de medición de 0 a 14 U de pH a 25 °C; balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg; parrilla con agitación y calentamiento; estufa con control de temperatura para trabajar a 100 ± 5 °C.

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Los productos químicos utilizados deben ser grado analítico, a menos que se indique otro grado. El agua utilizada debe ser deionizada.

Solución de ácido clorhídrico (HCl) 1.0 N; solución de ácido nítrico (HNO_3) 1.0 N; solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1.0 N; ácido acético glacial ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$).

FLUIDO DE EXTRACCIÓN # 1

Adicionar 5.7 mL de ácido acético glacial a 500 mL de agua. Posteriormente, adicionar 64.3 mL de NaOH 1.0 N y llevar a un volumen de un litro. Cuando este fluido ha sido correctamente preparado presenta un valor de pH de 4.93 ± 0.05 .

FLUIDO DE EXTRACCIÓN # 2

Diluir 5.7 mL de ácido acético glacial a un litro de agua. Cuando este fluido ha sido correctamente preparado presenta un valor de pH de 2.88 ± 0.05 .

Los reactivos de extracción deben ser verificados frecuentemente. Su pH debe comprobarse para asegurar que sea el correcto. Si se encuentran impurezas o el pH no está dentro de los límites, se debe desechar el reactivo y preparar uno nuevo.

PRESERVACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras y los extractos obtenidos deben ser preparados para el análisis tan pronto como sea posible y mantenerse en refrigeración a 4 °C. Los extractos para las determinaciones de toxicología se guardan en frascos de vidrio o polietileno y se mantienen en refrigeración hasta su análisis.

PROCEDIMIENTO

Para la extracción de los componentes tóxicos de las muestras se deben realizar los pasos que se detallan a continuación.

EVALUACIONES PRELIMINARES

Realizar las evaluaciones preliminares con una alícuota de la muestra de un mínimo de 100 g. Esta alícuota se emplea únicamente para las evaluaciones preliminares que incluyen:

- 1.1. Determinar de forma preliminar el porcentaje de sólidos:
Si la muestra no produce líquido cuando está sujeto a la presión de filtración (es decir es 100 % sólido) continuar con el inciso 1.3.

1.2. Si la muestra es líquida o polifásica, se requiere la separación sólido-líquido para hacer la determinación preliminar del porcentaje de sólidos. Esto involucra el equipo de filtración mencionado en la sección de equipos y materiales.

1.2.1. Pesarse el filtro y el recipiente que recibirá el filtrado.

1.2.2. Ensamblar el porta filtros y colocar el filtro sobre el soporte y asegurarlo.

1.2.3. Pesarse una parte de la muestra (mínimo 100 g) y registrar el peso.

1.2.4. Las muestras que sedimentan lentamente pueden centrifugarse antes de filtrar. La centrifugación se utiliza como una ayuda de la filtración. Si ésta es utilizada primero, el líquido debe ser decantado y filtrado continuando con la filtración de la porción sólida.

1.2.5. Transferir cuantitativamente la muestra al equipo de filtración de una manera uniforme sobre la superficie del filtro. Dejar que la muestra se estabilice a temperatura ambiente en el aparato antes de ser filtrada, ya que si la filtración se hace a 4 °C, esto reduce la cantidad de líquido extraído. Si más de 1% del peso de la muestra se ha adherido al recipiente utilizado para transferir la muestra al aparato de filtración, determinar el peso de este residuo y restarlo del peso de la muestra calculado en el inciso 1.2.3 para conocer el peso efectivo del residuo que se filtró. Aplicar gradualmente la presión a través del filtro e incrementarla lentamente de 10 psi hasta 50 psi para que todo el líquido pase hasta que el flujo del líquido haya cesado.

1.2.6. El material retenido en el filtro se define como la fase sólida y el filtrado como la fase líquida. Determinar el peso de la fase líquida restando el peso del recipiente vacío, del peso total del recipiente con el filtrado. Determinar el peso de la fase sólida de la muestra restando el peso de la fase líquida del peso total de la muestra. Calcular el porcentaje de sólidos como sigue:

$$\% \text{ de sólidos} = \frac{\text{Peso de sólido}}{\text{Peso total de la muestra}} * 100$$

1.2.7. Si el porcentaje de sólidos determinado en el inciso 1.2.6 es $\geq 0.5\%$, entonces continuar ya sea con el inciso 2 para determinar si el material sólido requiere reducción de tamaño de partícula o con el inciso 1.3

1.2.8. Si el porcentaje de sólidos determinado es menor que 0.5% continuar con el inciso 4.6.

1.3. Determinar el porcentaje de sólidos secos.

1.3.1. Quitar del aparato de filtración la fase sólida y el filtro.

1.3.2. Secar el filtro y la fase sólida a 100 ± 5 °C, hasta que después de ser pesados dos veces consecutivas no varíen en $\pm 1.0\%$. Registrar el peso final.

1.3.3. Calcular el porcentaje de sólidos secos de la siguiente manera:

$$\% \text{ sólidos secos} = \frac{(\text{Peso del residuos sólido} + \text{filtro}) - \text{Peso del filtro}}{\text{Peso inicial del residuo}} * 100$$

1.3.4. Si el porcentaje de sólidos secos es $< 0.5\%$ continuar con 4.1, si es $\geq 0.5\%$, tomar una porción fresca de muestra, determinar si la reducción de tamaño de la partícula es necesaria y seleccionar el fluido de extracción adecuado.

2. Determinar si la muestra requiere reducción de tamaño de partícula. Evaluar el sólido para determinar el tamaño de la partícula. A menos que el área superficial del sólido sea, por gramo de materia, igual o mayor que 3.1 cm^2 o menor que 1.0 cm^2 en su dimensión más angosta, se requiere la reducción del tamaño de la partícula. El sólido debe ser capaz de pasar a través de una malla estándar de 9.5 mm o 0.375 pulgadas, si el área superficial es menor o el tamaño de la partícula es más grande de lo señalado anteriormente, preparar la porción sólida de los desechos para la extracción, comprimiendo, cortando o triturando los desechos hasta obtener un área superficial o tamaño de la partícula igual a la descrita anteriormente.

3. Seleccionar el fluido de extracción adecuado:

3.1. Pesar una fracción de la fase sólida, reducir si es necesario a un tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm de diámetro o menos y transferir 5 g a un matraz Erlenmeyer de 250 mL o un vaso de precipitado.

3.2. Añadir 96.5 mL de agua, cubrir con un vidrio de reloj y agitar durante 5 minutos en una parrilla de agitación magnética, sacar y dejar sedimentar, medir el pH.

