

ENSAYOS TOXICOLÓGICOS Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE CALIDAD DE AGUAS

ESTANDARIZACIÓN, INTERCALIBRACIÓN,
RESULTADOS Y APLICACIONES



Editado por Gabriela Castillo

**ENSAYOS TOXICOLÓGICOS Y MÉTODOS
DE EVALUACIÓN DE CALIDAD
DE AGUAS**

**ESTANDARIZACIÓN, INTERCALIBRACIÓN,
RESULTADOS Y APLICACIONES**

This page intentionally left blank

Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas

Estandarización, intercalibración,
resultados y aplicaciones

Gabriela Castillo Morales, editora

Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo
Ottawa • Dakar • El Cairo • Montevideo • Nairobi • Nueva Delhi • Singapur

Instituto Mexicano de Tecnología del Agua

615.907 Castillo Morales, Gabriela (ed.)
C13 *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones / Gabriela Castillo (ed.).* - México: IMTA, 2004.
Canadá: IDRC, 2004.
189 pp. 22.5 x 15.5 cm
Incluye bibliografía
ISBN 968-5536-33-3
1. Toxicología 2. Calidad del agua 3. Bioensayos

Coordinación editorial:
Instituto Mexicano de Tecnología del Agua,
Coordinación de Tecnología de Comunicación,
Participación e Información,
Subcoordinación de Editorial y Gráfica.

Coordinación técnica:
Yolanda Pica Granados,
Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.

Corrección y cuidado de edición:
Antonio Requejo del Blanco.
Helena Rivas López.

Diagramación:
Luisa Guadalupe Ramírez Martínez.

Diseño de portada:
Óscar Alonso Barrón.

Primera edición: 2004.

D.R. © Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo
PO Box 8500, Ottawa, ON, Canada K1G 3H9
info@idrc.ca / www.idrc.ca

ISBN 968-5536-33-3

Todos los derechos reservados. Ni la totalidad ni parte de la presente publicación puede ser reproducida, almacenada en sistemas de recuperación de información o transmitida bajo cualquier forma o por ningún medio, sea electrónico, mecánico, de fotocopiado o grabación, sin la previa autorización, por escrito, del editor.
El libro puede ser consultado en línea: www.idrc.ca

Impreso en México - *Printed in Mexico*

México-2004

Editora

Gabriela Castillo Morales
*Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas,
Universidad de Chile,
Santiago, Chile.*

Autores colaboradores

María Consuelo Díaz Báez
*Facultad de Ingeniería,
Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, Colombia.*

Yolanda Pica Granados
*Instituto Mexicano de Tecnología del Agua,
Jiutepec, Morelos, México.*

Alicia Ronco, Cecilia Sobrero y Gustavo Bulus Rossini
*Centro de Investigaciones del Medio Ambiente,
Universidad Nacional de La Plata,
La Plata, Argentina.*

Gabriela Feola
*Centro Internacional de Investigaciones
para el Desarrollo,
Montevideo, Uruguay.*

Gilles Forget
*Centro Internacional de Investigaciones
para el Desarrollo,
Dakar, Senegal.*

Andrés Sánchez-Bain
*Centro Internacional de Investigaciones
para el Desarrollo,
Ottawa, Canadá.*

AGRADECIMIENTOS

Los autores queremos manifestar nuestro agradecimiento a la ingeniera industrial química Gissel Trujillo Domínguez y al biólogo Homero Hernández Salgado, del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, por sus contribuciones técnicas dirigidas a la mejora de protocolos de pruebas y a minimizar la variabilidad de los resultados que de ellos se obtienen, por su invaluable ayuda en instrumentar el sistema de aseguramiento de la calidad en el que estos procedimientos se encuentran inmersos, así como por su impecable desempeño analítico en el manejo de las pruebas de toxicidad incluidas en las actividades que México realizó dentro del programa *WaterTox*.

También, al mismo biólogo Homero Hernández Salgado, por contribuir con el diseño y calibración de la cámara de iluminación casera presentada en el anexo del subcapítulo 4.5 de este libro, cuya aplicación será de enorme utilidad para los usuarios, ya que asegura una distribución homogénea de la luz emitida y la obtención de resultados analíticamente más consistentes para la prueba con *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*).

A la bióloga Adriana Espinosa, asistente de investigación en la Facultad de Ingeniería, de la Universidad Nacional de Colombia, por su trabajo en el montaje y estandarización de las pruebas, así como por su colaboración en la revisión de los manuscritos.

Asimismo, queremos extender nuestro agradecimiento al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, a la Universidad Nacional de La Plata, a la Universidad de Chile y a la Universidad Nacional de Colombia, por el apoyo e interés mostrado en el desarrollo del programa *WaterTox* y en la generación de la presente obra.

De manera especial, agradecemos al Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID, IDRC, por sus siglas en inglés) el apoyo financiero brindado a los grupos de la red *WaterTox*, que permitió explorar y consolidar nuestro trabajo en el campo de la toxicología acuática, implementar la infraestructura necesaria para continuar con el desarrollo de esta línea de investigación y, en particular, por proveer espacios de intercambio de conocimientos que hicieron posible constituir una red internacional de colaboradores con una filosofía de trabajo que aún persiste y que continuará vigente.

Por último, gracias a todos nuestros queridos colegas.

CONTENIDO

PRESENTACIÓN	11
Gilles Forget y Federico Burone	
PREFACIO	15
Gabriela Castillo	
1 CONCEPTOS GENERALES	17
Alicia Ronco, María Consuelo Díaz Báez y Yolanda Pica Granados	
1.1 <i>Marco conceptual</i>	17
1.2 <i>Aplicación de los ensayos de toxicidad al diagnóstico ambiental de efectos biológicos</i>	18
1.3 <i>Definiciones</i>	22
Referencias	22
2 MONITOREO AMBIENTAL	23
Alicia Ronco, María Consuelo Díaz Báez y Yolanda Pica Granados	
2.1 <i>Conceptos generales</i>	23
2.2 <i>Muestreo</i>	23
2.2.1 <i>Obtención de muestras, traslado y conservación</i>	25
2.2.2 <i>Almacenamiento de muestras</i>	26
2.2.3 <i>Acondicionamiento de las muestras para el ensayo</i>	27
2.3 <i>Tratamiento de las muestras durante los ensayos</i>	28
2.4 <i>Equipamiento de muestreo</i>	30
Referencias	30
3 ELEMENTOS BÁSICOS REQUERIDOS PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE PRUEBAS EN ANÁLISIS RUTINARIOS	31
Alicia Ronco, María Consuelo Díaz Báez y Yolanda Pica Granados	
3.1 <i>Requerimientos generales</i>	31
3.2 <i>Selección de especies de prueba</i>	31
3.3 <i>Suministros básicos</i>	32
3.4 <i>Cronograma de actividades y listado general</i>	33
3.5 <i>Formatos para la recolección de resultados</i>	34
3.6 <i>Cuadernos diarios</i>	34
3.7 <i>Preparación del material de vidrio u otros recipientes de ensayo</i>	34
Referencias	35
Anexos	36
4 PROTOCOLOS DE ENSAYO	47
4.1 <i>Ensayo de toxicidad aguda con Allium cepa L mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces de cebolla (Fiskesjö, G., 1997)</i>	47
María Consuelo Díaz Báez, Alicia Ronco y Yolanda Pica Granados	

4.1.1	Principio	47
4.1.2	Reactivos y materiales	47
4.1.3	Procedimiento para el desarrollo de la prueba	49
4.1.4	Expresión de resultados	51
Referencias		52
4.2	<i>Ensayo de toxicidad aguda con Daphnia magna (Dutka, B.J., 1989; US EPA, 1992)</i>	52
María Consuelo Díaz Báez, Yolanda Pica Granados y Alicia Ronco		
4.2.1	Principio	52
4.2.2	Materiales, reactivos y equipos	53
4.2.3	Cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba	54
4.2.4	Procedimiento para el desarrollo de la prueba	60
4.2.5	Expresión de los resultados	62
Referencias		63
4.3.	<i>Ensayo de toxicidad aguda (efectos letales y subletales) con Hydra attenuata (Trottier, S., Blaise, C., Kusui T., 1997; Johnson, E.M., et al., 1990)</i>	64
Yolanda Pica Granados, Alicia Ronco y María Consuelo Díaz Báez		
4.3.1	Principio	64
4.3.2	Reactivos y soluciones	65
4.3.3	Cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba	66
4.3.4	Procedimiento para el desarrollo de la prueba	68
4.3.5	Expresión de los resultados	70
Referencias		71
4.4	<i>Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (Lactuca sativa L)</i>	71
María Cecilia Sobrero y Alicia Ronco		
4.4.1	Principio	71
4.4.2	Reactivos y materiales	73
4.4.3	Procedimiento para el desarrollo de la prueba	74
4.4.4	Expresión de los resultados	78
4.4.5	Interpretación de los resultados	79
Referencias		79
4.5	<i>Ensayo de toxicidad crónica con Selenastrum capricornutum (Pseudokirchneriella subcapitata) método de enumeración celular basado en el uso del hemocitómetro Neubauer (Blaise et al., 2000)</i>	80
Yolanda Pica Granados, Alicia Ronco y María Consuelo Díaz Báez		
4.5.1	Principio	80
4.5.2	Reactivos, soluciones y cultivo de los organismos de prueba	81
4.5.3	Materiales y equipos	85
4.5.4	Procedimiento para el desarrollo de la prueba	86
4.5.5	Análisis de datos	89
4.5.6	Conteo con la cámara de Neubauer	90
Referencias		92
Anexo		93

5 MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS DE TOXICIDAD	99
María Consuelo Díaz Báez, Gustavo Daniel Bulus Rossini y Yolanda Pica Granados	
5.1 <i>Introducción</i>	99
5.2 <i>Pruebas de toxicidad</i>	100
5.3 <i>Tipos de pruebas o bioensayos</i>	101
5.4 <i>Métodos estadísticos</i>	102
5.4.1 Establecimiento de una relación dosis-respuesta	104
Análisis de regresión y análisis Probit	
Método de Litchfield-Wilcoxon	
Método de Sperman-Karber	
Método gráfico	
5.4.2. Pruebas para evaluar la diferencia entre organismos expuestos a distintas dosis	110
Referencias	110
Anexos	112
6 ASEGURAMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD DE BIOENSAYOS	125
María Consuelo Díaz Báez, Cecilia Sobrero y Yolanda Pica Granados	
6.1 <i>Introducción</i>	125
6.2 <i>Programas de aseguramiento de calidad</i>	125
6.2.1 Protocolos de prueba	126
6.2.2 Calibración de instrumentos y soluciones en el laboratorio	127
6.2.3 Materiales y reactivos del laboratorio	127
6.2.4 Tóxicos de referencia	127
6.2.5 Cartas de control de calidad	128
6.3 <i>Pruebas de toxicidad</i>	131
6.3.1 <i>Allium cepa</i>	131
6.3.2 <i>Lactuca sativa</i>	131
6.3.3 <i>Hydra attenuata</i>	132
6.3.4 <i>Daphnia magna</i>	134
6.3.5 <i>Selenastrum capricornutum</i>	136
6.4 <i>Preparación de soluciones de control</i>	137
6.5 <i>Replicabilidad y sensibilidad</i>	138
6.6 <i>Muestras duplicadas</i>	139
6.7 <i>Puntos finales ($CI_{50}/CE_{50}/CI_{50}$, NOEC, LOEC)</i>	139
Referencias	140
7 INTERPRETACIÓN Y MANEJO DE RESULTADOS	141
Alicia Ronco y María Consuelo Díaz Báez	
7.1 <i>Interpretación de datos toxicológicos</i>	141
7.2 <i>Validación a campo</i>	141
7.3 <i>Extrapolación de resultados de toxicidad</i>	142
7.4 <i>Unidades de toxicidad y emisiones tóxicas</i>	143
7.5 <i>Estrategia del “peso de la evidencia”</i>	144

7.6	<i>Índices de toxicidad</i>	144
7.7	<i>Relaciones estructura actividad (SAR)</i>	145
7.8	<i>Datos problemáticos</i>	145
7.9	<i>Evaluación de la toxicidad de efluentes</i>	146
7.10	<i>Toxicidad de aguas superficiales, subterráneas y sedimentos</i>	147
Referencias		148
8	TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA	151
8.1	<i>Experiencias de la Red Internacional WaterTox</i>	151
Gilles Forget y Andrés Sánchez		
8.1.1	Introducción	151
8.1.2	El comienzo	152
8.1.3	Creación de la red <i>WaterTox</i>	153
8.1.4	Retos y problemas en la coordinación de una red internacional	156
8.1.5	Cómo resultó en la práctica	160
8.1.6	Asegurando la transferencia tecnológica	161
8.1.7	Conclusiones	162
Referencias		163
8.2	<i>Transferencia tecnológica a municipios de América Latina</i>	164
Gabriela Feola y Andrés Sánchez		
8.2.1	Introducción	164
8.2.2	Actividades desarrolladas	166
8.2.3	Resultados y discusión	169
8.2.4	Conclusiones	174
8.2.5	Consolidación de una Red Interinstitucional de Bioensayos en Uruguay	175
Referencias		177
ANEXO FOTOGRÁFICO		179

PRESENTACIÓN

Un agua clara y potable es una necesidad humana básica; sin embargo, el acceso a ella continúa siendo una gran dificultad para muchas comunidades de países en desarrollo. La contaminación de agua por organismos patógenos constituye todavía una fuente de enfermedades importante en estos países, un gran número de poblaciones se enfrenta, además, con una contaminación química creciente proveniente del uso de agroquímicos, actividades industriales y fuentes domésticas. A pesar de este panorama, en las décadas pasadas se ha trabajado intensamente en el desarrollo y validación de diversos métodos de control microbiológico de agua, y varias técnicas han sido adaptadas para uso a nivel de comunidad de manera sustentable. Lamentablemente, los esfuerzos realizados en torno a la introducción de ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de agua concernientes a la contaminación química no han sido suficientes hasta el momento.

El Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo/*International Development Research Centre* (IDRC) emprendió en 1997, un trabajo orientado a la creación de la red internacional *WaterTox*. La red tenía como propósito evaluar una serie de ensayos de toxicidad que pudieran ser integrados en una batería mínima de pruebas para evaluar la contaminación química del agua. Aunque muchas pruebas de toxicidad existían desde hacía muchos años, este fue un primer intento a escala internacional para incorporar varias de las pruebas más prometedoras en una batería integrada y estandarizada. Se pretendía además, evaluar su capacidad para detectar la presencia de diferentes contaminantes tóxicos, así como validar su uso. Una de las primeras preguntas que surgieron cuando se planteó el proyecto fue: ¿quién podría llevar a cabo esta validación? Dado que el objetivo era obtener una herramienta de evaluación para uso en países en desarrollo, quién mejor para efectuar esta validación que científicos que trabajan en estos países. Así, la red *WaterTox* se constituyó con especialistas de Argentina, Chile, Colombia, Costa Rica, India y México, y, posteriormente, con colaboradores de Canadá y Ucrania.

Considero un gran honor que cuatro de las colaboradoras latinoamericanas de la red *WaterTox* me hayan pedido escribir la presentación del presente libro junto con mi colega Federico Burone. En las páginas siguientes, Alicia, Gabriela, María Consuelo, Yolanda y colaboradores comparten sus experiencias sobre experimentos y actividades de validación y calibración con los ensayos de toxicidad más prometedores que constituyeron la batería *WaterTox*. Incluyen también una sección en el libro que recapitula diversas actividades de disseminación y adaptación emprendidas para llevar esta herramienta al terreno. La publicación de este libro es una iniciativa importante que debe contribuir ampliamente a difundir este concepto

en el mundo hispano. Como todo lo que hacen, el libro ha sido cuidadosamente preparado y claramente escrito. Representa un abecedario óptimo para cualquier autoridad de control ambiental que desee efectuar pruebas de toxicidad en muestras ambientales de aguas. Deseo expresar mi gratitud a ellas por cumplir este compromiso y hacerme parte del mismo.

Gilles Forget
Director Regional
África Central y Occidental
IDRC-Canadá
Dakar, Senegal, 2003.

PRESENTACIÓN

Apoyar la mejora en la producción y el acceso a conocimientos para el diseño de acciones preventivas o de soluciones a los problemas del desarrollo humano representa el sentido primario de existencia del IDRC. La experiencia desarrollada a través de la red *WaterTox* y documentada en esta publicación, ejemplifica la labor del Centro avanzando gradualmente, aprendiendo junto con los científicos a quienes apoya y facilitando la necesaria conjunción de esfuerzos sistémicos.

De esta forma, y en una primera fase, un grupo de investigadores altamente calificados trabajando con los medios adecuados en distintas realidades socioeconómicas, lograron identificar y estandarizar una batería de bioensayos. Los ensayos fueron convertidos posteriormente en tecnologías destinadas a identificar posibles riesgos de contaminación química en agua y, con ello, también en instrumentos idóneos para prevenir en forma temprana posibles efectos sobre la salud de los ecosistemas y de las personas que de ellos dependen.

Esta publicación muestra los logros de otro componente del proceso propuesto por el conjunto de investigadores de la red *WaterTox*, destinado a analizar su adaptación a diversas realidades territoriales e institucionales en la región de América Latina y el Caribe. Para ello, la red de investigadores se amplió, dando cabida a un conjunto de instituciones e investigadores interesados en colaborar con la aplicación de estos ensayos, con fines de control más local de la calidad del agua, en el ámbito de responsabilidad municipal.

En años recientes, los gobiernos municipales de América Latina y el Caribe han ido asumiendo un conjunto de responsabilidades como son la gestión de la calidad de los servicios ambientales y de los recursos naturales, dentro de su ámbito de administración e influencia. La mayoría de estos gobiernos carece de la capacidad o de planes para monitorear sistemáticamente la calidad de estos bienes y, con ello, intervenir en forma preventiva o ante los primeros indicios de degradación de los ecosistemas o de riesgo para la salud humana. En este sentido, el IDRC y la red *WaterTox* consideraron de gran importancia la posibilidad de disponer de una tecnología que permitiera el monitoreo frecuente de diversas zonas dentro de territorios municipales, así como la detección temprana de posibles riesgos, favoreciendo, de esta manera, el mejor cumplimiento de las responsabilidades municipales y el uso eficiente de recursos técnicos y financieros que con frecuencia son escasos.

Como muestran los resultados de los casos que se documentan en esta publicación, los bioindicadores desarrollados por la red *WaterTox* han permitido avanzar posibilitando en los gobiernos municipales el análisis y la toma de decisiones sobre

dónde y cuándo es necesario realizar un esfuerzo de monitoreo y utilizar más adecuadamente el conjunto de recursos disponibles.

Al igual que mi colega Gilles Forget, verdadero líder intelectual y gestor de esta empresa de innovación tecnológica, deseo expresar mi gratitud y reconocimiento a los integrantes de la red *WaterTox*, que hicieron posible llegar a esta fase de innovación social consolidada. Asimismo, deseo extender mi más sincero reconocimiento a la invaluable labor de los colegas de los programas del IDRC: Enfoques Ecosistémicos en Salud Humana (*EcoHealth*) y Secretariado de Manejo del Medio Ambiente para América Latina y el Caribe (Sema). Su papel en las diversas fases de desarrollo tecnológico de adaptación y desarrollo institucional, representó un factor determinante, al facilitar la generación y posterior sustentación autónoma de una verdadera red de conocimientos en la instancia municipal.

Federico Burone
Director Regional
América Latina y el Caribe
IDRC-Canadá
Montevideo, Uruguay, 2003.

PREFACIO

Aunque varios países de América Latina cuentan con reglamentaciones sobre protección del ambiente, en muchos de ellos la capacidad de gestión institucional no ha sido efectiva. El énfasis en el control de los residuos se ha abocado principalmente a la contaminación orgánica y de organismos patógenos, mientras que la problemática de la descarga de compuestos tóxicos y manejo de los residuos peligrosos recién comienza a ser considerada. Una de las causales de esta falencia se relaciona con la falta de infraestructura y experiencia necesarias para la detección de contaminantes tóxicos complejos que, de una u otra forma, pueden generar riesgos para la salud humana y los ecosistemas naturales.

En la actualidad, se reconoce que la caracterización y medición de los tóxicos o componentes de los residuos peligrosos por separado no es suficiente para asegurar la ausencia de efectos indeseables, puesto que tanto la mezcla de los residuos como posibles transformaciones en el ambiente pueden modificar su efecto nocivo. De ahí que el uso de ensayos biológicos esté siendo considerado cada vez con mayor intensidad para la evaluación de la toxicidad global de estos contaminantes.

Históricamente, la utilización de métodos biológicos para la detección de sustancias nocivas o peligrosas se registra por primera vez a principios del siglo XX. Hacia 1940 se introdujo el uso de bioensayos con peces y durante los años cincuenta se inician las pruebas con invertebrados y algas. El concepto de bioensayo deriva de la toxicología clásica, el cual ha sido adaptado y aplicado al diagnóstico ambiental, considerándose como un complemento a la caracterización físico-química convencional. Las pruebas de toxicidad constituyen una herramienta eficaz para la predicción de niveles de concentración de compuestos tóxicos, en los que mediante la analítica clásica no se logra obtener efectos observables, extendiéndose estas evaluaciones al ámbito de poblaciones, comunidades o ecosistemas para la identificación de elementos biológicos en riesgo.

Dentro de este contexto, el Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo de Canadá —que desde la instauración de la Década del Agua y Saneamiento por las Naciones Unidas (1980) venía desarrollando importantes aportes a la evaluación y control de la calidad del agua— convocó en 1996 a una reunión internacional de expertos para examinar ensayos de toxicidad simples, de bajo costo, factibles de conformar una batería de bioensayos sustentable para la evaluación de toxicidad de aguas de consumo humano, accesible a países en desarrollo. Otro importante aspecto a considerar fue que el conjunto de pruebas permitiera realizar monitoreos rutinarios en laboratorios con equipamiento básico e insumos mínimos.

Como resultado de estas actividades se creó la red internacional *WaterTox* (1997) formada por instituciones de ocho países (Argentina, Canadá, Chile, Colombia, Costa Rica, India, México y Ucrania), lográndose los objetivos mediante el desarrollo

de un programa de intercalibración para la validación de una batería de ensayos a través de muestras ciegas, y su posterior aplicación en muestras ambientales.

El presente documento es el resultado del esfuerzo conjunto de investigadores latinoamericanos involucrados en el proyecto, cuyo objetivo es contribuir al desarrollo de estudios ecotoxicológicos utilizando especies de diferentes niveles tróficos, en particular organismos de agua dulce. En él se incluyen conceptos generales y definiciones básicas sobre los ensayos de toxicidad aplicados para aguas dulces; procedimientos de muestreo, almacenamiento y tratamiento de las muestras para bioensayos, y una detallada descripción de procedimientos estandarizados para la evaluación de toxicidad de sustancias químicas puras, efluentes, aguas naturales, superficiales, subterráneas y sedimentos. Las metodologías descritas corresponden a ensayos para determinar efectos agudos letales y subletales con los organismos de prueba *Daphnia magna* e *Hydra attenuata*, efectos fitotóxicos subletales agudos con *Allium cepa* L y *Lactuca sativa*, y efectos crónicos con el alga *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*).

Además, se incluyen directrices para la implementación de un laboratorio de bioensayos básico, considerando procedimientos para asegurar las condiciones fisiológicas o de aclimatación de los organismos que requieren ser cultivados y/o mantenidos *in situ*, o adquiridos desde terceros, aplicando buenas prácticas de laboratorio y un riguroso control de calidad analítico; esto, para lograr intervalos de sensibilidad propios y reproducibles para cada organismo en particular. Todo ello hecho con la intención de promover la participación de programas conjuntos de intercalibración y validación de las pruebas en el ámbito local o regional.

Igualmente, se presentan procedimientos estadísticos utilizados en pruebas de toxicidad, de forma tal que este libro provea una guía sobre las alternativas de análisis estadístico que requieren estos ensayos. Finalmente, se presentan experiencias sobre transferencia de tecnologías entre la red *WaterTox* y otros proyectos relacionados con calidad de aguas, financiados por el Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo.

Los autores de este documento están conscientes de que la utilización rutinaria de estos ensayos permitirá realizar una continua revisión de los mismos, por lo cual se espera que en el futuro se realicen modificaciones y actualizaciones mediante nuevas ediciones.

La preparación y edición de este libro han sido posibles gracias al CIID, a través del Programa Enfoques Ecosistémicos en Salud Humana, Ottawa, Canadá, y el Secretariado de Manejo del Medio Ambiente, América Latina y el Caribe. Nuestro agradecimiento para los representantes del CIID, Gilles Forget y Andrés Sánchez, quienes en todo momento otorgaron una favorable acogida a la materialización de esta iniciativa. Extendemos nuestra gratitud a los científicos del *National Water Research Institute* (Burlington, Ontario) y del *Centre Saint-Laurent* (Montreal, Quebec) de *Environnement Canada*, doctores Barney J. Dutka y Christian Blaise, por su valioso apoyo durante las diferentes etapas de desarrollo del proyecto *WaterTox*.

Gabriela Castillo Morales
Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas,
Universidad de Chile,
Santiago, Chile.

1 CONCEPTOS GENERALES

Alicia Ronco, María Consuelo Díaz Báez y Yolanda Pica Granados

1.1 *Marco conceptual*

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos.

Los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades. Por tanto, la toxicidad será la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismo o la biocenosis, y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico, y su relación con el ciclo de vida del organismo; las pruebas podrán ser de tipo agudo o crónico.

El potencial nocivo de una sustancia tóxica puede ser contrarrestado por el sistema biológico a través de diferentes estrategias, tales como reacciones metabólicas de detoxificación, excreción de tóxicos, etcétera. Por tanto, la toxicidad aparente evaluada en un ensayo biológico es el resultado de la interacción entre la sustancia y el sistema biológico.

Además, se debe considerar que el efecto tóxico sobre los sistemas biológicos es ejercido por la acción combinada de todas las sustancias nocivas presentes en el medio, incluso aquellas que no son tóxicas en sí, pero que afectan las propiedades químicas o físicas del sistema, y consecuentemente las condiciones de vida de los organismos. En los sistemas acuáticos es característico el caso de sustancias que agotan el oxígeno, o que son coloreadas, o que simplemente impiden la propagación de la luz (caso de material particulado). También se deben tener en cuenta aquellos efectos no directamente relacionados con sustancias, tales como el deterioro o daño producido por acción de cambios en la temperatura o por radiación.

Inversamente, los ensayos biológicos también incluyen el efecto de los organismos sobre las sustancias, como la degradación microbiana o biodegradabilidad.

Los resultados de los bioensayos se refieren, en primer lugar, a los organismos usados en el ensayo y las condiciones estipuladas en el procedimiento de prueba. Un efecto nocivo evaluado por medio de ensayos biológicos normalizados puede indicar niveles de peligrosidad trasladables y asimilables a organismos que forman parte de los sistemas naturales y la biocenosis.

En principio, se debe considerar que no existe ningún organismo ni biocenosis que pueda ser usado para evaluar todos los efectos posibles sobre el ecosistema bajo las diversas condiciones abióticas y bióticas presentes. En la práctica, solamente unas pocas especies (especies modelo), que representen funciones ecológicas relevantes, pueden ser ensayadas. Además de estas limitaciones fundamentales y prácticas en la selección de organismos de ensayo, la muestra a ser ensayada puede también plantear problemas experimentales para la realización de la prueba.

Las aguas, en particular las de desechos residuales (aguas servidas, efluentes), son mezclas complejas y a menudo contienen sustancias poco solubles, volátiles, inestables, coloreadas y/o a veces partículas coloidales en suspensión. La complejidad y heterogeneidad de los materiales dan lugar a una variedad de problemas experimentales cuando se practican los ensayos. Estos pueden estar relacionados con la inestabilidad de la muestra debido a diferentes reacciones y procesos, tales como separación de fases, sedimentación, volatilización, hidrólisis, fotodegradación, precipitación, biodegradación, biotransformación e incorporación por los organismos.

De manera general, los ensayos, también llamados pruebas de toxicidad, pueden ser definidos de acuerdo con:

- Su duración: corto, mediano o largo plazo.
- El método utilizado para incorporar la muestra al sistema de ensayo: estático, con renovación, de flujo continuo.
- El propósito para el cual son utilizados: control de calidad de vertidos, evaluación de compuestos específicos, toxicidad relativa, sensibilidad relativa, etcétera.

1.2 Aplicación de los ensayos de toxicidad al diagnóstico ambiental de efectos biológicos

La *ecotoxicología*, rama de la ciencia definida por Butler en 1978, estudia y analiza los efectos de agentes químicos y físicos sobre organismos vivos, con particular atención a poblaciones y comunidades de ecosistemas definidos.

La *ecotoxicología aplicada* tiene como objetivo el desarrollo de protocolos de ensayo para ser utilizados como herramientas de predicción tempranas que permitan definir umbrales permisibles, con niveles de incertidumbre aceptables, y sirvan de guía a las entidades reguladoras para la toma de decisiones (Day *et al.*, 1988).

La *evaluación de riesgo ecológico* es un proceso de asignación de magnitudes y probabilidades a los efectos adversos de actividades antrópicas y catástrofes naturales (Sutter, 1993); recurre tanto a métodos predictivos para la evaluación de la exposición, como de los efectos de sustancias tóxicas a distintos niveles de organización y escala trófica. Este último aspecto es de particular interés en el marco del presente manual, orientado a introducir al lector en el uso de técnicas bioanalíticas de diagnóstico con ensayos de toxicidad. Históricamente, los efectos han venido siendo estudiados en el nivel de los organismos, de las poblaciones y de los ecosistemas. Dado que en la mayoría de los casos no es posible la eliminación de la toxicidad, las agencias u organismos de protección ambiental deben definir la proporción de mortalidad o la reducción del crecimiento tolerable de las especies expuestas. Sin embargo, los ensayos de toxicidad y los modelos de extrapolación no son suficientes para encarar este tipo de problemas. Deberíamos preguntarnos ¿qué significa la muerte de un

organismo en la escala de las poblaciones? Probablemente nada, dado que puede ser reemplazado a corto plazo, y además está programado, como condición de todo ser vivo, para que esto suceda. El problema de interés está relacionado con la evaluación de los efectos sobre la abundancia, producción y persistencia de las poblaciones y los ecosistemas.

A pesar del limitado alcance de la información proveniente de los ensayos de toxicidad para su extrapolación a escala ambiental, los estudios con organismos en laboratorio, en condiciones controladas y estandarizadas para la evaluación de respuestas, han venido siendo las fuentes de información predominantes para la evaluación ecológica de los efectos de los contaminantes tóxicos. La ecología de poblaciones debe conectar información toxicológica con modelos poblacionales para predecir efectos a esa escala. Por otra parte, las evaluaciones ecotoxicológicas realizadas en ecosistemas deben tener en cuenta características como: interacciones entre poblaciones de distintas especies, cambios estructurales y cambios funcionales, observables en el contexto del ecosistema. Sin embargo, las evaluaciones a este nivel tienen una serie de restricciones relacionadas con el elevado costo y tiempo asociados, el limitado número de diseños estandarizados, de puntos finales de evaluación y la cantidad de información sobre efectos tóxicos requerida para su parametrización (Sutter, 1993).

Existen diversos organismos de protección ambiental en países centrales (*Environment Canada*, *Environmental Protection Agency*, etcétera) y de estandarización (ASTM, OECD, AOAC, ISO, entre otros) que han concretado la elaboración e implementación de sistemas de diagnóstico, base para la generación de estrategias ecosistémicas de protección. Ello, orientado a la obtención de respuestas estandarizadas de laboratorio (bioensayos) que permiten asegurar, dentro de un cierto grado de confiabilidad, la medida obtenida. La estimación del riesgo ecológico se basa en modelos y procedimientos recientemente incorporados (Bartell *et al.*, 1992; Faustman & Omenn, 1996) por algunos organismos de gestión de control ambiental.

1.3 Definiciones

El conjunto de las definiciones indicadas que se presentan a continuación se basan en el documento EPS 1/RM/34 de *Environment Canada* (1999). Incluyen términos o conceptos de interés en el marco del presente libro. Se han mantenido las siglas de abreviaturas en inglés, dado el extendido uso de términos en forma abreviada.

Agudo: ocurre dentro de un periodo corto (minutos, horas o algunos días) en relación con el periodo de vida del organismo de ensayo.

Batería de ensayos: combinación de diversos ensayos de toxicidad con diferentes organismos.

Bioensayo: ensayo en el cual el poder o potencia de una sustancia es medido a través de la respuesta de organismos vivos o sistemas vivientes.

Carta control: es un gráfico utilizado para seguir cambios a través del tiempo del punto final medido para un compuesto tóxico de referencia. En el eje *X* se grafica la fecha del ensayo, y en el eje *Y*, la concentración tóxica efectiva. Se toman como límite de alerta dos desviaciones estándar de la media histórica de la concentración letal media.

Contaminante: sustancia ajena, presente en un sistema natural en una concentración más elevada de lo normal por causa de actividad antrópica directa o indirecta. En un sentido más amplio se le define como la presencia de cualquier agente físico, químico o biológico, o de combinaciones de los mismos en lugares, formas y concentraciones tales y con tal duración que sean o puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o bienestar de la población, o perjudiciales para la vida animal y vegetal, o que impidan el uso y goce de las propiedades y lugares de recreación.

Control: es un tratamiento en una investigación que duplica todos los factores que puedan afectar el resultado, excepto la condición que está siendo investigada (sinónimo de control negativo).

Control positivo: evaluación de la respuesta tóxica con una sustancia de referencia, utilizada para controlar la sensibilidad de los organismos en el momento en el cual se evalúa el material problema.

Crónico: ocurre durante un periodo relativamente largo de exposición (una porción significativa de la vida del organismo >10%).

Cumplimiento: de acuerdo con reglamentaciones gubernamentales o requerimientos para el otorgamiento de un permiso.

CE₅₀/CI₅₀: concentración efectiva o de inhibición media. Concentración del material en agua, suelo o sedimento que se estima afecta al 50% de los organismos de ensayo. La CE₅₀ y sus límites de confianza (95%) son usualmente derivados de análisis estadístico.

Ensayo de toxicidad: determinación del efecto de un material o mezcla sobre un grupo de organismos seleccionados bajo condiciones definidas. Mide las proporciones de organismos afectados (efecto cuantitativo) o el grado de efecto (graduado) luego de la exposición a la muestra.

Factores de aplicación: multiplicadores aplicados a los CL₅₀ para estimar posibles umbrales subletales de efecto en comunidades acuáticas. Los valores más comunes derivados de la experiencia práctica son:

- 1/10 del 96h-CL₅₀ para compuestos no persistentes ni bioacumulables, o, 1/20 o menos, como la concentración mediana después de la mezcla luego de 24 horas.
- 1/20 y 1/100 del 96h-CL₅₀ para compuestos persistentes.

Factor de emisión de toxicidad: proporción de emisión de toxicidad de un determinado efluente por unidad de producción (ejemplo: por tonelada de producto) de la operación que genera el efluente.

Índices de toxicidad: expresan los resultados de diferentes ensayos de toxicidad como un único valor numérico que clasifica, según categorías, a la muestra. No existen reglas fijas para la designación de los índices.

CL₅₀: concentración letal media, concentración del material en agua, suelo o sedimento que se estima letal para el 50% de los organismos de ensayo. La CL₅₀ y sus límites de confianza (95%) son usualmente derivados de análisis estadístico.

LOEC: concentración más baja a la cual se observa efecto (LOEC, por sus siglas en inglés).

Nivel guía de calidad: es un valor numérico de concentración límite o indicación narrativa, con base científica, recomendado para proteger y mantener organismos nativos o un cuerpo de agua para un uso específico. Puede ser un nivel guía de calidad para suelos, agua, sedimentos. El objetivo de calidad tiene la misma definición, excepto que es aplicable a un sitio particular y refleja “condiciones oficiales” deseadas para determinada región. Un estándar de calidad es un objetivo que ha sido reconocido y es aplicado por legislación de control ambiental a escala gubernamental.

NOEC: concentración a la cual no se observa efecto (NOEC, por sus siglas en inglés).

PMTC (concentración mínima del tóxico esperada): término elaborado por *Environment Canada* para su uso en el monitoreo ambiental de efectos de efluentes. Concentración de un efluente en el cuerpo receptor por debajo de la cual se esperaría que sólo un 5% de las muestras manifestaran efectos nocivos subletales, estimado con un nivel de confianza del 95% (PMTC, por sus siglas en inglés).

Proporción de emisión tóxica: es la potencia tóxica de un efluente multiplicado por el volumen descargado. Por lo tanto, el valor de las unidades de toxicidad deberá ser multiplicado por la descarga en metros cúbicos por día.

Protocolo: es un conjunto de procedimientos explícitos para un ensayo o experimento, de acuerdo con lo establecido entre las partes y descrito en un documento.

Punto final: medida o valor que expresa el resultado de un ensayo (CL₅₀/CE₅₀/CI₅₀). También significa la respuesta del organismo para mostrar el efecto que se utiliza para indicar la finalización del ensayo, definido por un porcentaje de organismos y un tiempo de exposición.

Relación aguda-crónica (ACR): ACR, por sus siglas en inglés, es el inverso del factor de aplicación. Se deriva de la relación medida entre un dato agudo de CL₅₀ y un nivel subletal medido. Para la obtención de un valor más realista se puede combinar la información de varios ensayos. Se la utiliza ampliamente en la actualidad y tiene la ventaja de tener valores mayores a la unidad.

Replicado: es una cámara o recipiente de ensayo, conteniendo un número especificado de organismos en una concentración/dilución de muestra definida o de agua de dilución como control. En un ensayo de toxicidad con cinco concentraciones de ensayo y un control que usa tres replicados, se utilizan 18 cámaras de ensayo con tres cámaras por concentración. Un replicado debe ser una unidad separada o independiente de ensayo.

TOEC: concentración umbral a la cual se observa efecto (media geométrica del NOEC y LOEC).

Toxicidad aguda: efecto adverso (letal o subletal) inducido sobre los organismos de ensayo en prueba durante un periodo de exposición del material de ensayo, usualmente de pocos días.

Toxicidad crónica: efectos tóxicos a largo plazo relacionados con cambios en el metabolismo, crecimiento o capacidad de supervivencia.

REFERENCIAS

- Bartell, S.M., Gardner, R.H. & O'Neill, R.V., 1992, *Ecological Risk Estimation*, Lewis Publishers, Boca Raton.
- Butler, G.C., 1978, *Principles of Ecotoxicology*, SCOPE 12, John Wiley and Sons, New York.
- Day, K.E., Ongley, E.D., Scroggins, R.P. & Eisenhauer, R.P., 1988, "Biology in the New Regulatory Framework for Aquatic Protection", *Proceedings for the Alliston Workshop*, National Water Research Institute (Burlington, Ontario) and Environment Canada (Ottawa).
- Environment Canada, 1999, *Guidance Document on Application and Interpretation of Single-Species Tests in Environmental Toxicology*, Method Development and Application Section, Environmental Technology Centre, EPS 1/RM/34.
- Faustman, E.M. & Omenn, G.S., 1996, "Risk Assessment", en: *Casarett and Doull's Toxicology*, C.D. Klaassen editor, Chapter 4, McGraw-Hill, international edition.
- Sutter, G.W., 1993, *Ecological Risk Assessment*, Lewis Publishers, Boca Raton.

2 MONITOREO AMBIENTAL

Alicia Ronco, María Consuelo Díaz Báez y Yolanda Pica Granados

2.1 *Conceptos generales*

En la actualidad, el monitoreo ambiental recurre a una terna de técnicas de diagnóstico, complementarias entre sí, que se indican a continuación: a) monitoreo de efectos biológicos con ensayos de toxicidad, b) monitoreo biológico de campo, y c) medición de parámetros químicos convencionales en descargas y cuerpos receptores.

Los niveles guía de calidad ambiental representan concentraciones máximas permitidas en el ambiente de sustancias individuales a las cuales se considera la inexistencia de efectos adversos significativos. Estos niveles pueden ser utilizados para determinar estándares (límites legales) u objetivos que pueden ser medidos o evaluados en el ambiente. El monitoreo es retrospectivo, pero los niveles guía pueden ser utilizados de manera predictiva, preventiva o reglamentaria.

Dada la variabilidad inherente a los procedimientos bioanalíticos o analíticos convencionales y a los procedimientos de muestreo, una sola muestra es insuficiente para alcanzar un nivel razonable de confianza para la caracterización de un sistema en estudio. Definida una desviación estándar general (por ejemplo, combinada para el muestreo y el análisis), el número de muestras requerido para una matriz móvil como el agua, puede ser estimada de la siguiente manera:

$$N \geq (t \cdot s / U)^2$$

Donde:

N = número de muestras.

t = t de *Student* para un intervalo de confianza dado.

s = desviación estándar general.

U = nivel aceptable de incertidumbre.

2.2 *Muestreo*

El objetivo general de un programa de muestreo es coleccionar una porción de material que represente la composición verdadera de la muestra; por tanto, la calidad de los datos dependerá de las siguientes actividades:

- Formular los objetivos particulares del programa de muestreo.
- Colectar muestras representativas.
- Desarrollar un adecuado manejo y preservación de las muestras.
- Llevar a cabo un adecuado programa de análisis.

Estas actividades son de primordial importancia para asegurar que los datos ambientales tengan validez y calidad. Teniendo en cuenta lo anterior, el diseño del muestreo dependerá de los objetivos específicos y de si este programa es de:

- Rutina.
- Caracterización.
- Intensivo.
- Establecimiento de una estación de monitoreo.
- Parte de una red de monitoreo.
- Especial.

Con base en estas características se define el tipo de muestra (puntual, compuesta, duplicada, de control, etcétera), la forma de colección (muestreo automático o manual), el equipo de muestreo (bombas, recipientes, preservantes, etcétera) y los procedimientos especiales a seguir, según el tipo de análisis que se pretenda realizar (*Environment Canada*, 1999).

Tipos de muestras:

- **Puntual o simple:** muestra recolectada en un sitio específico durante un periodo corto, de minutos a segundos. Representa un instante en el tiempo y un punto en el espacio del área de muestreo. Las muestras *puntuales discretas* son aquellas que corresponden a un sitio seleccionado, a una profundidad y tiempo definidos. Una muestra *puntual integrada en profundidad* corresponde a la que es recolectada a profundidades definidas de la columna de agua, en un sitio y tiempo seleccionados. El diseño del muestreo deberá tener en consideración descargas cíclicas o temporales del cuerpo receptor en estudio.
- **Compuesta o integrada o balanceada:** provee un muestreo representativo de matrices heterogéneas, en la cual la concentración del o los analito (s) de interés pueden variar su concentración en el espacio o el tiempo. Las muestras compuestas pueden combinar porciones de varias muestras simples o las provenientes de sistemas automáticos de extracción. Las muestras integradas en el tiempo recurringen a muestreadores con bombeo a un flujo continuo constante de muestra o la mezcla de volúmenes iguales recolectados a intervalos regulares. Existen muestreadores continuos que permiten recolectar submuestras variando el caudal de bombeo en función de las variaciones de flujo del cuerpo o conducto de agua. Hay sistemas automáticos comerciales provistos con control de temperatura para la preservación de la muestra durante el periodo de muestreo. Su utilización deberá tener en cuenta un cuidadoso diseño en función del propósito del estudio y características del sistema de muestreo empleado.

Tipos de método de recolección:

- **Manual:** este método de recolección es el más simple e involucra equipamiento mínimo. Sin embargo, puede resultar laborioso en programas de muestreo extendidos en el espacio o el tiempo.
- **Automático:** existen diversos sistemas automáticos de extracción de muestra. Su utilización depende de la disponibilidad de dichos sistemas y de su posible localización en el campo de manera segura.
- **Matrices sorbentes de muestreo (membranas o cartuchos):** ofrecen alternativas de interés que dependen del analito en estudio.

2.2.1 Obtención de muestras, traslado y conservación

Un aspecto de gran importancia a tener en cuenta en los ensayos biológicos es el traslado, la conservación, la preparación de las muestras de agua y el tratamiento durante el ensayo, especialmente cuando se realizan pruebas con aguas y aguas residuales que contengan compuestos inestables o fácilmente removibles. Consideraciones asociadas con el manejo de problemas que surjan de la naturaleza y disponibilidad de los compuestos en la muestra, y de la conveniencia del diseño de ensayo seleccionado son fundamentales para una correcta evaluación de los efectos de compuestos tóxicos presentes (ISO 5667-16).

Si se han tomado varias muestras (por ejemplo, en diferentes lugares o en momentos distintos), éstas pueden combinarse para obtener una mayor representatividad. Dichas muestras deben mezclarse muy bien y, si es necesario, dividir las en submuestras. Para obtener submuestras de igual calidad se debe asegurar que el conjunto de muestras mantenga homogeneidad durante el proceso de submuestreo, por medio de técnicas de mezclado o agitación continua. Esto se aplica particularmente para el caso de mezclas de dos fases. Cuando se cuenta con infraestructura adecuada, se recomienda el uso de sistemas de muestreo integrado en el tiempo con equipos refrigerados.