3.3. Si el pH es < 5 utilizar el fluido de extracción 1. Si es > 5 adicionar 3.5 mL de HCl 0.1 N, mezclar y cubrir con un vidrio de reloj, calentar a 50 °C y mantener la temperatura por 10 min.

3.4. Dejar enfriar a temperatura ambiente y medir el pH, si es < 5 utilizar el fluido de extracción 1 y si es > 5 utilizar el fluido de extracción 2.

4. Determinar los constituyentes tóxicos.

4.1. Se recomienda un tamaño mínimo de muestra de 100 g.

- 4.2. Si la muestra no produce líquido, cuando se somete a filtración (100% sólido), pesar una porción de la muestra (100 g) y continuar con 1.3
- 4.3. Si la muestra es líquida o multifásica, se requiere una separación líquido-sólido. Esto involucra el equipo de filtración descrito en el apartado de materiales y equipos.
- 4.4. Pesar el recipiente que recibirá el filtrado.
- 4.5. Ensamblar el portafiltro y colocar el filtro en el soporte y asegurarlo.
- 4.6. Pesar una fracción de muestra (100 g mínimo). Si el residuo contiene menos del 0.5% de sólidos secos, la porción líquida del residuo, después de la filtración, se define como el extracto. Por lo tanto, se debe filtrar suficiente muestra para que la cantidad de líquido filtrado alcance para realizar todos los análisis requeridos. Para residuos que contienen más del 0.5% de sólidos secos, utilizar la información del porcentaje de sólidos obtenido, para determinar el tamaño óptimo de la muestra (100 g mínimo) que se llevará a filtración.
- 4.7. Dejar sedimentar la fase sólida, las muestras que sedimenten lentamente pueden centrifugarse antes de la filtración.
- 4.8. Transferir cuantitativamente la muestra (fase líquida y sólida) al equipo de filtración, verter la muestra en forma uniforme sobre la superficie del filtro, continuar como se indica en 1.2.5
- 4.9. El material en el portafiltro se define como la fase sólida del residuo, el filtrado como la fase líquida, pesar el filtrado.
- 4.10. Si la muestra contiene menos del 0.5% de sólidos secos continuar con 4.6. Si el residuo contiene más del 0.5 de sólidos secos y fue necesaria la reducción de tamaño de partícula, continuar con 4.2. Si el residuo pasa un tamiz de 9.5 mm, transferir cuantitativamente el material sólido a un frasco de extracción junto con el filtro (usado para separar la fase líquida inicial de la fase sólida) y continuar con 5.
- 4.11. Preparar la porción sólida del residuo para extracción. Cuando el tamaño de la partícula esté preparado adecuadamente, transferir cuantitativamente el material sólido a un frasco de extracción. Incluir el filtro utilizado para separar el líquido inicial de la fase sólida.
5. Determinar la cantidad del fluido de extracción necesario como sigue:

$$\text{Peso del fluido} = \frac{20 * \% \text{ sólidos} * \text{Peso de la muestra filtrada}}{100}$$

Agregar lentamente al recipiente extractor la cantidad de fluido de extracción calculado. Cerrar bien el vaso extractor (se recomienda utilizar cinta de teflón para asegurar un sello hermético), asegurar el recipiente en el aparato de agitación rotatorio y hacer girar a 30 ± 2 rpm por 18 ± 2 horas. La temperatura ambiente debe mantenerse a 23 ± 2 °C durante el período de extracción.

6. Después de las 18 ± 2 horas de extracción, separar el material en el recipiente extractor en sus fases líquida y sólida, filtrando a través de un filtro de fibra de vidrio nuevo. Para la filtración final del extracto, es necesario cambiar el filtro de fibra de vidrio, para facilitar la extracción.

El filtrado obtenido es la muestra para evaluar toxicidad.

7. Preparar el extracto obtenido.

7.1. Si el residuo no contiene fase líquida inicial, el líquido filtrado obtenido se define como el extracto.

7.2. Si los líquidos son compatibles, combinar el líquido filtrado con el líquido inicial del residuo obtenido en 6. Este líquido combinado se define como el extracto. Continuar con 8.

7.3. Si la fase líquida inicial del residuo, obtenida en 4.8 no es o no puede ser compatible con el líquido filtrado resultante en 6, no combinar los líquidos, analizar por separado cada uno y combinar los resultados matemáticamente, como se describe en 8.2.

8. Después de coleccionar el extracto, medir el pH y guardar el extracto para su análisis.

8.1. Si las fases individuales van a ser analizadas separadamente, determinar el volumen de la fase individual ($\pm 0.5\%$), realizar los análisis requeridos y combinar los resultados matemáticamente, utilizando un promedio volumen-peso, como se indica:

$$\text{Concentración final del analito} = \frac{V_1 C_1 + V_2 C_2}{V_1 + V_2}$$

donde:

V1= Volumen del primer extracto (L)

C1= La concentración del analito de interés en el primer extracto (mg/L)

V2= El volumen del segundo extracto (L)

C2= La concentración del analito de interés en el segundo extracto (mg/L)

CONTROL DE CALIDAD

Preparar un blanco del fluido de extracción tratándolo igual que una muestra, para monitorear posible contaminación.

Analizar una muestra por duplicado por cada lote de muestras o por cada 20 muestras.

BIBLIOGRAFÍA

NOM-053-SEMARNAT-1993 que establece el procedimiento para llevar a cabo la prueba de extracción para determinar los constituyentes que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente. *Diario Oficial de la Federación* del 2 de octubre de 1993, SEGOB, México.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Method 1311 Toxicity Characteristic Leaching Procedure. Revisión julio de 1992.

MÉTODO DE DESCAPSULACIÓN DE NAUPLIOS DE *ARTEMIA* SP. PARA LA ALIMENTACIÓN DE CAMARONES PENEIDOS

Cecilia Vanegas Pérez y Cecilia Robles Mendoza

CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento complementario se recomienda para la obtención de nauplios de *Artemia* sp. que pueden emplearse como alimento para el cultivo y mantenimiento de camarones peneidos y otras especies marinas.

MATERIAL

Probeta de 500 mL, vasos de precipitados de 500 mL, agitador de vidrio, pipeta serológica de 1 mL (recomendable con graduación de 1/100), bombilla para pipeta, contenedor plástico con ventana de malla planctónica (100 μ L), contenedor transparente de incubación de 2 L, manguera para acuario, llave de paso pequeña para acuario y plástico negro grueso.

EQUIPO

Lámpara de luz blanca o foco de 40 watts y bomba de aireación.

REACTIVOS

Hipoclorito de sodio comercial (6% de cloro libre) y agua de mar natural, artificial o reconstituída.

ORGANISMOS

Quistes de *Artemia* sp.

PROCEDIMIENTO

Se describe el procedimiento para la descapsulación de 1 g de quistes de *Artemia* sp. Se recomienda utilizar cepas de *Artemia* que garanticen un porcentaje de descapsulación del 90%.

DESCAPSULACIÓN DE QUISTES

Diluir el hipoclorito de sodio comercial con agua de la llave, en una proporción de 1:2. Colocar 1 g de quistes de *Artemia* sp. por cada 100 mL de la solución diluida de hipoclorito de sodio y agitar constantemente hasta que la tonalidad de los quistes cambie de café a anaranjado intenso. Dependiendo de la cepa de *Artemia* el cambio de tonalidad ocurre entre 5 y 10 minutos. Transferir inmediatamente los quistes en un contenedor con una ventana de malla planctónica (para retener los quistes) y enjuagar con agua de la llave durante mínimo 1 hora para eliminar el cloro (figura F.1A).

INCUBACIÓN

Colocar los quistes perfectamente enjuagados en el contenedor de incubación con 500 mL de agua de mar a 34 ups o agua de mar previamente filtrada. Mantener los organismos durante 24 a 48 horas a una temperatura de 28 °C, luz y aireación constante (figura F.1B). La aglutinación de los quistes altera la eclosión por lo cual es importante mantenerlos en constante movimiento con aireación desde la base del contenedor de incubación.

RECOLECCIÓN DE NAUPLIOS

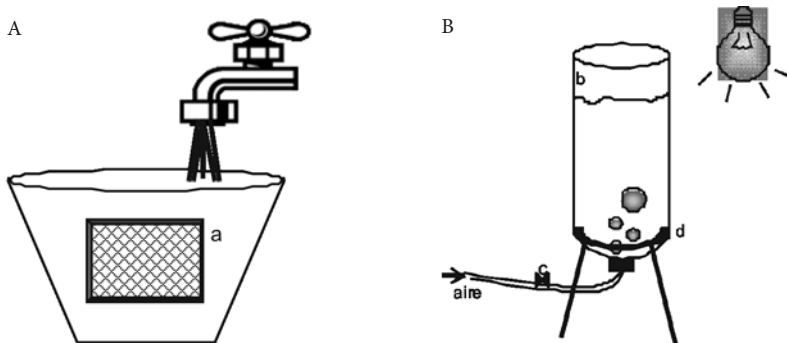
Para la separación de nauplios y quistes se recomienda bloquear la aireación cerrando la llave de paso y cubrir completamente el contenedor de incubación con plástico negro, dejando únicamente una pequeña apertura en la parte superior. Colocar junto a la apertura un foco o lámpara de 40 watts durante al menos 1 hora. Debido al fototactismo positivo de los organismos, los nauplios se concentrarán en la parte superior y los quistes precipitados estarán en el fondo del contenedor.

Colectar el precipitado con los quistes sin eclosionar. En otro recipiente coleccionar los nauplios eclosionados. Debido a la alta densidad de los nauplios es probable el incremento de los compuestos de excreción (principalmente amonio), tanto en el agua como en los nauplios. Estos compuestos pueden a su vez ejercer un efecto tóxico en las postlarvas de los camarones peneidos. Por lo tanto, se recomienda enjuagar a los nauplios con agua de mar, concentrarlos en una densidad máxima de 1500 a 1800 nauplios/mL y mantenerlos en refrigeración hasta su uso. Se recomienda alimentar a las postlarvas de los camarones peneidos con quistes de *Artemia* eclosionados el mismo día.

CONTEO DE NAUPLIOS

Colocar a los organismos colectados en un vaso de precipitado de volumen conocido con agua de mar. Agitar suavemente para que la distribución de los

Figura F.1. Dispositivos para la obtención de nauplios de *Artemia* sp. A) Para el lavado de quistes y B) Para la incubación de nauplios. a) ventana de malla planctónica, b) contenedor de incubación, c) llave de paso y d) soporte



organismos sea homogénea y con una pipeta serológica tomar 1 mL del medio con nauplios. Debido a que la distribución de los organismos en la pipeta es irregular, se recomienda contar los nauplios que se encuentren en 0.1 mL de la parte inicial, media y final de la pipeta. Realizar al menos 10 conteos, obtener el promedio de organismos en 0.1 mL y extrapolar la densidad a 1 mL.

CONSTRUCCIÓN DE UNA CÁMARA DE ILUMINACIÓN CASERA PARA EL ENSAYO DE TOXICIDAD CON EL ALGA *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM* (*PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA*)

Homero Hernández Salgado

MATERIAL

Dos pliegos de papel empleado para construcción de maquetas, color blanco, rígido y resistente (por ejemplo, cascarón), de aproximadamente 1.40 x 0.60 m; cinta adhesiva de 5 a 7 cm ancho; tijeras o navaja; papel aluminio; carrete de hilo nylon; marcador indeleble color azul o amarillo; guantes de látex; embudo de tallo largo de plástico transparente o vidrio de 10.5 cm de abertura de boca y 10 de fondo; 30 cm de alambre de 1 mm de diámetro; extensión eléctrica; socket para foco con entradas para clavija de conexión; bombilla de luz halógena fría 20W/11-860-120V-350mA, 1 155 lumen 50/60Hz, de triple foco (por ejemplo *Osram Dulux*) y conexión para anterior.

Este procedimiento apareció publicado originalmente en G. Castillo (ed.). 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IDRC, IMTA, Canadá. 202 pp. Se reproduce con la autorización de la editorial.

PREPARACIÓN DE LA PANTALLA DE ILUMINACIÓN

- De los pliegos de papel para construcción, cortar cuatro triángulos de 60 cm por lado. Posteriormente, cortar una de las esquinas de tal forma que se obtenga un polígono de 60 cm de base por aproximadamente 57 cm de altura (figura G.1. A)
- Forrar con papel aluminio los primeros 20 cm de la base de cada triángulo a manera de banda, la cual quedará en el interior de la cámara una vez armada (figura G.1. B).
- Formar la cámara uniendo los triángulos por sus lados, para estructurar una pirámide trunca en su punta (figura G.1. C) con ayuda de la cinta adhesiva. Pegar por la parte exterior.