El volumen, forma y material de los recipientes de recolección y almacenamiento de muestra dependen de la naturaleza de la misma, del número de réplicas, del volumen requerido para los ensayos y de la necesidad de preservar y/o almacenar las muestras antes de su procesamiento. Cuando se hace necesario el congelamiento de muestra, el tiempo requerido para congelar y descongelar debe minimizarse reduciendo el volumen de la misma; por ejemplo, el tamaño del recipiente. En general, el uso de recipientes de un litro para congelar es adecuado. Para ensayos que requieren mayores volúmenes, la muestra debe ser dividida en recipientes que contengan no más de diez litros. El volumen total extraído debe ser suficiente para la realización de ensayos suplementarios y réplicas.

El material de los envases debe ser químicamente inerte, fácil de lavar, resistente al calor y al congelamiento. Se recomienda el uso de recipientes de vidrio, polivinilo, polietileno, polipropileno u otros polímeros inertes. Debe decidirse previamente si los recipientes serán llenados completamente hasta el borde o parcialmente (dejando un espacio de aire), teniendo en cuenta el tipo de muestra, la forma de preservación y el ensayo biológico que se realizará. Sin embargo, el llenado parcial de recipientes puede ocasionar agitación durante el transporte, provocando desagregación de partículas, arrastre de componentes

gaseosos, oxidación, etcétera. Contrariamente, el llenado total de recipientes puede ocasionar agotamiento del oxígeno disuelto, acompañado de una descomposición de materia orgánica anaeróbica, conduciendo a la formación de metabolitos tóxicos.

Los recipientes de muestreo, especialmente los de vidrio, cuando se congelan con vistas a su preservación, no deben llenarse completamente para permitir la expansión del volumen.

Durante el transporte, las muestras recolectadas deben ser protegidas de posibles roturas y del aumento de temperatura. Para evitar confusión en la identificación, se deben utilizar etiquetas y marcadores a prueba de agua.

2.2.2 Almacenamiento de muestras

No existe ningún método que permita conservar de manera perfecta la integridad de las muestras, sean éstas aguas residuales, naturales o sedimentos. Es prácticamente imposible mantener la estabilidad de todos sus constituyentes. Las técnicas recomendadas para su conservación tratan de retardar los cambios producidos por agentes químicos, físicos o biológicos, que inevitablemente ocurren luego de la extracción de la muestra (Dutka, 1996; APHA, 1998). Debido a que las muestras serán ensayadas con pruebas biológicas, las metodologías de estabilización corriente para análisis químico, tales como la disminución del pH, agregado de conservantes químicos específicos para determinados componentes, u otras, no pueden ser consideradas, ya que podrían incorporar toxicidad a la muestra.

La norma ISO 5667-16 recomienda considerar la duración del periodo de almacenamiento y la eficiencia de los modos de conservación, aspectos que dependerán de la naturaleza de la muestra y, en especial, de su actividad biológica. Las aguas potables y aguas subterráneas generalmente son poco susceptibles a las reacciones químicas y biológicas, a diferencia de las aguas superficiales y aguas servidas, tratadas o crudas.

Una vez recolectadas, las muestras para bioensayo deben ser procesadas preferentemente sin demora para evitar cambios en su composición original como resultado de reacciones físicas o químicas, y/o procesos biológicos. La duración máxima del almacenamiento no debe exceder las 12 horas a temperatura ambiente (máxima 25 °C). Las muestras deben conservarse en oscuridad para evitar el desarrollo de algas. Si no es posible realizar el ensayo inmediatamente después del muestreo, se recomienda enfriar o congelar.

El modo más común y recomendado para preservar muestras de aguas servidas es enfriar entre 0 y 5 °C. Cuando se enfría a estas temperaturas y se almacena en la oscuridad, las muestras, en su mayoría son estables hasta por 24 horas. El enfriamiento debe comenzar inmediatamente después del muestreo. Se puede hacer uso en el campo de recipientes con hielo. El enfriado por debajo de -20 °C permite un aumento del periodo de conservación, que puede variar desde pocas semanas hasta dos meses, dependiendo de la estabilidad de las muestras. La experiencia ha demostrado que la calidad de las aguas servidas puede ser afectada tanto durante el congelamiento como en el descongelamiento.

Las muestras que se almacenan congeladas deben descongelarse inmediatamente antes del uso. Se recomienda utilizar agua corriente o un baño de agua a temperatura que no exceda los 30 °C, agitando suavemente para evitar el sobrecalentamiento local. Es esencial que el descongelado sea completo antes del uso, ya que el proceso

de congelado puede afectar la concentración de algunos componentes en la parte interna de la muestra, que es la que se congela al último. No se recomienda el tratamiento en microondas.

Luego del descongelamiento se debe asegurar una distribución homogénea de todos los componentes. Para ello se puede aplicar agitación suave o vigorosa, tratamiento ultrasónico o dispersión mecánica a alta velocidad; ello según la naturaleza de la muestra. Especial atención se debe prestar a la potencial pérdida de compuestos volátiles. De manera general, hay que tener cuidado para que el estado original de la muestra sea restaurado o, en su defecto, alterado lo menos posible.

2.2.3 Acondicionamiento de las muestras

En general, los bioensayos se llevan a cabo con la muestra original. En algunos casos, sin embargo, una excesiva cantidad de material particulado, lodos o sedimentos interfieren con el comportamiento de los organismos utilizados en las pruebas (por ejemplo: deterioro de los filtros de alimentación de *Daphnia*, limitación de la entrada de luz a cultivos de algas). Para evitar que ese tipo de efectos se vea reflejado en los resultados en la prueba hay que tratar de eliminar estas interferencias. Sin embargo, la aplicación de métodos de filtración, sedimentación o centrifugación, entre otros, puede involucrar riesgos de pérdida de componentes asociados con partículas.

Cuando los ensayos se realizan en presencia de material particulado, se recomienda dejar sedimentar la muestra de treinta minutos a dos horas, o efectuar una filtración gruesa (>50 mm), separando solamente las partículas grandes. La masa de partículas así obtenida puede ser evaluada por separado. Algunos métodos de ensayo ofrecen la posibilidad de determinar un factor de corrección para parámetros, como la turbiedad. Las aguas ricas en bacterias pueden también producir interferencias con algunas pruebas. Sin embargo, existen soluciones parciales en casos como la filtración con fibra de vidrio (cuando corresponda) o la centrifugación (ejemplo: diez minutos a $4\,500\times g$). Esta segunda alternativa es, en general, preferible a la filtración.

Ajuste de pH:

La selección del valor de pH al que se ajusta la muestra está determinada por el objetivo del ensayo. Por lo general, el ajuste de pH se realiza en el intervalo entre seis y nueve (el cual es generalmente tolerable para la biota acuática). Las muestras con valores de pH extremos, que excedan los límites de tolerancia de los organismos de prueba, deben ser neutralizadas. La neutralización debe ser omitida, si se desea evaluar el efecto del pH o si se observan modificaciones físicas o químicas debido al ajuste. El agente neutralizante no debe reaccionar con los componentes de la muestra, lo cual podría, por ejemplo, conducir a la precipitación o a la formación de complejos. Tampoco debe influir sobre el organismo de ensayo provocando estimulación o inhibición. Los agentes neutralizantes de pH más usados son soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

Preconcentración:

El alcance del presente manual no incluye el análisis y discusión de alternativas de concentración de las sustancias nocivas para la posterior evaluación de efectos biológicos por medio de bioensayos. Cabe aclarar que, si bien existen algunas alternativas de concentración utilizando sistemas de extracción líquido/líquido con solventes orgánicos, la extracción en fase sólida favoreciendo la sorción de sustancias hidrofóbicas, la evaporación o liofilización, la ultrafiltración, etcétera, presenta limitaciones de aplicación. Los ensayos de toxicidad con muestras preconcentradas generalmente tienen menos significado y no se las recomienda. En todos los casos, los resultados obtenidos de los ensayos con muestras de agua preconcentradas deben interpretarse con extrema precaución (Díaz-Báez *et al.*, 2000; Ronco *et al.*, 2002).

Eliminación de cloro:

Cuando se realizan ensayos de toxicidad de agua clorada, sea por tratamiento convencional de agua potable, o efluentes de aguas servidas, se debe neutralizar el cloro previo al ensayo de la muestra. La forma más simple para su eliminación es dejar reposar la muestra en el envase destapado durante la noche a 4 °C. También se pueden utilizar métodos químicos de neutralización, como el agregado de tiosulfato de sodio (una solución de 3,6 mg/L de tiosulfato de sodio preparado a partir de la sal anhidra reduce 1,0 mg/L de cloro). Cuando se efectúa este tipo de eliminación se requiere llevar a cabo blancos en las pruebas de toxicidad.

2.3 Tratamiento de las muestras durante los ensayos

Aireación: los ensayos que requieren aireación deberán tener en cuenta la pérdida de compuestos volátiles durante el procedimiento.

Suspensión: si las interferencias por causa del material particulado se asumen como despreciables, éste puede mantenerse en suspensión. El plancton debe mantenerse en suspensión durante el ensayo por medio de métodos apropiados, tales como agitación, rotación o por burbujeo. Debe tenerse especial cuidado de evitar el daño por causas mecánicas de los organismos de prueba.

Ajuste y control del pH: bajo ciertas circunstancias (por ejemplo, a causa de aireación), el pH puede fluctuar durante el ensayo. El ajuste y control del pH durante el ensayo debe decidirse de acuerdo con la causa de la fluctuación del mismo y el objetivo del ensayo. Desde los puntos de vista del analista y del regulador, puede ser preferible trabajar con una sustancia que se encuentre en un estado químico claramente definido y constante. Deben evitarse o contrarrestarse cambios de pH debidos a problemas de orden práctico, como lo es, por ejemplo, la pérdida del CO₂ a causa del suministro de aire por burbujeo. Esto es especialmente importante para algunas sustancias sensibles al pH, tal como amonio y amoníaco en peces, sulfuros, cianuros, aminas, fenoles y ácidos orgánicos.

Sin embargo, si el cambio en el pH durante el ensayo ocurriera debido al efecto de un proceso vital e inherente, necesariamente acompañado del consumo de CO₂ (tal como lo es la fotosíntesis en el crecimiento de las algas), en ese caso sería razonable

no realizar ajustes. El permitir la transición de pH en un intervalo amplio no sólo aumentará la aplicabilidad y la importancia indicativa del ensayo, sino que además ofrece la oportunidad de desencadenar los efectos de compuestos químicos que, de otro modo, podrían haber permanecido no detectados.

Un diagrama general de pasos a seguir con la muestra desde el pretratamiento hasta el ensayo de toxicidad se puede ver en la figura 2.1.

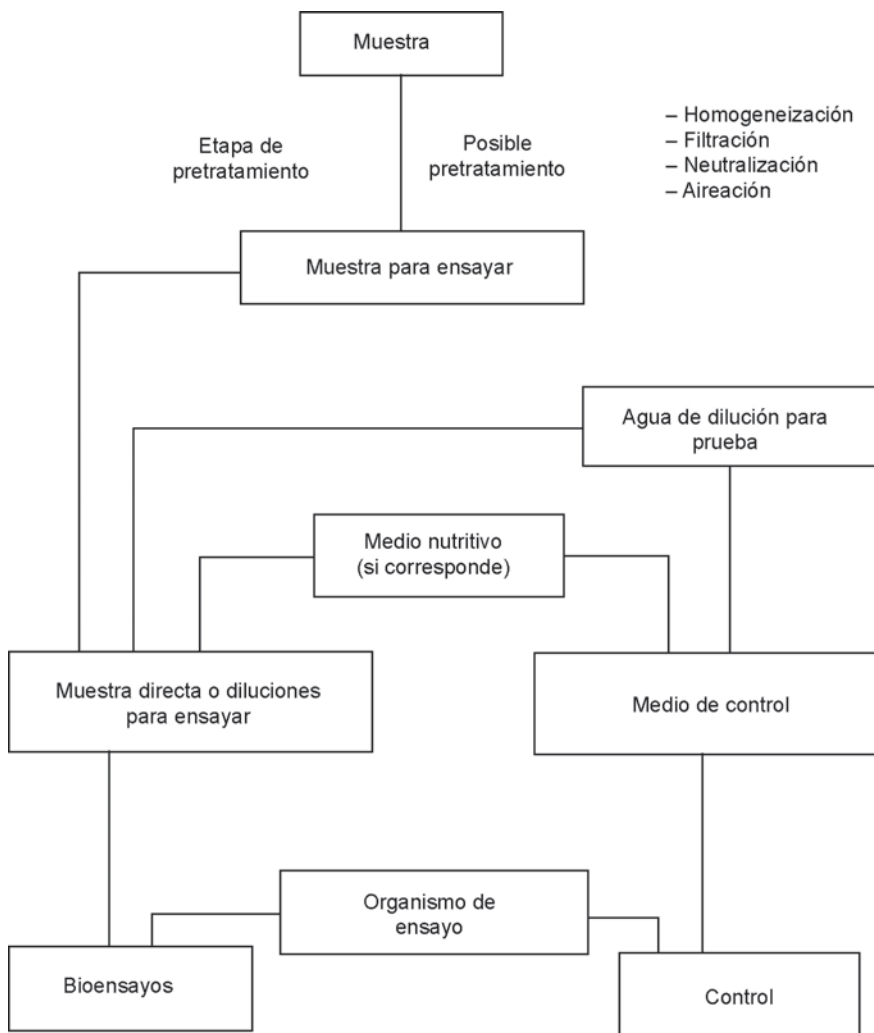


Figura 2.1. Diagrama general para el tratamiento de las muestras durante los bioensayos.

2.4 Equipamiento de muestreo

Los implementos necesarios para la recolección de muestras dependen del tipo de fuente en estudio. Deberá tenerse en cuenta si se trata de un cuerpo de agua superficial, agua subterránea, agua de red, agua de lluvia, descarga de agua servida a través de tuberías, conducto de agua pluvial o agua intersticial (agua de poro) de sedimentos.

El equipamiento a utilizar dependerá del tipo de fuente, de los objetivos del muestreo, acceso al sitio de muestreo, profundidad, tipo de muestra y otras consideraciones analizadas en el punto 2.2 de este capítulo. Existen diferentes opciones de muestreadores que pueden obtenerse de proveedores de equipamiento especializado, o ser contruidos en el laboratorio, de acuerdo con diseños convencionales. Los mismos permiten la extracción desde puentes, riveras, embarcaciones, bocas de perforaciones, etcétera. Algunos de ellos aseguran el ingreso de la muestra a determinada profundidad con mecanismos de cierre y apertura por medio de válvulas, con disparadores manuales o automáticos.

De manera equivalente se obtienen muestras de sedimentos con dragas o *corers*. Se recomienda la consulta de manuales generales o especializados.

Además de las consideraciones antes expuestas, se puede recurrir a métodos simples utilizando baldes (cubetas) para el muestreo superficial de lagos, lagunas o arroyos; o directamente en el recipiente final de embotellado, cuando se colecta agua de red o desde bombeadores de pozos.

Para la batería de bioensayos propuesta en este manual, se requiere de un volumen total aproximado de entre siete y nueve litros de muestra para su posterior evaluación.

REFERENCIAS

- APHA, 1998, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edition, American Public Health Association, Washington, D.C.
- Díaz-Báez, M.C., Cruz, L.E., Rodríguez, D., Pérez, J. & Vargas, C.M., 2000, "Evaluation of Three Water Concentration Techniques as a Prior Step to Test Acute Toxicity", *Environ. Toxicol.*, 15 (4): 345-351.
- Dutka, B.J., 1996, *Bioassays: a Historical Summary of those Used and Developed in Our Laboratories at NWRI*, National Water Research Institute, Environment Canada, Burlington, ONT., 93 pp.
- Environment Canada, 1990, *Guidance Document on Application and Interpretation of Single-Species Tests in Environmental Toxicology*, 1999, Method Development And Application Section, Environmental Technology Centre, Environment Canada, EPS 1/RM/34.
- ISO 5667-16:1998, *Water Quality-Sampling-Part 16: Guidance on Biotesting of Samples*.
- Ronco, A.E., Gagnon, P., Díaz-Báez, M.C., Arkhipchuk, V., Castillo, G., Castillo, L.E., Dutka, B.J., Pica Granados, Y., Ridal, J., Srivastava, R.C. & Sánchez, A., 2002, "Overview of Results from the Watertox Intercalibration and Environmental Testing Phase II Program: Part I. Statistical Analysis of Blind Sample Testing". *Environ. Toxicol.* 17 (3), 232-240.
- USE PA, 1993, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*, 4th ed., EPA/600/4-90/027F, Office of Research and Development, Washington, D.C.

3 ELEMENTOS BÁSICOS REQUERIDOS PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE PRUEBAS EN ANÁLISIS RUTINARIOS

Alicia Ronco, María Consuelo Díaz Báez y Yolanda Pica Granados

3.1 *Requerimientos generales*

El laboratorio para ensayos biológicos deberá contar con equipamiento apropiado para realizar este tipo de pruebas en particular. Ello implica que, además del equipamiento técnico, el laboratorio debe contar con infraestructura edilicia, con cuartos de preparación y almacenamiento de materiales y provisión de servicios (electricidad, gas, agua, filtrado de emisiones, ventilación, temperatura ambiente controlada) necesarios para cumplir los requerimientos de los ensayos a realizar.

La asignación del espacio dentro del área de laboratorio debe ser tal que se evite la contaminación de los ambientes, equipos, personal y sistema de prueba, como podría ser la mezcla no deseada de sustancias para ensayo y el medio. En particular, la zona para el cultivo y mantenimiento de los organismos debe estar separada del área para preparación y conducción de las pruebas de toxicidad.

Dentro de los requerimientos básicos y condiciones deseables para la realización de tareas, se considera imprescindible contar con:

- Abundante suministro de agua de calidad, preferentemente *Millipore Super Q*, adecuada para cultivo, mantenimiento y realización de pruebas (ver requerimientos específicos para cada ensayo en el capítulo 4 “Protocolos de ensayo”).
- Sistema de suministro de agua construido con materiales no contaminantes ni sorbentes.
- Infraestructura de iluminación adecuada para los organismos (ver requerimientos específicos para cada prueba en el capítulo 4 “Protocolos de ensayo”).
- Áreas de trabajo y de mantenimiento de cultivos con temperatura ambiente estable de 20 ± 2 °centígrados.

Los aspectos específicos asociados con el cuidado y mantenimiento de organismos para la ejecución de las pruebas son discutidos y analizados en el alcance del presente manual.

3.2 *Selección de especies de prueba*

En general, los criterios de selección de especies se fundamentan en los siguientes aspectos:

- Alta y constante sensibilidad a tóxicos.
- Alta disponibilidad y abundancia.
- Estabilidad genética y uniformidad en las poblaciones.
- Representatividad de su nivel trófico.
- Significado ambiental en relación con el área de estudio.
- Amplia distribución e importancia comercial.
- Facilidad de cultivo y adaptabilidad a las condiciones de laboratorio.

Es importante destacar que no siempre puede cumplirse con todos los requerimientos señalados y, en algunos casos, la selección aparentemente mostrará algunas contradicciones. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que en algunos procesos de selección, los investigadores, de acuerdo con cada situación, darán mayor o menor peso a ciertos criterios de selección (Dutka, 1996).

3.3 Suministros básicos

A continuación se listan los requerimientos específicos para el caso de las pruebas incluidas en el presente manual.

Material de laboratorio:

- Acuarios, bombas de acuario, conexiones, tuberías.
- Recipientes para crianza.
- Material de vidrio de laboratorio, vasos de precipitado, matraces, kitsatos, tubos de ensayo, viales de centelleo de borosilicato, botellas para soluciones, tubos para centrífuga, cristalizadores.
- Pipetas volumétricas y graduadas, pipetas con propipetas o peras de goma, pipetas automáticas con puntas descartables.
- Cápsulas de Petri, de vidrio o descartables.
- Microplacas de 12 pozos, del tipo de las usadas en cultivo de tejidos.
- Recipientes para almacenamiento de soluciones (bidones, garrafones).
- Mecheros.
- Gradillas para tubos.
- Elementos para pesar (recipientes, espátulas).
- Film de laboratorio para sellado (Parafilm o similar).
- Film transparente (Duraseal o similar).
- Papel filtro.
- Filtros con tamiz de malla para separación de organismos.
- Recipientes para refrigeración (para hielo o refrigerantes).
- Reglas para medición con escala al cm o mm.
- Gasa, algodón.
- Asas bacteriológicas.
- Hemocitómetro o cámara de conteo.
- Pinzas.
- Toallas de papel.
- Bolsas plásticas.

Equipamiento:

- Balanza analítica.
- Campana de flujo laminar o mechero.
- Centrífuga (opcional).
- Base de agitación orbital o vórtex (opcional).
- Parrilla de calentamiento y agitación.
- Heladeras (refrigeración y congelación).
- Autoclave o sistema de esterilización.

Instrumental:

- Microscopio óptico con aumento de 100x.
- Lupa estereoscópica de 10x de aumento.
- Medidor de pH (opcional, se puede reemplazar con tiras indicadoras).
- Medidor de oxígeno disuelto.
- Medidor de conductividad.
- Sistema de filtración.

Las figuras 3.1 y 3.2 muestran vistas de infraestructura característica para laboratorios de bioensayos. La figura 3.3 muestra el sector con recipientes para separación de neonatos de *Daphnia magna*, las figuras 3.4 y 3.5 presentan el sector para cultivo masivo de algas, la figura 3.6 muestra una cámara de iluminación casera para prueba con *Selenastrum capricornutum* y, la figura 3.7, un microscopio y elementos para conteo de algas. Se han tomado como ejemplo vistas de laboratorios institucionales de Latinoamérica (ver imágenes en anexo fotográfico).

En el anexo 1 las tablas 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5 presentan detalles de los requerimientos para las pruebas incluidas en el presente texto.

3.4 Cronograma de actividades y listado general

En todo laboratorio de bioensayos, cada vez que se inicia un estudio de toxicidad se debe preparar: a) un cronograma de actividades y b) un listado general. En el primero se debe incluir la información sobre el objetivo del estudio, los protocolos que se van a utilizar, así como cualquier modificación, nombre de los investigadores y colaboradores, personal involucrado, número de muestras y características de las mismas. El cronograma de estudio se debe comenzar con la aprobación del (o los) protocolo (s), fecha de colección de las muestras, fecha de recepción, iniciación y finalización de las pruebas, análisis de resultados, preparación del informe y fecha de finalización del estudio.

El listado general debe prepararse previo al inicio del estudio, incluir en él todas las pruebas a realizar, los protocolos y las instrucciones especiales que se deben tener en cuenta. También se deben especificar las fechas de inicio y finalización de cada prueba.

Estos dos formatos permitirán hacer una revisión rápida de cada proyecto, por lo que se recomienda anexarlos al informe final.

3.5 Formatos para la recolección de resultados

Para cualquier ensayo de toxicidad a realizar, se debe contar con una serie de formatos o planillas, entre los cuales se recomienda, en particular, uno sobre información general (anexo 2: formato 3.1), y otros específicos para los registros diarios de cada una de las pruebas, mediciones físico-químicas, preparación de las soluciones de prueba y cálculos estadísticos (anexo 2: formatos 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6).

En la literatura existen modelos de formato recomendados por diferentes agencias internacionales, por lo que será decisión de cada laboratorio adoptar aquellos que mejor le convengan.

3.6 Cuadernos diarios

Al igual que para el registro de resultados, se deben llevar cuadernos separados para cada organismo cultivado en el laboratorio. En ellos se debe consignar información sobre:

- Preparación de reactivos (patrones, medios, agua de dilución, etcétera).
- Recepción y salida de muestras.
- Recepción de organismos de fuentes externas al laboratorio.
- Información de referencia (tasas reproductivas).
- Análisis físicos y químicos complementarios (pH, oxígeno disuelto, otros).
- Pruebas de sensibilidad.

3.7 Preparación del material de vidrio u otros recipientes de ensayo

La vidriería u otro material no descartable a utilizar en las pruebas de toxicidad y que entre en contacto con muestras debe ser de uso exclusivo para el desarrollo de esta clase de determinaciones. El lavado del material se lleva a cabo de la siguiente forma:

- Lavar con agua caliente y una solución jabonosa (se aconseja el uso de detergentes no iónicos).
- Enjuagar tres veces con agua de la red.
- Enjuagar tres veces con una solución de HCl o HNO_3 al 10%.
- Enjuagar dos veces con agua de la red.
- Enjuagar una vez con acetona (para la remoción de compuestos orgánicos).
- Enjuagar tres veces con agua deionizada.

Una vez lavado, dejar secar boca abajo sobre material absorbente; al término, cubrir con papel aluminio.

Las pipetas volumétricas se deben lavar sin detergente, inmediatamente después de su uso.

Los recipientes para ensayo deberán ser enjuagados con agua de dilución inmediatamente antes de su uso en pruebas de toxicidad.

REFERENCIAS

- ISO 5667-16 (UNE-EN ISO), 1998, "Water Quality, Sampling", Part 16: *Guidance on Biotesting of Samples*.
- APHA, 1998, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed., American Public Health Association, Washington, D.C.
- Dutka, B.J., 1996, *Bioassays: a Historical Summary of those Used and Developed in our Laboratories at NWRI*. National Water Research Institute, Environment Canada, Burlington. 93 pp.

ANEXO 1

En esta sección se listan en diferentes tablas los requerimientos mínimos para el inicio de actividades de mantenimiento de organismos de prueba: tablas 3.1 y 3.2 y, para la etapa posterior de mantenimiento y ejecución de ensayos: tablas 3.3, 3.4 y 3.5. Las cantidades sugeridas corresponden a los requerimientos aproximados para un año de trabajo.

Tabla 3.1. Listado de materiales para establecimiento de cultivos.

Descripción	Núm.	Prueba
Material permanente:		
Cristalizadores grandes 20 cm diámetro	2	<i>Hydra</i>
Cristalizadores pequeños 10 cm diámetro	2	<i>Hydra</i>
Aro de soporte para minitimiz	2	<i>Hydra</i>
Mallas para anterior (núm. 60 y 120)	2	<i>Hydra</i>
Frasco de vidrio de 2 L s/tapa	1	<i>Daphnia</i>
Frasco de vidrio de 1 L s/tapa	2	<i>Daphnia</i>
Cámara de iluminación (iluminación algal)	1	<i>Daphnia</i> /algas
Focos Osram triple barra p/anterior	2	<i>Daphnia</i> / algas
Cámara de incubación e iluminación	1	<i>Hydra/Artemia</i>
Bombilla 100 watts	1	<i>Hydra/Artemia</i>
Bomba de acuario para 200 L	1	<i>Daphnia</i> /algas
Recipiente de vidrio autoclavables de 5, 10 o 20 L	1	Cultivo de algas
Recipiente de vidrio o polipropileno de 20 L	1	<i>Daphnia</i> (agua dura)
Recipiente de polipropileno de 10 L	1	<i>Hydra</i> (medio <i>Hydra</i>)
Recipiente de polipropileno de 5 o 10 L	1	<i>Hydra</i> (medio desquistación de <i>Artemia</i>)
Matraz aforado de 1 L clase A	8	Usos diversos
Recipientes de vidrio 1 L	8	Usos diversos

Tabla 3.2. Material biológico.

Descripción	Prueba
Cepas	
Cepa de <i>Hydra attenuata</i>	<i>Hydra</i>
Quistes de <i>Artemia salina</i>	<i>Hydra</i> (alimentación)
Semillas de <i>Lactuca sativa</i> L	Semilla
Cepa <i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia</i>
Bulbos de <i>Allium cepa</i> L	Cebolla
Cepa <i>Selenastrum capricornutum</i> (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	Algas/o alimentación <i>Daphnia</i>

Tabla 3.3. Listado de materiales generales.

Descripción	Núm.	Prueba
Bombas de acuario 50 L	3	<i>Hydra</i> / <i>Artemia</i> / algas
Pipetas Pasteur y bulbos	15	Todas
Jeringa de 20 mL	1	<i>Daphnia</i>
Filtros 0,22 µm estériles	25 pz	Algas
Tramo de manguera para bomba y derivaciones	4 m	Algas/ <i>Daphnia</i> / <i>Artemia</i>
Llaves para bombas de acuario	5	Algas/ <i>Daphnia</i> / <i>Artemia</i>
Termómetro ambiental	1	Todas
Varillas de vidrio 20 cm	5	Algas/ <i>Daphnia</i> / <i>Artemia</i>
Pipeta volumétrica de vidrio 100 mL	4	Cultivo <i>Hydra</i>
Filtros tipo Millipore de ésteres de celulosa liso blanco de 0,22 µm poro, 45 mm diámetro, estériles	50 pz	Cultivo algas
Papel tipo Watman núm. 2 diámetro de 11 cm c/100 pz	2 cajas	<i>L. sativa</i>
Tubo para centrífuga, desechable, cónico, estéril de polipropileno, tapa roscada de 50 mL, graduado		
paquetes de 50 pz	3 paq.	Varios
Pipetas Pasteur de 5.75", caja de 200 pza. Vidrio	1 caja	Varios
Perilla de tres vías de látex negro	3	Varios
Tubos de cultivo de vidrio con tapa de rosca de baquelita, de 25 x 2 000, 70 mL 20 pz autoclavables	3	Cepas algas
Placas para cultivo celular, polipropileno, 12 pozos fondo planas, con tapa, estériles y empaque individual, 50 pz	1	<i>Hydra</i>
Asa bacteriológica	1	Cultivo algas
Pipetas plásticas desechables estériles doble escala y empaque individual de 10 y 20 ml, caja c/100 pz	1	Varios
Vaso plástico de 30 ml paq. 100	4	<i>Daphnia</i>
Caja de Petri plástica de 35 x 10 mm empaques de 20 pz, estéril	5 paq.	<i>Hydra</i>
Caja de Petri plástica de 100 x 15 mm estériles en empaques de 10 pz, caja con 200 pz	1	<i>L. sativa</i>
Papel Parafilm	Tramo	<i>Daphnia</i>
Papel Duraseal	Tramo	Algas
Pipetas serológicas de 10 y 25 mL	10 pz	<i>L. sativa</i>
Vasos pastilleros de 30 ml plástico	100 pz	<i>Daphnia</i>
Papel aluminio y papel absorbente en rollo	1	<i>L. sativa</i> y otros
Algodón cardé (p/tapones de esterilización)	1 kg	Algas
Gasa (p/tapones de esterilización)	1 tramo	Algas
Viales de centelleo de 20 mL	100	Algas
Gradillas o soportes para los tubos de ensayo	10	Cebolla
Cámara Neubauer	1	Algas
Tubos de ensayo de 10 mL o recipientes para prueba (dependerá del tamaño de los bulbos de cebolla)	100	Cebolla
Bisturís	2	Cebolla

Tabla 3.4. Listado de reactivos.

Se indica en algunos casos la posible marca comercial del producto con el número de catálogo correspondiente.

Descripción	Cantidad (g)	Prueba
Cloruro de sodio R.A (NaCl)	1 000	<i>Hydra/Artemia</i>
EDTA Sal Disódica $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	500	<i>Algas/Hydra</i>
Buffer N-tris(hidroximetil) metil-2-ácido aminoetano sulfónico2- (2Hidroxil-1-1-bis [hidroximetil] etil amino etanosulfónico Sigma Chem. T4152)	100	<i>Hydra</i>
Cloruro de calcio dihidratado. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Sigma Chem. C3881	500	<i>Hydra/Algas</i>
Pastillas Coglan's o Isodine de yodo para desinfección bucal	1 fco.	<i>Hydra</i>
Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)	10	Tóx. Ref. daphnia/hidra
Vitamina B_{12} de 99% pureza. Sigma Chem. V.2876	1	<i>Daphnia</i>
Tiamina hidrocloreto, Sigma Chem. T.4625	5	<i>Daphnia</i>
Biotina, Sigma Chem. B.4501 1 <i>Daphnia</i>		
Sulfato de calcio dihidratado, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	500	<i>Daphnia</i>
Cloruro de potasio, KCl	500	<i>Daphnia</i>
Sulfato de magnesio, MgSO_4	500	<i>Algas/Daphnia/cebolla</i>
Sulfato ferroso heptahidratado $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500	<i>Algas</i>
Nitrato de sodio, NaNO_3	500	<i>Algas</i>
Cloruro de magnesio hexahidratado $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	500	<i>Algas</i>
Ácido bórico ACS H_3BO_3	500	<i>Algas/cebolla</i>
Cloruro de manganeso tetrahidratado, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	500	<i>Algas</i>
Cloruro de zinc granular, ZnCl_2	500	<i>Algas</i>
Cloruro de cobalto hexahidratado, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100	<i>Algas</i>
Cloruro de cobre dihidratado, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	500	<i>Algas/cebolla</i>
Molibdato de sodio dihidratado, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	500	<i>Algas</i>
Cloruro férrico hexahidratado, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	500	<i>Algas</i>
Fosfato de potasio di y monobásico, $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$	500	<i>Algas</i>
Bicarbonato de sodio NaHCO_3	500	<i>Algas</i>
Sulfato de zinc P.A. >99,5% pureza, certificado, marca Fluka 96 500	250	Tóx. Ref. <i>L. sativa</i> , micronutriente cebolla
Sulfato de cobre pentahidratado, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	100	Tóx. Ref. cebolla/algas
Nitrato de calcio hidratado, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2	<i>Cebolla</i>
Nitrato de potasio, KNO_3	2	<i>Cebolla</i>
Sulfato de manganeso, MnSO_4	2	<i>Cebolla</i>
Fe EDTA $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	2	<i>Cebolla</i>

Tabla 3.5. Listado de equipos e instrumentos.

Descripción	Cantidad	Prueba
Sistema de control de temperatura ambiente (18-22 °C)	1	Uso general
Balanza analítica	1	Uso general
Autoclave o sistema de esterilización	1	Algas
Centrífuga	1	Uso general
Campana de flujo laminar o mechero	1	Algas
Heladeras (refrigerador y congelador)	1	Uso general
Plancha de agitación y calentamiento	1	Uso general
Base de agitación orbital o vórtex	1	Algas
Medidor de pH	1	<i>Hydra/Daphnia</i> caracterización de muestras
Medidor de conductividad	1	Caracterización de muestras
Medidor de oxígeno disuelto	1	Uso general
Sistema de filtración	1	Algas/ <i>Hydra</i>
Microscopio o lupa estereoscópica (10x)	1	<i>Hydra/Daphnia</i>
Microscopio óptico (100x)	1	Algas

ANEXO 2

Formato 3.1. Muestras ambientales, caracterización física, química y bacteriológica.

Muestra núm.	Tipo de muestra	pH	Temperatura (°C)	Conductividad (μScm^{-1})	Turbiedad (UNT)	O.D. ^a (mgL^{-1})	Dureza ($\text{mgCaCO}_3\text{L}^{-1}$)	Alcalinidad ($\text{mgCaCO}_3\text{L}^{-1}$)	ST ^b (mgL^{-1})	SS ^c (mgL^{-1})	DBO ₅ ^d (mgL^{-1})	DQO ^e (mgL^{-1})	COT ^f (mgL^{-1})	CT ^g NMP/100 mL	CF ^h NMP/100 mL

^a Oxígeno disuelto.^b Sólidos totales.^c Sólidos suspendidos.^d Demanda bioquímica de oxígeno (cinco días).^e Demanda química de oxígeno.^f Carbono orgánico total.^g Coliformes totales.^h Coliformes fecales.

Formato 3.2. Resultados de la prueba de toxicidad con *Daphnia magna*.

Nombre del laboratorio: _____

Fecha de inicio: _____

Nombre del técnico: _____

Fecha de término: _____

Informar el número de *Daphnias* vivas

MUESTRA	CONCENTRACIÓN	RÉPLICA Núm. 1		RÉPLICA Núm. 2		RÉPLICA Núm. 3		D.S.	PROMEDIO Núm. <i>Daphnias</i> vivas	% MORTALIDAD
		Núm. inicial	Núm. final	Núm. inicial	Núm. final	Núm. inicial	Núm. final			
CONTROL POSITIVO										
CONTROL NEGATIVO										
1										
2										
OBSERVACIONES										

D.S.: desviación estándar.

Formato 3.3. Resultados de la prueba de toxicidad con Hydra attenuata.

Nombre del laboratorio: _____

Fecha de inicio: _____

Nombre del técnico: _____

Fecha de término: _____

Informar el número de organismos que presentan diferentes morfologías

TIEMPO	CONCENTRACIÓN	RÉPLICA Núm. 1					RÉPLICA Núm. 2					RÉPLICA Núm. 3					(X) TOTAL DE ORGANISMOS	(Y) SUBLETAL (B+C)	(Z) LETAL (T+D)	% SUBLETALIDAD	% LETALIDAD
		N	B	C	T	D	N	B	C	T	D	N	B	C	T	D					
CONTROL POSITIVO																					
CONTROL NEGATIVO																					
24 h																					
48 h																					
72 h																					
96 h																					

$$\% \text{ subletalidad} = (Y+Z/X) \times 100$$

$$\% \text{ letalidad} = (Z/X) \times 100$$

N: normal	B: bulbo	C: cortas	T: tulipán	D: desintegrado
-----------	----------	-----------	------------	-----------------

Formato 3.4. Resultados de la prueba de toxicidad con *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*).

Nombre del laboratorio: _____

Fecha de inicio: _____

Nombre del técnico: _____

Fecha de término: _____

Informar número de células por mililitro (cél.·mL⁻¹)

CONTROL NEGATIVO	RÉPLICA Núm. 1	RÉPLICA Núm. 2	RÉPLICA Núm. 3	RÉPLICA Núm. 4	RÉPLICA Núm. 5	PROMEDIO cél.·mL ⁻¹	% INHIBICIÓN
Medio de crecimiento							
MUESTRA	CONCENTRACIÓN	RÉPLICA Núm. 1	RÉPLICA Núm. 2	RÉPLICA Núm. 3	D.S.		
CONTROL POSITIVO (Tóxico de referencia)							
1							
2							
3							
4							

D.S: desviación estándar.

Formato 3.5. Resultados de la prueba de toxicidad con Lactuca sativa.

Nombre del laboratorio: _____

Fecha de inicio: _____

Nombre del técnico: _____

Fecha de terminación: _____

Informar la longitud en mm

MUESTRA	CONCENTRACIÓN	Longitud de la raíz (mm)																				D.S.	PROMEDIO	% INHIBICIÓN	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20				
CONTROL POSITIVO																									
CONTROL NEGATIVO																									
1																									
2																									
3																									

D.S. desviación estándar.

Formato 3.6. Resultados de la prueba de toxicidad con *Allium cepa*.

Nombre del laboratorio: _____

Fecha de inicio: _____

Nombre del técnico: _____

Fecha de terminación: _____

Informar la longitud en cm

MUESTRA	CONCENTRACIÓN	RÉPLICA Núm. 1	RÉPLICA Núm. 2	RÉPLICA Núm. 3	RÉPLICA Núm. 4	RÉPLICA Núm. 5	D.S	PROMEDIO	% INHIBICIÓN
CONTROL POSITIVO									
CONTROL NEGATIVO									
1									
2									
3									
4									

D.S. desviación estándar.

This page intentionally left blank

4 PROTOCOLOS DE ENSAYO

4.1 *Ensayo de toxicidad aguda con Allium cepa L mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces de cebolla*

María Consuelo Díaz Báez, Alicia Ronco y Yolanda Pica Granados

4.1.1 Principio

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).

El efecto puede determinarse en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas al tóxico con las de cebollas no expuestas, luego de un periodo de 72 h 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.

4.1.2 Reactivos y materiales

Bulbos de *Allium sp* (cebolla amarilla)

Para la elaboración de las pruebas se deben seleccionar bulbos de 1,5 cm de diámetro, secos y sin formación de hojas y/o raíz. 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 4.1.1). No se deben dañar las raíces primordiales. Con el fin de eliminar los restos de tejidos es conveniente colocar los bulbos en agua destilada por dos horas y secar.

Medio de crecimiento

El medio de crecimiento utilizado para el desarrollo del ensayo se indica en la tabla 4.1.1.

La solución madre preparada de acuerdo con lo indicado se diluye diez veces con agua destilada, y el pH se ajusta a siete antes de utilizar. También se puede

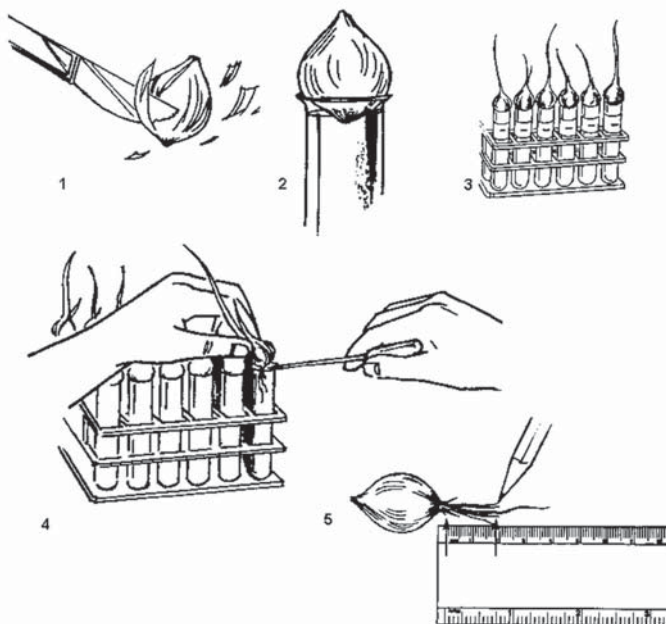


Figura 4.1.1. Esquema gráfico de los pasos a seguir en la prueba con *Allium cepa*. 1) limpieza y pelado de bulbos, 2) ubicación de bulbos en tubos para exposición a las soluciones de ensayo, 3) colocación de tubos en soporte, 4) agregado de soluciones a tubos durante el ensayo, 5) medición de longitud de raíces al finalizar el tiempo de exposición de los bulbos.

Tabla 4.1.1. Medio de crecimiento para *Allium* sp.

Masa de sal para disolver en un litro de agua destilada

Reactivo	mg
Ca (NO ₃) ₂ •4H ₂ O	236,1
KNO ₃	202
MgSO ₄ •7H ₂ O	246
KH ₂ PO ₄	136,1
Fe EDTA•3H ₂ O	67,6
Elementos traza	
Reactivo	mg
MnSO ₄	0,55 (*)
CuCl ₂	0,0645 (*)
NaMnO ₄	0,001 (*)
ZnSO ₄	0,0007 (*)
H ₃ BO ₃	0,23 (*)

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

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 químicos o las muestras deberá ser la misma.

Materiales

- 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.
- Reglilla para hacer mediciones en cm o mm.

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 humedad son altas, el almacenamiento está limitado a unos pocos días.

4.1.3 Procedimiento de la prueba

Preparación de diluciones

Generalmente se sugiere el empleo de una serie de cinco concentraciones, un control negativo y uno o dos controles positivos. 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 presuntiva puede emplearse una serie de diluciones logarítmicas, por ejemplo: 100; 10; 1; 0,1; 0,01, etcétera, lo cual permitirá establecer el intervalo de concentración conveniente para la determinación de la concentración inhibitoria media (CI_{50}).

Se recomienda igualmente utilizar agua dura para el control negativo, así como para la preparación de las diluciones de la muestra y la preparación del control positivo con el tóxico de referencia Cu(II).

Ensayo

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 cinco concentraciones de la muestra, un control negativo, y uno o dos controles positivos (ver capítulo 6 “Aseguramiento y control de calidad de bioensayos”), cada una con doce réplicas. El ensayo se inicia con el llenado de los tubos con cada una de las diluciones y controles; este llenado deber 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 4.1.1 [2]).

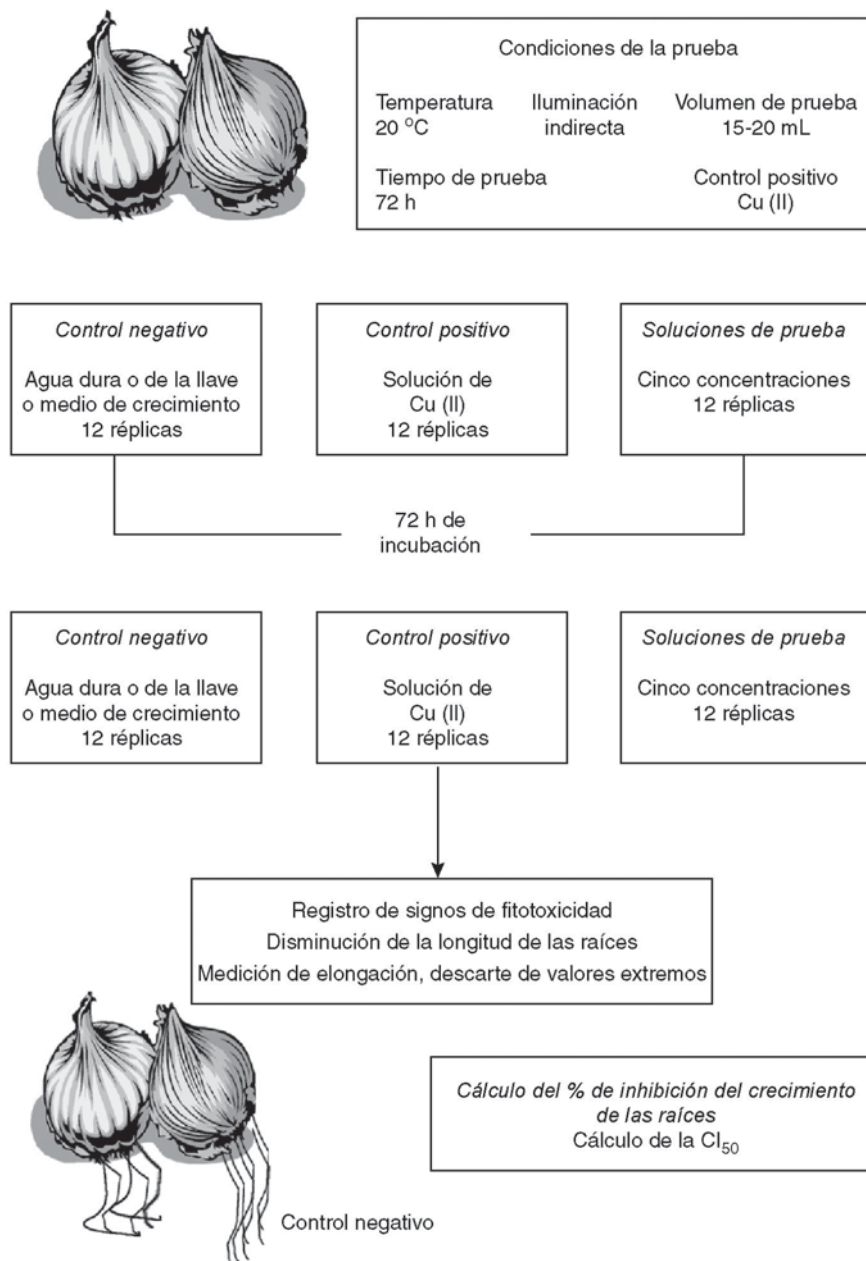


Figura 4.1.2. Ensayo de toxicidad con *Allium cepa* L.