COLOCACIÓN DEL SISTEMA DE ILUMINACIÓN

SISTEMA DE FILTRADO

- A 20 cm de la boca superior, introduzca en una esquina hilo nylon resistente y cruce a la esquina opuesta; repita la operación en otra de las esquinas de tal forma que se forme una cruz o red de soporte (figura G.2. D).
- Trozar el tallo del embudo hasta su base.
- Cortar el guante de cirujano conservando la banda de aproximadamente 8 cm de la muñeca del mismo. Eliminar el resto.
- Colocar la banda de látex, obtenida del guante de cirujano, en la boca del embudo sin tallo, de forma que cubra solo 5 cm, y dejar un espacio traslúcido de 5 cm (figura G.2. D).
- Enderezar el alambre y enrollar uno de los extremos de tal forma que se fije en el interior del embudo. Introducir el alambre por el orificio dejado por el tallo del embudo. Dar un espacio de 5 cm, y en el extremo saliente formar un gancho (figura G.2. D). Colgar el embudo del centro de la red de sostén (figura G.2. E).

COLOCACIÓN DE LÁMPARA

- Atornillar la bombilla de luz halógena de triple barra en el porta-lámpara correspondiente.
- Introducir el sistema por el interior de la pirámide de tal forma que la rosca del porta-lámpara salga por la punta de la pirámide. Tomar la conexión

múltiple y enroscar al resto del sistema por el exterior. Esto dará estructura y soporte a la lámpara (figura G.2. E).

BASE DE LA CÁMARA

- Cortar un cuadrado de papel para construcción de 62 cm². Forrar una cara con papel aluminio.
- Ubicar el centro del cuadrado y en torno a él dibujar un cuadrado de 10 cm; después marcar dos más de forma concéntrica, el primero de 40 cm por lado y el segundo de 60 cm por lado (figura G.2. F).
- Trazar líneas diagonales con el marcador, en la banda que se forma entre el cuadrado 1 y 3. El área marcada señalará la zona donde siempre deberán ser colocados los viales de prueba dentro de la cámara. En esta banda, bajo el diseño antes mencionado, la iluminación será homogénea proporcionando una intensidad luminosa de entre 2 800 y 3 000 luxes.
- El borde del recuadro 3 es el sitio donde la pantalla de la cámara de iluminación deberá ser colocada (figuras G.2. F y G.3. G).

Figura G.1. Preparación de la pantalla de la cámara de iluminación para el ensayo de toxicidad con *Selenastrum capricornutum*

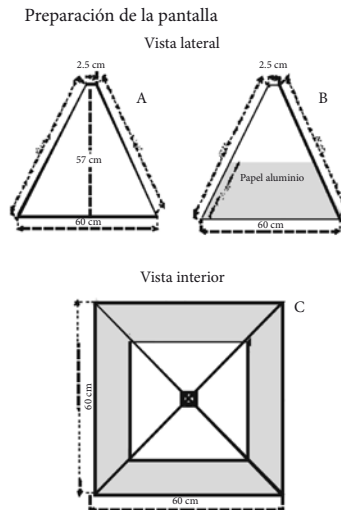
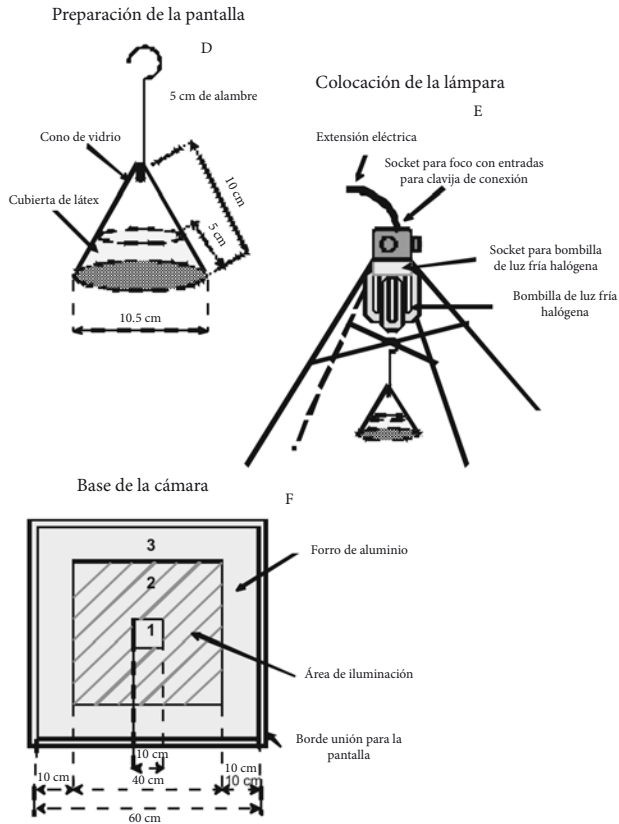


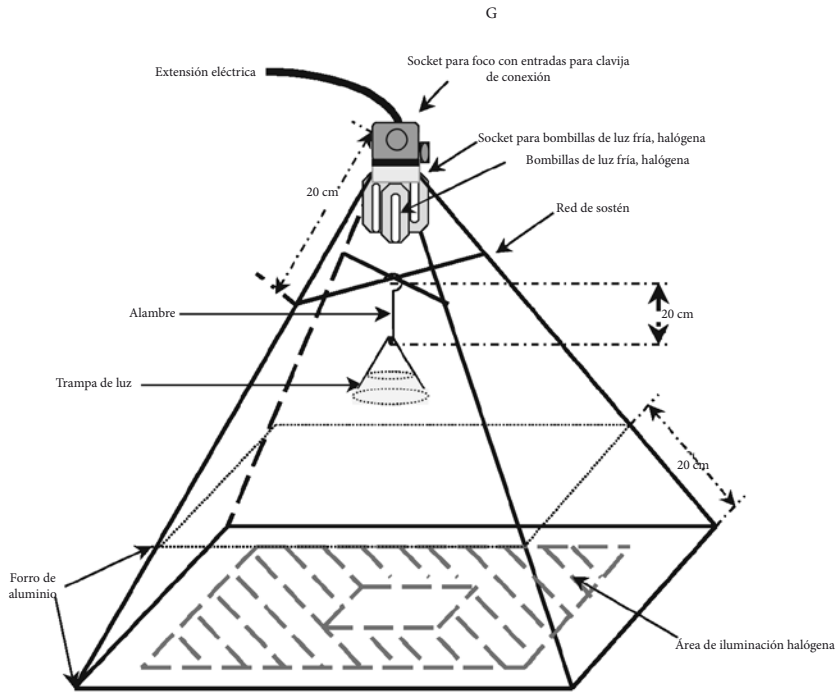
Figura G.2. Colocación de sistema de iluminación en la cámara para el ensayo de toxicidad con *Selenastrum capricornutum*



SUGERENCIAS

Cambiar la lámpara de iluminación de triple barra de forma regular cada 45 días si es que el uso es continuo, o calcule las horas de uso equivalentes. El cambio debe efectuarse ya que el brillo de la lámpara tiende a disminuir con el uso, reduciendo la intensidad luminosa, lo que puede reducir significativamente el crecimiento de las algas durante el desarrollo de pruebas.

Figura G.3. Vista tridimensional de la cámara de iluminación para el ensayo de toxicidad con *Selenastrum capricornutum*



CULTIVO DE MICROALGAS PARA LA ALIMENTACIÓN DE LA ALMEJA CATARINA *ARGOPECTEN VENTRICOSUS*

Alma Socorro Sobrino Figueroa

CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento complementario es útil para el cultivo de las microalgas *Isocrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans*, que se utilizan como alimento de las almejas (Torretera y Tacon, 1989; Díaz-Báez *et al.*, 2004). Para ello se debe seguir los pasos que se detallan a continuación:

Lavar el material que se utilizará para efectuar los cultivos, de acuerdo a lo descrito en el procedimiento complementario de este documento. Generalmente se utilizan recipientes de borosilicato, tales como matraces Erlenmeyer de 500, 1000, 2000 y 4000 mL, matraces Ferenback (1 L) y Carboys (20 L). Para cultivos a gran escala se utilizan contenedores de materiales inertes, como plástico o fibra de vidrio, de volumen variable (50 a 200 L) o bolsas de plástico resistentes.

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

SOLUCIONES DE NUTRIENTES MAYORES

Rotular 3 recipientes de plástico donde se colocarán las soluciones de nutrientes mayores. Las soluciones de NaNO_3 y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ se pueden mezclar y todas se deben almacenar en el refrigerador o cámara fría.

Tabla H.1. Soluciones de nutrientes mayores para el cultivo de *Isocrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans*

Nutrientes traza	Concentración (g/100 mL de agua destilada)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.98
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.2
ZnCl_2	1.05
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.8
$\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.63

SOLUCIÓN FINAL DE NUTRIENTES TRAZA

Disolver 3.15 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ o 4.36 g de EDTA (Na_2) en 900 mL de agua destilada, agregar 1 mL de cada una de las soluciones stock primarias de nutrientes traza y aforar a 1 L, ajustar a pH de 2.0.

Tabla H.2. Soluciones de nutrientes traza para el cultivo de *Isocrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans*

Nutrientes mayores	Concentración (g/100 mL de agua destilada)
NaNO_3	7.5
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5
NH_4Cl	2.65
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	3

SOLUCIÓN DE BIOTINA

Disolver 10 mg de biotina en 96 mL de agua destilada. Esta solución debe hacerse ligeramente ácida (pH = 6 con ácido clorhídrico) antes de esterilizarse en el autoclave. Una vez fría manténgase en un congelador.

SOLUCIÓN DE VITAMINA B₁₂

A partir de cyanocobalamina U.S. de 1000 mg/mL solución inyectable. Tomar 1 mL y aforarlo en 100 mL de agua destilada, acidificar a pH = 6 con ácido clorhídrico. Esterilizar en autoclave, enfriar y congelar.

SOLUCIÓN DE VITAMINAS

Tomar 1 mL de la solución primaria de biotina y 0.1 mL de la solución stock primaria de vitamina B₁₂, aforar a 100 mL con agua destilada y añadir 20 mg de tiamina HCl.

Se pueden preparar ampollas de 2, 5 ó 10 mL y almacenarlas estériles (acidificadas) en el congelador.

CULTIVO Y PROPAGACIÓN DE LAS MICROALGAS

Las cepas se pueden obtener por compra o intercambio con instituciones que cuenten con ceparios de especies marinas (UABCS, UABC, UNISON, CIBNOR, CIAD).

La siembra de las microalgas en el medio de cultivo (F/2) se debe realizar bajo condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar o trabajando cerca de un mechero.

El cultivo se puede iniciar a partir de cepas mantenidas en medio sólido (agar o microesferas de alginato), tomando las células con un asa y esparciéndolas en el medio líquido en un volumen reducido (50 mL). Colocar el medio inoculado a $20 \pm 2^\circ \text{C}$ con iluminación continua superior a 2,000 lux, sin aireación.

A partir de este cultivo inicial y una vez que se tenga un color verde intenso, con una densidad de 800,000 a 1 millón de células/mL, se puede realizar una resiembra a volúmenes mayores (1 a 5 L).

Para volúmenes superiores a 10 L se recomienda inocular entre el 20 a 30% de la cepa en fase estacionaria (200 a 300 mL de cultivo de algas/L de medio de cultivo). Los cultivos se deben mantener $20 \pm 2^\circ \text{C}$, con iluminación

continua superior a 2,000 luxes y cuando se manejan volúmenes mayores a 1 L con aeración permanente moderada.

Una vez que el cultivo alcanza la fase estacionaria (de cinco a siete días), se retira de la cámara de incubación y se deja reposar a 4 °C en el refrigerador o en el interior de un cuarto frío, bajo condiciones de oscuridad de 48 a 72 horas. El cultivo sedimentado es separado del sobrenadante por decantación, para obtener el concentrado de algas que se utilizará en la alimentación de las almejas.

MEDIO F/2 DE GUILLAR

Para preparar el medio F/2 agregar 1 mL de cada una de las soluciones de nutrientes mayores, 1 mL de la solución final de nutrientes traza y 0.5 mL de la solución de vitaminas, por cada litro de agua de mar filtrada (10, 1 µm) y de ser posible irradiada con UV (Stein, 1973).

Las condiciones en las cuales se deben realizar los cultivos se resumen en la tabla H.3.

Tabla H.3. Condiciones recomendadas para el mantenimiento de los cultivos de *Isocrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans*

Intensidad de la luz	2,000 – 4,000 lux
Fotoperíodo	Iluminación continua
Temperatura	15 – 22 °C
Salinidad	36 a 37‰
pH	7 – 9

BIBLIOGRAFÍA

- Díaz-Báez, M. C., Y. Pica Granados y A. Ronco. 2004. Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*. En: G. Castillo (ed.). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IDRC-IMTA, México. pp.52-63. Disponible en: www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html.
- Stein, J. R. 1973. *Handbook of phycolgical methods*. University Press. Cambridge, 448 pp.
- Torrentera, B. L. y A. G. J. Tacon. 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis. FAO. Documento de campo 12. GCP/RLA/075/ITA, Roma. 120 pp.

LOS AUTORES

Guillermina Alcaraz Zubeldia. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.

Maribel Badillo Alemán. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.

Martha Barajas Aceves. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.

Miguel Betancourt Lozano. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán.

Diana Corona Vadillo. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.

Silke Cram Heydrich. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geografía.

María del Carmen Cuevas Díaz. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional-Unidad Zacatenco. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.

María Consuelo Díaz Báez. Universidad Nacional de Colombia, Unidad Académica de Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingeniería.