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) por un periodo de 72 horas. Debe evitarse la iluminación directa.

Dos veces al día durante el periodo de prueba se debe restablecer el volumen perdido por evaporación o absorción. Para restablecer 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 4.1.1 [3 y 4]).

En las figuras 4.1.1 y 4.1.2, y en la tabla 4.1.2 se resumen las condiciones de prueba.

4.1.4 Expresión de resultados

Medición

Al término del periodo de exposición se registra la longitud promedio de las raíces, la cual se lleva a cabo con ayuda de una regla común con escala en milímetros (figura 4.1.3). La medición se lleva a cabo colocando la escala en el margen del

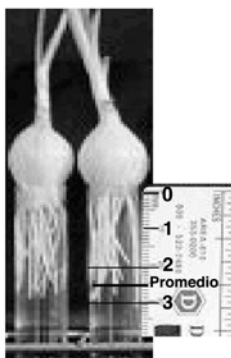


Figura 4.1.3. Elongación de las raíces de bulbos de cebolla después de un proceso de hidratación.

Tabla 4.1.2. Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con *Allium cepa* L.

1	Tipo de ensayo	Estático
2	Temperatura	20 °C; ambiente
3	Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
4	Iluminación	Indirecta
5	Recipientes	Tubos de ensayo de 10 x 1,5 cm de diámetro
6	Número de réplicas	12
7	Material biológico	Bulbos de aproximadamente 1,5 cm de diámetro
8	Condición de los bulbos	Pelar los bulbos y la base, evitar dañar el anillo radicular
9	Agua de dilución	Agua de la llave o canilla o medio de crecimiento
10	Número de concentraciones	Cinco
11	Duración de la prueba	72 h
12	Efecto medido	Inhibición de crecimiento de las raíces
13	Control negativo	Agua de la llave o medio de crecimiento
14	Control positivo	Cobre(II) a partir de una solución de CuSO_4
15	Resultado final	Cl_{50}

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 & Karber (ver capítulo 5 “Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad”).

REFERENCIAS

- Fiskesjö, G., 1985, *The Allium Test as Standard in Environmental Monitoring*, Hereditas, 102: 99-12.
- Fiskesjö, G., 1993, “The *Allium* Test in Wastewater Monitoring”. *Env. Toxicol. Wat. Qual.*, 8: 291-298
- Fiskesjö, G., 1997, “*Allium* Test for Screening Chemicals; Evaluation of Cytological Parameters”, in: *Plants for Environmental Studies*, Wancheng, W.; J. W. Gorsuch, J. S. Hughes eds., CRC Press, Florida, pp. 308-329.

4.2 Bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

María Consuelo Díaz Báez, Yolanda Pica Granados y Alicia Ronco

4.2.1 Principio

Dentro del grupo de 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, de carácter universal.

El género *Daphnia* se ubica dentro del orden cladócera de la clase crustácea, y especies como *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* y *Daphnia 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 tóxicos. Específicamente, los ensayos de toxicidad con *Daphnia magna* (ver figura 4.2.1 en anexo fotográfico) permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros.

En las pruebas de toxicidad con *D. magna*, neonatos menores de 24 h de edad son expuestos a la muestra o compuesto a probar, por un periodo de 48 h, al término

del cual se cuantifica el número de organismos muertos. Con estos resultados se establece la proporción o porcentaje de mortalidad producida.

4.2.2. Materiales, reactivos y equipos

Material biológico

Las hembras partenogenéticas 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 taxonómicamente identificada.

Materiales de laboratorio

- Acuarios de 3 L de capacidad.
- Vaso de precipitado de 2 000, 1 000 y 600 mL.
- Pipetas volumétricas y graduadas de 1, 2, 5, 10 y 20 mL.
- Matraz aforado de 100 mL.
- Pipetas Pasteur y bulbos de látex.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL, peras para pipetas.
- Pipetas automáticas de 250, 500 y 1 000 mL; puntas para micropipetas.
- Recipientes plásticos de 30, 50 y 100 mL.
- Papel aluminio.
- Garrafón o bidón de veinte litros.
- Manguera delgada para bombas de acuario.
- Matraz Kitasato de dos litros.
- Platos para pesar reactivos.
- Espátulas.
- Hielera y hielo o geles refrigerantes.
- Papel Parafilm.
- Tubos de ensayo.

Reactivos

- NaHCO_3
- MgSO_4
- KCl
- $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Biotina.
- Tiamina.
- Vitamina B_{12}
- Na_2SeO_4
- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
- Agua deionizada o destilada.

Equipos

- 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.
- Autoclave o equivalente.
- Medidor de oxígeno disuelto.
- Potenciómetro.
- Tituladores para dureza y alcalinidad.
- Termómetro.
- Sistema purificador de agua (deionizador, sistema *Milli-Q*) o una fuente de abastecimiento de agua destilada.
- Centrífuga.

4.2.3 Cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba

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

Los organismos se mantienen en agua reconstituida con una dureza entre 160 y 180 mg CaCO_3/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 (ver figura 4.2.2 en anexo fotográfico).

Los cultivos se mantienen a una temperatura de 21 ± 2 °C, un fotoperiodo aproximado de 16 h luz/8 h oscuridad y una intensidad lumínica de alrededor de 800 lux (ver condiciones en tabla 4.2.1).

Agua dura reconstituida (APHA,1998)

Para su preparación se recomienda colocar en un garrafón: 19 L de agua deionizada o destilada 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 1L de agua deionizada o destilada. Es necesario tener en cuenta que la disolución de esta sal puede requerir un periodo 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 veinte litros de agua dura reconstituida.

Suplementos (adicionar sólo en caso de un crecimiento deficiente del cultivo)

Cuando se determine la necesidad de suplementar el agua dura, deben prepararse por separado las soluciones de biotina, vitamina B_{12} , tiamina y selenito de sodio (Na_2SeO_4) (Elendt & Bias, 1990), de la siguiente forma:

Solución de biotina	0,0075 g/L
Solución de vitamina B ₁₂	0,010 g/L
Solución de tiamina	0,075 g/L
Selenito de sodio (Na ₂ SeO ₄)	0,010 g/L

Las soluciones preparadas se deben mantener refrigeradas (4 ± 2 °C) y pueden almacenarse por un periodo de hasta seis meses. Para un volumen de veinte litros 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).

Tabla 4.2.1. Resumen de las condiciones recomendadas para el mantenimiento de cultivos de *Daphnia magna*.

Temperatura	20±2 °C
Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
Intensidad luminosa	600-1000 lux (luz blanca fría) en la superficie del líquido
Fotoperiodo	16 horas luz/8 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
Dosis de alimento	La cantidad de alimento suministrada se calcula de la siguiente manera: $V = A \times B / C$ donde: V = volumen a ser adicionado, A = número de organismos B = número de células por <i>daphnia</i> (1,5 x10 ⁶ células por <i>daphnia</i> /día), C = densidad celular de la suspensión algal El alimento es suministrado diariamente
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, los cuales deben lavarse con una esponja o un paño de tela, enjuagar varias veces con agua desionizada. No se deben 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 como para no ocasionar daños a los neonatos.

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 h). El aire utilizado debe estar libre de grasas y aceites.

Se recomienda que antes de utilizar el agua se determine: 1) la concentración de oxígeno (la cual debe estar por encima de 6 mg/L), y 2) y la dureza (que debe encontrarse dentro del intervalo preestablecido de 160-180 mg CaCO₃/L). En caso de que alguno de los 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 y/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 diez neonatos/recipiente. Al cabo de las 48 h la supervivencia deberá ser mayor del 90%; en caso contrario se debe descartar el agua reconstituida.

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/L5.018,1991) recomiendan mantener lotes de individuos separados por edad, desde 0-1 semana hasta cuatro o cinco semanas de la siguiente forma:

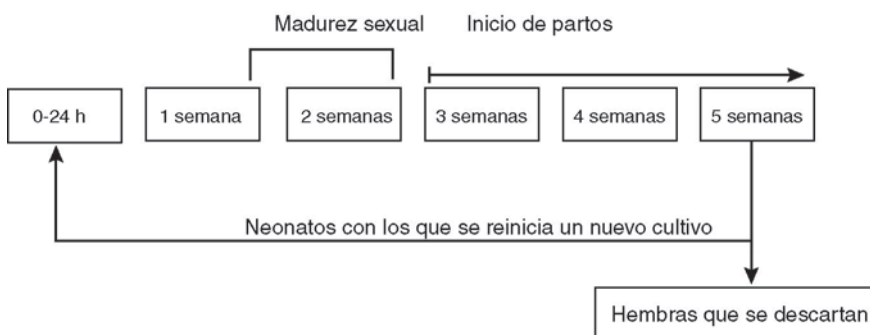


Figura 4.2.3. Cultivo de organismos-ciclo de renovación.

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 mudas y los restos de alimento depositados en el fondo de los recipientes. Al finalizar, se recupera el volumen de agua en cada recipiente, adicionando y/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 a cuatro o cinco semanas, reemplazarlos e iniciar un nuevo cultivo con los neonatos colectados ese día.

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 h de nacidos.

Alimentación

Para la alimentación de los cultivos se pueden emplear suspensiones de diferentes especies de algas (*Selenastrum capricornutum*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.*, etcétera). Para el cultivo de los dos primeros géneros se recomienda utilizar medio AAP, cuyos detalles de preparación se presentan en el protocolo de prueba para *S. capricornutum* (US EPA, 1991); para las restantes especies se puede utilizar medio Bristol, cuya composición se detalla en la tabla 4.2.2.

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, calcular el volumen de la siguiente manera:

$$V=(AxB)/C$$

Donde:

- V = volumen del concentrado algal.
 A = número de *daphnias* por acuario.
 B = dosis óptima recomendada ($1,5 \times 10^6$ 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 protocolo de prueba con *Selenastrum capricornutum*).

Tabla 4.2.2. Medio de cultivo o medio Bristol.

Solución de macronutrientes			
Compuesto	Solución núm.	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
KOH	8	3,1 g/100 mL	
EDTA		5,0 g/100 mL	1
FeSO ₄ • 7H ₂ O	9 0,498	g/100 mL	
H ₂ SO ₄		0,1 mL/L	1
H ₃ BO ₃	10 1,142	g/100 mL	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		

Control del cultivo del organismo de prueba

Para establecer si los individuos del cultivo tienen las condiciones fisiológicas óptimas para el desarrollo de pruebas de toxicidad, es necesario hacer un seguimiento de la sensibilidad del cultivo empleando tóxicos de referencia, así como evaluar alteraciones en el ciclo de vida. El control de estas características permitirá mantener el correcto desarrollo del cultivo.

a) Prueba de sensibilidad

Los cambios en el estado fisiológico del cultivo pueden ser detectados mediante la evaluación periódica de la respuesta de los individuos a un determinado tóxico de referencia. Aunque existen varios tóxicos recomendados, uno de los más utilizados es el cromo (Cr VI) a partir de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$). Para determinar si la sensibilidad del cultivo es adecuada es necesario, previo a iniciar las pruebas rutinarias, evaluar la respuesta de los organismos ante la exposición al tóxico de referencia. La concentración en la cual se produce la muerte del 50% de la población de neonatos (concentración letal media o CL_{50}) deberá encontrarse dentro del intervalo anteriormente establecido.

Para definir este intervalo es necesario realizar por lo menos cinco pruebas con el tóxico de referencia, con estos datos se inicia la construcción de la carta control que deberá complementarse con la información generada en nuevas evaluaciones, las cuales se recomienda, se realicen de forma rutinaria una vez por mes hasta alcanzar un número de veinte. Esta carta se debe mantener actualizada con los veinte datos más recientes (US EPA, 1991). A partir de estos resultados, se determina la CL_{50} promedio para la sustancia, así como la desviación estándar (σ) de la CL_{50} . Los límites superior (promedio + 2σ) e inferior (promedio - 2σ), corresponderán al intervalo de concentración en el cual varía la respuesta de los organismos al tóxico seleccionado (figura 4.2.4.).

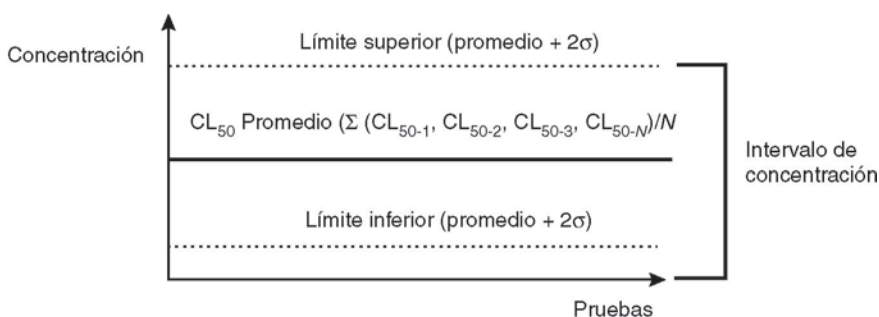


Figura 4.2.4. Modelo de construcción de la carta control para el tóxico de referencia.

Para estimaciones de punto como la CL_{50} con un nivel de probabilidad $P_{0,05}$, se espera que sólo una de veinte pruebas esté fuera de los límites del intervalo por azar. Si se produce más de un valor fuera de los límites de control, los resultados de las pruebas de toxicidad llevadas a cabo durante el mes que se produjo el valor

fuera de los límites deberán considerarse provisionales y debe llevarse a cabo una cuidadosa revisión. Estos valores por fuera del control estarían indicando anomalías en la sensibilidad de los organismos de prueba.

En caso que se presenten variaciones anómalas de la sensibilidad, se deben verificar las condiciones de cultivo y eliminar las posibles causas que están alterando la respuesta de los individuos.

b) Desarrollo óptimo del cultivo

En forma similar se recomienda hacer regularmente un monitoreo del desarrollo del cultivo, el cual puede llevarse a cabo mediante el seguimiento del ciclo de vida de los individuos, estableciendo la edad de madurez sexual, la tasa reproductiva y la longevidad.

Para el seguimiento del ciclo de vida, se coloca un número conocido de neonatos (cinco a diez) del mismo parto, cada uno en un recipiente y se anota la fecha de inicio del proceso. Durante todo el periodo de monitoreo se deberá alimentar a los organismos y mantener los patrones de limpieza rutinarios recomendados anteriormente.

Madurez sexual

Durante la primera semana de seguimiento se harán observaciones del crecimiento y maduración de los neonatos, así como la formación de los huevos en su bolsa de incubación (ver figura 4.2.2 en anexo fotográfico). Este evento, así como el tiempo al cual se produce el primer parto debe registrarse a fin de definir la edad en que se alcanza la madurez sexual del cultivo.

De acuerdo con datos reportados en la literatura (Lewis & Maki, 1981; Goulden *et al.*, 1982), los individuos de un cultivo sano alcanzan su madurez sexual entre los ocho y doce días de edad. En caso de que dicho periodo sea más prolongado o se observe mortalidad, es necesario revisar las condiciones del mantenimiento del cultivo o suplementar el agua reconstituida con vitaminas y selenio.

Tasa reproductiva

A partir del primer parto, se lleva a cabo un registro diario del número de crías que se producen, removiéndolas de los recipientes de monitoreo. El registro debe cubrir un tercio del ciclo de vida (21 días) o hasta cuando alguna de las hembras adultas muera (lo que suceda primero). Con los resultados obtenidos se establece el número de crías promedio por hembra.

Este valor puede oscilar entre 112 y 212 de acuerdo con algunos autores (Girling & Garforth, 1989; Klüttgen *et al.*, 1994).

Longevidad

Para determinar la longevidad, el seguimiento debe prolongarse hasta que quede con vida por lo menos el 20% del número inicial de organismos bajo observación. En el registro se debe anotar el tiempo al que se produce la muerte, valores que permitirán establecer la longevidad promedio de los individuos

del cultivo. De acuerdo con Edley & Law (1988) y Girling & Garforth (1989), la longevidad de las *daphnias* provenientes de un cultivo sano puede variar entre cuarenta y sesenta días.

La detección de mortalidad en periodos más cortos hará necesaria la revisión de las condiciones de mantenimiento del cultivo o, incluso, el manejo de suplementos en el agua dura (vitaminas y selenio).

4.2.4. Procedimiento de la prueba

Para el desarrollo de pruebas de toxicidad aguda con *D. magna* se emplean neonatos (< 24 h nacidos) expuestos a diferentes concentraciones de una muestra o de un agente tóxico durante un periodo de 48 h. 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 por ciento.

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).

Cuando no hay un conocimiento de la toxicidad de las muestras es recomendable llevar a cabo una prueba preliminar, en la cual se prepara un amplio número 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 los vasos de prueba, se transfieren diez neonatos y a las 24 h 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 mortalidad. Este intervalo se utiliza como guía para la preparación de las diluciones en las pruebas definitivas.

Para la preparación de las diluciones de las muestras se utiliza como medio de dilución agua dura reconstituida (180 y 160 mg/L $CaCO_3$), sin ningún suplemento. En la preparación del agua se deben determinar los parámetros (numeral 4.2.3) señalados anteriormente (APHA, 1998).

Preparación de las soluciones de prueba: muestras ambientales (efluentes y aguas superficiales)

Para preparar las diluciones de la muestra 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%, etcétera). Si se observa un alto porcentaje de mortalidad durante las primeras horas del bioensayo, es necesario realizar más diluciones de la muestra y repetir el bioensayo.

Las pruebas definitivas requieren por lo menos cinco 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. Como recipientes se pueden emplear vasos de polietileno desechables (figura 4.2.5) de 30 mL, o vasos de precipitado de vidrio de 50 mililitros.

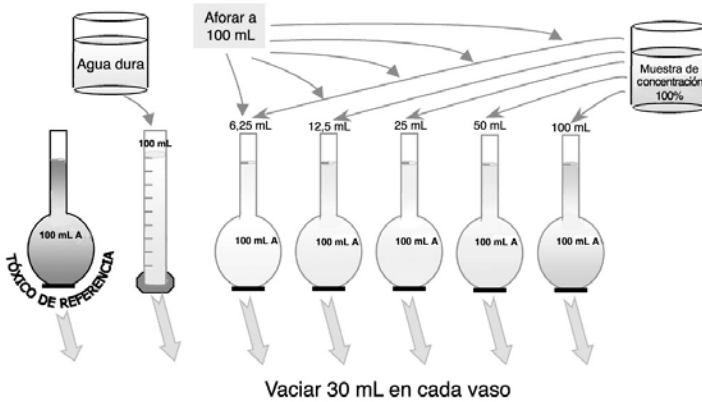
Además de las diferentes concentraciones de la muestra, se debe preparar junto con las respectivas réplicas un control negativo con agua dura reconstituida sin suplementos, y un control positivo con una solución del tóxico de referencia (Cr VI) en la concentración que, según la carta control previamente elaborada, corresponda a la CL_{50} .

Una vez preparadas cada una de las soluciones, se transfieren diez neonatos de menos de 24 h 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 4.2.2) por un periodo 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 cardiaco. 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 cardiaco.

En las figuras 4.2.5 y 4.2.6 se presenta un esquema del procedimiento de prueba, así como el diagrama de flujo de las actividades seguidas durante la elaboración de las pruebas de toxicidad con *Daphnia magna*.

1 Preparación de diluciones



2 Preparación de prueba

$20 \pm 2^\circ \text{C}$, e iluminación
600-1 000 lux por 48 h

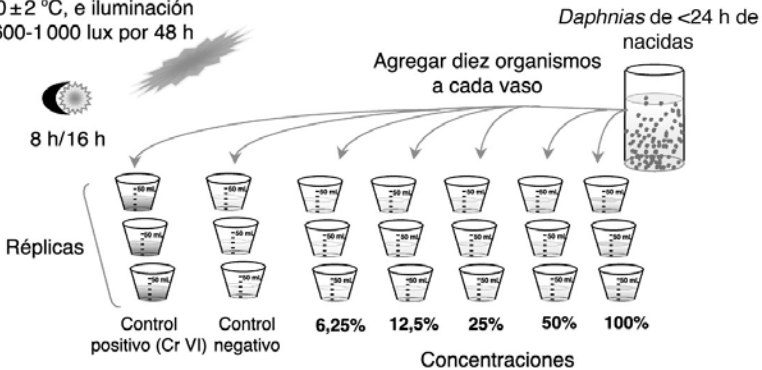


Figura 4.2.5. Procedimiento de prueba.

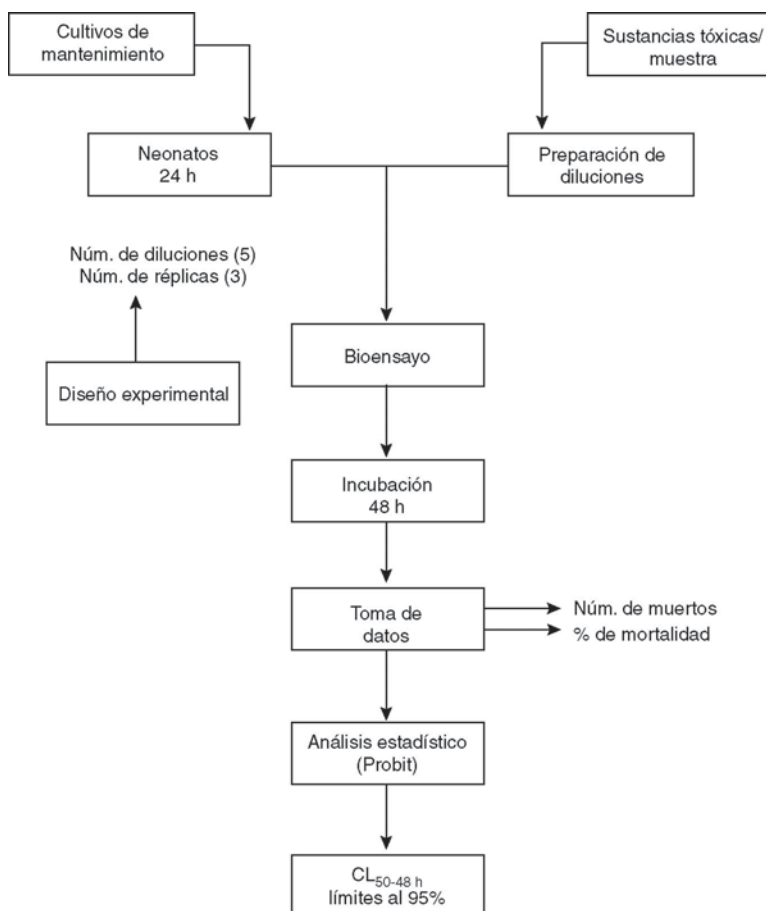


Figura 4.2.6. Diagrama de flujo de las actividades vinculadas al desarrollo del protocolo de prueba de Daphnia magna.

4.2.5 Expresión de los resultados

Cálculo de la CL_{50}

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.

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 transforma a unidades Probit. Esta transformación permite el ajuste a una línea de regresión, en la cual la

concentración perteneciente 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 CE_{50} o CL_{50} 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 CL_{50} para el 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 CL_{50} , los valores de mortalidad obtenidos deberán encontrarse cercanos al 50%. Se puede considerar aceptable el encontrar mortalidades entre el 33 y 57 por ciento.

REFERENCIAS

- APHA, 1998, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed., American Public Health Association, Ap. 8010G., Washington D.C., pp. 8-20, 8-23.
- CETESB, 1991, *Água-Teste de Toxicidade com D. similis Clauss 1876 (Cladocera, Crustacea)*, *Método 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. Burlington, Ontario.
- Edley, M.T. & R. Law, 1988, "Evolution of Life Histories and Yields in Experimental Population of *Daphnia magna*", *Biol. J. Limn. Soc.*, 34: 309-326.
- Eldendt, B.P. & Bias, W.R., 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*", *Wat. Res.* 24 (9): 1157-1167.
- Girling, A.E. & Garforth, B.M., 1989, "Influence of Variations in Culture Medium on the Survival and Reproduction of *Daphnia magna*", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42:119-125.
- Goulden, C.E., Comotto, R.M., Hendrickson, J.A. Jr., Horning, L.L. & K.L. Johnson, 1982, *Procedures and Recommendations for the Culture and Use of Daphnia in Bioassay Studies*, Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster & W. E. Bishop, eds., American Society for Testing and Materials, pp. 139-160.
- Gutiérrez, L.E., Lerdo de Tejada B.A., Huerto-Delgadillo, R.Y. & C.J. García, 1989, *Procedimientos de evaluación tóxica de efluentes industriales líquidos utilizando Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)*, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, México, pp. 105.
- Klüttgen, B., Dülmer, U., Engels, M. & H.T. Ratte, 1994, "A Dam and Artificial Freshwater for the Culture of Zooplankton", *Water Research*, 28 (3): 743-746.
- Lewis, M.A. & A.W. Maki, 1981, "Effects of Water Hardness and Diet on Productivity of *Daphnia magna* Strauss, in Laboratory Culture", *Hydrobiology*, 85: 175-179.
- US EPA Environmental Protection Agency (EPA), 1991, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluent and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*, 4th ed, Weber, C.I., ed., EPA-600/4-90-027.

4.3 Bioensayo de toxicidad aguda (efectos letales y subletales) con *Hydra attenuata*

Yolanda Pica Granados, Alicia Ronco y María Consuelo Díaz Báez

4.3.1 Principio

Los pólipos de agua dulce del género *Hydra* son microinvertebrados de la clase Hydrozoa de amplia distribución geográfica y 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 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 & Bode, 1983). Su tamaño varía de 5 a 20 mm de longitud, y de 2 a 3 mm de espesor (figura 4.3.1).

La especie *Hydra 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 aumentando su potencial para la detección de tóxicos, así como el presentar cambios morfológicos fácilmente reconocibles bajo condiciones progresivas de intoxicación (Trottier *et al.*, 1997).

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

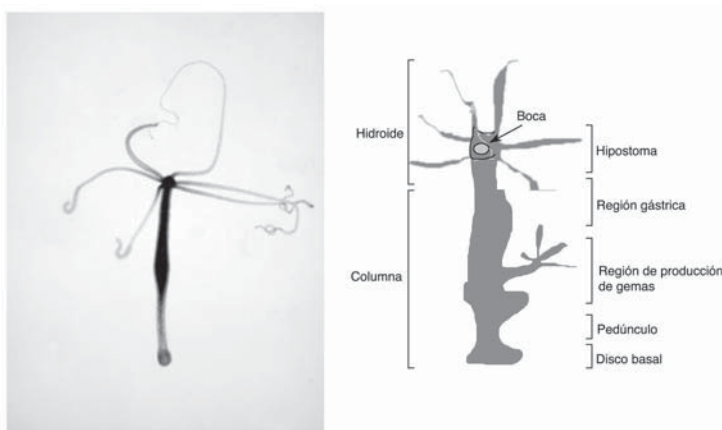


Figura 4.3.1. Morfología de *Hydra attenuata*.

Las pruebas de toxicidad con *Hydra attenuata* tienen una duración máxima de 96 h, tiempo durante el cual los organismos son expuestos al tóxico o muestran problemas. Durante el ensayo, diariamente se hace un examen microscópico y se registran 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 TOEC (Blaise & Kusui, 1997).

4.3.2 Reactivos y soluciones

Todos los reactivos utilizados deben tener una calidad ACS o, por lo menos, 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 de *Hydra*

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 4.3.1.

Tabla 4.3.1. Reactivos utilizados en la preparación de medio de Hydra.

Reactivo	Cantidad
Cloruro de calcio: $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,94 g
N-tris (hydroximetil)metil 1-2aminoetanosulfónico, Buffer TES	2,2 g
Ácido etilén-diamino-tetraacético (EDTA)	0,080 g
Agua destilada	20,0 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 volumen (20 L) con agua destilada. El pH del medio debe ser $7,0 \pm 0,1$; 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 de *Hydra* sin EDTA

Para el enjuague de las *Hydras* 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 etilén-diamino-tetraacético (EDTA).

Medio de cultivo de *Hydra* para suplementar las muestras de agua que van a ser ensayadas

Cuando se analizan muestras de aguas naturales, aguas residuales o agua de poro de sedimentos, se debe adicionar a la muestra una concentración de cloruro de

calcio y *Buffer* TES igual a la presente en el medio de cultivo de *Hydra*. Para adicionar estos compuestos se procede de la siguiente forma: a un volumen de 100 mL de muestra filtrada (0,22 mm) 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 $7,0 \pm 0,1$ con una solución de NaOH o HCl 1 N. Este ajuste se realiza antes de la preparación de las diluciones de la muestra.

4.3.3 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 lux aproximadamente (equivalente a la incidencia de luz natural en áreas interiores), y un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h 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

1. Dependiendo de la calidad de los huevos de *Artemia*, 24 o 48 h antes de la alimentación se coloca media cucharadita de quistes en 500 mL de una solución salina (10 g NaCl/L). 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 cinco minutos, los quistes no eclosionados sedimentan y los nauplios forman una nube que flota cerca del fondo del recipiente.
2. 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 de 100 a 150 mL de una solución de NaCl (10 g/L) y media pastilla de yodo disuelta en dicha solución. Generalmente se utilizan tabletas de yodo comerciales para desinfección de aguas formuladas con tetraglicina hidropéridato; en caso de que exista dificultad para obtenerlas, se pueden usar cinco gotas de una solución de yodo-povidona de uso farmacéutico, cuya formulación debe indicar un contenido de 8 a 10 g de yodo-povidona en 100 mililitros.
3. Después de diez o 15 min se drena el tamiz para eliminar el excedente de la solución y se transfiere a otro recipiente de iguales dimensiones, con medio de cultivo de *Hydra*. Se deja reposar tres min, 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 *Hydra* durante la alimentación y reduciendo el riesgo de infecciones en el cultivo (ver figura 4.3.2 en anexo fotográfico).

4. Desinfectada la *Artemia*, se procede a alimentar a las *hydras* 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 una o dos horas para efectuar una primera limpieza y eliminar los nauplios excedentes. Después de cuatro o cinco 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 *hydras* flotantes se recuperan al filtrar el medio de desecho con un tamiz de 60 mallas.
5. 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 *hydras* 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 volumétrica 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 cubre permitiendo la entrada de aire (Johnson *et al.*, 1990) (ver figura 4.3.3 en anexo fotográfico).

Control del cultivo

Antes de iniciar las pruebas de toxicidad es importante verificar si la salud de las *hydras* 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, se colocan en un recipiente pequeño con suficiente medio de cultivo cinco organismos de similar tamaño, que presenten una gema. En una *Hydra* adulta cada hidrante está localizado en la cabeza del animal, como cada *Hydra* seleccionada tiene una yema, el número de hidrantes al tiempo cero será igual a diez. Durante todo el periodo de evaluación, se debe realizar la limpieza y alimentación de forma rutinaria, evitando que durante la manipulación se produzca la pérdida de hidrantes. Diariamente, durante un periodo de cinco a seis días, se cuenta y registra el número de hidrantes con ayuda de una lupa estereoscópica.

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

$$k = (\ln 2) / T = 0,693 / T$$

donde T es el tiempo expresado en días requerido para que la población se duplique.

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). En la tabla 4.3.2 se resumen las condiciones de cría y mantenimiento de los organismos.

Tabla 4.3.2. Resumen de las condiciones recomendadas para el mantenimiento de cultivos de *Hydra attenuata*.

Temperatura	21±2 °C
Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
Intensidad luminosa	800 lux (luz blanca fría) en la superficie del líquido
Fotoperiodo	16 horas luz/8 oscuridad
Recipientes de mantenimiento	Circulares de vidrio transparente de 20 cm de diámetro de fondo plano, tipo refractario. Debe permanecer la entrada de aire
Alimentación	Cuatro días por semana alimentar con nauplios de <i>Artemia sp.</i> , desinfectados con solución yodada
Dosis de alimento	No requiere de control estricto, sólo la adición de 2 a 3 mL de medio de <i>Hydra</i> , conteniendo una nube densa de artemias eclosionadas a cada recipiente de cultivo y homogeneizar su distribución para que cada <i>Hydra</i> pueda tomar entre uno y seis nauplios
Densidad poblacional	No requiere control estricto. Sólo requiere cuidado 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: el primero dos horas después de la alimentación y el segundo cuatro o cinco horas más tarde. Recuperar organismos flotantes con tamiz de 60 mallas. Semanal: desprendimiento de organismos del fondo, recuperar con tamiz y transferir a recipientes limpios con medio de <i>Hydra</i> fresco

4.3.4 Procedimiento de la prueba

Preparación de la muestra

En caso de muestras acuosas, excepto soluciones de compuestos químicos puros, debe filtrarse un volumen aproximado de 150 mL de muestra a través de una membrana de 0,22 milímetros.

Preparación de diluciones

Para la realización de pruebas se recomienda trabajar con un mínimo de siete diluciones seriadas de la muestra problema, y una concentración del tóxico de referencia (ver capítulo 6 “Aseguramiento y control de calidad de bioensayos”). Para las pruebas preliminares con compuestos tóxicos puros o muestras ambientales, se

recomienda emplear una serie de diluciones logarítmicas (100; 10; 1; 0,1; etcétera), e identificar posteriormente el intervalo de concentraciones conveniente en el que deberá desarrollarse la prueba definitiva.

Para el control negativo, medio de dilución para la preparación de las diluciones de la muestra y la del tóxico de referencia (sea Cr VI o NaCl), emplear agua dura reconstituida sin ningún suplemento. Ver fórmula del agua de dilución en el protocolo de prueba para *Daphnia magna* (numeral 4.2.3).

Sistema de prueba

Las pruebas de toxicidad se llevan a cabo en microplacas de cultivo celular de 12 pozos (figura 4.3.4). 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 de Petri de 35 x 10 milímetros.

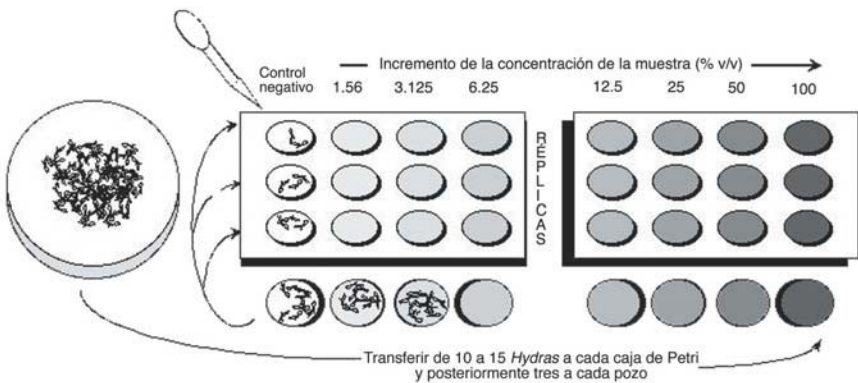


Figura 4.3.4. Disposición de las concentraciones de prueba en el ensayo y transferencia de organismos.

Transferencia de *hydras*

1. Se selecciona un grupo de organismos mantenidos sin alimentación durante 24 h. Se elimina el medio de cultivo invirtiendo el recipiente y descartando el líquido; los organismos permanecerán adheridos al fondo del recipiente. A continuación adicionar un volumen de medio de cultivo de *Hydra* sin EDTA.
2. Se vuelven a suspender 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.

3. A continuación, se colocan las *hydras* en un recipiente de 10 cm de diámetro con medio de cultivo sin EDTA, y con la ayuda de una pipeta Pasteur se transfieren de diez a 15 organismos a cada una de las cajas de Petri. Esta transferencia permite reducir el efecto de dilución producido por el medio de cultivo sobre la concentración de la muestra. Posteriormente se colocan tres *hydras* en cada pozo, evitando aquellas que presenten gemas (figura 4.3.4).

4.3.5 Expresión de los resultados

La prueba se desarrolla por un periodo de exposición de 96 h. Cada 24 h se realiza la observación de los organismos con la ayuda de un microscopio estereoscópico o lentillas de acercamiento con capacidad de 6 a 10x, con la intención de registrar los cambios morfológicos ocurridos. Dichos cambios se clasifican como se establece en la figura 4.3.5.

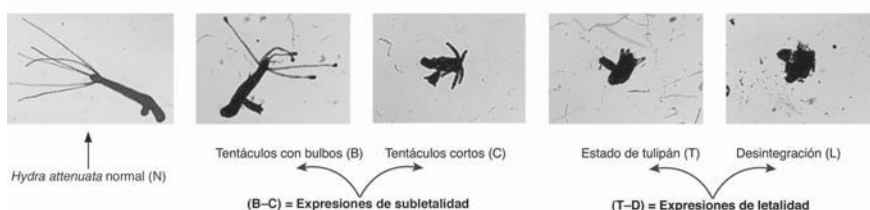


Figura 4.3.5. Microfotografías de *Hydra attenuata*, mostrando los diferentes cambios morfológicos: a) normal, b) bulbo, c) acortamiento de tentáculos, d) estadio de tulipán, e) desintegración (Trottier et al., 1997).

Al terminar la revisión diaria, sumar el número total de *hydras* que presentan el mismo estado morfológico en los tres pozos correspondientes a cada dilución. Con los resultados formar tres grupos: el primero definido por el número de *hydras* normales, el segundo con organismos que presentan efectos subletales (núm. bulbos + núm. cortas) y el tercero con organismos que presentan efectos letales (núm. tulipán + núm. desintegradas).

A partir de los resultados registrados, obtener para cada concentración el porcentaje de efectos 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 porcentaje de letalidad se obtendrá 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 (*Threshold Observable Effect Concentration*, por sus siglas en inglés), este último se calcula según:

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

En la tabla 4.3.3 y la figura 4.3.4 se resumen las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con *H. attenuata*.

Tabla 4.3.3. Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con *H. attenuata*.

1	Tipo de ensayo	Estático
2	Temperatura	21±2 °C
3	Calidad de luz	Iluminación natural (cercana a una ventana) fluorescente o blanco-frío
4	Intensidad luminosa	800 lux
5	Fotoperiodo	16 h luz/8 h de oscuridad
6	Volumen del recipiente	5 mL en placas estériles de 12 pozos
7	Volumen de la solución de prueba	4,0 mL
8	Características de los organismos	Pólipos (<i>hydras</i>) sin gemas, en ayuno de 24 h
9	Densidad inicial de organismos	Tres <i>hydras</i> por pozo
10	Número de réplicas	Tres
11	Agua de dilución	Agua dura (sin suplementos)
12	Factor de dilución	0,3 o 0,5
13	Duración de la prueba	96 h, revisión cada 24 h
14	Efecto medido	Cambios morfológicos. Número de organismos normales con tentáculos, con bulbos o acortados (reversibles), o sin tentáculos y pólipos desintegrados (irreversibles)
15	Resultado final	CE ₅₀ para subletalidad y (CL ₅₀) letalidad
16	Aceptabilidad de los resultados	Morfología normal en el 100% de los organismos en el control negativo
17	Control positivo	Cr (VI) a partir de una solución de K ₂ Cr ₂ O ₇

REFERENCIAS

- Blaise, C. & T. Kusui, 1997, "Acute Toxicity Assessment of Industrial Effluents with a Microplate-based *Hydra attenuata* Assay", *Environm. Toxicol. Water. Qual.*, 12:53-60.
- Campbell, R.D. & H.R. Bode, 1983, "Terminology for Morphology and Cell Types", pp. 5-14, in H. M. Lenhoff, ed., *Hydra: Research Methods*, Plenum Press, New York.
- Johnson, E.M., Gabel, B.E.G., Newman, L.M. & 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, Philadelphia, P.A., USA, 19107, 96 p.
- Trottier, S., Blaise, C., Kusui T., & Johnson, E.M., 1997, "Acute Toxicity Assessment of Aqueous Samples using a Microplate-based *Hydra attenuata* Assay", *Environm. Toxicol. Water. Qual.*, 12:265-271.

4.4 Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.)

María Cecilia Sobrero y Alicia Ronco

4.4.1 Principio

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 h de exposición) en la 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. Es importante destacar que durante el periodo de 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 el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos (figura 4.4.1). 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 relevante 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.

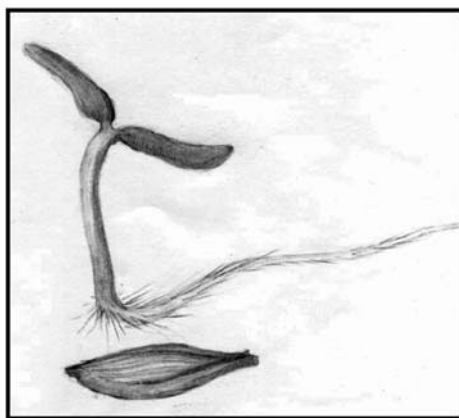


Figura 4.4.1. Morfología de la semilla y la plántula de lechuga.

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 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 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, además de simplificar 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 los 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 pesticidas sobre especies no blanco necesarios para el registro de pesticidas (OECD, 1984; Wang, W. 1987; US EPA, 1989; Boutin *et al.*, 1993).

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 reúso de biosólidos.

4.4.2 Reactivos y materiales

- Material biológico: semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L var. mantecosa).
- Agua dura reconstituida (APHA, 1992). Para su preparación se recomienda utilizar reactivos Grado ACS y agua destilada en vidrio o *Millipore Supera Q*.
- Cápsulas de Petri de 100 mm de diámetro.
- Papel de filtro Whatman núm. 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 (ej. blanqueadores).
 - Que no promueva el desarrollo de hongos (no asociados a las semillas).
- 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.
- Cámara oscura termostatzada (22 ± 2 °C).

Obtención, control y conservación de las semillas

La obtención de semillas de lechuga (*L. sativa* L var. mantecosa) 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. Los criterios de control del material biológico y del desarrollo de la prueba se describen en el capítulo 6 “Aseguramiento y control de calidad de bioensayos”.

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 dos 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 (ver también capítulo 6 “Aseguramiento y control de calidad de bioensayos”). En este caso se recomienda realizar las pruebas de toxicidad utilizando un nuevo lote de semillas.

4.4.3 Procedimiento para el desarrollo de la prueba

Preparación de las diluciones

Para realizar una curva dosis-respuesta se recomienda preparar un mínimo de cinco o seis 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 cinco 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 presuntiva (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} .

Con el fin de controlar la sensibilidad de las semillas, simultáneamente a la evaluación de la toxicidad de una muestra debe realizarse un control positivo, utilizando, por ejemplo, una sal de Zn (II) como tóxico de referencia. La concentración de prueba de este control es la correspondiente a la CI_{50} para el lote de semillas en uso (ver capítulo 6 “Aseguramiento y control de calidad de bioensayos”).

Protocolo de ensayo

En la figura 4.4.2 y tabla 4.4.1 se resume el procedimiento del ensayo de toxicidad aguda con semillas:

- Colocar en cada cápsula de 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.

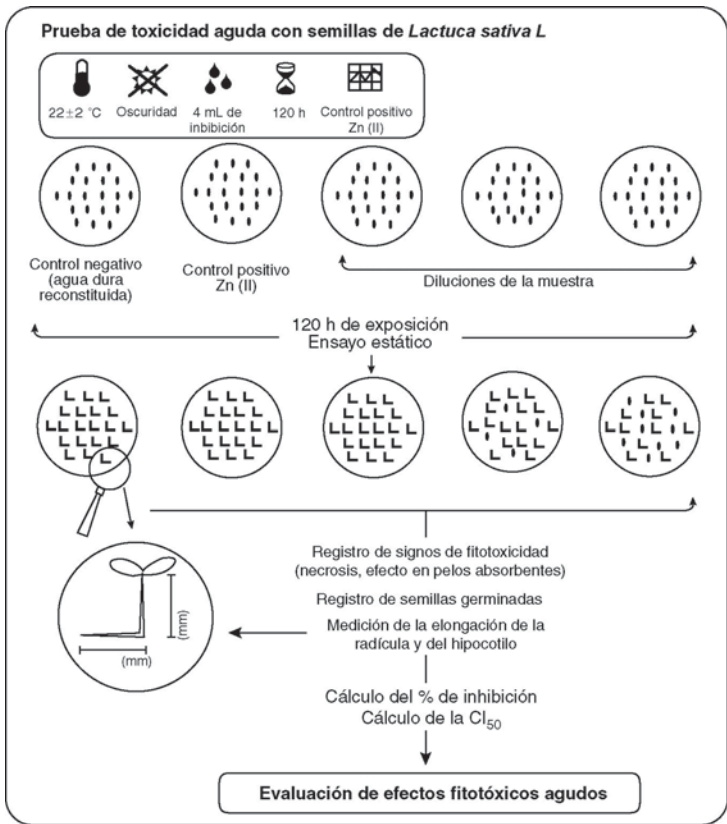


Figura 4.4.2. Esquema general del procedimiento de prueba de toxicidad con semillas.

Tabla 4.4.1. Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con *Lactuca sativa* L.

1	Tipo de ensayo	Estático
2	Temperatura	22±2 °C
3	Calidad de luz	Oscuridad
4	Volumen de solución de prueba	4 mL
5	Agua de dilución	Agua dura reconstituida
6	Número de semillas por réplica	Veinte
7	Número de réplicas	Tres
8	Duración de la prueba	120 h
9	Efecto medido	Inhibición en la elongación de la raíz y hipocotilo. Inhibición en la germinación
10	Resultado final	CE_{50} o CI_{50} 0% inhibición
11	Aceptabilidad de los resultados	Germinación > 90% Control positivo y negativo de acuerdo con los valores admitidos en las cartas control
12	Control positivo	Zn (II)

- Con la ayuda de una pinza, colocar cuidadosamente veinte semillas, dejando espacio suficiente entre ellas 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 en las cápsulas y durante el periodo de ensayo. Incubar durante 120 h (cinco días) a una temperatura de 22 ± 2 °C. Realizar repeticiones para cada dilución ensayada.

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 periodo de exposición (120 h), se procede a cuantificar el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula y del hipocotilo.

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 de 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 4.4.3). La figura 4.4.4 muestra los distintos estadios de la semilla durante la prueba de germinación y elongación.

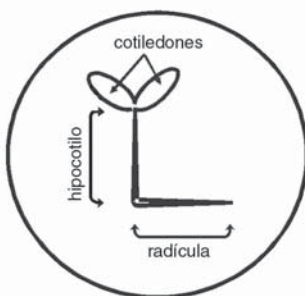


Figura 4.4.3. Esquema de plántula de *L. sativa* al finalizar el periodo de exposición.



Figura 4.4.4. Estadios por los que atraviesa la semilla durante el ensayo de germinación y elongación.

Antes de retirar las plántulas de las cápsulas de 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, etcétera). 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 cápsulas de 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 periodo de exposición.

Control de calidad de la prueba

El ensayo deberá repetirse en caso de que los controles presenten:

En el control negativo:

- Porcentaje de germinación inferior al 90%.
- Alta variabilidad en la elongación de la radícula ($CV > 30\%$).

En el control positivo:

- Porcentaje de germinación inferior al 90%.
- Variación de la sensibilidad de las semillas fuera de lo permitido por las cartas control (ver capítulo 6 “Aseguramiento y control de calidad de bioensayos”).

Posibles interferencias en el proceso normal de germinación o desarrollo de las plántulas en los controles

- 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 han tenido buenos resultados con una marca o calidad determinada de papel, es conveniente no variar el sustrato de ensayo.
- Suciedad de las cápsulas: si no es posible utilizar material descartable, es importante asegurar un enjuague minucioso del material para evitar la presencia de residuos de detergente u otra solución de limpieza.
- Exceso de agua o de muestra utilizada para embeber el papel; esto 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.
- Déficit hídrico durante el periodo 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 está 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 tóxico cuya toxicidad estamos evaluando y, por lo tanto, las conclusiones a las que arribaremos serán erróneas.
- Exposición a la luz durante el proceso de imbibición: inmediatamente después de colocar las semillas sobre el papel de filtro, se recomienda tapar y envolver las cápsulas de Petri cubriéndolas de la luz (para el caso de semillas fotoblásticas negativas).
- 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).

4.4.4 Expresión de los 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.

Elaborar 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, calcular 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 (ver capítulo 5 “Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad”).

4.4.5 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 periodo de exposición, la inhibición en la germinación es elevada, pero si se extiende el periodo 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 (ej.: 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 y/o radícula se corresponde con toxicidad frente a otros ensayos de la batería.

REFERENCIAS

APHA-AEEA-WPCF, 1992, *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*, Editorial Díaz de Santos, S.A., Madrid, 1576 pp.

- Bowers, N., Pratt, J.R., Beeson D. & Lewis M., 1997, "Comparative Evaluation of Soil Toxicity using Lettuce Seeds and Soil Ciliates", *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (2), 207-213.
- Cheung, Y.H., Wong, M.H. & Tam, N.F.Y.; 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.
- Ellis, R.H., Hong, T.D. & Roberts, E.H., 1985, *Handbook of Seed Technology for Genebanks*, Vol.1 *Principles and Methodology*, International Board of Plant Genetic Resources, Rome, 210 pp.
- Organization for Economic Cooperation and Development, 1984, *Terrestrial Plants: Growth Test. Guideline for Testing of Chemicals* N° 208, OECD Publications Service, Paris.
- US EPA, 1989, *Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites*, US Environmental Protection Agency, 600/3-88/029, Corvallis.
- Wang, W., 1987, "Root Elongation Method for Toxicity Testing of Organic and Inorganic Pollutants", *Environmental Toxicology & Chemistry* 6, 409-414.

4.5 Ensayo de toxicidad crónica con *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*). Método de enumeración celular basado en el uso de hemocitómetro Neubauer

Yolanda Pica Granados, Alicia Ronco y María Consuelo Díaz Báez

4.5.1 Principio

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 este procedimiento su nombre original: *Selenastrum capricornutum*.

Selenastrum capricornutum es una alga verde (clorofita) unicelular con forma de media luna (ver figura 4.5.1 en anexo fotográfico) y un volumen aproximado de entre 40 y 60 mm³, que puede encontrarse en sistemas acuáticos epicontinentales eutróficos u oligotróficos. Este método puede ser utilizado por sí mismo o como parte de una batería para estimar la potencial fitotoxicidad de aguas dulces superficiales o subterráneas, aguas servidas y otro tipo de muestras líquidas, tales como: elutriados 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.

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 h 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 CI₅₀ (concentración de inhibición media), la LOEC (concentración mínima a la cual se observa efecto) y la NOEC (concentración a la cual no se observa efecto).

El protocolo de prueba con el alga *Selenastrum capricornutum* presentado en este manual es una modificación del método estándar publicado por la Agencia de Protección Ambiental de Canadá (*Environment Canada*, 1992 EPS1/RM/25). Los cambios introducidos (Blaise *et al.*, 2000) corresponden al uso de volúmenes reducidos (2,6 mL en viales de borosilicato de vidrio de 20 mL) y la cuantificación de las células mediante una cámara de conteo (Neubauer) utilizando un microscopio óptico.

4.5.2 Reactivos, soluciones y cultivo del organismo de prueba

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

a) Preparación de soluciones

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 inicia con la preparación de las soluciones de cloruro de zinc, cloruro de cobalto, molibdato de sodio y cloruro de cobre. Con este fin, se emplean cinco frascos de 100 mL de capacidad, que deben ser previamente etiquetados con el nombre del compuesto. 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 (ZnCl_2). Llevar a volumen final de 100 mL con agua y mezclar bien. A partir de esta solución transferir 1 mL mediante pipeta al frasco 1.

Solución de cloruro de cobalto

Verter en el frasco 70 mL de agua, agregar 71,4 mg de cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Llevar a volumen con agua hasta completar 100 mL y mezclar bien. A partir de esta solución, transferir 1 mL mediante pipeta al frasco 1.

Solución de molibdato de sodio

Verter en el frasco 70 mL de agua, luego agregar 363 mg de molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Finalmente, completar el volumen hasta 100 mL con agua y mezclar bien. A partir de esta solución, transferir 1 mL mediante pipeta al frasco 1.

Solución de cloruro de cobre

Verter 70 mL de agua en dos de los frascos de 100 mL; en el primero de ellos agregar 60,0 mg de cloruro de cobre ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 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, verter en el segundo frasco y completar el volumen de 100 mL con agua; 1 mL de esta segunda solución es el que se emplea para la preparación de la solución núm. 1 de micronutrientes.

Cuando estén preparadas las soluciones anteriores, pesar el resto de los reactivos, tomar el frasco de 500 mL etiquetado como solución 1 y agregar cada compuesto químico en el orden fijado a continuación. No alterar la secuencia, ya que se formarán precipitados difíciles de solubilizar.

Asegúrese que antes de adicionar el siguiente compuesto las sales se encuentren completamente disueltas.

Después de haber agregado todos los componentes al frasco de la solución 1, llevar a volumen de 500 mL con agua (tabla 4.5.1).

Tabla 4.5.1. Reactivos utilizados en la preparación de solución de micronutrientes.

	Compuesto	Fórmula	Masa en gramos (g) o volumen (mL) de solución stock
1	Cloruro de magnesio	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6,08
2	Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,20
3	Ácido bórico	H_3BO_3	0,0928
4	Cloruro de manganeso	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}^*$	0,208
5	Cloruro de zinc	ZnCl_2^*	1 mL de la solución
6	Cloruro férrico	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}^*$	0,0799
7	Cloruro de cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}^*$	1 mL de la solución
8	Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL de la solución
9	Cloruro de cobre	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL de la solución
10	Etilen-diaminotetracético: sal disódica	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,150

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

Soluciones de macronutrientes:

Adicionar en los frascos respectivos de 500 mL restantes las cantidades de las sales indicadas a continuación (tabla 4.5.2).

Mezclar bien hasta disolver y, posteriormente, adicionar agua hasta alcanzar el volumen de 1 000 mL en cada uno de los recipientes.

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

Este medio de proliferación también puede ser empleado para otras especies de algas, tales como *Ankistrodesmus sp.*, *Scenedesmus sp.*, entre otras. 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 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.

Tabla 4.5.2. Reactivos utilizados en la preparación de solución de macronutrientes.

Frasco	Compuesto	Fórmula	Masa (g)
Solución 2	Nitrato de sodio	NaNO_3	25,5
Solución 3	Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14,7
Solución 4	Fosfato de potasio	K_2HPO_4	1,044
Solución 5	Bicarbonato de sodio	NaHCO_3	15,0

Al final, el pH del medio deberá ser $7,5 \pm 0,1$, 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 μm 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.

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 2 000 lux, 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 anexo 1. Para la aireación, se puede emplear una bomba de aire para acuarios, o se utiliza 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, etcétera). Existen filtros especiales disponibles en el mercado de artículos para laboratorio; en el caso de no contar con ellos pueden fabricarse en el laboratorio, empacando carbón activado y lana de vidrio.

La manguera se conecta a un tubo hueco de vidrio o a una pipeta despuntada previamente esterilizados. El tubo se introduce en el medio inoculado cuidando 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 (de 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 h. 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*.

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 adicionan 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 veinte a treinta minutos). Con ayuda de un agitador o vórtex (a intensidad moderada) se puede reducir el tiempo de proceso a cinco minutos. Una vez disueltas las perlas, centrifugar a 3 000 rpm durante diez minutos. Eliminar el sobrenadante, conservar las algas sedimentadas, resuspender las células en 5 mL de la solución amortiguadora utilizada para las pruebas (0,15 mg NaHCO_3/L).

Medio nutritivo enriquecido (18x) para las pruebas de toxicidad

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 colocan 800 mL de agua, a los cuales se adicionan 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 $7,5 \pm 0,1$ con NaOH o HCl 1 N.

Solución amortiguadora para las pruebas (15 mg NaHCO_3/L)

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

Medio sólido para mantenimiento de las cepas

Disolver 1 g de agar-agar en 100 mL del medio nutritivo para desarrollo de *Selenastrum capricornutum* y llenar con medio los tubos de ensayo hasta la mitad de su volumen. Cerrar los tubos y esterilizar en autoclave u olla de presión a 120 °C, 15 lb durante 15 o veinte minutos. Al término del periodo, sacar los tubos, apretar sus tapas y dejar enfriar en posición inclinada hasta que el medio se solidifique. El medio sólido puede conservarse en refrigeración hasta por un mes.

Inoculación de las algas en medio sólido

Bajo condiciones de esterilidad, transferir 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 inoculados los nuevos medios, incubar a 24 ± 2 °C con iluminación continua e intensidad de luz superior a 2 000 lux por un periodo entre 48 y 72 h. Cuando se observe crecimiento, se retiran los tubos de la cámara y se almacenan en oscuridad a 4 ± 2 °C. Bajo estas condiciones, las algas continuarán creciendo, pero de forma lenta.

4.5.3 Materiales y equipos

Materiales

- Pipetas de vidrio graduadas (5 y 10 mL).
- Pipeta automática de 100 μ L con puntas estériles.
- Pipeta automática de 100-1 000 μ L con puntas estériles.
- Viales de centelleo de vidrio borosilicato claro de 20 mL de capacidad.
- Papel (film) transparente.
- Cámaras de iluminación (ver en anexo 1, como opción, un diseño de cámara para pruebas).
- Gasa y algodón.
- Tubo de vidrio o pipeta de vidrio despuntada.
- Manguera de acuario.
- Botellas de 1 L o matraces aforados de igual capacidad.
- Cinco botellas de 500 mL o matraces aforados de igual capacidad.
- Seis botellas de 100 mL o matraces aforados de igual capacidad.
- Recipiente de vidrio claro para cultivo de boca angosta, preferentemente esterilizable, de 10-20 L de capacidad.
- Asas bacteriológicas.
- Tubos de centrifuga (opcional).
- Tubos de cultivo con tapa de rosca.
- Tubos de centrifuga de 50 mL plásticos con tapa de rosca y estériles (opcional).
- Hemocitómetro o cámara Neubauer (ver en punto 4.5, indicaciones de manejo).
- Matraz de filtración de 4 L.

Equipos

- Microscopio óptico con aumento de 100x.
- Potenciómetro.
- Balanza analítica.
- Bombas de acuario.
- Bomba de vacío.
- Sistema de filtración.
- Mechero o campana de flujo laminar.
- Centrifuga (opcional).
- Base de agitación o vórtex (opcional).

4.5.4 Procedimiento para el desarrollo de la prueba

Preparación del inóculo de algas para desarrollo de pruebas

Conocido el número de células presentes en el inóculo mediante la cámara de Neubauer, se debe hacer una dilución con el fin de obtener en cada vial de prueba una concentración inicial de 10 000 cél./mL. Como el volumen final en cada vial, incluyendo el inóculo, es de 2,6 mL (figura 4.5.2), se preparan 2 mL de una suspensión de algas que contenga $2,6 \times 10^6$ cél./mL de la siguiente manera:

Factor de dilución (FD) = número cél./mL en el concentrado / $2,6 \times 10^6$ cél./mL.

Volumen (mL) del cultivo de algas para 2 mL = 2 mL / Factor de dilución.

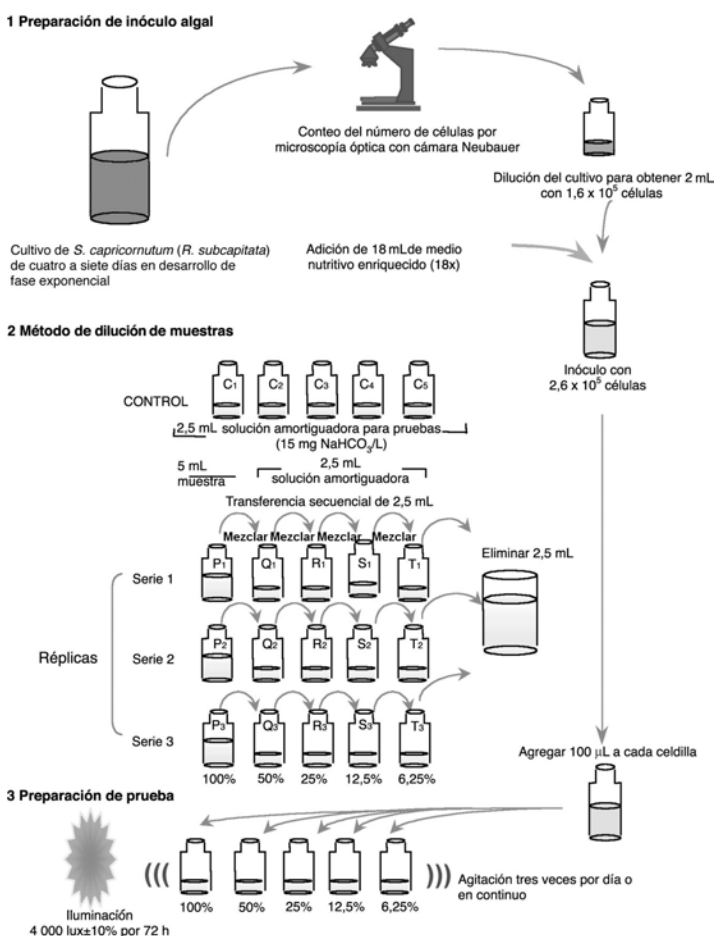


Figura 4.5.2. Esquema del procedimiento de prueba con *S. capricornutum*.

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 una celda de conteo o cámara de 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 ($2,6 \times 10^6$ cél./mL) en un volumen de 2 mililitros.

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

1 Cálculo del factor de dilución (FD):

$$FD = \text{núm. de cél./mL en el cultivo algal} / 2,6 \times 10^6 \text{ cél./mL}$$

Si la concentración de células por mililitro en el cultivo fue de $2,9 \times 10^6$ cél./mL, entonces:

$$FD = 2,9 \times 10^6 \text{ cél./mL} / 2,6 \times 10^6 \text{ cél./mL} = 1,115$$

2 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 centrifuga de 50 mL con ayuda de una pipeta automática.

Los 2 mL tendrán una concentración de algas de $2,6 \times 10^6$ cél./mL, la cual nuevamente se diluye adicionando 18 mL del medio nutritivo enriquecido (18x) para tener una densidad final de $2,6 \times 10^5$ células por mililitro.

Método de dilución de muestras

En las pruebas se requiere de veinte viales de borosilicato de vidrio de 20 mL similares a los utilizados en contadores de centelleo (Arensberg *et al.*, 1995). Se toman cinco, se rotulan como control (C_1 hasta C_5) y se adiciona en cada uno de ellos 2,5 mL de la solución amortiguadora (NaHCO_3 15 mg/L). Los viales restantes se organizan en tres series de cinco 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 deberá 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 viales restantes se utilizarán para la preparación de las diluciones seriadas de la muestra.

Para iniciar el proceso de dilución de la muestra, en cada uno de los viales restantes se colocan 2,5 mL de solución amortiguadora (NaHCO_3 15 mg/L). A continuación se transfieren 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 el 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 descartan. Se sigue el mismo procedimiento para las series dos y tres 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 μL del inóculo de algas anteriormente preparado, cuya concentración es $2,6 \times 10^5$ cél./mL, a cada uno de los viales de la prueba. La concentración final de las algas en cada uno de los viales será de 10 000 células por mililitro.

Se colocan los viales en la cámara con iluminación fluorescente (luz blanca fría), con una intensidad luminosa entre 60-80 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (aproximadamente 4 000 lux). En el anexo 1 se presenta el diseño y procedimiento de elaboración de un modelo piramidal de cámara que puede ser construido con materiales de bajo costo y permite que en toda el área se tenga una distribución homogénea de luz.

La incubación de los viales se lleva a cabo durante 72 h. 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 de la prueba se presenta en la tabla 4.5.3 y en las figuras 4.5.2 y 4.5.3.

Tabla 4.5.3. Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con *S. capricornutum*.

1	Tipo de ensayo	Estático
2	Temperatura	24±2 °C
3	Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
4	Intensidad luminosa	60-80 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (4 000 lux)
5	Fotoperiodo	Iluminación continua
6	Volumen del recipiente	Viales de 20 mL
7	Volumen de la solución de prueba	2,6 mL
8	Edad del cultivo usado como inóculo	Cuatro a siete días
9	Densidad celular inicial	10 ⁴ células/mL
10	Número de réplicas	Tres
11	Velocidad de agitación	Manual, discontinua
12	Agua de dilución	Solución amortiguadora (NaHCO_3 15 mg/L)
13	Factor de dilución	0,3 o 0,5
14	Duración de la prueba	72 h
15	Efecto medido	Crecimiento (conteo)
16	Resultado final	IC ₅₀
17	Aceptabilidad de los resultados	Densidad celular en el control >16 veces la densidad inicial
18	Control positivo	Cu (II) a partir de CuSO_4

Diagrama de flujo ensayo *S. capricornutum*

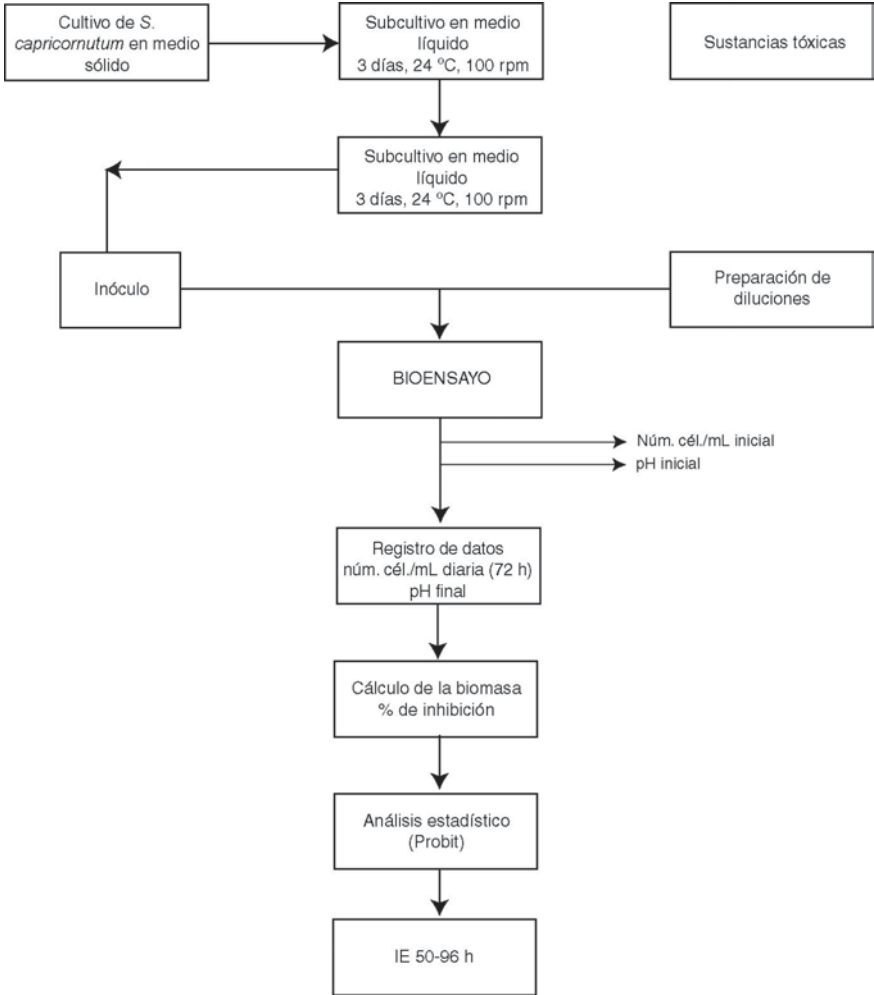


Figura 4.5.3. Ensayo de toxicidad crónica con *S. Capricornutum*.

4.5.5 Análisis de datos

Al finalizar el tiempo de exposición se inicia el conteo del número de algas en cada vial. Para el conteo se toman entre 20 y 50 μL 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, y que se describe en el numeral 4.5.6.

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:

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

4.5.6 Conteo con la cámara Neubauer

La cámara Neubauer, también conocida como hemocitómetro, consta de un cubreobjetos de cuarzo y un portaobjetos de un grosor mayor a los de uso común (figura 4.5.4). En la parte superior del portaobjetos 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 (figuras 4.5.4 A-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 corresponda 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 de 0,04 mm² (figura 4.5.4 C).

Al colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos se tiene una profundidad de 0,1mm, de forma que el volumen contenido en cada uno de los cuadrados grandes será 0,1 mm³ (1,0 mm² x 0,1 mm = 0,1 mm³).

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

- Limpiar con papel de arroz la cámara de Neubauer.
- Colocar el cubreobjetos sobre los canales, tal como se indica en la figura 4.5.4.
- 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, tome 0,1 mL de la suspensión de algas y coloque la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos; deje que la solución ingrese a la cámara por capilaridad, sin que pase a los canales laterales (figura 4.5.4 D). 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 (ubicando la cuadrícula de 25 cuadros de 0,04 mm²), hacer un cambio de lente al objetivo de 40x y contar las células que se encuentran sobre el mismo (figura 4.5.4 C).
- 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 doscientas y trescientas células por muestra. Cuando en el cuadro central existen 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 alcanzan las doscientas células, se debe contar el total en los 25 cuadros.

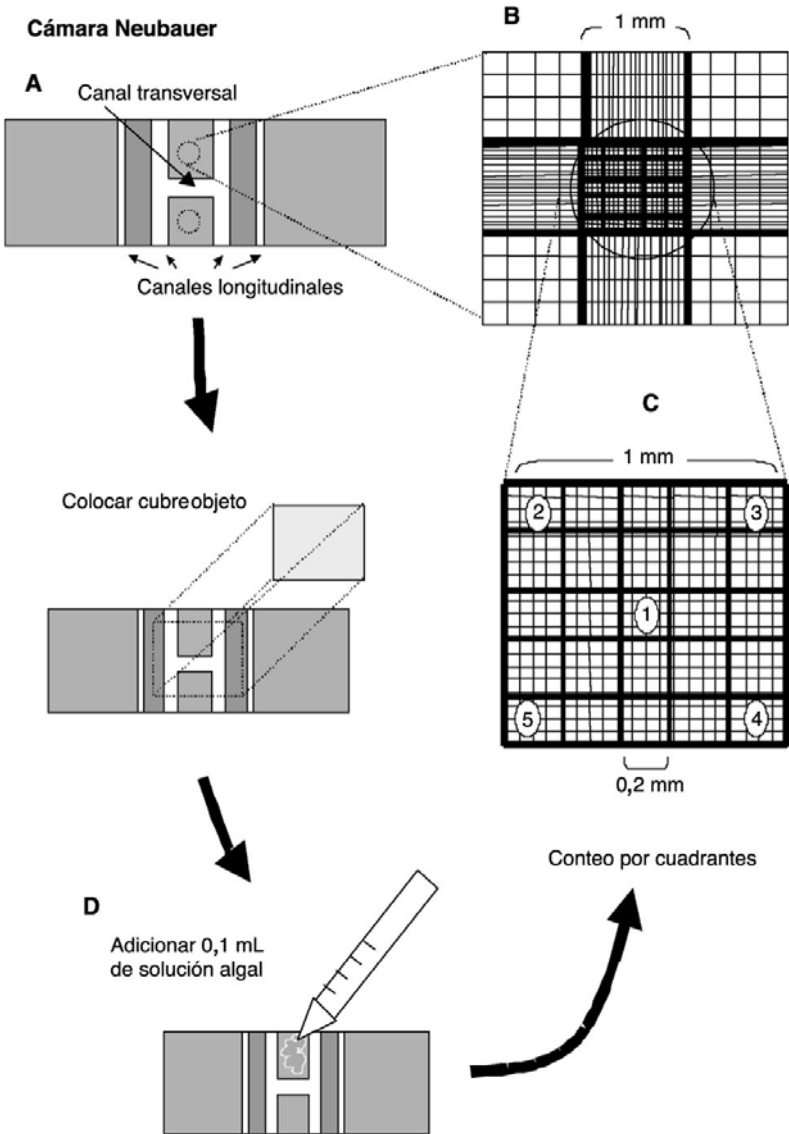


Figura 4.5.4. Conteo celular mediante la utilización de la cámara de Neubauer.

- 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 que deberá ser tomada 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:

1. En caso de haber empleado los cuadrantes de 0,04 mm².

Núm. células en 0,1 mm³ = (núm. total células contadas/núm. cuadros 0,04 mm²).

Esto dará el número total de células por 0,1 mm³ (volumen obtenido de multiplicar el área de 1 mm² x 0,1 mm de profundidad de la cámara).

El número de células por mL se obtendrá de multiplicar el valor obtenido anteriormente por 10 000.

$$\text{núm. células por mL} = \text{núm. células en 0,1 mm}^3 \times 10\,000$$

2. En caso de haber empleado los cuadrantes de 1 mm².

núm. células en 0,1 mm³ = núm. total células contadas / núm. cuadros 1 mm² contados

Este valor corresponderá al número total de células en 0,1 mm³. Para obtener el número por mL se multiplica por 10 000.

REFERENCIAS

- Arensberg, P., Hemmingsen, V.H. & Nyholm, N., 1995, *A Miniscale Algal Toxicity Test*, *Chemosphere*, 30:2103-2115.
- Blaise, C., Forget, G. & Trottier, S., 2000, "Toxicity Screening of Aqueous Samples Using a Cost-Effective 72-hour Exposure *Selenastrum capricornutum* Assay", *Environ Toxicol.*, 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 Chlorococcal Algae (*chlorophyta*)", V. *Biologické Práce* (Slovenskej Akademie Vied), Bratislava, 36:1-225.
- UNAM, 1986, "Biología celular", *Manual de prácticas*. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 20-28.
- US EPA, 1992, *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms EPA-600/4-91-022*, 3th ed., Philip Lewis, A., L.; Klem, D.J. & Lazorchak, J.M.

ANEXO 1

*Construcción de una cámara de iluminación casera para el ensayo de toxicidad con *S. capricornutum**

Materiales

- Dos pliegos de papel empleado para construcción de maquetas, color blanco, rígido y resistente (ej. cascarrón), 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 (ej. *Osram dulux*).
- Conexión para anterior.

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 4.5.5 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 4.5.5 B).

Formar la cámara uniendo los triángulos por sus lados para estructurar una pirámide trunca en su punta (figura 4.5.5 C) con ayuda de la cinta adhesiva. Pegar por la parte exterior.

Colocación del sistema de iluminación

a) 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 4.5.6 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 sólo 5 cm y dejar un espacio traslúcido de 5 cm (figura 4.5.6 D).

Preparación de la pantalla

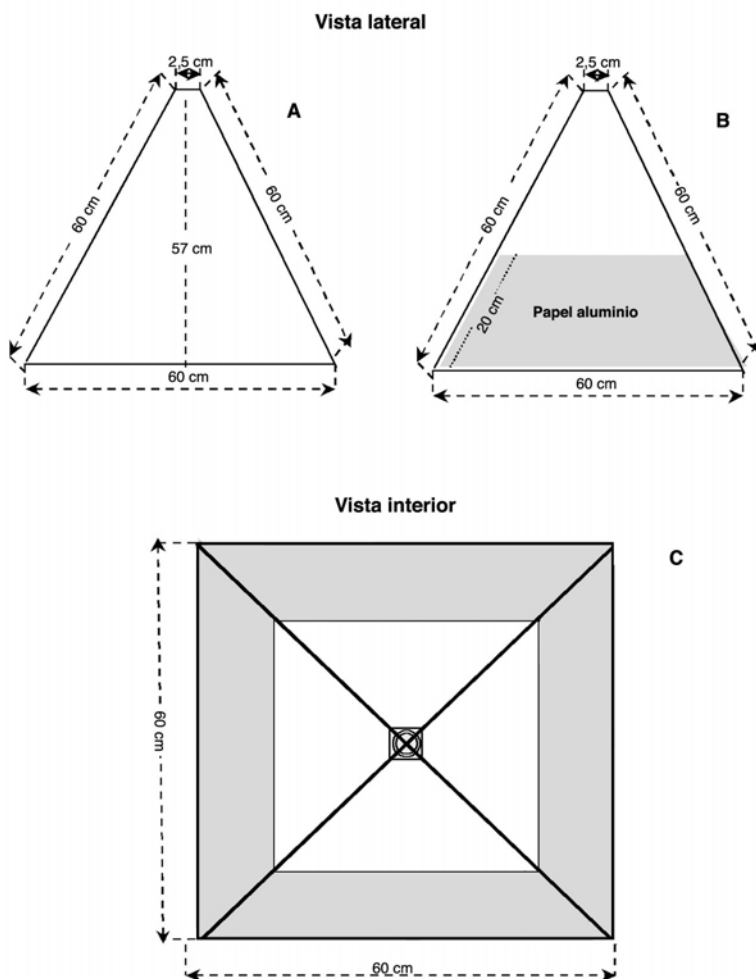
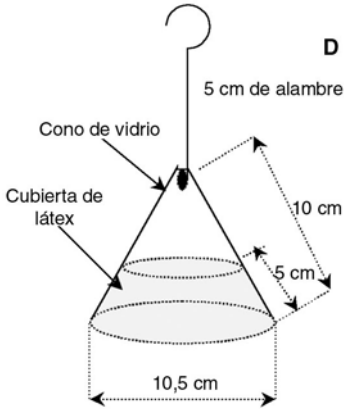
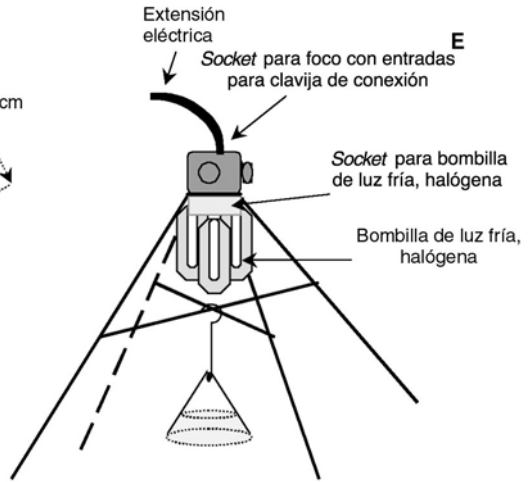


Figura 4.5.5. Preparación de pantalla de iluminación.

Sistema de filtrado de luz



Colocación de la lámpara



Base de la cámara

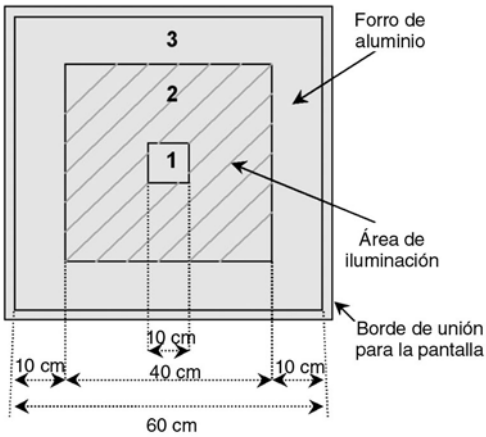


Figura 4.5.6. Colocación de sistema de iluminación.

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 4.5.6 D). Colgar el embudo del centro de la red de sostén (figura 4.5.6 E).

Colocación de la lámpara

Atornillar la bombilla de luz halógena de triple barra en el portalámpara correspondiente.

Introducir el sistema por el interior de la pirámide de tal forma que la rosca del portalámpara 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 4.5.6 E).

a) 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 4.5.6 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 lux.

El borde del recuadro 3 es el sitio donde la pantalla de la cámara de iluminación deberá ser colocada (figuras 4.5.6 F y 4.5.7 G).

Sugerencias

Cambiar la lámpara de iluminación de triple barra de forma regular cada 45 días si es que el uso es continuo, o calcular 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 mermar significativamente el crecimiento de las algas durante el desarrollo de las pruebas.

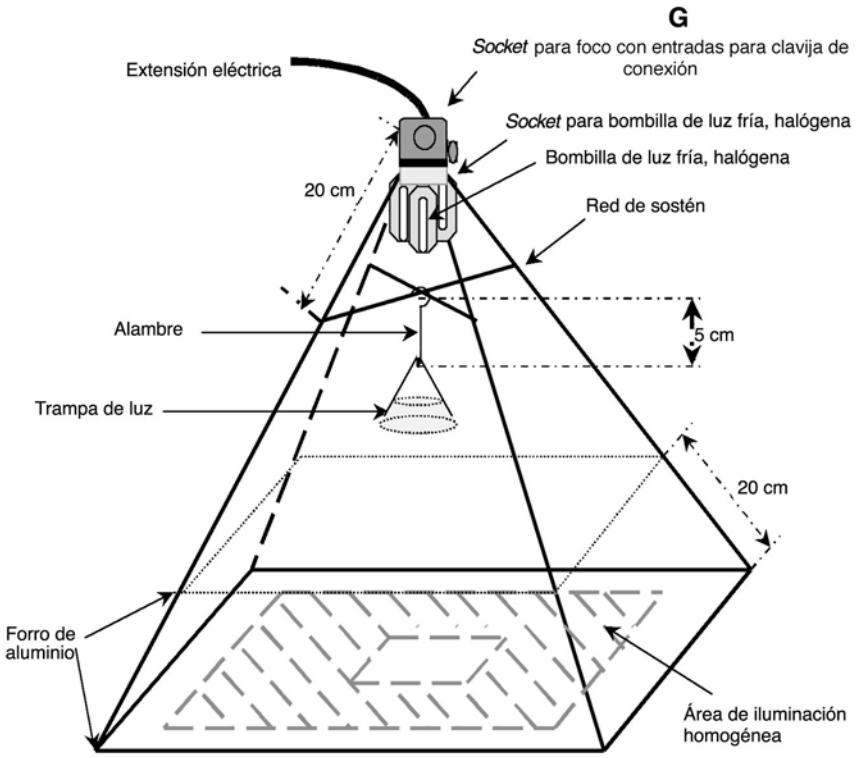


Figura 4.5.7. Vista tridimensional de la cámara de iluminación.

This page intentionally left blank

5 MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

María Consuelo Díaz Báez, Gustavo Daniel Bulus Rossini y Yolanda Pica Granados

5.1 *Introducción*

Uno de los aspectos importantes en toxicología y ecotoxicología es la relación entre la concentración de un compuesto químico a la cual se expone un organismo y el consecuente efecto nocivo que le produce. Esta relación, conocida como la relación dosis-respuesta, constituye la base para la evaluación del peligro y el riesgo generado por las sustancias químicas en el medio ambiente. Los gráficos bivariantes de estas relaciones muestran en general patrones no rectilíneos de tipo sigmoide (figura 5.1).

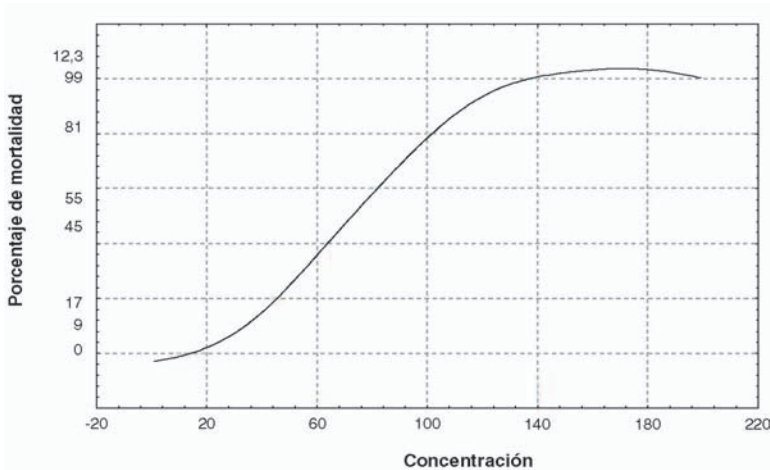


Figura 5.1. Relación dosis-respuesta.

Existen muchas formas de determinar la toxicidad, y aunque los efectos bioquímicos, fisiológicos, reproductivos y de comportamiento son de gran utilidad, el indicador comúnmente más utilizado es la muerte del organismo de prueba. La mayoría de las pruebas de toxicidad suministran una estimación de la dosis (o

concentración en el alimento, aire o agua) que produce una respuesta tóxica a un nivel del 50%. Por ejemplo, la dosis letal media es la dosis o concentración que mata al 50% de la población (CL_{50}). Otro indicador que ha ganado gran popularidad es la dosis o concentración más alta a la cual no se observa ningún efecto (NOEC).

Las estimaciones obtenidas en las pruebas de toxicidad, definidas en el capítulo I “Conceptos generales”, son parte integral de las mismas. En ellas, la estadística desempeña un papel importante no sólo para su cálculo, sino para la planificación y ejecución de las pruebas de toxicidad y para el análisis e interpretación de los resultados obtenidos en ellas. Por tanto, el diseño experimental, el muestreo, la modelación, la recolección de datos, las pruebas y los análisis deben ceñirse a principios estadísticos estrictos. En general, los métodos de análisis de los resultados están bien documentados, son aplicables a la mayoría de los datos obtenidos en este tipo de pruebas y pueden ser manejados por personas sin entrenamiento estadístico.

El análisis de relaciones entre dos o más variables implica, en la mayoría de los casos, la utilización de técnicas estadísticas de regresión. Estas técnicas requieren, antes de ser aplicadas, la selección de la ecuación matemática (en adelante, el modelo) con la que se relacionarán las variables analizadas. A su vez, en la selección del modelo a utilizar, es de vital importancia el tipo de variables a relacionar.

En general, las variables se clasifican en cualitativas y cuantitativas, pudiéndose distinguir en el último caso entre discretas y continuas. Las cuantitativas discretas son las que sólo pueden tomar valores pertenecientes al conjunto numérico de los enteros, mientras que las continuas pueden tomar cualquier valor en el conjunto numérico de los reales. Las variables cuantitativas pueden ser analizadas en forma directa a través de análisis estadísticos de regresión, mientras que las cualitativas deben ser expresadas de forma cuantitativa antes de ser analizadas. Este último caso es el que se verifica en los ensayos en los que se evalúa la mortalidad como variable, ya que ésta sólo puede tomar los estados vivo o muerto (variable cualitativa), y debe ser expresada como porcentaje de muertos antes de poder ser analizadas por métodos de regresión.

Finalmente, es importante destacar que, en lo que respecta al análisis de las relaciones entre la concentración de un tóxico y la respuesta o efecto del mismo en la materia viva, existen otras aproximaciones al análisis de dichas relaciones en las que, básicamente, sólo se pretende determinar la concentración a la cual no se observa un efecto nocivo del tóxico sobre el organismo expuesto, o la concentración más baja a la cual se observa un efecto tóxico. Este tipo de análisis se realiza a través del método de ANOVA (análisis de la varianza) o su equivalente no paramétrico.

5.2 Pruebas de toxicidad

Una prueba de toxicidad típica involucra un *agente* o *estímulo* (por ejemplo, un pesticida, un metal pesado o una muestra ambiental con contaminantes químicos), el cual se aplica a un organismo o grupo de organismos (por ejemplo, un cultivo bacterial o de un alga, animales, o plantas) al que denominaremos genéricamente *sujeto*, sobre el que se evalúa una cierta *respuesta* preseleccionada. La magnitud del estímulo o *dosis* puede medirse como un peso, un volumen o una concentración.

La respuesta del sujeto se valora mediante la cuantificación final de alguna característica (peso del cuerpo, peso del hígado, ritmo cardíaco, etcétera), el cambio de ella (aumento en el peso corporal, disminución en la presión sanguínea) o por la

ocurrencia o no de un determinado fenómeno (muerte, inhibición del crecimiento, una contracción muscular, etcétera).

Partiendo de la base de que la magnitud o la frecuencia de la respuesta dependerá de la dosis aplicada, las pruebas de toxicidad suelen diseñarse utilizando distintas dosis. La información obtenida de este tipo de ensayos permite la cuantificación de la relación entre las dos variables (dosis y respuesta), caracterizando toxicológica o ecotoxicológicamente al compuesto. Normalmente, las pruebas de toxicidad se diseñan para comparar o estimar la potencia de un agente con relación a una *preparación estándar o control*.

Es importante destacar que la respuesta a una dosis en particular se verá afectada en mayor o menor medida por factores no controlados durante el experimento.

5.3. Tipos de pruebas o bioensayos

Como se mencionó anteriormente, desde el punto de vista estadístico, el tipo de variable generada por la respuesta influencia en gran medida el tipo de análisis a aplicar sobre los datos. En este sentido, se pueden encontrar variables cualitativas (muerto-vivo, ausente-presente), cuantitativas discretas (núm. de muertos, % de muertos) y cuantitativas continuas (reducción del crecimiento en longitud o peso). En el caso de las variables cualitativas, debido a sus características, es muy difícil establecer relaciones cuantitativas con la dosis y, en general, se diseñan los experimentos de manera tal para evaluar respuestas cuantitativas. Por ejemplo, al utilizar como punto final en la lectura la muerte de un organismo, se puede diseñar la experiencia de forma tal que cada replicado contenga al menos cinco organismos e interpretar las respuestas individuales como resultados de un ensayo de Bernoulli asignando a muerto el valor 1 (éxito) y a vivo el valor 0 (fracaso), permitiendo de esta manera que el replicado con los cinco organismos pueda considerarse con el resultado de un experimento binomial y la respuesta en cuestión se expresa como la proporción de organismos muertos, que es una variable cuantitativa discreta.