Félix Espinosa Chávez. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Ronald Ferrera Cerrato. Colegio de Postgraduados.

Gabriela Gaxiola Cortez. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.

Homero Hernández Salgado. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.

Fernando Martínez Jerónimo. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Ania Mendoza Cantú. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT.

Juan Manuel Pedrero Ríos. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Mérida.

Yolanda Pica Granados. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.

Patricia Ramírez Romero. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Cecilia Robles Mendoza. Universidad Nacional Autónoma de México – Facultad de Ciencias.

Refugio Rodríguez Vázquez. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.

Emilio Rojas del Castillo. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Adriana Roldán Martín. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional-Unidad Zacatenco, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.

Isabel Romero Terán. Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental. SEMARNAT.

Alicia Ronco. Universidad Nacional de La Plata, Argentina, Centro de Investigaciones sobre el Medio Ambiente (CIMA).

Ana María Sandoval Villasana. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.

María Cecilia Sobrero. Universidad Nacional de La Plata, Argentina, Centro de Investigaciones sobre el Medio Ambiente (CIMA).

Alma Socorro Sobrino Figueroa. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Gissel Trujillo Domínguez. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.

Raúl Uribe Hernández. Instituto Mexicano del Petróleo, Dirección Ejecutiva de Medio Ambiente y Seguridad.

Cecilia Vanegas Pérez. Universidad Nacional Autónoma de México – Facultad de Ciencias.

Omar Zapata Pérez. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Mérida.

Sebastián Zúñiga Lagunes. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.

ÍNDICE ANALÍTICO

- actividad de deshidrogenasa, ensayo de
 - condiciones recomendadas, 293
 - expresión de resultados, 293
 - material, 292
 - principio, 291
 - procedimiento, 292
 - reactivos, 292
- agua dura reconstituida, preparación de, 19
- algas, cultivo de, 24
- Allium cepa*, almacenamiento de, 34
 - como organismo de prueba, 35
 - control de calidad de, 34
 - elongación de la radícula y el hipocótilo, 285-289
 - inhibición de la germinación, 285-289
 - medio de crecimiento para, 34
- Allium cepa*, ensayo con
 - características requeridas, 286
 - condiciones recomendadas, 39, 288
 - control de calidad de, 35-37
 - desarrollo de, 37
 - equipo, 286
 - expresión de resultados, 39, 287
 - material, 34, 286
 - preparación de diluciones, 37
 - principio, 285
 - procedimiento, 36, 38, 286
 - pruebas definitivas, 287
 - pruebas exploratorias, 286
 - reactivos y soluciones, 34, 285
- Argopecten ventricosus*
 - alimentación con microalgas, 401
 - características de, 191
 - condiciones recomendadas para el mantenimiento de, 197
 - cultivo y mantenimiento de, 19
 - fuentes de, 194
 - obtención de larvas, 195
 - pruebas agudas con larvas de, 197
- Argopecten ventricosus*, ensayo con biomarcadores, 204
 - condiciones recomendadas para las pruebas agudas, 199
 - equipo, 193
 - infraestructura, 192
 - material, 193
 - preparación de material, 197
 - principio, 191
 - procedimiento, 197
 - pruebas agudas con juveniles, 198
 - pruebas de efectos subletales, 200

- Argopecten ventricosus*, ensayo con
(continúa)
reactivos, 194
- Artemia*,
como alimento de camarones penidos,
391-394
como alimento de *Hydra attenuata*,
45
- Artemia* sp., descapsulación de nauplios de
campo de aplicación, 391
equipo, 392
material, 391
procedimiento, 392
reactivos, 392
- aseguramiento de calidad, programa de
calibración de instrumentos y solucio-
nes, 350
calidad de materiales y reactivos, 350
características, 348
cartas de control de calidad, 351
compuestos tóxicos de referencia, 351
evaluación de puntos finales, 359
evaluación de replicabilidad y sensibi-
lidad, 357
muestras duplicadas, 358
preparación de soluciones de control,
355
protocolos de prueba, 348
soluciones de control, 355-357
- bioensayos, clasificación, 10-12
bioensayos de toxicidad, necesidades de la
SEMARNAT, 9
- Brachydanio rerio*,
cultivo y mantenimiento de, 120
fuentes de, 119
- Brachydanio rerio*, ensayo con
aplicación, 115-117
condiciones recomendadas, 125
desarrollo de, 124-125
equipo, 118
expresión de resultados, 126
infraestructura, 117
material, 118
principio, 115
- procedimiento, 124
reactivos, 118
- cámara de iluminación, 395-398
camarones peneidos, ensayo con
cámaras experimentales, 176
características requeridas de los orga-
nismos de prueba, 177
compuestos tóxicos de prueba, 175
condiciones recomendadas, 180
duración, 177
equipo, 171
especies recomendadas, 169
expresión de resultados, 179
material, 171
parámetros físicoquímicos, 176
principio, 169
procedimiento, 176
prueba definitiva, 179
pruebas de intervalo de toxicidad, 178
reactivos, 171
validación de pruebas definitivas, 179
- carpa
como organismos de prueba, 156, 159
cultivo y mantenimiento, 160
fuentes de, 159
limpieza de, 161
- carpa, ensayo con
aclimatación de organismos, 161
calibración de equipo, 161
condiciones recomendadas, 164
criterios para evaluar la respuesta,
163
desarrollo, 162
equipo, 158
expresión de resultados, 163
infraestructura, 157
material, 157
preparación de material, 161
principio, 155
procedimiento, 161
reactivos, 158
reporte, 163
soluciones, 158
validación del método, 164