Para el análisis de las relaciones cuantitativas entre la dosis y la respuesta, es necesario recurrir a modelos matemáticos que describan dicha relación. En general, los modelos matemáticos se pueden clasificar en:

- Mecanístico: es un modelo que intenta describir un proceso basándose en postulados acerca de la mecánica de dicho proceso.
- Empírico o descriptivo: es un modelo que intenta describir cuantitativamente los patrones de las observaciones sin basarse en los procesos subyacentes o mecánica del proceso.
- Determinístico o no estocástico: es un modelo en el que dado un dato en particular, la predicción que se obtiene del modelo es siempre el mismo valor.
- Probabilístico o estocástico: es un modelo en el que dado un dato en particular, la predicción que se obtiene del modelo es un valor variable.

En el caso particular de las pruebas de toxicidad, los más utilizados son los de tipo empírico o descriptivo de forma rectilínea, a los cuales se llega muchas veces luego de haber transformado una o las dos variables estudiadas. La utilización de transformaciones no sólo altera la forma de la relación estudiada, sino que también modifica el comportamiento de las variables con respecto a los supuestos del método estadístico a ser aplicado.

Dentro de la gran cantidad de modelos y técnicas de análisis disponibles para evaluar los resultados de los ensayos de toxicidad, sólo se describirán aquellos asociados al análisis de los ensayos descritos en los capítulos anteriores, que además sean ampliamente utilizados y se encuentren bien documentados en la bibliografía.

5.4 *Métodos estadísticos*

Para poder dar cumplimiento a los requerimientos de validez y precisión de las pruebas es necesario utilizar una metodología estadística desde la planificación hasta la ejecución y, luego, el posterior análisis de los resultados. El criterio básico recomendado es seleccionar un método estadístico sencillo, que se ajuste a las condiciones experimentales y que permita obtener resultados válidos.

Diseños de experimentos

Para la elaboración de una prueba de toxicidad se deben seguir los principios básicos planteados para el diseño de experimentos. Esto implica un número razonable de repeticiones (dependiendo de la prueba), aleatorización de las dosis en las unidades experimentales y un control para lograr una estimación válida del error experimental.

En la mayoría de las pruebas se trabaja con un diseño completamente aleatorizado, del tipo clásico, para ser analizado a través del análisis de la varianza o del análisis de regresión, con unidades experimentales homogéneas y condiciones ambientales controladas. Sin embargo, en algunos casos es necesario recurrir a análisis de covarianza o ANOVA en bloques para controlar la heterogeneidad de las unidades experimentales. La estructura del diseño normalmente usado se presenta en los textos clásicos de diseño de experimentos, tales como Steel & Torrie (1985). Para los cálculos de los diferentes análisis utilizados se pueden usar programas de computación que se consiguen comercialmente.

Diseño y ejecución de los ensayos de toxicidad-fuentes de variación

Los elementos básicos del diseño experimental para una prueba de toxicidad se presentan en la tabla 5.1. Para el análisis estadístico se debe especificar la respuesta (*punto final*), ya sea en términos de una frecuencia de conteos, una tasa de mortalidad, una tasa de inhibición, etcétera.

Es importante también identificar las *fuentes de variabilidad*, las cuales pueden presentarse *dentro* de los ensayos y *entre* los ensayos. La *variación dentro de los ensayos* contribuye a la precisión de la estimación y puede ser causada por problemas como: errores en diluciones, imprecisiones en el pesado, errores al medir volúmenes, errores en el conteo, variación biológica (genética, fisiológica, etaria), etcétera. La *variación entre ensayos* tiene que ver con la reproducibilidad de los mismos y puede ser causada por factores como: las propiedades físicas y químicas de los agentes, almacenamiento y preparación, cambios en las condiciones de cultivo de los organismos, cambios *históricos* en el protocolo, cambios en el personal del laboratorio o cambios genéticos en el material biológico usado. La variabilidad dentro y entre ensayos contribuye a la *variabilidad entre laboratorios* y debe analizarse en forma separada.

Tabla 5.1. Elementos estadísticos para el diseño de ensayos de toxicidad.

- Unidad experimental - Respuesta (<i>punto final</i>) Observación, medición, identificación - Condiciones para la evaluación Tamaño de la población, ensayo de supervivencia en paralelo - Grupos de tratamiento Dosis-respuesta, controles, varias muestras individuales - Fuentes de variabilidad - Fuentes de sesgos - Métodos de evaluación estadística

Otro aspecto a tener en cuenta es el patrón de los errores, que puede ser aleatorio o sistemático. El primero corresponde a variaciones que ocurren siguiendo un patrón en el que el sentido y la magnitud del error son igual de probables en ambas direcciones, y el segundo corresponde a una deriva sistemática (en un sentido) de los valores de la respuesta (*punto final*). En general, no existe ninguna garantía de protección contra los errores sistemáticos o sesgos, sin embargo, es posible reducirlos o reconocerlos, especialmente cuando se elaboran las mismas pruebas en diferentes laboratorios. Esto permite la evaluación de la variabilidad entre laboratorios y mejora la representatividad del resultado.

Diseño experimental

Las condiciones o requisitos formales de experimentación tienen que ver con la *reproducibilidad* o *replicabilidad*. En este sentido, las propiedades físicas y químicas de los compuestos químicos que se utilizan deben ser muy bien conocidas y controladas, por lo que la preparación y almacenamiento de los compuestos y solventes constituyen un elemento técnico importante, además de los asociados con la producción de los organismos de prueba. Igualmente, el uso de réplicas es básico cuando se lleva a cabo la evaluación estadística de medidas.

En pruebas de toxicidad deben tenerse en cuenta algunos factores que pueden ser una fuente potencial de confusión. Entre ellos se pueden mencionar: número de células al momento de la inoculación o tamaño inicial de los organismos en pruebas de crecimiento, número de repeticiones, número de tratamientos/grupos de dosis o concentraciones, intervalo de las dosis y la selección de controles. Montgomery (1991) recomienda trabajar con un mínimo de tres niveles de dosis y dos cultivos separados en cada grupo de dosis.

El principio básico en el diseño estadístico es la aleatorización, por ello los esfuerzos y el tiempo dedicados a cumplir con este principio producirán resultados más confiables y reproducibles, ya que el concepto de muestra aleatoria es un requisito indispensable para la validez de cualquier prueba estadística.

En las pruebas de toxicidad en general se utilizan dos diseños básicos:

1. Establecimiento de una relación dosis-respuesta.
2. Pruebas para evaluar la diferencia entre organismos tratados o expuestos a distintas dosis contra un control negativo (dosis 0).

En lo que respecta al método de análisis de los resultados obtenidos, se puede hacer una primera y gran división entre métodos paramétricos y no paramétricos. Los métodos paramétricos involucran suposiciones y/o estimaciones acerca de los parámetros de las distribuciones probabilísticas de la variable, utilizadas en la prueba estadística en cuestión, mientras que los no paramétricos no hacen este tipo de suposición.

Aunque la selección del tipo de método estadístico se puede hacer al finalizar el experimento, es aconsejable considerarlo desde la fase de planeación o diseño, ya que la selección de la metodología estadística tendrá un cierto impacto en la determinación óptima de los grupos de dosis y el número de repeticiones por dosis.

5.4.1 Establecimiento de una relación dosis-respuesta

Como resultado del análisis de los datos de un diseño para estimar una relación dosis-respuesta, lo que se pretende obtener son las estimaciones de los parámetros del modelo seleccionado para relacionar las variables y , a continuación, utilizar el modelo con las estimaciones de los parámetros encontrados para determinar los valores de la variable *concentración de tóxico* que causan un grado de efecto, en particular sobre los organismos expuestos. Entre estas concentraciones, la más utilizada es la que se conoce como concentración letal, efectiva o inhibitoria 50 ($CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$), que es la concentración que produce la respuesta esperada sobre el 50% de los organismos expuestos.

Como se ha dicho anteriormente en este capítulo y dado que la variable concentración del tóxico es de tipo continua, el tipo de variable de la respuesta (mortalidad, inhibición de la elongación de la raíz, etcétera) condiciona el modelo a utilizar en el análisis.

5.4.1.1 Establecimiento de una relación dosis-respuesta de tipo mortalidad

La selección del método a utilizar para estimar los valores de $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ de este tipo de pruebas de toxicidad aguda con múltiples concentraciones dependerá de la forma de la distribución de tolerancias,¹ y que tan bien las concentraciones o dosis seleccionadas la caracterizan (por ejemplo, el número de mortalidades parciales).

En general, se recomiendan los siguientes cuatro métodos para la estimación de $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$:

1. Método Probit (paramétrico).
2. Método de Litchfield-Wilcoxon (gráfico).

¹ Tolerancia se refiere al porcentaje de organismos de una población dada que se verá afectada a una cierta dosis. Así, la distribución de tolerancias es una cierta distribución de frecuencias o de probabilidades de tolerancias a las distintas dosis del tóxico.

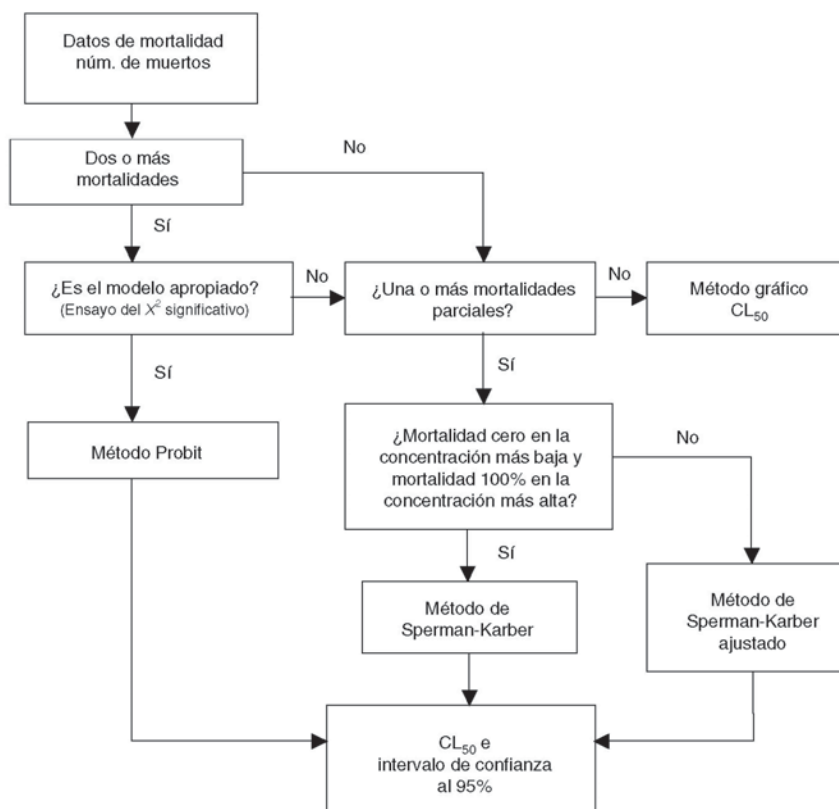


Figura 5.2. Determinación de $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ para pruebas de toxicidad aguda con múltiples concentraciones.

3. Método de Sperman-Karber (no paramétrico).
4. Método gráfico.

En la figura 5.2 se presenta el diagrama de flujo recomendado por la US EPA (1993) para la selección del método, basado en los requerimientos de cada uno.

5.4.1.1.1 Análisis de regresión y análisis Probit

Para el cálculo de los $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ generalmente se usa el análisis Probit (con o sin ajuste). En un experimento típico de pruebas de toxicidad aguda se tiene la siguiente situación:

- Concentración de la sustancia o dosis (d).
- Número de individuos (n).
- Número de organismos muertos o afectados (r).
- Porcentaje de efecto (p).

$$p = \left(\frac{r}{n} \right) \times 100$$

La representación gráfica de p vs. d , o relación dosis-respuesta, genera una curva parabólica que muchas veces presenta dificultades en la construcción de un modelo lineal. Una forma de abordar este problema es transformando d a una escala logarítmica ($X = \log_{10}(d)$), lo cual mostrará una relación dosis-respuesta de forma S o sigmoidea normal, como se muestra en la figura 5.1); de esta manera la distribución de p vs. X será de tipo normal.

Posteriormente, mediante las tablas de Probit se transforma p (porcentaje de efecto) a unidades probit (buscando en una tabla de distribución normal el valor de z correspondiente a una probabilidad acumulada igual a p y sumándole a continuación cinco unidades), se obtiene una distribución de puntos en un sistema bivariado de tipo lineal, los cuales se procesan según un análisis de regresión típico. Vale la pena enfatizar que el Probit es una transformación sobre la tasa de efecto (p), y la ecuación generada es de la forma:

$$y = a + bx$$

Donde:

$$y \text{ (expresado en unidades probit)} = z + 5$$

$$z = \text{Variable normal estándar} = z_0 \text{ tal que la Prob}(z \leq z_0) = p$$

a y b son los estimadores de los parámetros de la recta de regresión

Así, cuando $p=50\%$ entonces $y=5$, por lo tanto:

$$x_5 = \log_{10} CL_{50}, \text{ entonces } CL_{50} = 10^{x_5}$$

Para facilitar los cálculos, simplemente se puede usar un *software* como el suministrado por la *US Environmental Protection Agency* (US EPA): *Probit Analysis Program*, versión 1.5. En el anexo 5.2 se presenta un ejemplo para el cálculo de la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ por el método Probit. El procedimiento Probit permite encontrar estimadores m -verosímiles de parámetros de regresión y de tasas naturales (por ejemplo, tasas de mortalidad) de respuesta para ensayos biológicos cuantales, analizando porcentajes de efecto vs. dosis dentro del marco de la regresión. Adicionalmente, hacen dos pruebas de bondad de ajuste: Pearson y Log-Likelihood Ratio. Estas pruebas son importantes, porque si los datos no se ajustan a la línea recta generada, es necesario llevar a cabo un análisis Probit ponderado o aplicar métodos no paramétricos o gráficos para poder determinar la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$.

5.4.1.1.2 Método de Litchfield-Wilcoxon

Este método consiste en la construcción de una gráfica a partir de los datos obtenidos en pruebas de toxicidad aguda de un agente tóxico. Se utiliza papel *prob-log*, en el cual se colocan en el eje de las X el logaritmo (X) de las concentraciones usadas y en

el eje de las Y el porcentaje de respuesta del efecto observado. En la literatura se presentan varios ejemplos de cálculo, como el que se puede observar en la norma sobre análisis estadísticos de CETESB (L50.17-1992).

Para el cálculo de la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ mediante este método, es necesario tener por lo menos, un porcentaje intermedio de efecto observado (valores entre 0 y 100% de efecto).

Elaboración de tabla y gráfico

- Se prepara una tabla con las concentraciones utilizadas en la prueba, el número de organismos afectados sobre el número de organismos probados y un porcentaje de efecto observado. En la tabla se colocan sólo las concentraciones consecutivas que producen un efecto observado entre 100 y 0 por ciento.
- Se grafica en el papel *prob-log* el porcentaje de efecto observado (en el eje probabilístico) en función de las concentraciones probadas (en el eje logarítmico), excepto los valores de 0 y 100%. Luego se ajusta la recta a través de los puntos graficados, teniendo en cuenta principalmente los puntos que se encuentran en la región entre el 40 y 60% de efecto observado.

Obtención de los porcentajes de efecto esperado

A partir de los puntos de intersección de la recta trazada con los valores de las concentraciones estudiadas, se obtienen los respectivos porcentajes de efecto esperado, los cuales se anotan en la columna correspondiente de la tabla. No se deben considerar los valores de porcentaje esperado para cualquier concentración probada que estén por debajo de 0,01% o por encima de 99,9 por ciento.

Introducción de los valores 0 y 100% de efecto observado

Utilizando los porcentajes de efectos esperados, se obtienen mediante la tabla del anexo 5.3 los valores corregidos para los porcentajes 0 y 100% de efecto. A continuación se tabulan los valores al lado de los porcentajes de efecto observado. En el gráfico se colocan los valores corregidos y se verifica si la recta trazada es adecuada. Cuando la recta trazada es inadecuada, se rehace la recta repitiendo el procedimiento antes mencionado para obtener un ajuste de los valores esperados y corregidos.

Determinación de la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$

Mediante el uso de la recta trazada se obtiene en el eje logarítmico la concentración correspondiente al 50% del efecto observado sobre el eje probabilístico. La concentración así obtenida corresponde a la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$.

Cálculo del intervalo de confianza (al nivel del 95%)

- A partir del gráfico elaborado, obtener las concentraciones correspondientes a 16, 50 y 84% de efecto esperado.
- La pendiente de la recta (S) se calcula de la siguiente forma:

$$S = \frac{CL_{84} / CL_{50} + CL_{50} / CL_{16}}{2}$$

- Se obtiene el valor de N' o el número total de organismos utilizados en las concentraciones probadas, en las cuales se observó un porcentaje de efecto esperado entre 16 y 84 por ciento.
- Se calcula un exponente E para una inclinación de la recta (S) y un factor (fCL_{50}) de acuerdo con la siguiente expresión:

$$E = \frac{2,77}{\sqrt{N'}} \quad fCL_{50} = S^E$$

También se puede obtener el fCL_{50} o el fCE_{50} a partir de nomogramas elaborados para tal fin.

- Para calcular los límites de confianza se utilizan las siguientes expresiones:

$(CL_{50})(fCL_{50})$ = límite superior al 95% de confianza

$$\left(\frac{CL_{50}}{fCL_{50}} \right) = \text{límite inferior}$$

5.4.1.1.3 Método de Spearman-Kärber

El método de Spearman-Kärber es un método aproximado, no paramétrico, que proporciona una buena estimación de la media y la desviación estándar. Si la distribución es simétrica, se obtiene una estimación de la concentración total mediana ($CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$). Bajo las condiciones mencionadas, y si además la distribución considerada es más normal que logarítmica, se cumple que:

$$CL_{50} = m = X_k - d(S_1 - 1/2)$$

Donde:

X_k = dosis mínima a partir de la cual todas las reacciones son del 100%.

d = distancia entre cada dos dosis.

S_1 = suma de las fracciones de individuos que presentaron reacción.

La desviación estándar $S_{CL_{50}}$, o más fácil S_m , se determina mediante la siguiente ecuación:

$$S_m = \sqrt{2S_2 - S_1 - S_1^2 - 1/12}$$

Donde:

S_2 = suma de la fracción acumulada de los individuos que presentaron reacción.

En la tabla 5.2 se muestran los resultados de un experimento en el que se determinó la dosis letal para un poderoso desinfectante. Cada dosis se ensayó en seis *daphnias*.

Tabla 5.2. Dosis y número de *daphnias* muertas.

Dosis mg/L	Núm. de <i>daphnias</i> muertas	Tasa de mortalidad	Fracción acumulada de <i>daphnias</i> muertas
10	0	0	0
15	0	0	0
20	1	0,17	0,17
25	3	0,50	0,67
30	3	0,50	1,17
35	4	0,67	1,84
40	5	0,83	2,67
45	5	0,83	3,50
50 = X_k	6	1,00	4,50
		4,50 = S_k	14,51 = S_2

$$m = X_k - d(S_1 - 1/2) = 50 - 5(4,5 - 0,5) = 30$$

$$S_m = d\sqrt{2S_2 - S_1 - S_1^2 - 1/12} = S_m = 5\sqrt{2(14,50) - 4,50 - (4,50)^2 - 0,083} = 10,26$$

La relación $m \pm 1,645 S_m = 30 \pm 1,645 (10,26)$ permite estimar los límites de confianza al 90%, correspondientes a dicha dosis media (suponiendo una distribución aproximadamente normal).

$$\text{Límite superior} = 30 + 16,88 = 46,88 \text{ mg/L}$$

$$\text{Límite inferior} = 30 - 16,88 = 13,12 \text{ mg/L}$$

5.4.1.1.4 Método gráfico

Además de los métodos anteriores, se puede utilizar el método gráfico para estimar la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$. De forma similar, se parte de los datos obtenidos en las pruebas de toxicidad aguda, y utilizando papel logarítmico se grafican en el eje de las X las concentraciones (mg/L) y en el eje de las Y el porcentaje de mortalidad. Se colocan los puntos de los porcentajes de mortalidad observados (en escala lineal) en función de las concentraciones probadas (en escala logarítmica); se conectan los puntos obtenidos más cercanos al 50% del efecto observado, o sea, a la mayor concentración que no causa efecto tóxico y a la menor concentración que causa efecto tóxico. A partir de la recta trazada, se obtiene el punto de corte correspondiente al 50% del efecto observado. Este valor corresponde a la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ del estímulo o agente estudiado (Hubert, 1980 y 1995; Finney, 1978). Cuando no se logra hacer un ajuste adecuado de los datos, se pueden utilizar otros métodos para hacer las estimaciones de $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$.

5.4.1.2 Establecimiento de una relación dosis-respuesta tipo inhibición del crecimiento (variable cuantitativa continua)

En muchos casos de estudios de toxicidad, la respuesta evaluada da lugar a una variable continua. En estos casos, la relación dosis-respuesta se sigue estimando con métodos de regresión; sin embargo, las transformaciones utilizadas para obtener dos variables relacionadas de manera lineal son distintas. En general, la concentración se transforma aplicándole logaritmos para lograr una distribución de las respuestas para una concentración dada de tipo normal. La variable respuesta puede o no transformarse, dependiendo de la distribución de los puntos en un gráfico bivariable. Para efectuar la regresión en cuestión se aplican las técnicas de regresión básicas que se pueden encontrar en cualquier libro de estadística. Entre los modelos más utilizados para este tipo de variables se encuentra el logístico, que puede ser transformado fácilmente en una recta o analizado por procedimientos de regresión no lineal, que se encuentran disponibles en la mayoría de los programas estadísticos (*Statistica*, *Systat*, *Minitab*, etcétera).

5.4.2 Pruebas para evaluar la diferencia entre organismos expuestos a distintas dosis contra un control negativo (dosis 0)

Este tipo de análisis se realiza para determinar la concentración más alta a la que no se observa efecto (NOEC) o la concentración más baja a la que se observa efecto (LOEC) e implica pruebas de hipótesis. El método clásico para este tipo de análisis es el ANOVA, seguido por la prueba *a posteriori* de Dunnet. Esta prueba está diseñada para comparar los resultados obtenidos para un tratamiento en particular contra un control negativo (tratamiento con dosis 0). Para este tipo de análisis se requiere que se verifiquen los supuestos de un ANOVA (varianzas homogéneas, independencia de los errores, distribución normal de los residuos, entre los más importantes), que el número de replicados por tratamiento sea superior a tres y que todos los tratamientos tengan el mismo número de replicados. Si hay menos de tres replicados, no se debería proceder con una prueba de hipótesis, y si el número de replicados varía entre los tratamientos, se debería utilizar en lugar de la prueba de Dunnet, la prueba de *t* con el ajuste de Bonferroni. La homogeneidad de varianzas se puede evaluar con la prueba de Bartlett (Zar, 1994), y la distribución normal de los residuos con la prueba de Shapiro-Wilk (Conover, 1980). Un ejemplo del cálculo de NOEC por los procedimientos mencionados puede observarse en el anexo 5.1.

Es importante destacar que de no verificarse los supuestos del ANOVA será necesario proceder a la transformación de la variable dependiente (respuesta) hasta obtener una que verifique dichos supuestos o aplicar métodos no paramétricos, como la prueba de Kruskal-Wallis, la prueba de rangos de Steel Many o la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con el ajuste de Bonferroni.

REFERENCIAS

- CETESB, 1992, L50.17, *Análise estatística de resultados de testes de Toxicidade Aguda*, Sao Paulo, Brasil.
- Conover, W.J., 1980, *Practical Nonparametric Statistics*, 2nd ed., J. Wiley & Sons, New York.

- Conover, W.J., 1980, *Practical Nonparametric Statistics*, 2nd ed., New York, Wiley.
- Finney, D.L., 1978, *Statistical Method in Biological Assay*, 3rd ed., Charles Griffin & Company Ltd, London and High Wycombe.
- Hubert, J., 1995, *Bioassay and its Relation to Agricultural and Environmental Issues*. Simposio Internacional de Estadística, Santa Marta.
- Hubert, J., 1980, *Bioassay*, Kendall/Hunt Publishing Company, Toronto.
- Martínez, R. y N. Martínez, 1995, *Diseño de experimentos*, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Montgomery, D.C., 1991, *Design and Analysis of Experiments*, 3rd ed., J. Wiley & Sons, New York.
- Steel, R.G.D. y Torrie, J.H., 1985, *Bioestadística, principios y procedimientos*, 2^a ed., Editorial McGraw Hill, Bogotá.
- US Environmental Protection Agency, 1993, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*, 4th ed., EPA/600/4-90/027F, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati.
- Zar, J.H., 1994, *Biostatistical Analysis*, 3rd ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

ANEXO 1

Ejemplo de cálculo simplificado del NOEC por prueba de hipótesis

Para el cálculo del NOEC por este método es necesario contar con más de tres replicados por concentración.

Los valores que se proporcionan a continuación corresponden a los promedios de longitudes de raíces de semilla de lechuga resultantes de un ensayo de elongación de raíz con *Lactuca sativa*. Cada valor es el promedio redondeado a entero de un replicado.

Tabla 5.3. Elongación de raíz (mm), promedio de cada replicado, redondeado a entero.

Réplica	Dilución de la muestra ensayada						
	Control	1%	5%	10%	25%	50%	75%
1	24	21	16	17	18	13	12
2	26	22	22	17	15	17	14
3	21	22	18	21	19	18	17
4	25	22	21	21	14	16	13
5	25	19	22	18	15	18	12

El primer paso para evaluar los resultados obtenidos es determinar si verifican normalidad de errores y homogeneidad de varianzas. Para evaluar lo primero se realizará la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y para evaluar lo segundo se realizará la prueba de Bartlett.

Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk

En esta prueba se estima un estadístico D según la expresión:

$$D = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Donde:

x_i = la observación centrada i , se obtiene restando a cada valor su respectiva media aritmética dentro de cada concentración evaluada.

$\bar{x}$ = la media total de todas las observaciones centradas (de todas las concentraciones).

n = el total de las observaciones centradas.

Luego se computa el estadístico W según la siguiente expresión

$$W = \frac{1}{D} \left[\sum_{i=1}^K a_i (x_{(n-i+1)} - x_{(i)}) \right]^2$$

Donde:

a_i = representa los coeficientes que se obtienen de la tabla del anexo 5.4 (Conover, 1980).

$K = n/2$ = si k es par y $(n-1)/2$ si k es impar.

Como resultado del procesamiento de los datos, se obtienen los siguientes valores:

$$D = 106,3640$$

$$W = 0,9692$$

Los valores críticos para el estadístico W se presentan a continuación

Alfa	N	W tabulado
0,01	35	0,9100
0,05	35	0,9340

Como el W calculado supera los valores de tabla en ambos casos se acepta la hipótesis de la distribución normal de los errores a los dos alfa presentados.

Prueba de Bartlett para evaluar la homogeneidad de las varianzas de cada concentración evaluada

El estadístico calculado $B = 2,6046$ ($p = 0,8566$) no supera los valores de B tabulados que se presentan a continuación:

Alfa	Grados de libertad	B tabulado
0,01	6	16,8119
0,05	6	12,5916

Como el B calculado resulta menor que el B de tabla para los dos alfa presentados, se acepta la hipótesis nula que plantea la homogeneidad de las varianzas.

A continuación, dado que los datos verifican ambos supuestos del ANOVA y la prueba paramétrica de Dunnett, se procede a realizar el ANOVA correspondiente, obteniéndose los siguientes resultados:

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Valor p
Entre grupos	6	380,0857	63,3476	16,6761	0,0000
Dentro de grupos	28	106,3640	3,7987		
Total		34	486,4497		

	Error de tipo I (α)	Grados de libertad	F tabulado
Valores tabulados de F	0,01	6 y 28	3,5276
	0,05	6 y 28	2,4453

Dado que el F calculado supera el F de tabla a cualquiera de los dos (α) se rechaza la hipótesis nula en ambos casos (al menos un par de medias difieren entre sí).

Dado que el ANOVA indica diferencias significativas en, al menos, un par de medias, se compararán las medias utilizando la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Los resultados de dicha prueba se pueden observar a continuación:

Tratamiento	Media	Valor de t para un α de 0,05
Control	24,18	
1%	21,20	2,4175
5%	19,66	3,6668 *
10%	18,58	4,5430 *
25%	15,98	6,6522 *
50%	16,32	6,3764 *
75%	13,60	8,5830 *

El * indica diferencias significativas con el control negativo. El valor tabulado para la prueba a una sola cola para un $\alpha = 0,05$ para grados de libertad 6 y 24 (valores más cercanos en la tabla para 6 y 28) es de 2,43. Todas las diferencias mayores de 2,43 difieren significativamente del control.

De esta forma, se determina el valor del NOEC en 1% y el LOEC en 5 por ciento.

ANEXO 2

Ejemplo de cálculo simplificado de la CL₅₀ por el método Probit

Para el cálculo de la CE₅₀ o CL₅₀ por este método es necesario contar, por lo menos, con dos porcentajes intermedios del efecto esperado (valores entre 0 y 100%).

Con los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda de efluentes con *D. magna* se construye la tabla 5.4, con los siguientes datos:

- Concentración de la sustancia ensayada (en %).
- Logaritmo en base 10 de las anteriores concentraciones (*x*).
- Número de organismos en cada concentración (*N*).
- Número de organismos muertos en cada concentración (*r*).
- Porcentaje de mortalidad en cada concentración (*P*).
- Probit empírico (*PE*).
- Probit esperado o calculado (*Y*).

Los cinco primeros resultados corresponden a datos experimentales; el Probit empírico se obtiene de la tabla 5.5 con el porcentaje de mortalidad observada en cada una de las concentraciones.

Tabla 5.4. Ejemplo de cálculo de la CL₅₀ por el método Probit.

Concentración del agente tóxico (%)	Log ₁₀ de la concentración (<i>x</i>)	Núm. de organismos (<i>N</i>)	Núm. de muertos (<i>r</i>)	Porcentaje de mortalidad (<i>P</i>)	Probit empírico (<i>PE</i>)	Probit calculado (<i>Y</i>)
100	2,0	20	15	75	5,67	5,53
50	1,7	20	9	45	4,87	4,96
25	1,4	20	5	25	4,33	4,40
12,5	1,1	20	2	10	3,72	3,84
6,25	0,8	20	1	5	3,36	3,27

Tabla 5.5. Relación entre el Probit empírico y el porcentaje de mortalidad.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99 ^a	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	9,09

^a Valores entre 99,0 y 99,9.

A partir de estos datos se elabora una gráfica en papel cuadriculado, colocando en el eje x el logaritmo de las concentraciones y en el eje Y el Probit empírico (figura 5.3), y se ajusta la recta a través de estos puntos. En el gráfico se traza una línea a partir del Probit 5,0 hasta cortar la línea trazada; el valor correspondiente en el eje x se denomina m y el antilogaritmo de este valor corresponderá a la CE_{50} o CL_{50} . En este ejemplo, $m = 1,72$, por tanto, $CL_{50} = 52,5$ miligramos por litro.

Para el cálculo del Probit esperado o calculado, debe hallarse el valor de S correspondiente a la tasa de incremento del log de la concentración (x) por unidad de incremento del Probit.

En la recta trazada se calcula la pendiente, tomando el porcentaje donde se halló el mayor y el menor efecto, así como los probits correspondientes a estos valores. En el ejemplo:

$$\begin{array}{ll} x_m = 0,8 & PE = 3,30 \\ x_M = 2,0 & PE = 5,55 \end{array}$$

$$\text{Si:} \quad S = (X - x) / (PE - PE)$$

Siendo:

x_M = mayor concentración.

x_m = menor concentración.

PE = Probit empírico correspondiente a la mayor concentración.

PE = Probit empírico correspondiente a la menor concentración.

Para el ejemplo será:

$$S = (2,0 - 0,8) / (5,55 - 3,30)$$

$$S = 0,533$$

Así, los valores del Probit esperado o calculado (Y) para cada concentración podrán ser calculados utilizando la siguiente expresión:

$$Y = 5 + \frac{\{(x - m)\}}{S}$$

Una vez calculados se colocan en la columna correspondiente de la tabla 5.4.

La prueba de hipótesis utilizada para establecer la asociación entre la concentración de la sustancia tóxica y la respuesta en unidades probit es la prueba de CHI-cuadrado (X^2). Los datos para el cálculo de este valor se colocan en una tabla de la siguiente forma (tabla 5.6):

- Concentración de la sustancia estudiada (%).
- Logaritmo decimal de la concentración (x).
- Probit calculado o esperado (Y).
- Número de organismos (N).

- Mortalidad observada (r).
- Porcentaje de efecto esperado (P').

Los cinco primeros datos se obtienen de la tabla 1 y el último dato de la tabla 2, utilizando los valores de Y . Con los valores obtenidos se construye la tabla 3 dividiendo entre 100.

Tabla 5.6. Determinación del Chi-cuadrado (χ^2).

Concentración de la sustancia tóxica (%)	Log_{10} de la concentración (x)	Probit calculado (Y)	Porcentaje de efecto esperado (P')	Núm. de organismos (N)	Núm. de muertos (r)	Mortalidad esperada (NP')	Desviación ($r - NP'$)	Contribuc. al χ^2 $\frac{(r - NP')^2}{NP' (1 - P')}$
100	2,0	5,53	0,705	20	15	14,1	0,9	0,19
50	1,7	4,96	0,485	20	9	9,7	-0,7	0,09
25	1,4	4,40	0,275	20	5	5,5	-0,5	0,06
12,5	1,1	3,84	0,125	20	2	2,5	-0,5	0,11
6,25	0,8	3,27	0,045	20	1	0,9	0,1	0,01
								0,48

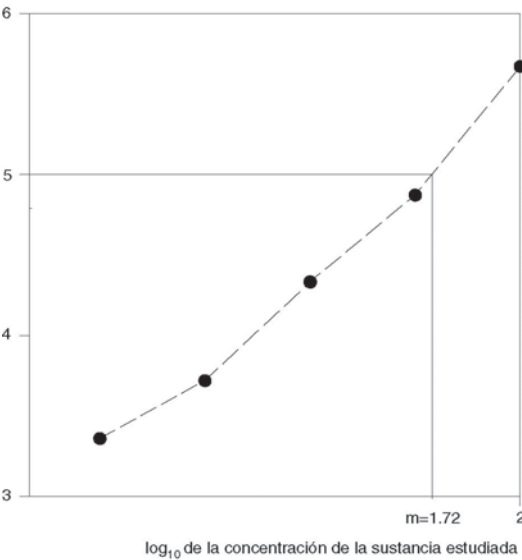


Figura 5.3. Representación gráfica del cálculo de la CL_{50} .

La mortalidad esperada (NP') se calcula multiplicando el número de organismos en cada prueba (N) por el porcentaje de efecto esperado (P').

El cálculo de la desviación de la mortalidad se obtiene hallando la diferencia entre la mortalidad observada y la esperada.

La contribución al Chi cuadrado de cada uno de los valores se calcula:

$$(r - NP')^2 / NP' (1 - P')$$

Y para el cálculo de los grados de libertad (n):

$$N = K - 2$$

donde K es el número de concentraciones utilizadas; en el ejemplo será:

$$n = 5 - 2$$

$$n = 3$$

En la tabla 4 se determina el valor de X^2 para tres grados de libertad. En el ejemplo, el valor obtenido es 7,82; al compararlo con el valor obtenido en la tabla, se observa que:

$$7,82 > 0,482$$

Por lo tanto, la recta está bien ajustada; en caso contrario, trazar nuevamente la recta y volver a calcular el Chi cuadrado.

Tabla 5.7. Valores de X^2 para una $P = 0.05$.

Grados de libertad (n)	X^2
1	3,34
2	5,99
3	7,82
4	9,49
5	11,4
6	12,6
7	14,4
8	15,5
9	16,9
10	18,8

Cálculo del intervalo de confianza

Para el cálculo de los límites es necesario establecer el error estándar. El error estándar del log de la concentración letal para el 50% de los organismos se obtiene a través de la siguiente expresión:

$$EE \log_{10} CL_{50} = \{S^2 [1/SNp + (m - x)^2 / S Np x - x^2] \}^{0.5}$$

Inicialmente, se construye una tabla en la cual se incorporen los siguientes datos:

- Logaritmo decimal de las concentraciones (x).
- Número de organismos por concentración (N).
- Probit esperado o calculado (Y).
- Factor p , el cual se obtiene de la tabla 6.5. con el valor Y .
- Productos Np , Npx y Npx^2 , obtenidos de los datos de la misma tabla.
- Sumatoria de los productos correspondientes a los valores SNp , $SNpx$ y $SNpx^2$

Tabla 5.8. Factor (p) para el Probit calculado (Y).

Y	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
1	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	0,005	0,006	0,008	0,011
2	0,015	0,019	0,025	0,031	0,040	0,069	0,062	0,076	0,092	0,110
3	0,131	0,154	0,180	0,208	0,238	0,264	0,302	0,336	0,370	0,406
4	0,439	0,471	0,503	0,532	0,558	0,583	0,601	0,616	0,627	0,634
5	0,637	0,634	0,627	0,616	0,601	0,589	0,558	0,532	0,503	0,471
6	0,439	0,405	0,370	0,336	0,302	0,269	0,238	0,208	0,180	0,154
7	0,131	0,110	0,092	0,076	0,062	0,059	0,050	0,031	0,025	0,019
8	0,015	0,011	0,008	0,006	0,005	0,003	0,002	0,002	0,001	0,001

Tabla 5.9. Cálculo del error estándar del $\log_{10} CL_{50}$.

Log ₁₀ de la concentración (x)	Núm. de organismos (N)	Probit calculado (Y)	Factor (p)	Producto (Np)	Producto (Npx)	Producto (Npx ²)
2,0	20	5,53	0,569	11,38	22,76	45,52
1,7	20	4,96	0,635	12,70	21,59	36,70
1,4	20	4,40	0,558	11,16	15,62	21,87
1,1	20	3,84	0,388	7,76	9,54	9,39
0,8	20	3,27	0,194	<u>3,88</u>	<u>3,10</u>	<u>2,48</u>
(Σ)				46,88	71,61	115,96

- Factor p debe ser obtenido en la tabla entrando el valor de Probit calculado.
- Producto Np resultante de la multiplicación de los valores de número de organismos por el factor p y su respectiva sumatoria.
- Producto Npx resultante de la multiplicación del producto anterior por el logaritmo de las concentraciones con su respectiva sumatoria.
- Producto Npx^2 resultante de la multiplicación del producto anterior por el logaritmo de la concentración con su respectiva sumatoria.

En el ejemplo:

$$S = 0,533$$

$$x = \Sigma Npx / \Sigma Np = 1,527$$

$$m = 1,72$$

$$\Sigma Np = 46,88$$

$$\Sigma Npx = 71,61$$

$$\Sigma Npx^2 = 115,96$$

$$\Sigma Np(x - x^2) = Npx^2 - \{(\Sigma Npx)^2 / \Sigma Np\} = 6,574$$

Sustituyendo estos valores en la expresión:

$$EE \log_{10} CL_{50} = 0,0875$$

Así, el EE de CL_{50} será:

$$EE CL_{50} = \log_e 10 \cdot EE \log_{10} CL_{50} \cdot 10^m$$

Donde:

$$\log_e 10 = 2,3026$$

$$EE \log_{10} CL_{50} = 0,0875$$

$$10^m = 52,5$$

Sustituyendo los valores en la expresión:

$$EE CL_{50} = 10,58$$

Como la:

$$CL_{50} = 52,5$$

$$\begin{aligned} \text{Intervalo de confianza} &= m \pm EECL_{50} \\ \text{al 95\%} &= 52,5 + 10,58 = 63,1 \\ &= 52,5 - 10,58 = 41,9 \end{aligned}$$

Por tanto, la CL_{50} con los respectivos límites será:

$$41,9 < 52,5 < 63,1$$

ANEXO 3

Tabla 5.10. Valores corregidos para 0 y 100% de efecto.

Valor esperado	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	0,3	0,7	1	1,3	1,6	2	2,3	2,6	2,9
10	3,2	3,5	3,8	4,1	4,4	4,7	4,9	5,2	5,5	5,7
20	6	6,2	6,5	6,7	7	7,2	7,4	7,6	7,8	8,1
30	8,3	8,4	8,6	8,8	9	9,2	9,3	9,4	9,6	9,8
40	9,9	10	10,1	10,2	10,3	10,4	10,4	10,4	10,4	10,5
50	-	89,5	89,6	89,6	89,6	89,7	89,7	89,8	89,9	90
60	90,1	90,2	90,4	90,5	90,7	90,8	91	91,2	91,4	91,6
70	91,7	91,9	92,2	92,4	92,6	92,8	93	93,3	93,5	93,8
80	94	94,3	94,5	94,8	95,1	95,3	95,6	95,9	96,2	96,5
90	96,8	97,1	97,4	97,7	98	98,4	98,7	99	99,3	99,7

ANEXO 4

Tabla 5.11. Coeficientes para la prueba de Shapiro-Wilk (Conover, 1981).

<i>i/n</i>	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,7071	0,7071	0,6872	0,6646	0,6431	0,6233	0,6052	0,5888	0,5739
2	-	0,0000	0,1667	0,2413	0,2806	0,3031	0,3164	0,3244	0,3291
3	-	-	-	0,0000	0,0875	0,1401	0,1743	0,1976	0,2141
4	-	-	-	-	-	0,0000	0,0561	0,0947	0,1224
5	-	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0399

<i>i/n</i>	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0,5601	0,5475	0,5359	0,5251	0,5150	0,5056	0,4968	0,4886	0,4808	0,4734
2	0,3315	0,3325	0,3325	0,3318	0,3306	0,3290	0,3273	0,3253	0,3232	0,3211
3	0,2260	0,2347	0,2412	0,2460	0,2495	0,2521	0,2540	0,2553	0,2561	0,2565
4	0,1429	0,1586	0,1707	0,1802	0,1878	0,1939	0,1988	0,2027	0,2059	0,2085
5	0,0695	0,0922	0,1099	0,1240	0,1353	0,1447	0,1524	0,1587	0,1641	0,1686
6	0,0000	0,0303	0,0539	0,0727	0,0880	0,1005	0,1109	0,1197	0,1271	0,1334
7	-	-	0,0000	0,0240	0,0433	0,0593	0,0725	0,0837	0,0932	0,1033
8	-	-	-	-	0,0000	0,0196	0,0359	0,0496	0,0612	0,0711
9	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0163	0,0303	0,0422
10	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0144

<i>i/n</i>	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	0,4643	0,4590	0,4542	0,4493	0,4450	0,4407	0,4366	0,4328	0,4291	0,4254
2	0,3185	0,3156	0,3126	0,3098	0,3069	0,3043	0,3018	0,2992	0,2968	0,2944
3	0,2578	0,2571	0,2563	0,2554	0,2543	0,2533	0,2522	0,2510	0,2499	0,2487
4	0,2119	0,2131	0,2139	0,2145	0,2148	0,2151	0,2152	0,2151	0,2150	0,2148
5	0,1736	0,1764	0,1787	0,1807	0,1822	0,1836	0,1848	0,1857	0,1864	0,1870
6	0,1399	0,1443	0,1480	0,1512	0,1539	0,1563	0,1584	0,1601	0,1616	0,1630
7	0,1092	0,1150	0,1201	0,1245	0,1283	0,1316	0,1346	0,1372	0,1395	0,1415
8	0,0804	0,0878	0,0941	0,0997	0,1046	0,1089	0,1128	0,1162	0,1192	0,1219
9	0,0530	0,0618	0,0696	0,0764	0,0823	0,0876	0,0923	0,0965	0,1002	0,1036
10	0,0263	0,0368	0,0459	0,0539	0,0610	0,0672	0,0728	0,0778	0,0822	0,0862
11	0,0000	0,0122	0,0228	0,0321	0,0403	0,0476	0,0540	0,0598	0,0650	0,0697
12	-	-	0,0000	0,0107	0,0200	0,0284	0,0358	0,0424	0,0483	0,0537
13	-	-	-	-	0,0000	0,0094	0,0178	0,0253	0,0320	0,0381
14	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0084	0,0159	0,0227
15	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0076

i/n	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1	0,4220	0,4188	0,4156	0,4127	0,4096	0,4068	0,4040	0,4015	0,3989	0,3964
2	0,2921	0,2898	0,2876	0,2854	0,2834	0,2813	0,2794	0,2774	0,2755	0,2737
3	0,2475	0,2462	0,2451	0,2439	0,2427	0,2415	0,2403	0,2391	0,2380	0,2368
4	0,2145	0,2141	0,2137	0,2132	0,2127	0,2111	0,2116	0,2110	0,2104	0,2098
5	0,1874	0,1878	0,1880	0,1882	0,1883	0,1883	0,1883	0,1881	0,1880	0,1878
6	0,1641	0,1651	0,1660	0,1667	0,1673	0,1678	0,1683	0,1686	0,1689	0,1691
7	0,1433	0,1449	0,1463	0,1475	0,1487	0,1496	0,1505	0,1513	0,1520	0,1526
8	0,1243	0,1265	0,1284	0,1301	0,1317	0,1331	0,1344	0,1356	0,1366	0,1376
9	0,1066	0,1093	0,1118	0,1140	0,1160	0,1179	0,1196	0,1211	0,1225	0,1237
10	0,0899	0,0931	0,0961	0,0988	0,1013	0,1036	0,1056	0,1075	0,1092	0,1108
11	0,0739	0,0777	0,0812	0,0844	0,0873	0,0900	0,0924	0,0947	0,0967	0,0986
12	0,0585	0,0629	0,0669	0,0706	0,0739	0,0770	0,0798	0,0824	0,0848	0,0870
13	0,0435	0,0485	0,0530	0,0572	0,0610	0,0645	0,0677	0,0706	0,0733	0,0759
14	0,0289	0,0349	0,0395	0,0441	0,0484	0,0523	0,0559	0,0592	0,0622	0,0611
15	0,0144	0,0206	0,0262	0,0314	0,0361	0,0404	0,0444	0,0481	0,0515	0,0546
16	0,0000	0,0068	0,0131	0,0187	0,0239	0,0287	0,0331	0,0372	0,0409	0,0444
17	-	-	0,0000	0,0062	0,0119	0,0172	0,0220	0,0264	0,0305	0,0343
18	-	-	-	-	0,0000	0,0057	0,0110	0,0158	0,0203	0,0244
19	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0053	0,0101	0,0146
20	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0049

i/n	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
1	0,3940	0,3917	0,3894	0,3872	0,3850	0,3830	0,3808	0,3789	0,3770	0,3751
2	0,2719	0,2701	0,2684	0,2667	0,2651	0,2635	0,2620	0,2604	0,2589	0,2574
3	0,2357	0,2345	0,2334	0,2323	0,2313	0,2302	0,2291	0,2281	0,2271	0,2260
4	0,2091	0,2085	0,2078	0,2072	0,2065	0,2058	0,2052	0,2045	0,2038	0,2032
5	0,1876	0,1874	0,1871	0,1868	0,1865	0,1862	0,1859	0,1855	0,1851	0,1847
6	0,1693	0,1694	0,1695	0,1695	0,1695	0,1695	0,1695	0,1693	0,1692	0,1691
7	0,1531	0,1535	0,1539	0,1542	0,1545	0,1548	0,1550	0,1551	0,1553	0,1554
8	0,1384	0,1392	0,1398	0,1405	0,1410	0,1415	0,1420	0,1423	0,1427	0,1430
9	0,1249	0,1259	0,1269	0,1278	0,1286	0,1293	0,1300	0,1306	0,1312	0,1317
10	0,1123	0,1136	0,1149	0,1160	0,1170	0,1180	0,1189	0,1197	0,1205	0,1212
11	0,1004	0,1020	0,1035	0,1049	0,1062	0,1073	0,1085	0,1095	0,1105	0,1113
12	0,0891	0,0909	0,0927	0,0943	0,0959	0,0972	0,0986	0,0998	0,1010	0,1020
13	0,0782	0,0804	0,0824	0,0842	0,0860	0,0876	0,0892	0,0906	0,0919	0,0932
14	0,0677	0,0701	0,0724	0,0745	0,0765	0,0783	0,0801	0,0817	0,0832	0,0846

15	0,0575	0,0602	0,0628	0,0651	0,0673	0,0694	0,0713	0,0731	0,0748	0,0764
16	0,0476	0,0506	0,0534	0,0560	0,0584	0,0607	0,0628	0,0648	0,0667	0,0685
17	0,0379	0,0411	0,0442	0,0471	0,0497	0,0522	0,0546	0,0568	0,0588	0,0608
18	0,0283	0,0318	0,0352	0,0383	0,0412	0,0439	0,0465	0,0489	0,0511	0,0532
19	0,0188	0,0227	0,0263	0,0296	0,0328	0,0357	0,0385	0,0411	0,0436	0,0459
20	0,0094	0,0136	0,0175	0,0211	0,0245	0,0277	0,0307	0,0335	0,0361	0,0386
21	0,0000	0,0045	0,0087	0,0126	0,0163	0,0197	0,0229	0,0259	0,0288	0,0314
22	-	-	0,0000	0,0042	0,0081	0,0118	0,0153	0,0185	0,0215	0,0244
23	-	-	-	-	0,0000	0,0039	0,0076	0,0111	0,0143	0,0174
24	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0037	0,0071	0,0104
25	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0035

Tabla 5.12. Cuantiles para el estadístico de la prueba de Shapiro-Wilk.