- cíclidos
véase carpa
- cíclidos, ensayo con
véase carpa, ensayo con
- cladóceros,
características, 100-101
cultivo y mantenimiento, 105
desarrollo, 110-111
medio de cultivo, 110
partenogénesis, 100
- cladóceros, ensayo con
aplicación de, 102
condiciones recomendadas , 110
desarrollo de, 110-112
equipo, 103
especies recomendadas, 99
expresión de resultados , 112
infraestructura, 103
material, 103
obtención de organismos de prueba,
104
preparación, 106-110
principios, 99
procedimiento, 106
reactivos, 104
- conocimientos, intercambio de, 2
- constituyentes tóxicos, extracción de
campo de aplicación, 383
control de calidad, 390
equipo, 384
procedimiento, 383, 385
material, 384
preservación de muestras, 385
reactivos y soluciones, 384
- contaminación
efectos de la, 5
necesidades de investigación en México,
8-9
- contaminantes
efectos de los, 5
investigación de los efectos de los, 6
- cultivo de microalgas, 93-95, 401
- Daphnia magna*
aceptabilidad de resultados, 30
- alimentación, 23
aplicación, 18
condiciones recomendadas para su
cultivo, 22
control de calidad del cultivo, 25
cultivo y mantenimiento, 20
equipo, 20
expresión de resultados, 28
fuentes, 20
limpieza del cultivo, 22
preparación de diluciones, 28
prueba exploratoria, 26
ventajas como organismo de prueba, 17
- Daphnia magna*, ensayo con
aceptabilidad de resultados, 30
aplicación, 18
condiciones recomendadas, 30
equipo, 20
expresión de resultados, 28
material, 18
preparación de diluciones, 28
principio, 17
procedimiento, 26, 29, 31
prueba exploratoria, 26
reactivos y soluciones, 19
- dureza, definición, 366
- dureza, determinación de
campo de aplicación, 366
control de calidad, 369
equipo, 366, 367
expresión de resultados, 369
interferencias, 369
material, 366
medidas de seguridad, 370
procedimiento, 368
reactivos, 367
- ecotoxicología
definición, 6
- efipio
en cladóceros, 102
- Eisenia andrei*
alimentación, 251
características recomendadas, 214
características requeridas, 250, 278

- Eisenia andrei* (continúa)
- condiciones de cultivo, 250
 - control del cultivo, 214
 - cultivo y mantenimiento, 248
 - fuentes, 248
 - medio de cultivo, 248
 - principio, 211
 - prueba de toxicidad en suelos, 233
 - transferencia y manejo, 251
- Eisenia andrei*, ensayo con
- características recomendadas, 214
 - características requeridas, 250, 278
 - control del cultivo, 214
 - cultivo y mantenimiento, 248
- Eisenia andrei*, ensayo de genotoxicidad con compuesto tóxico de referencia, 251
- condiciones recomendadas, 269
 - consideraciones adicionales, 268
 - consideraciones finales, 268
 - desarrollo, 256
 - ensayo cometa, 235, 258
 - equipo, 237
 - expresión de resultados, 266
 - infraestructura, 236
 - material, 237
 - preparación del material, 252
 - preparación de muestras, 253-254
 - principio, 233
 - procedimiento, 252
 - prueba definitiva, 257
 - prueba exploratoria, 256
 - reactivos, 239
 - respuestas medidas, 268
 - suelos, 254
- Eisenia andrei*, ensayo de toxicidad con aplicación de lombrices, 280
- concentración de la sustancia de prueba, 279
 - condiciones, 280
 - condiciones de validación, 281
 - condiciones recomendadas, 282
 - duración, 280
 - expresión de de resultados, 281
 - límites, 281
 - preparación de lombrices, 279
 - preparación del suelo, 279
 - procedimiento, 279
 - reporte, 281
 - suelos a utilizar, 277
 - sustancia de referencia, 277
- Eisenia andrei*, ensayo de toxicidad aguda con,
- condiciones y recomendaciones, 222
 - equipo, 213, 277
 - expresión de resultados, 220
 - procedimiento, 217, 218
 - material, 213
 - muestra de suelo, 213
 - preparación de muestras, 215
 - principio, 211, 212
 - procedimiento, 217-220
 - prueba de contacto en papel filtro, 217
 - prueba de suelo artificial, 219
 - prueba de suelo contaminado, 219
 - reactivos y soluciones, 213, 277
 - reporte, 221
 - suelo artificial, 213
 - suelos a utilizar, 277
 - sustancia de referencia, 277
- Eisenia andrei*, ensayo de toxicidad subcrónica con
- aplicación de lombrices, 280
 - concentración de la sustancia de prueba, 279
 - condiciones, 280
 - condiciones de validación, 281
 - condiciones recomendadas, 282
 - duración, 280
 - equipo, 277
 - expresión de de resultados, 281
 - infraestructura, 276
 - límites de prueba, 281
 - material, 276-277
 - preparación de lombrices, 279
 - preparación del suelo, 279
 - principio, 275-276
 - procedimiento, 279
 - reactivos y soluciones, 277
 - reporte, 281
 - suelos a utilizar, 277
 - sustancia de referencia, 277
- Eisenia foetida*, ensayo con equipo, 226

- material, 226
principio, 225
- Eisenia foetida*, ensayo de citotoxicidad con
condiciones recomendadas, 230
cuenta celular, 228
determinación de viabilidad, 228
equipo, 226
expresión de resultados, 229
obtención de celomocitos, 227
organismos de prueba, 227
procedimiento, 227
prueba con Rojo Neutro, 228
reactivos, 226
- elutriados, definición, 371
elutriados, generación de
campo de aplicación, 371
equipo, 373
evaporación, 375
expresión de resultados, 379-380
extracción de Soxhlet, 374
material, 372
trasvasado, 375
precauciones, 378
procedimiento, 373, 377
reactivos, 373
- ensayo cometa
principio, 235
procedimiento, 258
- ensayos de toxicidad
aseguramiento y control de calidad,
347
campo de aplicación, 347, 361
factores involucrados, 347
lavado de material, 361
procedimiento, 361
programa, 348
- estudios de toxicidad, con animales, 6
- extracción de constituyentes tóxicos
véase constituyentes tóxicos
- extractos orgánicos, definición, 371
- extractos orgánicos, generación de
véase elutriados, generación de
- generación de elutriados
véase elutriados
- generación de extractos orgánicos
véase extractos orgánicos
- germinación
efecto de la inhibición en la, 55, 56
- Glycine max*
véase *Allium cepa*
- Glycine max*, ensayo con
véase *Allium cepa*, ensayo con
- Hydra attenuata*
alimentación y limpieza de, 44
aplicación de, 42
características, 41
como organismo de prueba, 42
condiciones recomendadas para el
cultivo de, 48
control del cultivo, 46
cultivo y mantenimiento, 44
medio de cultivo, 43
- Hydra attenuata*, ensayo con
condiciones recomendadas, 52
expresión de resultados, 51
medio de cultivo, 43
preparación de diluciones, 49
preparación de la muestra, 49
procedimiento, 49
principio, 41-42
reactivos y soluciones, 43
sistema de prueba, 50
transferencia de organismos, 50
- Lactuca sativa*
efectos sobre la elongación de la
radícula e hipocotilo, 63
efectos sobre la germinación de, 62
obtención y conservación de semillas
de, 58
viabilidad de semillas de, 58
ventajas como organismo de prueba, 56
viabilidad de semillas de, 58
- Lactuca sativa*, ensayo con,
aceptabilidad de resultados, 65
condiciones recomendadas para ensayo
con, 61
control de calidad, 60
equipo, 58