<i>n</i>	0,01	0,02	0,05	0,10	0,50	0,90	0,95	0,98	0,99
3	0,753	0,756	0,767	0,789	0,959	0,998	0,999	1,000	1,000
4	0,687	0,707	0,748	0,792	0,935	0,987	0,992	0,996	0,997
5	0,686	0,715	0,762	0,806	0,927	0,979	0,986	0,991	0,993
6	0,713	0,743	0,788	0,826	0,927	0,974	0,981	0,986	0,989
7	0,730	0,760	0,803	0,838	0,928	0,972	0,979	0,985	0,988
8	0,749	0,778	0,818	0,851	0,932	0,972	0,978	0,984	0,987
9	0,764	0,791	0,829	0,859	0,935	0,972	0,978	0,984	0,986
10	0,781	0,806	0,842	0,869	0,938	0,972	0,978	0,983	0,986
11	0,792	0,817	0,850	0,876	0,940	0,973	0,979	0,984	0,986
12	0,805	0,828	0,859	0,883	0,943	0,973	0,979	0,984	0,986
13	0,814	0,837	0,866	0,889	0,945	0,974	0,979	0,984	0,986
14	0,825	0,846	0,874	0,895	0,947	0,975	0,980	0,984	0,986
15	0,835	0,855	0,881	0,901	0,950	0,975	0,980	0,984	0,987
16	0,844	0,863	0,887	0,906	0,952	0,976	0,981	0,985	0,987
17	0,851	0,869	0,892	0,910	0,954	0,977	0,981	0,985	0,987
18	0,858	0,874	0,897	0,914	0,956	0,978	0,982	0,986	0,988
19	0,863	0,879	0,901	0,917	0,957	0,978	0,982	0,986	0,988
20	0,868	0,884	0,905	0,920	0,959	0,979	0,983	0,986	0,988
21	0,873	0,888	0,908	0,923	0,960	0,980	0,983	0,987	0,989
22	0,878	0,892	0,911	0,926	0,961	0,980	0,984	0,987	0,989
23	0,881	0,895	0,914	0,928	0,962	0,981	0,984	0,987	0,989
24	0,884	0,898	0,916	0,930	0,963	0,981	0,984	0,987	0,989
25	0,888	0,901	0,918	0,931	0,964	0,981	0,985	0,988	0,989
26	0,891	0,904	0,920	0,933	0,965	0,982	0,985	0,988	0,989
27	0,894	0,906	0,923	0,935	0,965	0,982	0,985	0,988	0,990
28	0,896	0,908	0,924	0,936	0,966	0,982	0,985	0,988	0,990
29	0,898	0,910	0,926	0,937	0,966	0,982	0,985	0,988	0,990
30	0,900	0,912	0,927	0,939	0,967	0,983	0,985	0,988	0,990
31	0,902	0,914	0,929	0,940	0,967	0,983	0,986	0,988	0,990
32	0,904	0,915	0,930	0,941	0,968	0,983	0,986	0,988	0,990
33	0,906	0,917	0,931	0,942	0,968	0,983	0,986	0,989	0,990
34	0,908	0,919	0,933	0,943	0,969	0,983	0,986	0,989	0,990
35	0,910	0,920	0,934	0,944	0,969	0,984	0,986	0,989	0,990
36	0,912	0,922	0,935	0,945	0,970	0,984	0,986	0,989	0,990
37	0,914	0,924	0,936	0,946	0,970	0,984	0,987	0,989	0,990
38	0,916	0,925	0,938	0,947	0,971	0,984	0,987	0,989	0,990
39	0,917	0,927	0,939	0,948	0,971	0,984	0,987	0,989	0,991
40	0,919	0,928	0,940	0,949	0,972	0,985	0,987	0,989	0,991
41	0,920	0,929	0,941	0,950	0,972	0,985	0,987	0,989	0,991
42	0,922	0,930	0,942	0,951	0,972	0,985	0,987	0,989	0,991
43	0,923	0,932	0,943	0,951	0,973	0,985	0,987	0,990	0,991
44	0,924	0,933	0,944	0,952	0,973	0,985	0,987	0,990	0,991
45	0,926	0,934	0,945	0,953	0,973	0,985	0,988	0,990	0,991
46	0,927	0,935	0,945	0,953	0,974	0,985	0,988	0,990	0,991
47	0,928	0,936	0,946	0,954	0,974	0,985	0,988	0,990	0,991
48	0,929	0,937	0,947	0,954	0,974	0,985	0,988	0,990	0,991
49	0,929	0,937	0,947	0,955	0,974	0,985	0,988	0,990	0,991
50	0,930	0,938	0,947	0,955	0,974	0,985	0,988	0,990	0,991

6 ASEGURAMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD DE BIOENSAYOS

María Consuelo Díaz Báez, María Cecilia Sobrero y Yolanda Pica Granados

6.1 *Introducción*

Un elemento importante en el muestreo y análisis de muestras ambientales es utilizar métodos aprobados y estandarizados; sin embargo, este hecho por sí 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.

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.

6.2 *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 con la 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.

6.2.1 Protocolos de prueba

Uno de los problemas relacionados con los programas de control de calidad de ensayos de toxicidad es la existencia de un gran número de pruebas, muchas 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 (US EPA) y Canadá (*Environment Canada*) que cuentan con metodologías que pueden ser incorporadas al trabajo de rutina de cualquier laboratorio.

Aunque algunos de los métodos o protocolos recomendados en el capítulo 4 “Protocolos de ensayo” de 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 superficiales y subterráneas, aguas residuales industriales y domésticas, y aguas de poro de sedimentos y lodos.

Varios de los métodos recomendados por la US EPA 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, 4th edition.
- *Short Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*, EPA 600/4-91-002, 1994, 3rd edition.

También, la *American Society for Testing Materials* (ASTM), la *International Organization for Standardization* (ISO) y la *Organization for Economic Co-operation 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.

6.2.2 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.

6.2.3 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 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

En la oferta 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 tóxicos de referencia deberán ser de uso exclusivo para la preparación de una solución patrón, tener un grado de pureza del 99% y preferentemente contar 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.

6.2.4 Tóxicos de referencia

Un tóxico de referencia es un compuesto químico orgánico o inorgánico utilizado 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 $\geq 99\%$, 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 tóxico de referencia.

El registro histórico de la respuesta al 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 tóxicos de referencia; la US EPA (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*, recomiendan al Zinc(II) como tóxico de referencia inorgánico y 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 gráficos de control. Este gráfico es una herramienta que permite determinar la variabilidad de los resultados y, en consecuencia, definir la aptitud de un laboratorio para obtener resultados confiables.

6.2.5 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 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 al 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 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 (ver figura 6.2.1). 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 tóxico de referencia.

Los valores del límite superior e inferior se obtienen al adicionar o sustraer del promedio, respectivamente, dos desviaciones estándar de acuerdo con:

Concentración límite superior: promedio + 2σ

Concentración límite inferior: promedio - 2σ

Para la elaboración de las cartas control, se debe preparar una solución estándar del tóxico de referencia seleccionado. Uno de los tóxicos más utilizados con *D. magna* e *H. attenuata* es el cromo hexavalente [Cr(VI)], preparado a partir de dicromato de potasio. En el caso de *S. capricornutum* y *Allium cepa* el más reportado es el cobre [Cu(II)], preparado a partir de sulfato de cobre; y para las semillas de *Lactuca sativa* el zinc [Zn(II)], a partir de sulfato de zinc. Con la solución estándar del tóxico se preparan diluciones para obtener una serie de concentraciones, de manera que se logre obtener al menos dos valores de efecto mayor 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 veinte evaluaciones, la carta control se mantiene usando solamente los veinte datos más recientes. En general, se recomienda realizar pruebas mensuales con los tóxicos seleccionados; sin embargo, algunos laboratorios prefieren llevar a cabo ensayos con mayor frecuencia.

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 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 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 los gráficos 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 por ciento.

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 intralaboratorio de cada procedimiento de prueba se debe expresar en términos del coeficiente de variación ($CV\%$), calculado a partir de

$$CV = [(\sigma / \text{media}) \times 100]$$

Este valor se establece realizando un mínimo de cinco o más ensayos con diferentes lotes de organismos, el mismo tóxico de referencia, iguales concentraciones, las mismas condiciones y el mismo análisis de datos.

En la tabla 6.2.1 se presenta un ejemplo para la elaboración de una carta de control (figura 6.2.1) para pruebas con *D. magna* utilizando como tóxico de referencia cromo(VI).

Tabla 6.2.1. Resultados de CL_{50-48h} obtenidos con *D. magna* utilizando cromo (VI) como tóxico de referencia.

Número del bioensayo	CL_{50-48h} [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
0	0,17	0,16 - 0,18
Promedio	0,1705	
Desviación estándar	0,0089	
CV (%)	5,20	

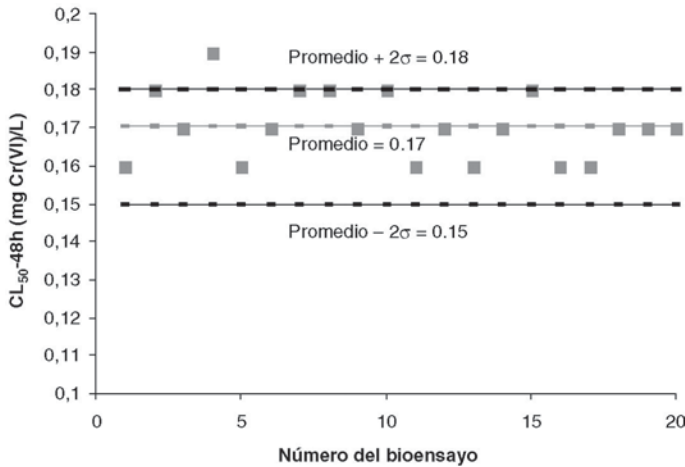


Figura 6.2.1. Carta control para *Daphnia magna* con Cr(VI) como tóxico de referencia.

6.3 Pruebas de toxicidad

6.3.1 *Allium cepa*

a) 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 tres o cuatro veces mayor al requerido para las pruebas. Su almacenamiento debe hacerse en ambiente exento de humedad, a una temperatura entre 10 y 20° grados centígrados.

b) Control de calidad en las pruebas con *Allium 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 doce réplicas por concentración con el fin de descartar, por lo menos, dos de los valores más extremos. En el caso que exista un bajo desarrollo radicular en más de dos 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 tóxicos de referencia y registrar 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.

6.3.2 *Lactuca sativa*

a) 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 ($CV < 30\%$). 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 tóxicos.

Si no es posible obtener lotes de semillas con poder germinativo $\geq$ 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.

b) Control de calidad de pruebas con *Lactuca sativa*

Es importante establecer cuáles son los valores de elongación en el control negativo, así como la sensibilidad de las semillas frente al 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 tóxico de referencia [promedio $\pm 2\sigma$ de la CE_{50} para el Zn(II)].

Como se mencionó en el punto 4.2.2, 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.

6.3.3 *Hydra attenuata*

a) Control del cultivo

La tasa de crecimiento (k) es una forma práctica de controlar el estado de salud de los cultivos de *Hydra*. Para su determinación, se colocan cinco organismos que presenten una yema en un recipiente más pequeño que los utilizados para el mantenimiento. Diariamente, por periodo 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 6.3.1 se presenta un ejemplo para ilustrar el procesamiento de los datos. 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, con programa de computación o calculadora, se obtienen los valores del intercepto en la ordenada (b) y la pendiente (m) de la ecuación de la recta.

$$y = mx + b$$

Tabla 6.3.1. Resultados hipotéticos de crecimiento.

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

Una vez graficada la recta, se calcula la tasa de crecimiento de la población de hidras (k) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$k = \ln 2 / T \quad (1)$$

donde T es el tiempo requerido para que la población se duplique (días).

Para calcular T , se despeja X de la ecuación de la recta Y , y se establece el tiempo requerido para que la población se duplique.

En el ejemplo 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:

$$y = mx + b \quad \therefore \quad b - y = mx \quad \therefore \quad x = y - b / m$$

Sustituyendo en la ecuación:

$$x = 38 - 0,82 / 6,82 = 5,45$$

Entonces T será:

$$5,45 - 3 = 2,45$$

Sustituyendo en (1):

$$k = \ln 2 / 2,45 = 0,693 / 2,45 = 0,28$$

Un valor de k entre 0,3 y 0,4 indica un crecimiento normal y puede considerarse que las condiciones fisiológicas son buenas para el desarrollo de pruebas de toxicidad. Valores menores estarían señalando condiciones inadecuadas de mantenimiento o infecciones bacterianas que inhiben el desarrollo y afectan la salud de los organismos. En este último caso, se recomienda llevar a cabo la desinfección masiva del cultivo.

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.

b) Control de las pruebas

El control de calidad de las pruebas de toxicidad con *Hydra* se lleva a cabo mediante la utilización de muestras control.

En las pruebas con *H. attenuata* se recomienda utilizar dos controles, uno negativo y otro positivo. En el primero, los organismos son expuestos por el mismo periodo de tiempo y en condiciones iguales a los ensayos, sin embargo no se utiliza tóxico en la solución de prueba. Generalmente se utiliza medio de *Hydra* o agua reconstituida con una dureza entre 160 y 180 mg CaCO₃/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 tóxico de referencia, cuyo efecto está bien establecido, al cual se exponen los

organismos de prueba. Se emplea para evaluar la sensibilidad de los organismos y se analiza conjuntamente con las muestras bajo estudio. Para *Hydra* se recomienda utilizar NaCl o Cr(VI). Cada laboratorio debe contar con la carta control con el tóxico seleccionado.

6.3.4 *Daphnia magna*

a) Control del cultivo

Para el control de calidad de los cultivos de *Daphnia*, 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 tóxico de referencia.

Para establecer los cambios en la sensibilidad del cultivo, se recomienda realizar mensualmente un bioensayo utilizando el 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 (cinco a diez) 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 *et al.*, 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 periodo 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 periodo de 21 días. De acuerdo con Girling y Garforth (1989) y Klüttgen *et al.* (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 cuarenta a sesenta

días han sido reportados como la longevidad promedio óptima (Girling y Garforth, 1989; Gutiérrez *et al.*, 1989).

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 a continuación (tabla 6.3.2).

Tabla 6.3.2. Tabla sugerida para el registro de los resultados de los experimentos de reproducción.

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

b) Control de calidad de pruebas con *Daphnia magna*

Para la elaboración de las pruebas se deben preparar dos controles: uno negativo y otro positivo. En el primero se colocan los organismos de prueba en agua de igual composición al mantenimiento y se observa su supervivencia durante las primeras 48 h de la prueba. Una mortalidad mayor del 10% en el control invalida la prueba.

El control positivo corresponde a una solución de concentración conocida del tóxico de referencia, cuyo efecto es conocido y ha sido cuantificado; se emplea para valorar la sensibilidad de los organismos. Aunque se pueden utilizar diferentes tóxicos de referencia, el más utilizado es Cr(VI) preparado a partir de dicromato de potasio.

6.3.5 *Selenastrum capricornutum*

a) 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 (descrita en el protocolo, capítulo 4 “Protocolos de ensayo”), agar-agar en una concentración al 1,5 a 2%. En otros casos, las células se mantienen inmovilizadas a una matriz de alginato esférica. 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 periodo de seis meses.

Cualquiera que sea el método de preservación, los cultivos deben renovarse haciendo nuevos trasposos cada tres o seis 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 del cual 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 fotoperiodo 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 tóxico de referencia seleccionado. En general, se recomienda utilizar Cu II como tóxico de referencia.

b) Control de calidad en las pruebas con *S. capricornutum*

El valor de CI_{50} obtenido para el 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:

$$\mu = (Ln N - Ln No) / \Delta t$$

donde:

N = Densidad celular al final del ensayo

No = 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 tanto, estos valores no son numéricamente comparables. Por esto, cuando se indica la CI_{50} debe anotarse con cuál variable fue calculada, 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 periodo de tiempo, en condiciones iguales a los ensayos pero sin tóxico en la solución de prueba (inóculo de algas en solución amortiguadora).

El control positivo corresponde a una solución de concentración conocida del tóxico de referencia y cuyo efecto está bien establecido. En general, se utiliza el tóxico de referencia [Cu(II)] 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 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.

6.4 Preparación de soluciones de control

a) Control positivo

Generalmente, como control positivo se utiliza una solución del tóxico 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 (US EPA, 1991), o el medio recomendado para cada prueba. En todos estos procedimientos se debe emplear material volumétrico. 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 tóxico de referencia:

Cada laboratorio debe conocer el patrón de respuesta de sus organismos al 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:

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

Donde:

V_i y V_f corresponden a los volúmenes iniciales y finales, y C_i y C_f a las concentraciones iniciales y finales.

Se recomienda hacer chequeos periódicos de la concentración del tóxico, dado que fenómenos de volatilización, evaporación, etcétera, pueden afectar la concentración del compuesto en la solución.

Preservación de las soluciones del tóxico de referencia:

Las soluciones del tóxico 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 seis meses. Mientras no se detecten resultados fuera de los límites normales de respuesta indicado por la carta control del tóxico de referencia, los patrones podrán usarse por un prolongado periodo de tiempo. Sin embargo, se sugiere efectuar su renovación a los 45 días y seis meses, respectivamente. Es importante también realizar la valoración química de la solución de prueba.

b) Preparación del control negativo

Como se mencionó en el capítulo 4 “Protocolos de ensayo”, en cada uno de los protocolos de prueba 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. 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 deben seguir los protocolos recomendados en cada una de las pruebas.

c) 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. Los resultados de toxicidad para el blanco no deben mostrar efecto, de lo contrario los resultados reportados para las muestras no son aceptables.

6.5 Replicabilidad y sensibilidad

La sensibilidad de las pruebas depende del número de réplicas por concentración, nivel de significancia establecido y 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.
- Calidad y cantidad 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 tóxicos 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.

6.6 Muestras duplicadas

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 cinco y diez, se debe tomar una muestra por duplicado; si son más de diez 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, 1998).

6.7 Puntos finales ($CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$, NOEC, LOEC)

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) correspondiente a una estimación de la concentración del tóxico que puede causar un efecto adverso observable, mediante una respuesta discreta en un porcentaje dado de organismos; concentración letal (CL), la cual corresponde a la concentración del 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 tóxico o 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 tóxico de referencia como para las muestras simples o duplicadas. Para el cálculo de la $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ se pueden utilizar técnicas de estimación de punto, tales como los métodos Probit, Spearman-Kärber, gráfico, etc., para lo que se pueden utilizar programas computacionales especialmente diseñados. Un ejemplo es la versión de la US EPA Probit 1.5 (ver capítulo 5 “Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad”).

REFERENCIAS

- APHA, 1998, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed., Washington, D.C.
- Blaise, C., Forget, G. & Trottier, S., 2000, "Toxicity Screening of Aqueous Samples Using a Cost-effective 72-hour Exposure *Selenastrum capricornutum* Assay", *Environ Toxicol.*, 15:352-359.
- Edley, M. T. & R. Law, 1988, "Evolution of Life Histories and Yields in Experimental Population of *Daphnia magna*", *Biol. J. Limn. Soc.*, 34: 309-326.
- Environment Canada, 1990, "Biological Test Method: Acute Lethality Test Using *Daphnia sp.*", *Report Environmental Protection series EPS 1/RM/11*, Canada, p 57.
- Girling, A. E. & Garforth, B. M., 1989, "Influence of Variations in Culture Medium on the Survival and Reproduction of *Daphnia magna*", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 42:119-125.
- Goulden, C. E., Comotto, R. M., Hendrickson, J. A. Jr., Horning, L. L. & K. L. Johnson, 1982, "Procedures and Recommendations for the Culture and Use of *Daphnia* in Bioassay Studies", *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766*, J. G. Pearson, R. B. Foster & W. E. Bishop eds., American Society for Testing and Materials, pp. 139-160.
- Gutiérrez, L.E., Lerdo de Tejada, B.A., Huerto-Delgadillo R.I. y García C.J., 1989, *Procedimientos de evaluación tóxica de efluentes industriales líquidos utilizando Daphnia magna* Straus (*Cladocera crustácea*), Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, México, 105 pp.
- ISO 8692, 1989, *Water Quality Fresh Water Algal Growth Inhibition Test with Scenedesmus subapicatus and Selenastrum capricornutum*.
- Lewis, M.A. & A.W. Maki, 1981, "Effects of Water Hardness and Diet on Productivity of *Daphnia magna* Strauss, in Laboratory Culture", *Hydrobiologia*, 85: 175-179.
- US EPA Environmental Protection Agency (EPA), 1993, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluent and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*: 4th Ed: Weber, C.I. Ed., EPA-600/4-90-027.
- US EPA Environmental Protection Agency (EPA), 1994, *Short Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*, EPA 600/4-91-002, 1994, 3rd edition.

7 INTERPRETACIÓN Y MANEJO DE RESULTADOS

Alicia Ronco y María Consuelo Díaz Báez

Los lineamientos generales presentados en este capítulo fueron desarrollados a partir de un documento publicado por la Agencia de Protección Ambiental de Canadá, sobre aplicación e interpretación de datos basados en ensayos de toxicidad con especies únicas (*Environment Canada*, EPS 1/RM/34, 1999).

7.1 Interpretación de datos toxicológicos

La estimación de la toxicidad de un ensayo de laboratorio está determinada por las especies y condiciones particulares bajo las cuales son llevados a cabo. A pesar de que no corresponden a efectos tomados directamente en el campo, las mismas pueden utilizarse para predecir el efecto nocivo de un tóxico. En el laboratorio, la toxicidad se mide bajo condiciones cuidadosamente controladas que permiten obtener resultados precisos, bajo condiciones estandarizadas que aseguran la reproducibilidad en la estimación. Estas mediciones pueden ser extrapoladas para predecir eventos tóxicos en sistemas fluctuantes, de forma similar al realizado con otro tipo de parámetros físico-químicos. Sin embargo, algunas de las preguntas frecuentes cuando se hacen estas predicciones son: ¿cómo se deben utilizar estas mediciones para predecir efectos en el ambiente? y ¿cómo se deben extrapolar los resultados a otras especies?

7.2 Validación a campo

Se han realizado numerosos estudios tendientes a validar los resultados de ensayos de toxicidad con una única especie por comparación con los efectos observados sobre comunidades. Uno de los problemas de este enfoque reside en el riesgo asociado con el uso de conocimiento obtenido de un nivel de integración más bajo, para predecir lo que ocurre en niveles más altos o amplios de integración de los ecosistemas, tal como lo son las poblaciones y comunidades naturales. Sin embargo, existen estudios asociados al vertido de efluentes líquidos, realizados por agencias de protección ambiental (US EPA, *Environment Canada*), que han permitido validar exitosamente, con hasta un 88% de acuerdo, los ensayos de toxicidad y las observaciones en campo (Stephan *et al.*, 1985; Eagleson *et al.*, 1990; Power y McCarty, 1997). A pesar de ello, hay poca información sobre métodos diseñados para la realización de estudios de validación y existen diferentes grados de complejidad en los métodos publicados, entre los cuales se distinguen:

Evaluaciones a campo: métodos en los cuales la correlación se determina entre los resultados de ensayos de laboratorio con especies individuales y mediciones de calidad de comunidades en el cuerpo receptor.

Validación científica a campo: métodos más rigurosos basados en experimentos científicos formales orientados a determinar si el ensayo de toxicidad predice efectivamente el efecto sobre la comunidad.

En este último caso se usan criterios de aceptabilidad fijados previamente y, como resultado del análisis, se obtiene un acuerdo o desacuerdo entre la información de ensayos de laboratorio y la evaluación de campo. Se establece una secuencia de pasos a seguir en este proceso, que incluye: la verificación de los ensayos de toxicidad, la selección de los sitios de estudio, la evaluación de datos antecedentes, la existencia de programas de evaluación preliminar, el diseño detallado del programa de validación y su ejecución.

7.3 Extrapolación de resultados de toxicidad

Frecuentemente se han utilizado extrapolaciones para predecir los umbrales de efectos subletales a partir de información obtenida en limitado número de ensayos de toxicidad. Los métodos de extrapolación utilizados van desde los muy simples hasta los más complejos, dependiendo de los datos existentes y el grado de incertidumbre aceptado en la estimación (OWRC, 1970; Sprague, 1971; CCME, 1991; OECD, 1992; US EPA, 1993). Entre ellos se reconocen las siguientes alternativas:

Factores de aplicación: con valores numéricos aplicados a la CL_{50} para estimar umbrales subletales sobre comunidades acuáticas. Los valores derivados de la experiencia son, para compuestos no persistentes y no acumulables: 1/10 de la $CL_{50-96\text{ h}}$, como máximo, en cualquier lugar y a cualquier tiempo; 1/20 o menor, de la concentración media a 24 h después de la mezcla. Los correspondientes valores para compuestos que se acumulan en el ambiente son 1/20 y 1/100 de la CL_{50} .

Relación aguda a crónica (ACR): es la relación entre la concentración del compuesto tóxico que produce efectos agudos letales respecto a la concentración que produce efectos tóxicos subletales. De manera práctica se define como la relación entre la CL_{50} aguda medida y el umbral subletal medido. Se pueden combinar datos de varios ensayos para obtener un resultado más indicativo. Las ACR son muy utilizadas en la actualidad. Una generalización muy amplia indica que esta relación tiene un valor cercano a diez.

Factores basados en bancos de datos amplios: se han realizado varios intentos para formular factores generales, a partir de distintos conjuntos de datos (de efectos letales y subletales) para establecer umbrales de efectos en el ambiente. Estos niveles son designados como: *concentraciones potencialmente peligrosas*, *niveles de preocupación* (OECD, 1992) y *niveles de protección* (Wagner & Lokke, 1991).

Grupos de trabajo de diversos países elaboraron los siguientes *factores de extrapolación a niveles de preocupación* en el ambiente:

Información disponible	Factor de extrapolación
El menor valor agudo de CL_{50}/CE_{50} para un conjunto de una o dos especies	1 000
El menor valor agudo de $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ para un conjunto que contenga al menos un alga, crustáceo y pez	100
El menor NOEC subletal para un conjunto que comprenda al menos un alga, crustáceo y pez	10

La US EPA (Oficina de Prevención de la Contaminación y Tóxicos) ha elaborado un esquema similar al anterior utilizando *factores de evaluación* para fijar a *niveles de preocupación* en el ambiente para nuevos compuestos:

Información disponible del compuesto o compuesto análogo	Factor evaluación
Limitada (ejemplo un valor agudo de CL_{50}/CE_{50} estimado desde relaciones estructura actividad (SAR))	1 000
Basado en un conjunto de resultados de toxicidad (ejemplo $CL_{50}/CE_{50}/IC_{50}$ para un alga, crustáceo y pez)	100
Umrales de toxicidad subletales	10
Mediciones de campo	1

Extrapolaciones estadísticas: cuando existe mayor información, con un conjunto de datos de toxicidad más completo, la extrapolación puede basarse en una función matemática ajustada a la distribución de la sensibilidad de distintas especies. De aquí surge una concentración del compuesto (aproximadamente el NOEC), que corresponde a cierto porcentaje (usualmente 95%) de la curva ajustada.

7.4 Unidades de toxicidad y emisiones tóxicas

Concepto de unidad de toxicidad: una extrapolación altamente simplificada para pasar datos de toxicidad de laboratorio al ambiente es el cálculo de la unidad de toxicidad (UT, grado de toxicidad de un efluente, o la concentración de una sustancia expresada como una fracción del punto final de toxicidad medido: $1/CL_{50}$). Este tipo de datos resulta más visual y práctico al momento de realizar evaluaciones ambientales, ya que el valor numérico se incrementa con el aumento de la toxicidad de un determinado compuesto o muestra compleja (US EPA, 1993).

La *unidad tóxica letal* (UTL) es la concentración verdadera medida o prevalente de un tóxico o sustancia en particular dividida por el umbral CL_{50} de dicha sustancia (ejemplo: la concentración medida en un cuerpo de agua dividida entre la CL_{50}). Para el caso de un efluente, esta relación se calcula con referencia a la concentración

inicial del efluente (la concentración real equivale al 100% del mismo): $UTL = 100\% / CL_{50}$ (en %).

La *unidad tóxica subletal* (UTSL) se calcula como la concentración verdadera o prevalente de un tóxico o sustancia en particular, dividida entre la CI_{25} o punto final similar que represente un umbral subletal.

El valor de la UTL también indica la dilución necesaria para alcanzar un nivel tóxico. Relaciones menores a 1 indican niveles no letales y mayores a 1 muy letales.

Para el caso del efecto de mezclas de compuestos tóxicos cuyas unidades de toxicidad individuales son conocidas, se pueden estimar las unidades de toxicidad de la mezcla como la suma de las UT de cada compuesto.

Concepto de carga tóxica: la importancia de una descarga sobre el cuerpo receptor está conferida no sólo por sus concentraciones tóxicas, sino por la cantidad total de tóxico en un volumen dado de la descarga. Una comparación adecuada de diferentes volúmenes y toxicidades de efluentes que descargan a un cuerpo receptor se realiza por medio de:

Proporción de emisión de toxicidad (por sus siglas en inglés, *Toxicity Emission Relation*, TER): $UT \times \text{volumen del caudal (m}^3/\text{t)}$. También se puede extender a masa de determinada sustancia o producto.

7.5 Estrategia del 'peso de la evidencia'

Esta estrategia utiliza información proveniente de tres fuentes: ensayos de toxicidad, mediciones químicas y monitoreos biológicos de campo.

Dado que estas tres aproximaciones son compatibles, juntas brindan mayor información sobre la presencia, potencia, naturaleza y efectos de los tóxicos que cualquier aproximación simple. Resumiendo, cada una aporta los siguientes datos:

- Los ensayos de toxicidad indican si un efecto tóxico es causado por una muestra conteniendo un compuesto, un desecho, una muestra ambiental de agua, un sedimento. No indican por sí mismos la identidad del compuesto.
- Los análisis químicos identifican qué es lo que podría estar causando toxicidad y a qué concentración. Pueden indicar la posible existencia de efecto, pero no lo prueban.
- Las evaluaciones biológicas de campo en cuerpos receptores resultan ser la auditoría confirmatoria si se ha producido o no un efecto sobre la comunidad.

7.6 Índices de toxicidad

Dentro del conjunto de índices indicadores de calidad de agua, se identifican aquellos basados en medidas de tipo físico o químico (Prati *et al.*, 1971), como también aquellos que evalúan la toxicidad.

Los *índices de toxicidad* expresan los resultados de varios ensayos de toxicidad como un valor único, que indica el nivel de toxicidad de la muestra. Inicialmente se utilizaron sistemas de categorización de muestras o sitios en función del grado de toxicidad de éstos. Posteriormente se han venido utilizando sistemas de categorización basados en la suma o el promedio de toxicidad de diferentes puntos

finales, incluyendo distintos tipos de organismos de ensayo. No existen en la actualidad reglas fijas para su generación. Es importante destacar que cualquier tipo de índice de toxicidad debe ser cuidadosamente utilizado ya que implica pérdida de información original. Algunos índices combinan o incorporan información de ensayos de toxicidad junto a parámetros físico-químicos (Costan *et al.*, 1993), o resultados de ensayos de toxicidad, bioquímicos y microbiológicos (Dutka *et al.*, 1988). Como ejemplo del primer caso se tiene al índice PEEP, desarrollado en el marco del Plan de Acción del Río San Lorenzo (Canadá) para la categorización de efluentes industriales. El mismo utiliza cuatro ensayos de toxicidad (inhibición de crecimiento de algas, *SOS Chromotest* para evaluación de genotoxicidad, inhibición de la luminiscencia de bacterias y efectos subletales en *Ceriodaphnia*), siendo estos ensayos aplicados sobre muestras previamente aireadas o sin aireación, generando finalmente diez puntos finales, los que combinados permiten calcular el índice propuesto. El mismo se combina con la medida del volumen de descarga del efluente, ponderando de esta forma el potencial de efecto tóxico. El intervalo de valores numéricos del índice varía entre 0 y 10.

La elaboración de índices de toxicidad debe tener en cuenta cuidadosos criterios para dar peso a los componentes. Entre ellos se debe considerar: a) el interés de ponderar con mayor o menor peso a determinado punto final o especie, b) el número de especies que indican respuesta y c) la intensidad de la respuesta (Dutka *et al.*, 1988).

7.7 Relaciones estructura-actividad (SAR)

Esta metodología se basa en que el efecto tóxico de una sustancia depende de su composición elemental y la estructura del compuesto. La toxicidad de los compuestos orgánicos puede ser pronosticada a partir de sus propiedades físico-químicas.

Se realizan evaluaciones cualitativas, basadas en predicciones que comparan compuestos de estructura similar (OECD, 1992), o cuantitativas (*Quality Structure-Activity Relationship*, QSAR) que relacionan datos toxicológicos y propiedades físico-químicas (ejemplo: coeficiente de partición octanol-agua), por medio de ecuaciones de regresión (Nabholz, 1993).

En la actualidad, la mayor parte de los registros de manufactura de nuevos compuestos incorporan información toxicológica generada por medio de relaciones estructura-actividad; permiten establecer prioridades sobre los que están en uso y desarrollar niveles guía preliminares de calidad de agua.

La Comunidad Económica Europea y la US EPA han realizado numerosos estudios para correlacionar datos de toxicidad de compuestos orgánicos provenientes de QSAR con información experimental de ensayos de toxicidad, encontrando buena relación entre los mismos (US EPA, 1993; EEC, 1993).

7.8 Datos problemáticos

La variabilidad inherente a los sistemas biológicos hace que los resultados provenientes de las herramientas bioanalíticas de diagnóstico lleven también asociados variaciones en los mismos (US EPA, 1993). Un análisis estadístico de los resultados de las respuestas de los bioensayos incluidos en este manual utilizando muestras ciegas tóxicas y no tóxicas, en el marco del ejercicio de intercalibración

internacional *WaterTox* (Forget, 2000; Ronco *et al.*, 2002), permitió identificar posibles problemas asociados a cada ensayo y tipo de respuesta. Se requiere de cuidadosos procedimientos de control y aseguramiento de la calidad de las mediciones. Sin embargo, existen circunstancias en las cuales es inevitable la aparición de datos problemáticos para su interpretación. Algunas de las causas determinantes son la estimulación de señales a bajas concentraciones, la distribución inusual de datos provenientes de la relación entre la concentración-efecto (bajas o muy abruptas pendientes, relaciones inversas a las esperadas), alta variabilidad, respuesta inesperada para el intervalo de toxicidad ensayado, información faltante y errores del operador.

Existen recomendaciones generales para el manejo de este tipo de problemas, sobre la base de distintas alternativas. Debe asegurarse la existencia de un conjunto de datos completos, verificar la existencia de anomalías en los datos que relacionan la medida del efecto con la concentración, verificar posibles variaciones en los parámetros físico-químicos medidos (revisar notas en planillas de ensayo, mediciones químicas, etc.), revisar aspectos relacionados con las condiciones de cría o mantenimiento de los organismos, evaluar la pertinencia de los resultados obtenidos para el tipo de sustancia o muestra y las condiciones de ensayo empleadas. Una vez realizadas estas etapas, si no se encuentran razones que justifiquen las anomalías encontradas, los datos deben ser descartados.

7.9 Evaluación de la toxicidad de efluentes

Una de las aplicaciones más extendidas del monitoreo de efectos biológicos con ensayos de toxicidad, ha sido la evaluación de descargas líquidas o efluentes (aguas servidas de origen doméstico, municipal o industrial descargadas de manera puntual sobre cuerpos receptores), en el marco de programas de control ambiental. Los métodos utilizados se han extendido y adaptado para cualquier tipo de fluidos (agua de poro o extractos de sedimentos y suelos u otros materiales sólidos).

El monitoreo de efluentes se ha orientado hacia la evaluación del cumplimiento de las reglamentaciones de descarga, para la predicción del impacto de descargas sobre sitios específicos del cuerpo receptor, para evaluar el efecto combinado de mezclas complejas de compuestos tóxicos y mejoras en procesos tecnológicos de control de la contaminación.

La US EPA (US EPA, 1993; 1994) ha desarrollado procedimientos específicos y detallados para limitar las descargas en función de objetivos de calidad aceptables para el cuerpo receptor. Ello, basado en ensayos de toxicidad que evalúan efectos letales y subletales de sustancias específicas. Este organismo sugiere un criterio de aceptabilidad de descargas en el que el efluente no puede superar las 0,3 UTL durante un día, ni con una frecuencia mayor a una vez cada tres años. Otro de los criterios sugeridos son las UTSL, las cuales no deben exceder de 1,0 en cuatro días, dentro de un periodo de tres años.

Por otra parte, este organismo ha elaborado ecuaciones para la estimación de concentraciones permisibles de sustancias tóxicas, teniendo en cuenta balances de masas y la dinámica del cuerpo receptor. Existen criterios regionales para definir zonas de mezcla del efluente en el cuerpo receptor basadas en información toxicológica proveniente de ensayos de toxicidad. De esta manera se logra

implementar el monitoreo del efluente en el sitio de descarga, y proyectar su efecto sobre el cuerpo receptor.

7.10 Toxicidad de aguas superficiales, subterráneas y sedimentos

Este punto tiende a analizar antecedentes de experiencias previas y recomendaciones para el monitoreo ambiental de efectos tóxicos en aguas de distinto origen y agua de poro de sedimentos. El presente manual de procedimientos, precisamente orienta hacia el uso de procedimientos bioanalíticos de diagnóstico de calidad de aguas, ya sean fuentes de abastecimiento (aguas dulces superficiales, subterráneas, de lluvia) para consumo humano, o con tratamiento, provenientes de la propia red de distribución. Ciertos contaminantes ambientales, en su proceso de compartimentación se asocian al material particulado en los sedimentos. Se producen equilibrios en la interfase agua-sedimentos, en la cual importantes procesos de sorción y desorción determinan la biodisponibilidad de sustancias tóxicas. El estudio de los efectos biológicos de los contaminantes en la fracción soluble (agua intersticial o agua de poro), o los asociados a las partículas por procesos de sorción, es un capítulo muy importante de las evaluaciones ecotoxicológicas. Existen diversas estrategias para su evaluación, por lo que se recomienda referirse a manuales específicos que atienden estas metodologías y estrategias (ASTM, 1994; APHA, 1998; *Environment Canada*, 1999).

Toxicidad de aguas superficiales

La evaluación ecotoxicológica de calidad de agua con ensayos de toxicidad de laboratorio o experiencias de campo es un diagnóstico complementario a investigaciones en curso, en las que se presentan evidencias de posible contaminación. Constituyen una herramienta para el diagnóstico de efectos, complementario al estudio de las causas, determinado por el análisis químico.

Las evaluaciones de toxicidad de aguas superficiales, por lo general se realizan en sitios en los que se sospecha la existencia de contaminación. No es de esperar encontrar importantes efectos letales sobre los organismos, o sólo de manera transitoria, excepto en el caso de cuerpos de agua altamente contaminados.

Los ensayos de toxicidad suelen ser utilizados en combinación con otras técnicas; algunas de estas combinaciones se resumen a continuación:

- Relacionar resultados provenientes de ensayos de toxicidad de laboratorio con aguas superficiales, o ensayos *in situ*, para estimar concentraciones de vertidos de efluentes o compuestos químicos específicos a lo largo de un curso. Resulta ser más directo y convincente que los métodos predictivos (ver punto 7.9).
- Verificar el comportamiento de un contaminante o mezcla en el cuerpo de agua teniendo en cuenta posibles procesos de detoxificación, como por ejemplo: formación de complejos con materia orgánica disuelta o particulada, influencia de la dureza del agua, contenido de oxígeno disuelto, pH, temperatura, potencial redox. Debe considerarse que existen publicaciones orientadas al estudio de estos factores, a través de relaciones basadas en cálculos teóricos o empíricos (ejemplo: toxicidad de metales con el cambio de dureza).
- Relacionar la toxicidad del agua del cuerpo receptor y los efectos observados en comunidades características del lugar.

Estas evaluaciones tienen en cuenta ensayos de laboratorio o *in situ* (aquellos que recurren a organismos, vertebrados o invertebrados), colocados en jaulas o limno-corrales. La discusión de estos últimos está fuera del alcance del presente manual.

Una publicación (Díaz-Báez *et al.*, 2002) realizada en el marco de la aplicación de la batería de bioensayos aquí discutido, dentro de la red *WaterTox*, indica buenos resultados (capacidad de detección de toxicidad) para el diagnóstico de aguas superficiales, subterráneas, aguas de descarga y agua de red con tratamiento. La calidad del diagnóstico mejora cuando se trabaja con varios ensayos sobre una misma muestra, aumentando la confiabilidad del diagnóstico (para el nivel de detección de los ensayos considerados) por la posible aparición de falsos positivos o negativos (Ronco *et al.*, 2002).

REFERENCIAS

- APHA, 1998, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed., American Public Health Association, Washington, D.C.
- ASTM, 1994, *Standard Guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Freshwater Invertebrates*, American Society for Testing and Materials, ASTM E1383-94, Vol. 11.04.
- CCME, 1991, "A Protocol for the Derivation of Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, in: *Canadian Water Quality Guidelines*, Canadian Council of Resource and Environmental Ministers, Appendix IX, Reprinted in CCME, 1998.
- Costan, G., N. Bermingham, C. Blaise & J.F. Ferard, 1993; "Potencial Ecotoxic Effects Probe (PEEP): a Novel Index to Assess and Compare the Toxic Potencial of Industrial Effluents, *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 8:115-140.
- Díaz-Báez, M.C., W.A. Sánchez, B.J. Dutka, A. Ronco, G. Castillo, Y. Pica-Granados, L.E. Castillo, J. Ridal, V. Arkhipchuk & R.C. Srivastava, 2002, "Overview of Results from the "WaterTox Intercalibration and Environmental Testing Phase II Program: Part 2, Ecotoxicological Evaluation of Drinking Water Supplies", *Environmental Toxicology*, 17(3), 241-249.
- Dutka, B.J., K. Jones, K.K. Kwan, H. Bailey & R. McInnis, 1988, "Use of Microbial and Toxicant Screening Tests for Priority Site Selection of Degraded Areas in Water Bodies", *Water Res.*, 22:503-510.
- Eagleson, K.W., D.L. Lenat, L.W. Ausley & F.B. Winborne, 1990, "Comparison of Measured Instream Biological Responses with Responses Predicted using the *Ceriodaphnia dubia* Chronic Toxicity Test", *Environ. Toxicol. Chem.*, 9:1019-1028.
- Environment Canada, 1999, *Guidance Document on Application and Interpretation of Single-species Tests in Environmental Toxicology*, Ottawa: Method Development and Application Section, Environmental Technology Centre, EPS 1/RM/34.
- Forget, G., Gagnon, P., Sánchez, W.A. & Dutka, B.J., 2000, "Overview of Methods and Results of the Eight Country International Research Development Centre (IDRC) *WaterTox* Project", *Environm. Toxicol.* 15:264-276.
- Nabholz, J.V., R.G. Clements, M.G. Zeeman, K.C. Osborn & R. Wedge, 1993, "Validation of Structure Activity Relationships Used by the US EPA's Office of Pollution Prevention and Toxics for the Environmental Hazard Assessment of Industrial Chemicals", pp. 571-590, in: *Environmental Toxicology and Risk Assessment*, 2nd Vol.; J.W. Gorsuch, F.J. Dwyer, C.G. Ingersoll, and T.W. LaPoint (eds.), Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, Pa., ASTM STP 1216.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 1992, *Report of the OECD Workshop on the Extrapolation of Laboratory Aquatic Toxicity Data to the Real Environment*, OECD, Paris, OECD Environment Monographs, Num. 59, OCDE/GD (92)169, 43 pp.
- OWRC, 1970, *Guidelines and Criteria for Water Quality Management in Ontario*, Ontario Water Resources Commission, OWRC, Toronto.
- Power, M. & L.S. McCarty, 1997, "Fallacies in Ecological Risk Assessment Practices", *Environ. Sci. Technol./News* 331:370A-375A.

- Prati, L., R. Pavanello & F. Pesarin, 1971, Assessment of Surface Water Quality by a Single Index of Pollution, "*Water Res.*", 5:741-751.
- Ronco, A., P. Gagnon, M.C. Díaz-Báez, V. Arkhipchuck, G. Castillo, L.E. Castillo, B.J. Dutka, Y. Pica-Granados, J. Ridal, R.C. Srivastava & A. Sánchez, 2002, "Overview of Results from the WaterTox Intercalibration and Environmental Testing Phase II Program: Part 1, Statistical Analysis of Blind Sample Testing", "*Environmental Toxicology*", 17(3), 232-240.
- Sprague, J.B., 1971, "Measurement of Pollutant Toxicity to Fish. Sublethal Effects and "Safe" Concentrations", "*Water Research*", 5:245-266.
- Stephan, C.E., D.I. Mount, D.J. Hanson, J.H. Gentile, G.A. Chapman & W.A. Brungs, 1985, *Guidelines for Deriving Numeric National Water Quality Criteria for the Protection of Aquatic Organisms and their Uses*, US EPA, Duluth, Minn., Natl. Tech. Inform. Service, PB85-227049.
- US EPA & EEC (United States Environmental Protection Agency and European Economic Community), 1993,
- US EPA/EEC *Joint Project on the Evaluation of (Quantitative) Structure-activity Relationships* (Draft Final Report). US EPA, Washington, D.C., 55 pp. +app.
- US Environmental Protection Agency (EPA), 1993, *Technical Support Document for Water Quality-based Toxics Control*, EPA/505/2-90-001, US EPA, Office of Water, Washington, D.C.
- US Environmental Protection Agency (EPA), 1993, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*, 4th ed., Washington, D.C., Report EPA 600/4-90/027F.
- US Environmental Protection Agency (EPA), 1994, *Short Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms*, 2nd ed., Cincinnati, Report EPA 600/4-91/003.
- Wagner, C. & H. Lokke, 1991, *Estimation of Ecotoxicological Protection Levels from NOEC Toxicity Data*, *Water Res.*, 25:1237-1242.

This page intentionally left blank

8 TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA

8.1 *Experiencias de la red WaterTox*

Gilles Forget y Andrés Sánchez

8.1.1 Introducción

La Década Internacional de las Naciones Unidas sobre Agua y Saneamiento en los años ochenta, se caracterizó por esfuerzos extensos y concertados para proveer agua sana y potable a comunidades pobres de países en desarrollo. Un gran énfasis en programas nacionales e internacionales de ese entonces se dirigió a mejorar la calidad microbiológica del agua de consumo, mediante la provisión de tecnologías apropiadas y educación en higiene personal y comunitaria. Como parte de estas iniciativas globales, se hicieron también esfuerzos para proporcionar a los gobiernos recursos y medios necesarios para impulsar un mejor control de calidad de aguas. Sin embargo en esa época, las pruebas de toxicidad para detectar y evaluar la contaminación química, no formaban parte de los programas y temas por abordar.

El fortalecimiento verdadero de poblaciones marginadas (tanto en el caso de acceso a agua limpia y sana, como con cualquier otra necesidad humana básica) debe ir acompañado de una participación comunitaria en la gestión de recursos conexos. El *International Development Research Centre* (IDRC) (Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo), apoyó activamente investigación aplicada sobre evaluación y control de calidad de aguas durante la Década del Agua y Saneamiento, así como en años posteriores. Puso un énfasis particular en la adaptación de métodos simples de monitoreo de calidad de agua a nivel comunitario, creyendo que este acercamiento participativo tenía mejores posibilidades de ser sustentable a nivel local dentro del marco de descentralización que enfrentaban muchos países en desarrollo, impuesto por políticas de ajuste estructural promovidas por instituciones financieras internacionales. A principios de los años ochenta, el IDRC lanzó una red internacional de investigación de calidad de agua conformada por científicos en instituciones de países en desarrollo. Conjuntamente con instituciones canadienses, la red comenzó su trabajo de revisión y refinamiento de protocolos de ensayo con varias pruebas de bajo costo para el control microbiológico de calidad de aguas. La investigación incluyó trabajos de campo con participación comunitaria, enfocados en recaudar información sobre retos y logros en la transferencia de pruebas de calidad de agua y su uso por miembros de las comunidades (Dutka, 1989; Payment y Sánchez, 1989; Dutka y El Shaarawi, 1990; Castillo, *et al.*, 1995). Un aspecto clave en el mantenimiento sostenible de programas de control de agua fue la participación de la comunidad en dichos

programas y la capacidad de acción oportuna guiada por los resultados de los muestreos (Aguilar y Rosales, 1998; Sánchez y Dutka, 1998; INN, 2002).

Durante este periodo se detectó también un interés creciente sobre la contaminación de fuentes de agua por productos químicos provenientes de fuentes agrícolas, industriales y domésticas. Dichas preocupaciones eran expuestas de manera regular por miembros de las comunidades que participaban en proyectos financiados por el IDRC en países de Sudamérica. Como observación interesante, se destacó que en muchas comunidades la gente parecía temer más a este tipo de contaminación que a la contaminación fecal del agua, siendo esta última el foco tradicional de intervenciones en saneamiento y abastecimiento de agua. Quizás el temor a amenazas “nuevas e invisibles” externas a la experiencia diaria de la gente, en combinación con el éxito de campañas de información por defensores del medio ambiente, forjaron esta nueva conciencia y preocupación a nivel local. Mientras que métodos tales como el ensayo de tira de papel indicador de sulfuro de hidrógeno (H_2S) y/o ensayo de presencia-ausencia (P/A) habían demostrado su valor y relevancia en programas locales de control de calidad de agua, éstos sólo detectan la contaminación microbiana. En ese tiempo no existían técnicas similares, simples y de bajo costo, para evaluar la contaminación química. Fue así como el IDRC decidió fomentar el desarrollo de un conjunto o “batería” de pruebas de calidad de agua para evaluar la contaminación química que fuese comparable en simplicidad y accesibilidad financiera a pruebas de contaminación fecal. Las secciones siguientes intentarán describir el proceso de inicio, ejecución y conclusión de este esfuerzo, así como las lecciones aprendidas a lo largo del camino.

8.1.2 El comienzo

En junio 1996, el IDRC convocó un panel internacional de expertos para examinar ensayos de toxicidad existentes que pudieran usarse o ser adaptados para evaluaciones de toxicidad de aguas. El objetivo principal era desarrollar y validar una batería de ensayos de toxicidad que fuese simple, de bajo costo y útil para el análisis de muestras ambientales y de aguas de consumo. Un requisito esencial de la batería era su adaptabilidad para uso en países en desarrollo. La idea inicial fue lograr una herramienta compuesta por un conjunto mínimo de pruebas que pudiese servir de manera sustentable a nivel comunitario, y que fuera suficientemente polivalente para detectar un espectro amplio de contaminantes químicos potencialmente nocivos o peligrosos. El panel fue constituido por científicos provenientes de Argentina, Canadá, Chile, Colombia, India, Suecia y Turquía. Estos expertos revisaron el conocimiento existente a la fecha sobre ensayos de toxicidad y sus límites correspondientes en cuanto a la identificación y medición de grados de toxicidad, así como costo y facilidad de uso. Los miembros de este primer panel definieron las características deseables de esta herramienta: simplicidad, duración corta (menos de cinco días), bajo costo (menos de \$5 US por muestra y ensayo), materiales de fácil abastecimiento disponibles localmente, y con mínima dependencia en equipo costoso y/o complicado. Además, dado que un mandato del panel fue proponer una batería de ensayos, se agregaron dos características más: la no redundancia entre bioensayos y la inclusión de especies de diferentes niveles tróficos, en particular organismos de agua dulce. El resultado de esta reunión fue una

propuesta para examinar siete ensayos complementarios de toxicidad para ser incluidos en una batería de pruebas apropiadas para países en desarrollo.

El primer paso en el examen de las siete pruebas fue la organización de un taller en la ciudad de Cornwall, Ontario (Canadá) en enero de 1997, organizado por el IDRC en colaboración con el *Saint-Lawrence River Institute of Environmental Sciences* (SLRIES) que actuó como anfitrión. Científicos de Argentina, Canadá, Chile, Colombia, Costa Rica, India, México, Suecia, Turquía y Ucrania (muchos de ellos habían sido miembros del panel original de especialistas) evaluaron los siete ensayos seleccionados durante un periodo de seis días, bajo la dirección de colegas expertos en el uso de cada protocolo. Seis de los ensayos (tabla 8.1.1) fueron seleccionados como candidatos potenciales, para ser incluidos en la siguiente fase experimental dentro de un ejercicio de estandarización y calibración. Dicha selección se basó en una evaluación realista de los criterios originales: simplicidad (incluyendo una curva de aprendizaje rápida para usuarios), duración corta de la prueba, bajo costo; así como también la reproducibilidad de los ensayos y la posibilidad de normalizar los protocolos.

Tabla 8.1.1. Ensayos de toxicidad seleccionados por la red WaterTox.

	Bioensayo	Referencia
1	Semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L), inhibición en la elongación de la radícula e hipocotilo, inhibición en la germinación (120 h)	Dutka, 1989
2	Bulbos de cebolla (<i>Allium cepa</i> L), inhibición del crecimiento de raíces (72 h)	Fiskesjö, 1993
3	<i>Daphnia magna</i> , porcentaje de mortalidad (48 h)	Dutka, 1989
4	<i>Hydra attenuata</i> , cambios morfológicos-efectos letales y subletales (96 h)	Trottier <i>et al.</i> , 1997
5	Nematodo (<i>Panagrellus redivivus</i> bq1), prueba de 96 h de maduración	Samoiloff, 1990
6	Versión MutachromoPlate© de la prueba Ames, con TA 100 <i>Salmonella typhimurium</i> sin activación S-9 (96 h, 96 micropozos)	Rao y Lifshitz, 1995

Con el fin de verificar el desempeño de los ensayos seleccionados bajo condiciones de campo y como parte de una batería integrada de pruebas, se consideró importante examinarlos bajo condiciones controladas en diferentes localidades, ambientes, distintos climas y capacidades de laboratorio disímiles. El IDRC y el *Nacional Water Research Institute* (NWRI) del gobierno canadiense invitaron a instituciones de investigación a presentar solicitudes de ingreso a una red internacional (con énfasis en países en desarrollo), con el objeto de conducir un ejercicio de estandarización e intercalibración antes de efectuar programas piloto de diseminación. Se alentó a los participantes originales del taller de Cornwall a conseguir el consentimiento oficial de sus instituciones para formar parte de la red.

8.1.3 Creación de la red WaterTox

En total, el IDRC y el NWRI invitaron a siete instituciones a unirse a la red, siendo éstas: el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente, Universidad Nacional de La Plata, Argentina; el *Saint-Lawrence River Institute of Environmental Sciences* (SLRIES) en Cornwall, Canadá; el Departamento de Ingeniería Civil de la Universidad de

Chile en Santiago, Chile; el Departamento de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá, Colombia; la Institución Centroamericana para Estudios sobre Sustancias Tóxicas de la Universidad Nacional en Heredia, Costa Rica; el *All India Institute of Hygiene and Public Health* en Calcuta, India; el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua en Cuernavaca, México; y el *Institute of Colloid Chemistry and Water Chemistry* de la Academia Ucraniana de Ciencias en Kiev, Ucrania. Otras instituciones y personas acordaron participar en actividades de la red como asesores, consultores y coorganizadores, incluyendo: el *St Lawrence Centre* del Ministerio del Ambiente del Canadá en Montreal y la doctora G. Fiskesjö de Suecia, en su calidad de experta.

Tabla 8.1.2. Criterios usados por IDRC y NWRI en la selección de instituciones participantes de la red WaterTox.

	Criterios de selección	Medios de confirmación
1	Capacidad del laboratorio y científicos para establecer y mantener una batería de ensayos de toxicidad, incluyendo capacidad de cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba	Visitas de campo
2	Experiencia previa del laboratorio con ensayos de toxicidad	Publicaciones en revistas científicas y/o visitas de campo
3	Apoyo institucional a la participación en la red	Cartas oficiales de apoyo y/o visitas de campo
4	Acceso fácil al correo electrónico para permitir el intercambio de información y entrega de datos a una base de datos centralizada	Verificación por <i>e-mail</i>
5	Compromiso por el equipo de investigación en seguir protocolos predeterminados de pruebas, además de acceder a operar con un presupuesto ajustado	Acuerdo institucional firmado

Aun cuando la selección de instituciones participantes se haya efectuado con base en un conjunto de criterios tendientes a asegurar el éxito de la iniciativa (tabla 8.1.2), las instituciones candidatas fueron en su origen “autoseleccionadas”. Por lo menos una de las dos agencias organizadoras (IDRC y NWRI) tenían una historia de colaboración previa con científicos de estas instituciones, o los científicos habían tenido conocimiento del programa mediante colegas y expresado su interés en participar. Otros habían participado en el panel original organizado por IDRC, o en el taller de seis días en Cornwall, y deseaban establecer su asociación con la red *WaterTox*. Sin embargo, cada institución seleccionada tuvo que presentar una propuesta escrita y acordar normalizar su protocolo con los de otras instituciones participantes. Este proceso de autoselección original tuvo repercusiones prácticas en las actividades de la red:

- Algunos investigadores eran conocidos de los organizadores, mientras que otros no lo eran.
- Algunos de los participantes se conocían entre ellos y tenían una historia de colaboraciones previas, mientras que otros eran desconocidos.
- Un grupo predominante de participantes de la red provenía de una misma región geográfica y compartía una lengua materna común (lenguas representadas en la red incluyeron inglés, francés, español, hindú, ucraniano y ruso); además de

un mismo género, lo que por un lado parece haber facilitado una cooperación más cercana entre estos miembros y, por otro, los alejó un poco del resto de participantes que no compartían todas estas características.

En un inicio, varios de los científicos de la red demostraron reticencia en aceptar estrictamente los protocolos presentados por las dos agencias organizadoras, las cuales creyeron que su insistencia en procedimientos homogéneos de alguna manera era vista por los participantes como una interferencia a la libertad académica. En retrospectiva, parte de las dificultades encontradas fueron por malentendidos probablemente debidos a las distintas procedencias culturales de los participantes y sus distintos idiomas de trabajo —algunos jefes de equipo no dominaban el inglés, lengua que se había elegido como la *lingua franca* de la red—, y esto condujo de vez en cuando a errores y malinterpretación de instrucciones. Sin embargo, con el tiempo, la integración de la red se logró gracias, en gran parte, al esfuerzo y deseo de todos los participantes en “hacer que ésta funcionara”.

En septiembre 30 de 1997, el IDRC patrocinó una reunión de tres días en Montevideo, Uruguay, para dar inicio al proyecto. Todos los participantes de la red asistieron. Durante la reunión se definieron y aceptaron todos los protocolos finales de prueba, al igual que la logística de operaciones de la red. La primera fase de investigación consistió en la compra del equipamiento necesario por las instituciones participantes, y el cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba para los ensayos de toxicidad seleccionados (tabla 8.1.1).

En esta primera fase se llevó a cabo un ejercicio de intercalibración, que consistió en enviar a cada laboratorio de la red seis conjuntos de cuatro muestras ciegas cada uno (para un total de 24 muestras) en el transcurso de un año. La composición de las muestras ciegas se presenta en la tabla 8.1.3. El protocolo establecido para este ejercicio requería un periodo de dos semanas para el análisis de las muestras y retorno de resultados (por correo electrónico). Al concluir los 12 meses, se planificó un cuarto taller para permitir a los participantes de la red analizar conjuntamente los resultados y sacar conclusiones sobre las pruebas individuales de ensayo, así como su uso en conjunto (como batería de pruebas de toxicidad).

Tabla 8.1.3. Tóxicos utilizados en la evaluación de muestras ciegas - fase 1.

Tóxicos			
1	2,4-dinitrofenol	12	4-nitroquinolina-N-óxido
2	Cu(II), sulfato	14	Hg(II), cloruro
3	Cd(II), cloruro	15	Nonilfenol
6	Cromo total (a partir de K ₂ CrO ₇)	16	Pentaclorófenol
7	Anilina	18	Aldrin
8	Zn(II), sulfato	19	As(V)
10	Metaloclor	20	p,p'-DDT
11	Cu(II), sulfato	21	4-nitroquinolina-N-óxido
		24	Lindano
Mezclas			
4,5,9,13			
17,22	Cd(II) (cloruro) y metaloclor	23	Pentaclorófenol y As(V)

Fue así como representantes de todos los laboratorios miembros de la red tuvieron la oportunidad de reunirse durante el IX Simposio Internacional de Evaluación de Toxicidad (ISTA 9) en Pretoria, Sudáfrica, del 26 de septiembre al 1° de octubre de 1999. En una reunión de trabajo paralela al simposio los miembros de la red se dieron cuenta, por primera vez, del alto grado de influencia que ejercían varios problemas en la variabilidad de resultados entre laboratorios (problemas que se describen y analizan en secciones siguientes). Se decidió añadir, por consiguiente, un conjunto más de muestras ciegas al total original de seis, pero en este caso, se pidió a todos los laboratorios preparar una curva dosis-respuesta para cada una de las seis muestras ciegas. El propósito de este conjunto adicional de muestras fue obtener una medida más precisa de variabilidad intra e interlaboratorio. Este último conjunto de muestras ciegas estuvo compuesto por tres juegos de duplicados: cloruro de mercurio, metalocloro y 4-nitroquinolina- N-óxido.

En paralelo al ejercicio de intercalibración se realizó un estudio experimental sobre alternativas para la concentración de muestras. Su propósito fue explorar la posibilidad de usar la batería de ensayos para evaluar muestras de agua de consumo humano. Lamentablemente, aunque dicho trabajo fue de alta calidad, los resultados obtenidos fueron desalentadores: la concentración de muestras ciegas y ambientales mostraron un nivel elevado de lecturas positivas falsas con varios de los ensayos de toxicidad. Los resultados de esta actividad se publicaron por separado por Díaz-Báez *et al*, 2000.

Otro estudio paralelo efectuado por Blaise *et al*. (2000) tuvo como fin normalizar un ensayo de 72 horas de exposición con el alga *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*) como organismo de prueba. El objetivo de este estudio fue adaptar y validar el protocolo de prueba para uso en laboratorios dotados de un mínimo de equipamiento para eventualmente incluir el bioensayo en la batería de pruebas. De hecho, el protocolo de la prueba se normalizó a tiempo para ser incluida en la segunda fase de investigación de la red *WaterTox*, siendo utilizada exitosamente por cuatro de los ocho laboratorios participantes.

Subsiguiente al ejercicio de intercalibración se planificó la segunda fase de estudio, también con un año de duración, para validar la batería seleccionada en cada país participante con series de muestras ambientales locales. Esta segunda fase también incluyó la evaluación de una serie de seis muestras ciegas enviadas a lo largo del año. La serie incluyó un metal (Hg[II], cloruro, enviado en solo una ocasión), una sustancia orgánica (4-Nitroquinolina-N-óxido enviado en dos ocasiones) y agua blanda (enviada en tres ocasiones) para evaluar el potencial de lecturas positivas falsas con la batería.

8.1.4 Retos y problemas en la coordinación de una red internacional

Las muestras fueron preparadas por el Grupo de Estadística y Normas Ambientales (*Environmental Standards and Statistics Group*) del NWRI. Los frascos con los químicos de prueba (concentrados puros) se enviaron a los laboratorios por valija diplomática mediante un arreglo previo con el Departamento Canadiense de Asuntos Extranjeros y Comercio Internacional (DFAIT, por sus siglas en inglés), para minimizar demoras.

Envío de muestras ciegas. La entrega de los paquetes con las muestras ciegas a través de embajadas o consulados canadienses en los países participantes resultó ser

más problemática de lo esperado. En la mayoría de los casos, las sedes diplomáticas entregaron las muestras oportunamente, pero en varias ocasiones se produjeron importantes demoras. No fue posible descubrir una causa principal que explicase las demoras, habiendo siempre razones distintas, pero estos problemas de entrega tuvieron un importante impacto a corto plazo en las actividades de la red, incluyendo retrasos en la entrega de resultados por los laboratorios afectados. Sin embargo, este método de distribución de muestras probó ser en general satisfactorio y consideramos que contribuyó al éxito del proyecto *WaterTox*.

Instrucciones mal entendidas. Los paquetes con las muestras ciegas incluían instrucciones sobre el tipo de diluciones necesarias para obtener las soluciones finales de prueba. La selección de químicos y concentraciones de prueba fue realizada por NWRI en consulta con IDRC, guiados por una encuesta informal de los participantes de la red sobre sustancias de pertinencia ambiental en sus países o región (tabla 8.1.3). Cada paquete de muestras contenía también una muestra negativa (sin tóxico) y una muestra positiva conocida, para servir como referencia interna. Además, una muestra ciega de cada uno de los seis envíos era un duplicado de una de las muestras del envío anterior, esto con el propósito de poder ser usada como control interno y medir la variabilidad intralaboratorio. Los ensayos de toxicidad debían ser efectuados con dos o tres concentraciones diferentes de las soluciones finales de prueba, como se indicaba en las instrucciones que acompañaban cada paquete. El código de las muestras ciegas no se dio a conocer hasta el final de las seis rondas, en una reunión con todos los participantes en Ottawa, Canadá, en noviembre de 1998.

Las instrucciones para el manejo de muestras probaron ser susceptibles a malentendidos. A principios del proyecto, las muestras fueron diluidas de manera distinta por diferentes laboratorios, aunque creían seguir las instrucciones recibidas. Un examen de esta situación reveló que el método usado para describir diluciones por el NWRI no era compartido por los laboratorios, siendo mal interpretado por varios de ellos. Esto pudo deberse a diferencias culturales científicas y modismos correspondientes (ingenieros *versus* microbiólogos o químicos, por ejemplo), o a las diferencias lingüísticas entre los participantes. En todo caso, este conjunto de malentendidos condujo a demoras y ajustes necesarios en actividades de la red. En retrospectiva, el IDRC y NWRI debieron asegurarse que “el vocabulario” y “la estenografía” utilizados en las instrucciones y protocolos de ensayo fuesen claramente definidos como parte de la finalización y aprobación de protocolos en el taller de Montevideo, Uruguay, antes de iniciar el ejercicio de intercalibración.

Transferencia electrónica de datos. Se acordó en un principio que cada laboratorio participante entregaría sus resultados electrónicamente vía internet a ambas organizaciones: IDRC y NWRI. Para ello, se entregó a cada laboratorio una plantilla electrónica de hoja de datos en formato *QuattroPro*®, preparada específicamente para recibir los resultados de cada laboratorio y facilitar su integración, comparación y manejo estadístico (análisis intra e interlaboratorio de resultados de las muestras ciegas). Sin embargo, la transferencia de datos por medios electrónicos resultó ser otra fuente inesperada de problemas. Mientras que el acceso al *e-mail* de cada laboratorio se había comprobado con anterioridad, la capacidad de uso en forma rutinaria fue una cosa totalmente distinta. En algunos de los laboratorios, el acceso a internet por los científicos miembros de la red resultó ser bastante limitado y/o

controlado. Por ejemplo, en un par de casos, el acceso a computadoras (y la capacidad para enviar *e-mails*) dependía de un centro de cómputo, bajo el control de personal cuyas prioridades no eran necesariamente las mismas del proyecto *WaterTox*. En otros casos, los científicos participantes tenían sólo un conocimiento básico en el uso de *software* y programas de cómputo utilizados (*PKZIP*® y *QuattroPro*®). Esto condujo a retrasos en la instalación del *software* y del aprendizaje de los científicos en su uso. En dos situaciones extremas, resultados de las primeras rondas fueron entregados en hojas de papel, con una petición a los coordinadores del IDRC de pasar los resultados a la base de datos electrónica, lo que significó un gran consumo de tiempo dada la cantidad de datos. Se puede decir, sin riesgo a equivocarse, que las dificultades en la transferencia de datos de los laboratorios a las agencias coordinadoras ocasionó demoras tempranas en el proyecto. Sin embargo, las comunicaciones mediante este medio electrónico mejoraron notablemente en el transcurso del programa.

Transferencia y desarrollo de conocimientos. Los ocho laboratorios que constituyeron la red tenían diferentes niveles de experiencia en el uso de ensayos de toxicidad. Algunos de ellos no conocían uno o varios de los ensayos que fueron seleccionados específicamente para el proyecto *WaterTox*. Cuatro de ellos contaban con experiencia limitada en evaluaciones de toxicidad con muestras de agua. En la mayoría de los casos, los laboratorios estaban situados en instituciones académicas y los ensayos fueron efectuados por estudiantes de posgrado como parte de sus tesis de maestría o doctorado. Durante la primera fase, varios laboratorios no efectuaron de manera rutinaria todos los ensayos de toxicidad, limitándose principalmente a evaluaciones de las muestras ciegas dado la escasez de recursos y el modesto financiamiento provisto para este ejercicio de intercalibración. Tal situación ofreció en tres de los ocho laboratorios un mínimo de oportunidades al personal técnico para perfeccionar sus técnicas y habilidades en el uso de los bioensayos.

En un principio, la necesidad de mantener un programa de control de calidad para cada tipo de prueba tampoco fue sistemáticamente valorada por todos los laboratorios, especialmente aquellos que eran relativamente nuevos en el campo de estudios ecotoxicológicos. Por todas estas razones se requirió más tiempo de lo previsto en establecer programas de ensayos adecuados con los seis tipos de pruebas y en tres de los ocho laboratorios; esta falta de experiencia previa influyó en su capacidad para entregar los resultados de las muestras ciegas de manera oportuna durante el proyecto.

Imprevistos. Otros problemas encontrados fueron totalmente inesperados. Un buen ejemplo lo da la prueba de bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.). Esta prueba fue originalmente desarrollada en Suecia, un país templado con una temporada agrícola corta. Las cebollas se cultivan, como en la mayoría de los países del hemisferio norte, usando bulbos que se cosechan en otoño, se guardan durante el invierno y se plantan de nuevo en primavera. Los bulbos de cebolla en estos países están disponibles durante la mayoría del año. Sin embargo, diferencias en prácticas agrícolas en América Latina (donde se situaban cinco de las ocho de instituciones), dificultó el abastecimiento de bulbos. En estos países de Sudamérica, debido a una temporada agrícola más larga, las cebollas son sembradas directamente en la parcela solamente una vez y los bulbos en general no son cosechados. Las agencias

coordinadores tuvieron entonces que encontrar una fuente de abastecimiento foránea para estos laboratorios, lo cual no fue fácil ya que la importación de estos productos agrícolas está reglamentada y requiere trámites burocráticos que en varias ocasiones resultaron bastante retrasados y pesados. Por otro lado, el abasto de bulbos de cebolla en la India, Canadá y Ucrania no representó ningún problema, aunque el uso de cebollas locales probablemente introdujo algún grado de variabilidad en el ejercicio de intercalibración de la red. Una razón más que explica la diferencia en prácticas agrícolas entre regiones se dejó conocer pronto: los bulbos de cebolla importados se echaron a perder rápidamente durante el curso del ejercicio por contaminación de hongos y/o bacterias, en la mayoría de los laboratorios que usaron especies no locales. Problemas similares ocurrieron con las semillas de lechuga. Varios de los laboratorios tuvieron dificultad en el almacenaje de las semillas por su facilidad de contaminación con hongos en temporadas húmedas y cálidas.

Otros problemas emergieron durante el cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba. El cultivo de nematodos también resultó ser relativamente susceptible a la contaminación según los reportes de tres de los laboratorios participantes. Otros tres laboratorios reportaron choques estacionales frecuentes con el cultivo de daphnias y, como era de esperar según la ley de Murphy, esto ocurrió en varias ocasiones cuando los organismos eran más necesitados: al recibir las tandas con muestras ciegas para ser analizadas. Sólo un laboratorio reportó dificultad en el mantenimiento de los cultivos de hydras y esto se debió a temperaturas estacionales muy elevadas durante el verano.

En resumen, la mayoría de estos problemas parecen haber estado relacionados con dos tipos distintos de circunstancias: variaciones importantes en condiciones climáticas/geográficas y condiciones de los laboratorios. En la primera instancia, organismos de prueba originarios de climas templados pudieron no haber sido los más apropiados para las circunstancias locales. En la segunda, algunos de los laboratorios no contaban con buenos equipos de control ambiental, lo que implicó que los organismos y las pruebas fueron hechas bajo condiciones climáticas locales (temperaturas y niveles de humedad no constantes). Por ejemplo, en por lo menos dos laboratorios, cultivos y ensayos fueron sujetos a temperaturas ambientes de 26 a 28 °C, en vez de 20 a 22 °C, como lo requería el protocolo acordado por todos. En un caso particular, el laboratorio contaba con aire acondicionado durante el día, pero este tenía que ser apagado durante la noche por reglamentos institucionales, lo cual produjo problemas en el mantenimiento de los cultivos durante la temporada de calor e introdujo fuentes de variabilidad durante los periodos de exposición a tóxicos en los ensayos.

Causas de fuerza mayor. Como si no fuese suficiente, sucesos climáticos y políticos extremos complicaron aún más las actividades de la red durante el ejercicio de intercalibración. Un paro laboral extendido, y en ocasiones violento, forzó a uno de los equipos de científicos participantes trabajar en secreto, bajo circunstancias particularmente difíciles. Mientras que en Norteamérica una tormenta catastrófica de lluvia helada en pleno invierno ocasionó un apagón de electricidad de cuatro semanas, afectando severamente el mantenimiento de los cultivos de prueba y retrasando por meses el trabajo de uno de los equipos; y en el Cono Sur, una sequía prolongada también llevó a interrupciones de servicios de electricidad afectando, de igual manera, los cultivos y capacidad de hacer los análisis de las muestras ciegas de manera puntual.

Finalmente, serios problemas fueron reportados por los laboratorios en relación al proveedor del bioensayo *MutaChromoplate*®. La mayoría de los laboratorios informaron haber recibido reactivos cuya fecha de caducidad había pasado y/o redomas de reactivos vacías, lo que representó una fuente de frustración aguda para los científicos y las agencias coordinadoras.

8.1.5 Como resultó en la práctica

La sección previa puede dar la impresión que las actividades de la red dieron resultados desastrosos. Esto, sin embargo, no fue el caso. Aunque a veces frustrante (para ambos, laboratorios participantes y agencias coordinadoras), el trabajo realizado produjo datos sumamente importantes y permitió exitosamente a la red identificar y validar una batería de ensayos de toxicidad apropiada para evaluaciones de calidad de aguas. Resultados sobre el ejercicio de intercalibración con muestras ciegas fueron analizados y presentados por Forget *et al.* (2000b) y Forget *et al.* (2000a). Las experiencias y trabajos realizados en cada país fueron publicados por cada laboratorio miembro de la red en un número especial de la revista *Environmental Toxicology* (Vol. 15(4), 2000; con acceso electrónico: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/jissue/72516023>). La validación de la batería de bioensayos con muestras ambientales se efectuó también exitosamente. Los resultados de estos estudios fueron presentados por Ronco *et al.* (2002) y Díaz-Báez *et al.* (2002). Como se mencionó antes, estos últimos estudios también incluyeron una segunda ronda con muestras ciegas, la cual, ya sin malentendidos y menos infortunios, permitió a los equipos de la red verificar la calidad de sus análisis y corroborar sus conclusiones con respecto a la relevancia y validez de los ensayos de toxicidad seleccionados.

Los problemas reportados en las secciones anteriores representan en sí mismos un tipo de información importante. Muchos de ellos se vinculan directamente a circunstancias o dificultades que podrían enfrentar laboratorios o grupos que quieran ejecutar estudios ecotoxicológicos en países en desarrollo. A pesar de las dificultades encontradas, los participantes de la red demostraron que cinco ensayos toxicológicos pudieron ser efectuados con precisión y exactitud adecuadas en ocho países distintos, con climas y ambientes muy diversos, y con diferentes niveles de experiencia y capacidad técnica. Una variabilidad interlaboratorio importante fue observada durante la primera ronda con muestras ciegas, pero una segunda ronda basada en una estrategia de análisis dosis-respuesta demostró que la variabilidad intralaboratorio era bastante aceptable. En otras palabras, dentro de un mismo laboratorio, los resultados con los ensayos toxicológicos presentados en este manual dieron resultados reproducibles y seguros. Con una adherencia estricta a un programa interno de control de calidad, el uso de este tipo de batería de ensayos puede ser recomendado para un monitoreo toxicológico rutinario.

Originalmente, las pruebas se eligieron por su aparente simplicidad y bajo costo. En la práctica, buenos bioensayos resultaron ser más problemáticos de lo esperado para uso en América Central y del Sur. Este fue el caso de la prueba de cebollas (*Allium sp.*), por razones de disponibilidad de los bulbos y dificultades en su almacenaje. Por otra parte, los problemas que seriamente incidieron en las operaciones de la red (comunicaciones y transferencia de datos por medios electrónicos, envío de muestras ciegas a través de fronteras internacionales, malentendidos lingüísticos, etc.) no deben presentarse en programas de evaluación

rutinarios por equipos de laboratorio adecuadamente entrenados y en un mismo país.

¿Qué otras cosas se aprendieron? Mientras que los ensayos de toxicidad pueden a primera vista parecer más aptos a las necesidades de países en desarrollo (más baratos, aparentemente tecnología simple, necesitando menos equipo moderno de laboratorio y menos infraestructura), sabemos ahora que esto no es más que un estereotipo errado de origen “Occidental”. En primer lugar, este tipo de pruebas requieren de un nivel de recursos humanos muy por arriba de pruebas más “clásicas” de laboratorio. El cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba representan tareas que nunca acaban y el examen de lotes grandes de muestras no es realmente posible en laboratorios pequeños o medianos, debido a la naturaleza de las pruebas mismas. Por otro lado, las políticas de ajuste estructural promocionadas por instituciones financieras internacionales han reducido drásticamente el tamaño y recursos operativos del servicio público en la mayoría de los países en desarrollo, mientras que los presupuestos para la compra de equipo de laboratorio moderno han aumentado considerablemente en varias instancias. Dadas tales condiciones, muy pocas agencias reguladoras en estos países considerarían necesariamente a este tipo de ensayos toxicológicos como una “tecnología apropiada de bajo costo” para su situación particular. Por ende, la batería de bioensayos debe ser valorada, por sí misma, como una herramienta válida de evaluación de calidad de aguas, más bien que como un “substituto” de alternativas de alta tecnología para países con pocos recursos. Al final de la fase II del proyecto *WaterTox*, los autores concluyeron que “la batería de ensayos puede detectar de manera segura toxicidad en las muestras cuando está presente” (Ronco *et al.*, 2002). Añadieron también que “en general, comparaciones interlaboratorio indicaron una buena confiabilidad de la batería como un procedimiento para detectar tóxicos” (*idem*), haciéndola una alternativa eficaz en la predicción de efectos tóxicos por compuestos químicos.

8.1.6 Asegurando la transferencia tecnológica

Lo que se ha descrito a la fecha, incluyendo viajes al campo para hacer muestreos ecotoxicológicos, han sido esencialmente ejercicios de laboratorio efectuados por investigadores altamente calificados. El propósito último del ejercicio entero, sin embargo, consistía en facilitar un monitoreo rutinario de la calidad del agua en comunidades pequeñas y medianas de países en desarrollo. Por lo tanto, desde el fin de la primera fase del proyecto *WaterTox*, el IDRC comenzó a explorar estrategias para diseminar la tecnología. Esto se hizo con la ayuda de los participantes de la red, así como con otros socios.

La primera de estas actividades de diseminación fue el proyecto educativo *Aquatox*®. El IDRC creó esta red para vincular a profesores y estudiantes jóvenes a través del mundo con expertos científicos que trabajan en laboratorios de calidad de agua en países del norte y sur. Desde 1999, grupos de estudiantes de escuelas participantes fueron invitados a usar bioensayos para evaluar la toxicidad química y contaminación microbiológica en muestras de agua tomadas directamente de su medio ambiente local. Escuelas participantes de Canadá y países del norte y sur recibieron *kits* o paquetes experimentales conteniendo instrucciones, equipo y suministros básicos para llevar a cabo estas pruebas usando versiones simplificadas de los ensayos de toxicidad del proyecto *WaterTox*, tales como: la prueba de toxicidad

aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), la inhibición del crecimiento promedio de raíces de cebolla (*Allium cepa* L), el bioensayo de toxicidad aguda (efectos letales y subletales) con *Hydra attenuata* y la prueba bacteriológica de tira de papel indicador de sulfuro de hidrógeno (H₂S).

El objetivo general del proyecto fue fomentar la protección del medio ambiente a través de estudios ambientales aplicados con estudiantes en escuelas primarias y secundarias. Los objetivos específicos incluyeron: ayudar a estudiantes comprender —a través de experimentos científicos prácticos— la importancia de proteger los recursos hídricos en sus comunidades y en el mundo entero; ayudarlos a pensar sobre los vínculos entre la protección ambiental, la salud y el desarrollo sustentable y sobre las implicaciones sociales en sus propias comunidades y el mundo; desarrollar e implementar una red electrónica de investigadores jóvenes, permitiendo un foro internacional para el diálogo sobre asuntos y prioridades medioambientales, y proporcionar a los maestros de ciencias la oportunidad de efectuar con sus estudiantes un proyecto práctico que involucra diversas disciplinas científicas, y que se relaciona a la salud de los seres humanos y ecosistemas. Las escuelas se enlazaron mediante la internet, permitiéndoles intercambiar resultados de sus experimentos y obtener asistencia técnica de expertos. El portal web del proyecto es trilingüe (inglés, francés, y español) y su dirección es <http://www.aquatox.net/>.

Una segunda meta del IDRC en crear el proyecto *Aquatox*® fue demostrar que los bioensayos promocionados por la red *WaterTox* eran bastante simples y que niños y jóvenes eran capaces de usarlos y realizar evaluaciones ambientales válidas. El programa en sí ha sido bastante exitoso y todavía está en operación, aunque que se planificó originalmente para un año de duración.

Un segundo proyecto con el mismo propósito de diseminar la batería de bioensayos consistió en la transferencia tecnológica a municipios de América Latina. Este proyecto fue apoyado por el IDRC conjuntamente con el Secretariado de Manejo del Medio Ambiente (SEMA-EMS). La experiencia y sus resultados se describen en la sección 8.2 de este libro. Sólo quisiéramos por el momento recalcar que desde el comienzo, la red *WaterTox* se preocupó y tomó pasos para asegurarse que los resultados obtenidos no permaneciesen en un dominio teórico, sino que, pudiesen ser aplicados rápidamente en evaluaciones de calidad de aguas. Consideramos que esta meta se logró con éxito.

8.1.7 Conclusiones

En la década de los años ochenta, el IDRC dirigió exitosamente una red internacional de científicos que desarrolló y validó una serie de pruebas microbiológicas para evaluar la calidad de agua potable. Basado en esta experiencia, el Centro emprendió en 1996 el proyecto *WaterTox*, con la seguridad que podría lograr un éxito similar en el desarrollo y validación de pruebas de agua para detectar sustancias tóxicas. En este caso particular, intentaba algo nuevo pero donde tenía menos experiencia y conocimiento técnico. Numerosas dificultades fueron encontradas, muchas de ellas resultaron en avances lentos y demoras, y también a veces en frustración para ambas agencias organizadoras y laboratorios participantes. Estos obstáculos, no obstante, presentaron oportunidades para aprender. Consideramos que a fin de cuentas, se logró un éxito importante y se pudo demostrar la validez del concepto, es decir, la utilidad de una batería de ensayos toxicológicos que incluye organismos de prueba

de diferentes niveles tróficos. Las actividades de la red dieron oportunidad también a efectuar un trabajo científico robusto (como lo testifican los trabajos publicados en revistas científicas citados en estas secciones), además de varias actividades prácticas de diseminación en países en desarrollo en muchas partes del mundo.

¿Cuáles fueron los ingredientes claves que llevaron al éxito esta actividad colaboradora de validación? Fue importante haber empezado por un estudio a fondo sobre los ensayos toxicológicos existentes, guiados por una matriz predefinida de parámetros y una validación práctica (con muestras ciegas) de aquellos ensayos que se retuvieron. Una comunicación frecuente con los participantes, y entre ellos, por internet, fue también sumamente importante para lograr una cohesión de grupo y a la vez facilitar la coordinación de actividades. Sin embargo, nos dimos cuenta rápidamente que reuniones cara a cara eran clave para el desarrollo de confianza mutua entre los miembros de la red. La decisión del IDRC de diseñar el proyecto con encuentros y talleres periódicos resultó ser un ingrediente esencial para el éxito. La posibilidad de aprovechar las reuniones bianuales del *International Symposium on Toxicity Assessment* para organizar encuentros de la red también representó un gran beneficio. Nada de esto pudo ser posible sin el arduo trabajo, dedicación y confianza mutua de los colegas de Argentina, Canadá, Chile, Colombia, Costa Rica, India, México y Ucrania. Un artifice para el éxito de este esfuerzo colaborador fue la desinteresada participación del experto Bernard J. Dutka, quien creyó en la necesidad y pertinencia de este tipo de herramienta para la evaluación de calidad de aguas en países en desarrollo. Barney trabajaba entonces para el NWRI y dedicó su tiempo libremente, sin discusión, compartiendo con entusiasmo su experiencia y conocimientos con todos los miembros de la red. Fue a la vez nuestro mentor y motivador. ¡Recibe un profundo agradecimiento de todos nosotros, Barney!

REFERENCIAS

- Aguilar Revelo, L. & E. Rosalez Escalante (eds.), 1998, *Modules 1-8*, Fundatec, Costa Rica.
- Blaise, C., G. Forget & S. Trotter, 2000, *Environ. Toxicol.*, 15(4): 352-359.
- Castillo, G., M.T. Martins & B.J. Dutka, 1995, "Assessment of the Efficiency of Drinking Water Treatment Using the Coliphage, Total Coliform and H₂S Paper Strip Tests", *Proceedings for the Specialty Conference of the Water Environment Federation Entitled Environmental Laboratories: Testing the Waters*, Water Environment Federation, Alexandria, Virginia.
- Díaz-Báez, M.C., L.E. Cruz, D. Rodríguez, J. Pérez & C.M. Vargas, 2000, *Environ. Toxicol.*, 15(4): 345-351.
- Díaz-Báez, M.C., W.A. Sánchez, B.J. Dutka, A. Ronco, G. Castillo, Y. Pica-Granados, L.E. Castillo, J. Ridal, V. Arkhipchuk & R.C. Srivastava, 2002, *Environ. Toxicol.*, 17: 241-249.
- Dutka, B.J., 1989, *Suggested Microbiological Water Quality Tests for Developing Countries and Rural and Isolated North American Communities*, NWRI Contribution No. 89-153, Burlington, Ontario, Canada: National Water Research Institute.
- Dutka, B.J. & A.H. El-Shaarawi (eds.), 1990, "Results of a Three Continent, 8 Country IDRC Sponsored Research Project on the Use of Simple, Inexpensive Microbial Water Quality Tests", *Proceedings of the Banff Meeting on Water Quality Control*, September 1988, Manuscript Report Series IDRC-MR247e, Ottawa, Ontario, Canada.
- Fiskesjö, G., 1993, *Environ. Toxicol. and Water Qual.*, 8: 461-470.
- Forget, G., A. Sánchez-Bain, V. Arkhipchuk, T. Beauregard, C. Blaise, G. Castillo, L.E. Castillo; M.C. Díaz-Báez, Y. Pica-Granados, A. Ronco, R.C. Srivastava & B. Dutka (2000a), *Environ. Toxicol.*, 15(5): 362-369.