- Lactuca sativa*, ensayo con,
 expresión de resultados, 64
 interpretación de resultados, 65
 material, 57
 medida de puntos finales, 61
 principio, 55-57
 procedimiento, 59-62
 reactivos, 58
- Latinoamérica, producción científica, 1
- Litopenaeus setiferus*
 aclimatación y mantenimiento, 172
 alimentación de, 176
 características, 169
 fuentes, 169
- Litopenaeus vannamei*
 véase *Litopenaeus setiferus*
- lombrices, como organismos de prueba,
 234
- lombriz de tierra
 véase *Eisenia andrei*
- medio ambiente, preocupación pública
 por el, 1
- microalgas clorofíceas
 aplicación, 90
 cultivo y mantenimiento, 93
 como organismo de prueba, 89-90
 fuentes, 93
 medio de cultivo, 94-95
 principio como organismo de prueba,
 89-90
- microalgas clorofíceas, ensayo con
 condiciones recomendadas, 97
 desarrollo, 96
 equipo, 92
 especies recomendadas, 90
 expresión de resultados, 96
 infraestructura, 91
 material, 92
 preparación de material, 95
 principio, 89
 procedimiento, 95
 reactivos, 92
- nauplios de *Artemia* sp., descapsulación de
 véase *Artemia* sp.
- nitrógeno
 reactivos y soluciones, 295
 transformación, 294
- nitrógeno, prueba de tasa de mineralización
 de
 condiciones recomendadas, 300
 determinación de amonio, 298
 determinación de nitrato, 299
 determinación de nitritos, 299
 expresión de resultados, 300
 extracción de muestras, 298
 preparación de muestras, 298
 principio, 294
 procedimiento, 298
- organismos de prueba
 peces como, 117
 plantas como, 56
- Panagrellus redivivus*
 características, 139-140
 control del cultivo, 146
 cultivo, 146
 cultivo masivo, 145
- Panagrellus redivivus*, ensayo con
 aceptabilidad de los resultados, 152
 aplicación, 140
 desarrollo, 147
 equipo, 141
 expresión de resultados, 149
 material, 140
 preparación de diluciones, 147
 principio, 139
 procedimiento, 147, 148
 reactivos y soluciones, 142
- peces, como organismos de prueba, 117
- pH
 definición, 363
- pH, medición de,
 campo de aplicación, 363

- control de calidad, 365
- equipo, 364
- interferencias, 366
- material, 364
- prevención de la contaminación, 366
- procedimiento, 365
- reactivos, 364
- Poecilia reticulata*
 - véase *Brachydanio rerio*
- Poecilia reticulata*, ensayo con
 - véase *Brachydanio rerio*, ensayo con
- producción científica en América Latina, 1
- pruebas biológicas, criterios de selección, 11
- pruebas de laboratorio, utilidad de las, 7-8
- pruebas de toxicidad,
 - batería, 8
 - características, 7
 - clasificación de, 11-12
 - criterios de selección, 11
 - definición de, 6
 - desarrollo y evolución, 2
 - indicadores, 6
 - química ambiental y ecotoxicología, 2
 - utilidad, 7
- pruebas exploratorias o de tamiz
 - procedimiento para, 286
- pulgas de agua
 - véase cladóceros
- química ambiental y ecotoxicología
 - conexión entre, 2
- radícula, elongación en la, 55, 56
- Salmonella typhimurim*
 - prueba de Ames, 319
 - aplicación de, 70
 - características de, 69
 - centro de cultivo, 76
 - manipulación, 332
- Salmonella typhimurim*, ensayo con
 - análisis de resultados, 81
 - condiciones recomendadas, 340
 - control de toxicidad, 334
 - control de viabilidad, 334
 - controles negativos, 333
 - controles positivos, 334
 - desarrollo de, 335
 - equipo, 322
 - evaluación, 339
 - expresión de resultados, 337
 - interferencias y manejo de muestras, 331
 - manejo de la muestra, 332
 - manipulación, 332
 - material, 320
 - precauciones, 331
 - preparación de inóculos, 332
 - preparación de mezcla S9, 333
 - principio, 319
 - procedimiento, 331, 338
 - reactivos y soluciones, 322
 - recomendaciones, 340
 - reporte, 340
 - condiciones recomendadas, 82
 - conteo de algas, 82
- Selenastrum capricornutum*
 - características, 69-71
 - como organismo de prueba, 75-76
 - control de calidad, 85
 - cultivo y propagación, 75
 - inoculación en medio sólido, 78
 - medio de cultivo, 72
 - medio sólido para su mantenimiento, 75
 - reactivación, 77
- Selenastrum subcapitata*, ensayo con
 - análisis de resultados, 81
 - aplicación de, 70
 - condiciones recomendadas, 82
 - conteo de algas, 82
 - determinación de la densidad celular, 84
 - dilución de muestra, 80
 - equipo, 71
 - material, 71
 - preparación de inoculación, 78
 - principio, 69
 - procedimiento, 80, 81, 83

Selenastrum subcapitata, ensayo con
(continúa)

reactivos y soluciones, 72

semillas de cebolla

véase *Allium sepa*

semillas de soya

véase *Glycine max*

semillas, ensayos con, 55

tilapia

véase carpa

tilapia, ensayo con

véase carpa, ensayo con

unidades arbitrarias, cálculo de, 267

Vibrio fischeri

características, 307

fuentes, manejo y transporte, 310

reactivación, 311

Vibrio fischeri, ensayo con

captura de datos, 314

condiciones recomendadas, 315

equipo, 309

expresión de resultados, 315

inoculación y lectura, 314

interferencias, 316

material, 309

preparación de diluciones, 313

principio, 307

procedimiento, 310

reactivación, 310

reactivos, 310

Xiphophorus montezumae,

aclimatación y mantenimiento de, 129

alimentación de, 134

características, 127-128

fuentes, 129

Xiphophorus montezumae, ensayo con

cámaras experimentales, 133

compuestos tóxicos, 132

condiciones recomendadas, 136

duración, 134

equipo, 129

expresión de resultados, 137

material para ensayo, 128-129

parámetros fisicoquímicos, 133

principio, 127

procedimiento, 133

prueba definitiva, 136

pruebas de intervalo de toxicidad, 135

reactivos, 129

validación de pruebas, 137

Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo.

La experiencia en México, compilado por Patricia Ramírez Romero
y Ania Mendoza Cantú, se terminó de imprimir y encuadernar en los talleres
de Impresora y Encuadernadora Progreso, S.A. de C.V. (IEPSA),
Calzada de San Lorenzo 244, 09830, México, D.F., durante el mes de julio de 2008.

La coordinación editorial y la composición tipográfica
estuvieron a cargo de la Dirección de Publicaciones del INE

Se tiraron 600 ejemplares