- Forget, G., P. Gagnon, W.A. Sánchez & B. Dutka, 2000b, *Environ. Toxicol.*, 15(4): 264-276.
- Instituto Nacional de Normalización, INN, 2002, *Calidad del agua-Determinación de la calidad bacteriológica del agua potable rural mediante el ensayo del H_2S* , Norma chilena: NCh2756.Of. 2002, Chile.
- Payment, P. & W.A. Sánchez (eds.), 1989, "Water Quality Control Network", Proceedings of the Meeting held in Ottawa, Canada, 21-24 February, 1989, Manuscript Report Series, IDRC-MR248e, Ottawa, Ontario, Canada.
- Rao, S.S. & R. Lifshitz, 1995, *Environ. Toxicol. and Water Qual.*, 10: 307-313.
- Ronco, A., P. Gagnon, M.C. Díaz-Báez, V. Arkhipchuk, G. Castillo, L.E. Castillo, B.J. Dutka, Y. Pica-Granados, J. Ridal, R.C. Srivastava & A. Sánchez, 2002, *Environ. Toxicol.*, 17: 232-240.
- Samoiloff, M., 1990, *Toxicity Assessment*, 5: 309-318.
- Sánchez, W.A. & Dutka, B.J., 1998, *Community-based Water Quality Monitoring (WQM) for Panama Health and Water Programs*, Consultancy Report, International Development Research Centre, 40 pp.
- Trottier, S., C. Blaise, T. Kusui & M. Johnson, 1997, *Environ. Toxicol. and Water Qual.*, 12: 265-271.

8.2 Transferencia tecnológica a municipios de América Latina

Gabriela Feola y Andrés Sánchez

8.2.1 Introducción

El apoyo del Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID) a la red *WaterTox*, descrito en la sección anterior, tuvo como propósito fundamental alentar el desarrollo de un enfoque ecosistémico a nivel municipal que considerara la protección del medio ambiente, el control toxicológico de aguas y la promoción de la salud humana en las poblaciones de mayor vulnerabilidad. A través de este proceso, se intentó también fortalecer el diálogo y fomentar asociaciones entre municipios con otras instituciones de la sociedad civil, tales como organizaciones no gubernamentales y centros de investigación, para la puesta en marcha de planes de control de calidad de aguas.

En 1999, una convocatoria para el desarrollo de proyectos de transferencia tecnológica dirigidos a gobiernos municipales de América Latina y el Caribe surgió como resultado de un taller organizado conjuntamente entre el Programa Ecosistemas y Salud Humana (EcoSalud-IDRC) y el Secretariado de Manejo del Medio Ambiente (SEMA-EMS) en Montevideo, Uruguay. En este taller participaron investigadores y funcionarios de varios municipios de la región y miembros de la red *WaterTox*. Del interés generado surgieron solicitudes de apoyo para la investigación en el tema, llevando al diseño de un proyecto que incluyó la convocatoria a estudios de investigación aplicada dirigida a gobiernos locales en asociación con centros de investigación y organismos no gubernamentales.

De esta forma, se abordó un aspecto de relevante importancia para la región: la posibilidad de mejorar la capacidad de evaluación de las fuentes locales de suministro de agua, a través de ensayos simples y de bajo costo. La realización de un control químico exhaustivo en muestras de agua y efluentes es poco probable para la mayoría de las municipalidades de América Latina, considerando el costo del equipamiento necesario y la disponibilidad de personal técnico calificado. Otra desventaja inherente

a mediciones puramente químicas es su incapacidad de detectar efectos combinados de diferentes sustancias contaminantes (inhibición o magnificación de efectos tóxicos).

El CIID, a través de su Programa Ecosistemas y Salud Humana y el Secretariado de Manejo del Medio Ambiente, financió el proyecto de referencia entre los años 2000 y 2001. Para la selección de las propuestas presentadas en respuesta a la convocatoria, se consideraron los siguientes aspectos:

- Justificación y descripción de la importancia del estudio en relación con la política de protección ambiental del gobierno local.
- Incorporación efectiva de actores públicos y privados (sociedad civil) en el manejo ambiental, especialmente referida a la evaluación comunitaria de la calidad del agua.
- Contribución a la participación efectiva de los técnicos y expertos municipales en los estudios propuestos e impacto en el desarrollo de las capacidades institucionales para el uso continuo de ensayos de toxicidad a nivel municipal.
- Asociaciones entre el proponente y otros municipios (coordinación intermunicipal) o con instituciones de la comunidad, para la ejecución del estudio piloto y con vistas a la implementación de planes futuros de evaluación de calidad del agua y uso de ensayos de toxicidad.
- Especial interés en aquellos temas de contaminación ambiental que afecten la interfase urbano-rural, a nivel tanto de generación del problema a estudiar como en el impacto del mismo sobre estas zonas.
- Compromiso de apoyo financiero por los gobiernos locales e instituciones asociadas
- Compromiso de sostenibilidad institucional de los planes para el uso de ensayos de toxicidad y factibilidad de los planes futuros
- Calidad técnica de la propuesta y enfoque ecosistémico para el análisis de la contaminación ambiental.
- Vinculación del estudio piloto con actividades educativas ambientales en la comunidad local.

Resultados de la convocatoria

Como resultado de la convocatoria realizada a fines de 1999, se presentaron 24 propuestas provenientes de pequeños y medianos municipios de 11 países de América Latina. Luego de dos etapas de selección, se eligieron las propuestas de los siguientes cinco municipios para la implementación de los proyectos de investigación aplicada: La Plata, Argentina; Piracicaba, Brasil; Mosquera, Colombia; Pudahuel, Chile; y Montevideo, Uruguay. En la tabla 8.2.1 se indican los sectores municipales participantes y las instituciones asociadas para la ejecución del proyecto.

Los estudios de investigación comenzaron en el primer semestre del año 2000. Para ello se transfirieron fondos de 20 000 dólares canadienses por país, los cuales sumados a la contraparte municipal y de las instituciones asociadas, posibilitaron la ejecución de los mismos.

Tabla 8.2.1. Instituciones participantes.

País	Municipio	Sector del municipio	Institución asociada
Argentina	La Plata	Parque Ecológico Municipal	Universidad Nacional de La Plata (CIMA) y Asociación Ecológica Foro Verde
Brasil	Piracicaba	SEMAE (Serviço Municipal de Água e Esgoto)	Universidade de São Paulo- Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA)
Colombia	Mosquera	EAMOS (Empresa de Acueducto y Alcantarillado de Mosquera)	Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá
Chile	Pudahuel	Departamento de Medio Ambiente	Universidad de Chile
Uruguay	Montevideo	Unidad Laboratorio de Higiene Ambiental y Unidad Montevideo Rural	Sin institución asociada

8.2.2 Actividades desarrolladas

Taller de transferencia

Las actividades dieron inicio con un taller teórico-práctico de transferencia tecnológica realizado en el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIMA) de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina, en la que participaron dos técnicos por municipio y expertos latinoamericanos integrantes de la red *Watertox*. Estos últimos fueron los encargados de entrenar a los participantes en el manejo de la batería de ensayos de toxicidad compuesta por *Daphnia magna*, *Hydra attenuata*, *Allium sp.* y *Lactuca sativa*, siguiendo los protocolos indicados en el capítulo 4 “Protocolos de ensayo”.

En la figura 8.2.1 (ver anexo fotográfico) se muestran fotos de las actividades realizadas durante el taller.

Al término del mismo, los participantes fueron provistos de algunos materiales para iniciar el mantenimiento de los cultivos y de las cepas de los organismos de prueba.

Implementación de ensayos de toxicidad

Posteriormente, cada municipio realizó las adaptaciones de un área de trabajo que le permitiera contar con la infraestructura mínima necesaria, así como las adquisiciones de materiales y reactivos para el desarrollo de las técnicas aprendidas. En esta etapa, los municipios participantes contaban con diferente grado de facilidades. En algunos casos: Montevideo, Piracicaba y Mosquera, ya disponían de laboratorios, debiendo adaptar un sector del mismo para el desarrollo de los ensayos de toxicidad. Un caso intermedio fue el Parque Ecológico del Municipio de La Plata, que destinó una sala pequeña para llevar a cabo determinados ensayos de toxicidad con las mínimas condiciones requeridas, realizándose el mantenimiento y suministro de *Daphnia magna* e *Hydra attenuata* a través del laboratorio del CIMA (Universidad Nacional de La Plata). En cambio, la municipalidad de Pudahuel no

disponía de una infraestructura básica ni la posibilidad de adaptar otra sala, por lo que se debió comenzar a construir e implementar un pequeño laboratorio (ver figura 8.2.2 en anexo fotográfico).

Controles de calidad

Se establecieron los procedimientos de garantía de calidad para el manejo de las pruebas, según se describe en el capítulo 6 “Aseguramiento y control de calidad de ensayos”, y se participó en un ejercicio de intercalibración con seis muestras ciegas provistas por el *National Water Research Institute* (NWRI, *Environment Canada*).

Los productos químicos utilizados para las muestras ciegas fueron seleccionados por el NWRI y el IDRC-Canadá, basados en los resultados obtenidos en las intercalibraciones realizadas por la red *Watertox* (Forget *et al.*, 2000).

Los laboratorios realizaron el ejercicio sin conocer las características de cada muestra. Las mismas correspondieron a las sustancias de toxicidad variable que se indican en la tabla 8.2.2. La muestra número 6 correspondió a agua moderadamente dura para evaluar la detección de falsos positivos.

Tabla 8.2.2. Descripción de las muestras utilizadas en el ejercicio de intercalibración.

Núm. de muestra	Descripción	Concentración
1	Mercurio	5 ppm
2	4-nitroquinolina-N-óxido	2 ppm
3	Metaloclor	45 ppm
4	2,4-dinitrofenol	2 ppm
5	Lindano	20 ppm
6	Agua moderadamente dura	

Simultáneamente a la recepción de las muestras, fue entregado un instructivo a cada laboratorio participante con las diluciones sugeridas para cada ensayo de toxicidad. Las muestras se procesaron siguiendo los mismos procedimientos que las muestras ambientales descritas más abajo.

Los datos fueron procesados en el Centro *Saint-Laurent* (*Environment Canada*), discutiéndose los resultados en el taller final realizado en la ciudad de Québec, con el asesoramiento de integrantes de la red *Watertox*.

Estudios de caso

En forma simultánea se iniciaron los estudios piloto correspondientes en cada municipio, para definir la relevancia de los ensayos de toxicidad como herramientas de monitoreo. Cada estudio de investigación aplicada contó con sus objetivos específicos, adaptado a sus propias preocupaciones y condiciones. De esta forma, se lograba probar la batería de ensayos de toxicidad en contextos ambientales, socioeconómicos y tecnológicos diferentes.

En la tabla 8.2.3 se presentan, en forma comparativa, las características de las muestras analizadas en cada estudio de caso.

Tabla 8.2.3. Características de las áreas de muestreo seleccionadas por municipio.

Municipio	Área de muestreo	Tipo de muestras	Uso del agua e interés del estudio
La Plata	Urbana y rural	Agua superficial	Calidad de dos arroyos Énfasis educativo
Montevideo	Rural	Agua superficial y subterránea	Agua de consumo humano, agua para riego y lavado de vegetales
Mosquera	Urbana y rural	Agua subterránea Humedal	Agua destinada al consumo. Calidad del humedal
Piracicaba	Urbana y rural	Agua superficial luego de tratamiento convencional y agua subterránea	Agua destinada al consumo humano
Pudahuel	Urbana y rural	Agua superficial y una muestra de pozo	Riego, agua de consumo, recreación

Participación en *Aquatox*

A su vez, los cinco proyectos seleccionados incluyeron actividades educativas en centros de enseñanza primaria (ver figura 8.2.3 en anexo fotográfico). Para ello, los municipios trabajaron con dos o tres escuelas, posibilitando su participación en la Red Escolar Internacional sobre la Toxicidad del Agua (*Aquatox*®).

Este programa, creado por IDRC-Canadá, vinculó a los escolares y maestros de diferentes países con expertos científicos en evaluación y protección de la calidad de agua. De esta forma, se promovió la sensibilización de los estudiantes, motivándolos a comprender la importancia de proteger los recursos hídricos de su comunidad y del mundo, a través de experimentación científica, en la que se incluyeron diferentes disciplinas relacionadas a la salud humana y del ecosistema. La red utilizó métodos de comunicación vía internet para facilitar el intercambio de información entre los participantes (<http://www.aquatox.net>). En el año 2001 participaron en el programa *Aquatox* alrededor de cien escuelas (45 de América Latina, 12 de Asia, 11 de África y el resto de Canadá). Entre ellas, doce escuelas primarias trabajaron bajo el asesoramiento técnico de los cinco municipios participantes en este proyecto.

Es de destacar que el proyecto del Parque Ecológico del Municipio de La Plata, a diferencia del resto, contó con un énfasis exclusivamente educativo.

Participación comunitaria

La comunidad involucrada fue informada de cada proyecto municipal, presentándose los resultados a través de jornadas de difusión e intercambio. El proyecto de Montevideo contó con una fuerte componente participativa, a través de varios talleres de discusión y planificación de mejoras en las prácticas agrícolas y en el monitoreo de la calidad del agua, llegando a acuerdos de actividades futuras entre las autoridades municipales y los productores rurales involucrados (ver figura 8.2.4 en anexo fotográfico). La utilización de ensayos de toxicidad por grupos comunitarios no fue realizada, salvo en el contexto educativo.

Actividades de difusión

En el año 2000 se creó una página web (<http://idrc.ca/lacro/bioensayos>) para la difusión de los diferentes aspectos vinculados al programa. Actualmente incluye los informes finales de los proyectos municipales.

A su vez, cada municipio realizó diferentes actividades de disseminación (jornadas, talleres, presentaciones a congresos, elaboración de videos, artículos o entrevistas en distintos medios de prensa) para la promoción de las experiencias generadas durante la ejecución del proyecto.

A fines de agosto del 2001 se participó en el *X International Symposium on Toxicity Assessment* (ISTA 10), organizado por el Centro Saint Laurent (*Environment Canada*) en la ciudad de Québec, para lograr una difusión internacional de la actividad y favorecer el diálogo e intercambio entre los gobiernos municipales y la comunidad científica. Durante el simposio, se participó tanto en la sesión plenaria como en la sesión de paneles.

Taller final

En la ciudad de Québec, posterior al simposio ISTA 10, se realizó el taller final para la discusión de los resultados obtenidos con la participación de representantes técnicos de los cinco municipios y los expertos latinoamericanos de la red *Watertox* (ver figura 8.2.5 en anexo fotográfico).

8.2.3 Resultados y discusión

Experiencia limitada

Los resultados que se presentan corresponden a los estudios de investigación aplicada emprendidos por los cinco municipios en el periodo de un año. En ese periodo se realizó la transferencia tecnológica y la implementación de las técnicas. Cabe destacar que los laboratorios municipales no poseían experiencia previa en la aplicación de ensayos de toxicidad en agua, siendo un punto de gran interés los retos enfrentados por los diferentes equipos en desarrollar la capacidad necesaria para planear y llevar a cabo estudios en sus municipios.

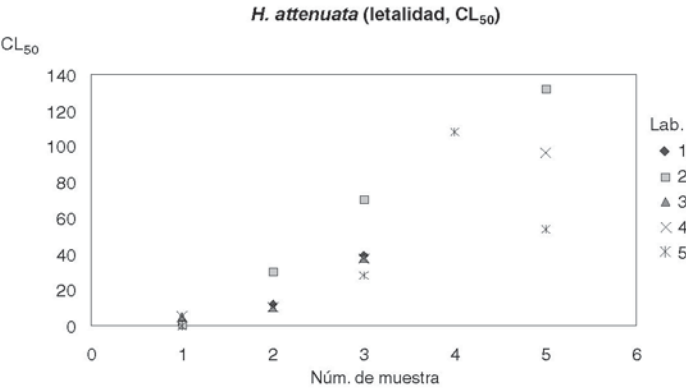
Intercalibración con muestras ciegas

Los resultados obtenidos en el ejercicio de intercalibración con muestras ciegas, se presentan en la figura 8.2.6 A-C.

De los mismos, se resaltan los siguientes aspectos:

- Se observó una buena respuesta de *Hydra attenuata* y *Daphnia magna* a las soluciones con mercurio (muestra 1) y óxido de 4-nitroquinolina-N-óxido (muestra 2). En cambio, se presentó una mayor variabilidad de respuesta a los compuestos orgánicos menos solubles como en los casos del metaloclor, 2,4-dinitrofenol y lindano, contenidos en las muestras tres, cuatro y cinco, respectivamente.

(A)



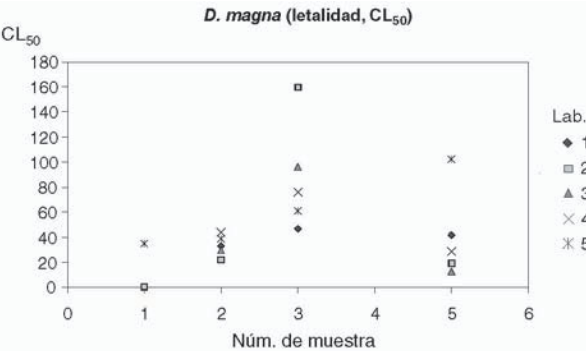
***H. attenuata* (subletalidad y letalidad, 96 h)**
Controles negativos

Municipio	Sub-letalidad	Letalidad	Total	% subletalidad	% muerte
1	0	0	54	0	0
2	0	0	36	0	0
3	0	0	54	0	0
4	0	0	54	0	0
5	0	0	108	0	0

***H. attenuata* (subletalidad y letalidad, 96 h)**
Muestra ciega 6 (agua)

Municipio	Sub-letalidad	Letalidad	Total	% subletalidad	% muerte
1	4	0	36	11,1	0
2	8	0	24	33,3	0
3	0	0	49	0	0
4	6	0	36	16,7	0
5	0	0	36	0	0

(B)



***D. magna* (letalidad, 48 h)**
Controles negativos

Municipio	Letalidad	Total	% muerte
1	5	180	2,8
2	0	180	0
3	0	152	0
4	0	180	0
5	0	180	0

***D. magna* (letalidad, 48 h)**
Muestra ciega 6 (agua)

Municipio	Letalidad	Total	% muerte
1	0	120	0
2	69	150	0
3	-	-	-
4	0	120	0
5	0	120	46

Figura 8.2.6. Resultados de los bioensayos con (A) *Hydra attenuata* (letalidad y subletalidad), (B) *Daphnia magna* (letalidad) y (C) *Lactuca sativa* (elongación de raíz), realizados en las muestras ciegas.

(C)

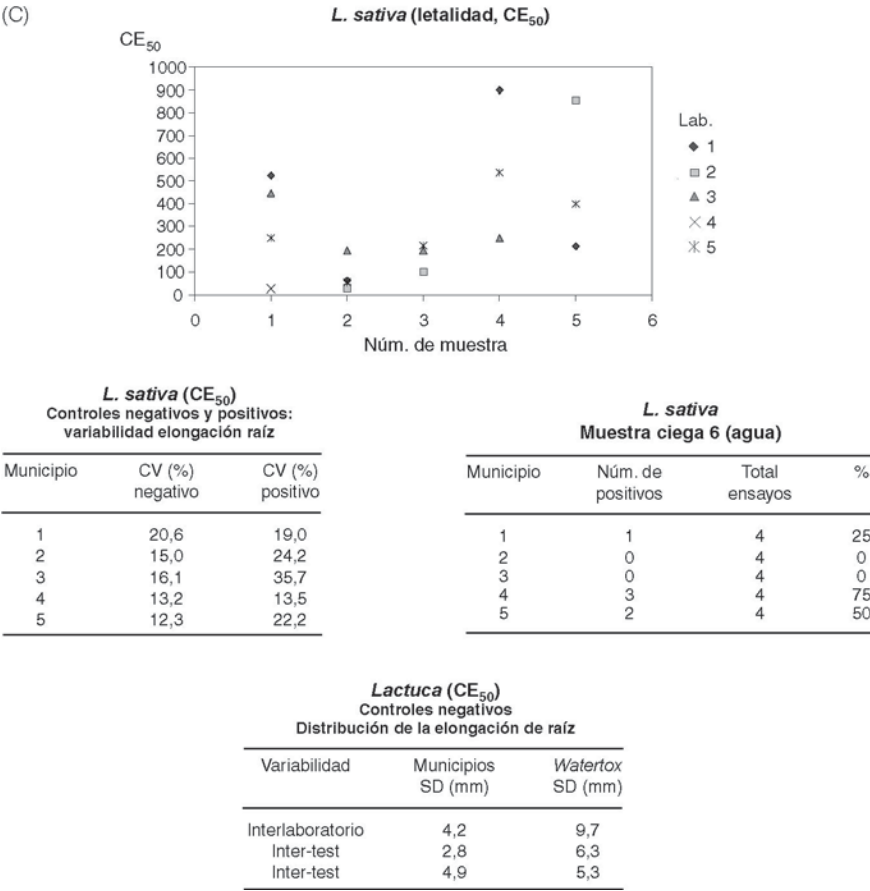


Figura 8.2.6. Resultados de los bioensayos con (A) *Hydra attenuata* (letalidad y subletalidad), (B) *Daphnia magna* (letalidad), y (C) *Lactuca sativa* (elongación de raíz), realizados en las muestras ciegas (continuación).

- En la muestra ciega número 6, que contiene sólo agua, se observaron falsos positivos para *H. attenuata* en el punto de subletalidad (CE₅₀), ocasionado probablemente por la apreciación inadecuada de la formación de bulbos en tentáculos. En cambio, en el punto final de letalidad (CL₅₀) no se observaron falsos positivos.
- Para *D. magna*, algunos laboratorios obtuvieron falsos positivos para muestras de agua moderadamente dura, que constituyen a los controles negativos y a la muestra ciega número 6.
- Respecto a *L. sativa* se obtuvieron respuestas consistentes para las muestras con 4-nitroquinolina-N-óxido y metaloclor (muestras ciegas 2 y 3) y una mayor variabilidad para las restantes. Cabe resaltar que el método mostró mayor incidencia de falsos positivos en el control negativo, en relación a los otros métodos de prueba.

- Al comparar los resultados de *L. sativa* con los obtenidos por la red *Watertox* para las mismas sustancias (Ronco, A. *et al.*, 2002), se observó una menor variabilidad interlaboratorio para los municipios. Las razones podrían deberse a que en los laboratorios municipales se trabajó con un mismo lote de semillas, las cuales fueron utilizadas en un plazo relativamente corto.
- En general, durante el proyecto de una año de duración, los equipos municipales fueron capaces de recibir capacitación, habilitar sus laboratorios, y establecer un sistema adecuado de aseguramiento y control de calidad de los ensayos de toxicidad.

Muestras ambientales

En la tabla 8.2.4 se indica el número de puntos de muestreo seleccionados por cada municipio y el origen de la muestra (superficial, subterránea o agua tratada por método convencional de potabilización). Se realizaron, como mínimo, dos campañas de muestreo y cada muestra se procesó con la batería de ensayos de toxicidad compuesta por *Daphnia magna*, *Hydra attenuata*, *Allium cepa* y *Lactuca sativa*, y por análisis complementarios.

Tabla 8.2.4. Tipo y número de puntos de muestreo evaluados por municipio.

Municipio	Núm. puntos muestreos	Agua superficial	Agua subterránea	Agua tratada
La Plata, Argentina	4	4	0	0
Montevideo, Uruguay	43	10	33	0
Mosquera, Colombia	7	4	2	1
Piracicaba, Brasil	7	0	0	7
Pudahuel, Chile	11	10	1	0
Total	72	28	36	8

Agua superficial

En el Parque Ecológico Municipal de La Plata se trabajó con dos escuelas de la región, estudiando dos cursos de agua superficial (nacientes y aguas abajo de potenciales fuentes de contaminación). Las tareas operativas las realizaron los niños con la supervisión de los coordinadores del proyecto (ver figura 8.2.7 en anexo fotográfico). A pesar de la variabilidad en los resultados obtenidos, se destaca que las muestras produjeron respuestas tóxicas en prácticamente el 80% de los casos con *Allium cepa*, *Hydra attenuata* y *Daphnia magna*.

En Pudahuel, los resultados en las respuestas de toxicidad fueron variables según los organismos (ver figura 8.2.8 en anexo fotográfico). Se observó cierto grado de toxicidad, principalmente con *Hydra attenuata* y *Lactuca sativa*; en general, aguas abajo de zonas de descarga de efluentes industriales. No se detectó toxicidad con *Daphnia magna*.

En Montevideo, en las muestras analizadas de agua superficial (tajamares utilizados para riego), no se observaron efectos tóxicos agudos.

Las muestras extraídas de la ciénaga Gualí-Tres Esquinas, Mosquera, Colombia, indicaron la presencia de toxicidad química, probablemente asociadas al vertido de aguas residuales sin tratar o insuficientemente tratadas, y a zonas de cultivo cercanas en las que se utilizan plaguicidas y fertilizantes (ver figura 8.2.9 en anexo fotográfico). En la figura se observa uno de los pozos de agua utilizados por el municipio de Mosquera, lindero al nacimiento de la ciénaga.

Agua subterránea

Los resultados de los ensayos de toxicidad realizados en 32 pozos (69 muestras analizadas) en la zona rural de Montevideo, no revelaron toxicidad aguda con *Daphnia magna*, ni *Hydra attenuata*. En cambio, el 74% de las muestras analizadas presentaron algún grado de toxicidad para *Lactuca sativa*. Este efecto se relacionó con la salinidad de las muestras, más específicamente con el contenido de sodio observado (concentración promedio de 159,1 mg/L de sodio). A su vez, el 70% de las muestras de agua subterránea superaron la concentración de 10 mg/L tanto de nitrógeno como de nitrato (la concentración promedio obtenida fue de 12,5 mg/L), probablemente relacionado con la utilización de fertilizantes en la zona.

En el municipio de Mosquera se analizaron muestras de dos pozos de agua utilizados para el abastecimiento de la población, luego de un tratamiento convencional. Los resultados mostraron toxicidad aguda, en especial con *Hydra attenuata*.

La única muestra de agua de pozo analizada en la municipalidad de Pudahuel no presentó indicios de toxicidad con los ensayos realizados.

Agua tratada

En Piracicaba no se observó toxicidad en las muestras de agua estudiadas (18 muestras analizadas). De los siete puntos de muestreo, cuatro corresponden a captación de agua superficial, y tres a pozos profundos con los que se abastece a la población del municipio. Al concentrarse las muestras diez veces por el método de extracción en fase sólida (Díaz-Báez *et al.*, 2000), resultó que las muestras provenientes del río Piracicaba producían cierta toxicidad, principalmente para *Daphnia magna* e *Hydra attenuata*.

En el municipio de Mosquera, sólo fue estudiada una muestra de agua tratada del acueducto, observándose efectos letales con *Hydra attenuata*.

Dificultades encontradas

Durante el desarrollo de los proyectos se tuvo que ir superando dificultades relacionadas a la implementación de las técnicas propuestas. Algunas de estas dificultades, fueron:

- **Tiempo requerido para la implementación de las técnicas.** Fue bastante mayor al previsto inicialmente. Esta etapa incluyó los trabajos necesarios de adaptación de los laboratorios, la adquisición de materiales y reactivos con demoras variables según los aspectos administrativos de cada municipio, así como la puesta a punto de las técnicas. Como consecuencia de ello, algunos municipios no lograron procesar el número de muestras, ni pudieron desarrollar actividades con

participación comunitaria como estaba previsto inicialmente dentro del curso de un año.

- **Provisión de organismos para los ensayos de toxicidad.** Relacionada, principalmente, con los bulbos de cebolla, dado que se tuvieron dificultades para adquirirlos localmente, así como para conseguirlos de tamaño adecuado y uniforme.
- **Aspectos técnicos.** Requerieron ajustes, tales como la calidad del agua utilizada para los cultivos y diluciones, y la estandarización de las condiciones ambientales de los laboratorios.
- **Estadística e interpretación.** Se constató la necesidad de mayor conocimiento en métodos estadísticos y de asesoramiento en la interpretación de los resultados obtenidos para el personal municipal.

8.2.4 Conclusiones

Sobre los resultados obtenidos

Un número significativo de muestras provenientes de diferentes fuentes de agua mostraron toxicidad. En estos casos, se considera necesario en una etapa posterior, la realización de análisis químicos específicos (por ejemplo, metales y plaguicidas, según el uso del suelo y actividades en la zona) para identificar los contaminantes responsables de la respuesta de toxicidad positiva.

De los resultados obtenidos, se resalta la contaminación de pozos de agua construidos u operados inadecuadamente, así como la de acuíferos, como es el caso de los pozos evaluados en Mosquera, Colombia. Los análisis microbiológicos y físico-químicos de rutina los calificaban como aptos, pero los ensayos de toxicidad realizados indicaron toxicidad química.

Basados en las respuestas generales observadas al emplear la batería de ensayos de toxicidad, se puede decir que los ensayos con *Hydra attenuata* y *Daphnia magna* fueron aplicados con mayor facilidad por los equipos municipales e implementados correctamente en los ejercicios con muestras ciegas.

Esta experiencia, como proceso de aprendizaje en la aplicación de las técnicas de ensayos de toxicidad en agua, evidencia la necesidad de continuar con el trabajo técnico, buscando reducir la variabilidad de resultados y mejorar el nivel de entrenamiento para la interpretación de los mismos.

Sobre la experiencia de transferencia

Se destacan los siguientes aspectos:

- **La exitosa implementación de la batería de ensayos de toxicidad en los laboratorios.** Los municipios participantes lograron llevar a cabo los proyectos de investigación aplicada, adquiriendo conocimientos y experiencias importantes, y logrando, en su mayoría, la incorporación de la batería de ensayos de toxicidad de bajo costo en su rutina de análisis como herramienta para detectar la presencia de toxicidad en agua.
- **El proceso de aprendizaje efectuado.** Los equipos municipales pudieron superar variadas dificultades y desarrollar la habilidad de juzgar por ellos

mismos la utilidad y relevancia de los diferentes ensayos de toxicidad, según sus objetivos.

- **La promoción de actividades entre los gobiernos locales y la comunidad académica de la zona.** Las actividades de intercambio llevadas a cabo entre las instituciones participantes han consolidado un buen vínculo, facilitando la coordinación en próximas etapas. Un claro ejemplo de ello ha sido la asociación entre el municipio de Piracicaba y la Universidad de San Pablo, a través del Centro de Energía Nuclear en Agricultura, localizado en Piracicaba. La asociación con centros de investigaciones locales se considera de gran ayuda para la resolución de situaciones fuera de la rutina establecida.
- **La relevancia de las actividades educativas.** Activa participación de los municipios apoyando a escuelas locales.
- **La importancia de la participación comunitaria.** Como parte de las estrategias municipales para el monitoreo de la calidad del agua. En el caso de Montevideo se puso de manifiesto un fuerte potencial de colaboración entre las autoridades municipales y los productores rurales para la implementación de un programa de monitoreo específico.

Debe notarse que la utilización de ensayos de toxicidad por miembros de la comunidad no fue realizada, con la excepción de las actividades educativas llevadas a cabo a través del programa *Aquatox*. Con base en la experiencia con los laboratorios municipales, se puede concluir que un monitoreo directo, por parte de la comunidad, aplicando esta batería de ensayos de toxicidad, requeriría respaldo del continuo de una institución con la capacidad técnica e infraestructura adecuada (laboratorio municipal o académico, organización no gubernamental, etc.).

De esta primera experiencia de transferencia tecnológica se pone de manifiesto la necesidad e importancia de un plan de monitoreo periódico de la calidad de las aguas utilizadas para abastecimiento humano y riego, siendo los ensayos de toxicidad una herramienta de gran utilidad. Se recomienda a los municipios u otros organismos interesados en esta tecnología, asirse de un asesoramiento adecuado que oriente la resolución de dificultades técnicas, como por ejemplo, en el mantenimiento de los cultivos y confirmación de resultados, entre otros, mientras se logre la experiencia necesaria. Esto puede generarse a través de actividades coordinadas con universidades y centros de investigación locales.

8.2.5 Consolidación de una Red Interinstitucional de Bioensayos en Uruguay

Otra aplicación asociada al uso de la batería de bioensayos estandarizada por la red *WaterTox*, se relaciona con el trabajo desarrollado por la red uruguaya interinstitucional de bioensayos, llevada a cabo posterior al proyecto de municipios. Esta iniciativa fue financiada por el Programa Ecosistemas y Salud Humana (EcoSalud-IDRC) y el Secretariado de Manejo del Medio Ambiente (SEMA-EMS) en el año 2002, y contó con el asesoramiento técnico del Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIMA), Universidad de la Plata, en el acompañamiento de transferencia tecnológica.

Su objetivo principal fue apoyar la consolidación de la red interinstitucional para generar una base de datos científicos que permitiera incorporar a la normativa ambiental nacional, aspectos biológicos. La red fue formada por cuatro instituciones

nacionales: la Dirección Nacional de Medio Ambiente (Dinama), la Intendencia Municipal de Montevideo (IMM), el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (Latu) y la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República. El trabajo de la red constituyó el primer antecedente formal para ese país acerca de la evaluación toxicológica de los efluentes de origen industrial, a través de una batería de ensayos de toxicidad (Castro Scarone *et al.*, 2002).

Como parte del trabajo se analizaron treinta muestras simples de efluentes industriales líquidos, vertidos ya sea a cursos naturales, al colector de alcantarillado público o infiltrados al terreno. Las mismas fueron recolectadas por técnicos de la IMM y la Dinama, con una frecuencia aproximada de dos muestras por semana, durante un periodo de cuatro meses. La selección de los efluentes industriales se basó en un estudio previo realizado en el marco del Plan de Saneamiento Urbano (fase III), para la IMM (Consortio Multiservice-Seinco-Tahal, 2001). Asimismo, se contó con el asesoramiento complementario de la Unidad de Efluentes Industriales de la IMM y de la División Control de Emisiones de la Dinama-MVOTMA. En el citado estudio se definen establecimientos de control prioritario, que aportan en su conjunto más del 80% de la contaminación total en el departamento de Montevideo. Este aporte es realizado por un grupo de veinte establecimientos, cuyos vertidos caracterizan los siguientes porcentajes del total de vertimientos industriales de la zona:

- El 60% del caudal total vertido.
- Cerca del 90% del vertido de grasas y DBO.
- Más del 80% del vertido de sulfuros.
- Más del 90% del vertido de metales pesados.

El estudio se realizó empleando una batería de ensayos de toxicidad compuesta por la bacteria luminiscente (*Vibrio fischeri*, antes *Photobacterium phosphoreum*, sistema *Microtox*), un pez (*Cnesterodon decemmaculatus*) y dos de los ensayos descritos en este libro (ensayos con el cnidario, *Hydra attenuata* y el cladóceros, *Daphnia magna*). El análisis de resultados incluyó la evaluación de valores de concentraciones letales o inhibitorias (CL_{50} , CI_{50}).

Los análisis mostraron que para el 90% de los efluentes se obtuvieron respuestas de toxicidad positiva; de ellos el 84% se clasificó como muy tóxico (CE o CI_{50} entre 51-75%), para por lo menos una de las cuatro especies ensayadas, y como moderadamente tóxico o tóxico, el restante 16% (CE o CL_{50} entre 25-50%), de acuerdo con los criterios de clasificación de la US EPA.

En la mayoría de los efluentes con toxicidad positiva se observó que la respuesta de los distintos organismos a una misma muestra no era siempre reiterativa, sino más bien complementaria. Estos patrones de respuesta obedecen a las diferencias de la sensibilidad de las especies de prueba. En algunas ocasiones, mientras que algunos de los ensayos no mostraban efectos, otros ponían en evidencia la presencia de carga contaminante en la muestra. Solamente en los casos en que el efluente fue en extremo tóxico, la respuesta positiva fue homogénea para todas las especies de prueba, así como en caso de efluentes sin carga contaminante, la respuesta negativa (sin efectos) fue generalizada para los distintos ensayos.

Este comportamiento de la respuesta pone de manifiesto la importancia de que las evaluaciones toxicológicas se realicen con base en el empleo de una batería de

pruebas, cuyo patrón de sensibilidad complementa y permita estimar con mayor confianza la peligrosidad de una muestra o el riesgo al ambiente.

El análisis estadístico mostró que *Hydra attenuata* fue significativamente más sensible a la carga contaminante presente en el conjunto de muestras evaluadas, que el resto de los organismos empleados en la batería. El 83% del total de los efluentes analizados, produjeron efectos tóxicos a *Hydra attenuata* mientras que para *Daphnia magna*, *Cnesterodon decemmaculatus* y *Vibrio fischeri*, el porcentaje de efluentes con efectos tóxicos fue del 70, 63 y 60%, respectivamente.

Con base en información adicional sobre la caracterización físico-química de los efluentes que presentaron toxicidad, se encontró que la mayoría (65%), no cumplía con los estándares de vertido, establecidos en el decreto 253/79 y modificativos, mientras que el 35% restante cumplía con los criterios mencionados. Considerando el tipo de disposición final, 100% de los efluentes que vierten a colector presentaron toxicidad y de éstos, el 57% cumplía con los estándares físico-químicos de vertido establecidos para colectores. Con respecto a los efluentes que vierten a cursos de aguas, el 86% de los mismos fueron tóxicos, y de éstos, sólo el 28% cumplía con la reglamentación vigente.

El estudio concluye que la caracterización físico-química de los efluentes industriales no es suficiente para garantizar la calidad de la descarga, por lo que es necesario que en paralelo se realice su evaluación toxicológica. Se demostró que existe un elevado porcentaje de efluentes que cumplen con la normativa vigente basada exclusivamente en información físico-química y microbiológica; sin embargo, presentan alta toxicidad para las especies evaluadas en la batería de ensayos de toxicidad aplicada.

Los análisis químicos, por sí solos, son rara vez adecuados para evaluaciones ecológicas, a causa de la complejidad cualitativa y cuantitativa de las sustancias presentes, mientras que los sistemas biológicos, por el contrario, integran los efectos de las mezclas complejas de contaminantes. Esto abre un campo de discusión técnica sobre la necesidad de incluir en la normativa información toxicológica, como herramienta complementaria para la evaluación de efluentes descargados al ambiente. (Castro *et al.*, 2002).

REFERENCIAS

- Aquatox®, Red Escolar Internacional sobre la Toxicidad del Agua. <http://www.aquatox.net>
- Castro Scarone, S., Espínola Molledo, J.C., Migues Caramés, D. y Viana Matturro, F., 2002, *Los bioensayos como herramienta de evaluación de la toxicidad de los efluentes industriales en Uruguay*, Informe final, International Development Research Centre (IDRC), File 04464, Canadá.
- Consorcio Multiservice-Seinco-Tahal, 2001, *Evaluación de la contaminación industrial*, Informe final, Plan de Saneamiento Urbano (fase III), Préstamo BID 948/OC-UR.
- Díaz-Báez, M.C., Cruz, L.E., Rodríguez, D., Pérez, W.J. & Vargas, C.M., 2000, "Evaluation of Three Water Concentration Techniques as a Prior Step to Test Acute Toxicity", *Environ. Toxicol.*, 15:345-351.
- Forget, G., Gagnon, P., Sánchez, W.A. & Dutka, B.J., 2000, "Overview of Methods and Results of the Eight Country International Development Research Centre (IDRC) WaterTox Project", *Environm. Toxicol.*, 15: 264-276.
- Ronco A., Gagnon, P., Díaz-Báez M.C., Arkhipchuk V., Castillo G., Castillo L.E., Dutka B.J., Pica-Granados, Y., Srivastava R.C. & Sánchez A., 2002, "Overview of Results from the Watertox Intercalibration and Environmental Testing Phase II Program: Part I, Statistical Analysis of Blind Sample Testing", *Jour. Envir.Toxicology*, Vol. 17, No.3, pp. 232-240.

This page intentionally left blank

Anexo fotográfico

This page intentionally left blank



Figura 3.1. y figura 3.2. Vista general de un laboratorio de bioensayos.



Figura 3.3. Zona para separación de neonatos de *D. magna*.



Figura 3.4. Cultivo masivo de algas.



Figura 3.5. Zona de crecimiento de algas.



Figura 3.6. Cámara casera para las pruebas con algas.



Figura 3.7. Microscopio y accesorios para conteo de algas.



Figura 4.2.1. Vista general de *Daphnia magna*.

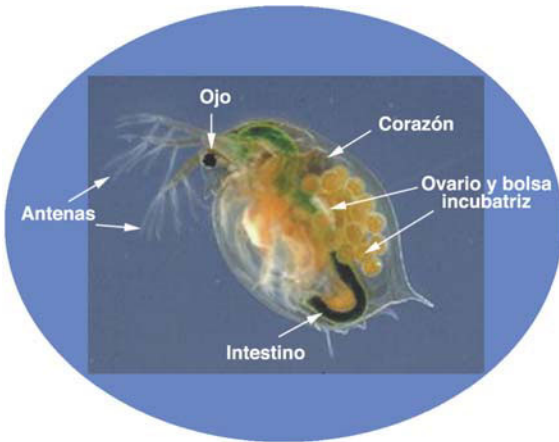


Figura 4.2.2. Principales rasgos morfológicos de *Daphnia magna*.



Figura 4.3.2. Preparación de Artemia para alimentación.

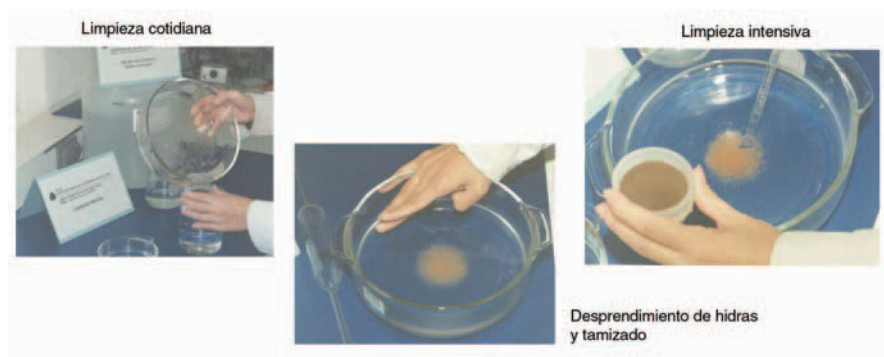


Figura 4.3.3. Limpieza de Hydra attenuata.

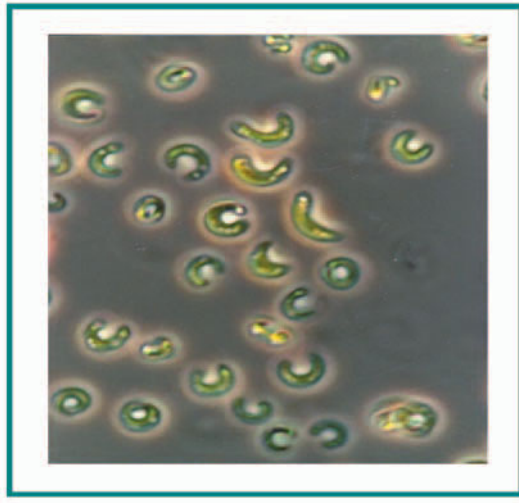


Figura 4.5.1. Microfotografía de *Selenastrum capricornutum*.



Figura 8.2.1. Actividades del taller Transferencia de tecnología de ensayos de toxicidad a municipalidades de América Latina, Argentina, 14-21 de mayo, 2000.



Figura 8.2.2. Sala de ensayos de toxicidad de Pudahuel (etapa de construcción y vistas interiores).



Fig. 8.2.3. Actividades con escolares en Piracicaba, Montevideo y Mosquera.



Figura 8.2.4. Actividades comunitarias en el proyecto de la intendencia municipal de Montevideo.



Figura 8.2.5. Taller final, agosto 31-septiembre 1º, 2001, Québec.



Figura 8.2.7. Proyecto Parque Ecológico Municipal de La Plata (muestreo y aplicación de ensayos de toxicidad por niños).



Figura 8.2.8. Muestreo superficial, municipalidad de Pudahuel.



Figura 8.2.9. Muestreo nacimiento de la ciénaga Gualí-Tres esquinas, Mosquera.

El libro *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*, se terminó de imprimir el mes de octubre de 2004, en los talleres de Carlos Alvarado Bremmer-Impresión y Diseño, Av. Río Churubusco 2005, Col. El Rodeo, Delegación Iztacalco, 08510, México, D.F. La edición consta de mil ejemplares.