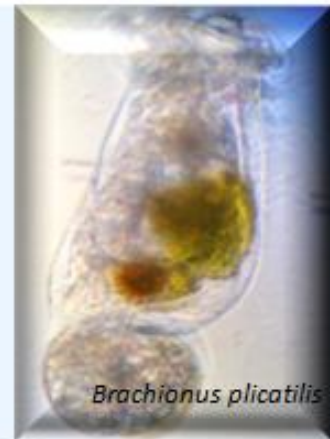
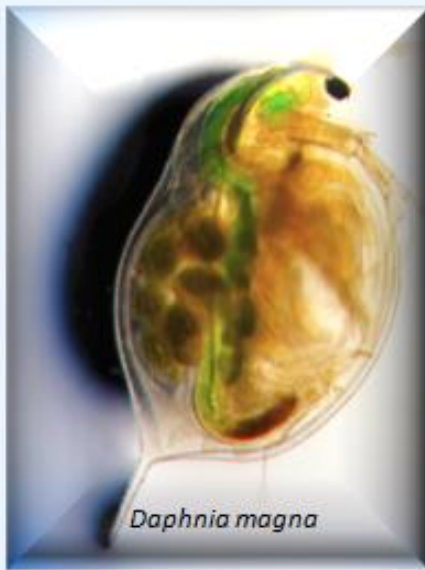
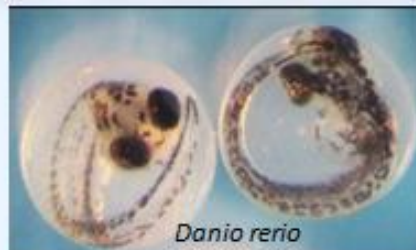


INFORME FINAL 2013 Proyecto TC-1324.1

Herramientas biológicas para el análisis de toxicidad y detección de efectos asociados a contaminantes, en sistemas acuáticos epicontinentales, costeros y aguas de uso antropogénico. Desarrollo, adaptación y calibración de tecnologías (3ª Parte).



Ciclo embrionario



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

Herramientas biológicas para el análisis de toxicidad y detección de efectos asociados a contaminantes, en sistemas acuáticos epicontinentales. Aplicación, adaptación, y validación de tecnologías (3ra. parte)

INFORME FINAL 2013

PROYECTO INTERNO TC 1324.1

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

JEFE DE PROYECTO: M.C. Yolanda Pica Granados

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

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN	9-17
2. OBJETIVO	18
2. OBJETIVO	18
3. METODOLOGÍAS	18- 24
3.1 Pruebas con <i>Danio rerio</i> .	
3.1.1 Mantenimiento de adultos reproductores	18
3.1.2 Obtención de huevos	19-20
3.1.3 Prueba de alteración del desarrollo embrionario (ADE) con huevos de <i>D. rerio</i>	20 -22
3.1.4. Preparación de la prueba	23-24
3.2 Prueba de reproducción y ciclo gestacional con <i>Daphnia magna</i> .	25 -31
3.2.1 Cultivo y obtención de neonatos	29
3.2.2 Preparación y desarrollo de la prueba	30-31
3.3 Desarrollo del método de prueba con <i>Brachionus plicatilis</i>	31-33
3.3.1 Determinación del proceso reproductivo de rotífero <i>B. plicatilis</i>	32.33
3.4 Desarrollo de pruebas con algas inmoilizadas	33-35
3.5 Adaptación del método de análisis de toxicidad aguda con <i>Vibrio fischeri</i> a protocolo ISO y sus repercusiones técnicas.	36-37

	Página
4. RESULTADOS	38 –65
4.1 Pruebas de campo para la calibración de la prueba de alteración del desarrollo embrionario (ADE) con huevos de <i>D. rerio</i>	38-44
4.1.1 Prueba de campo en la presa Colorines	38-40
4.1.2 Prueba de campo. Análisis del efluente de una planta de tratamiento de la industria farmacéutica	41-44
4.2 Pruebas de campo para la calibración de la prueba de reproducción y ciclo gestacional con <i>Daphnia magna</i>	43-53
4.2.1 Prueba de campo en la presa Colorines	43-48
4.2.2 Prueba de campo. Análisis del efluente de una planta de tratamiento de la industria farmacéutica	49-53
4.3 Análisis de ciclo reproductivo de <i>Brachionus plicatilis</i>	53-57
4.3.1 Comportamiento del crecimiento del cultivo del rotífero <i>B. plicatilis</i>	53-54
4.3.2 Verificación de las fases de desarrollo del rotífero <i>B. plicatilis</i>	54-55
4.3.3 Desarrollo de un sistema para obtención de rotíferos en fase R3	55-57
4.4 Desarrollo de prototipo de cámara de exposición para pruebas <i>in situ</i> con algas inmovilizadas	58-60
4.5 Adaptaciones metodológicas para la actualización de la NMX-AA:112.SCFI, Protocolo de prueba para la evaluación de toxicidad aguda con <i>Vibrio fischeri</i>	61-65

	Página
5. CONCLUSIONES	65-66
6. BIBLIOGRAFÍA	67-69
7. ANEXOS	70
7.1 ANEXO A. Producción Científica (Publicación de artículo en revista arbitrada)	
7.2 ANEXO B. Desarrollo Tecnológico Propuesta de protocolo de prueba para análisis de toxicidad aguda y de embriotoxicidad con <i>Danio rerio</i>	
7.3 ANEXO C1. Cartas de participación MODERN WATER, INC., para la valoración del desempeño de la solución FDB (Freeze Dried Bacteria Solution).Calibración	
7.3 ANEXO C2. Diseños experimentales para la calibración y valoración MODERN WATER	
7.4 ANEXO D. Desarrollo Tecnológico . Anteproyecto para la actualización del protocolo de norma para consulta pública Norma Mexicana NMX –AA-112-SCFI	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Etapas de desarrollo de los diversos protocolos y adaptaciones metodológicas	
Tabla 2. Criterios para la determinación de efectos en el desarrollo embrionario de peces, de efecto de acuerdo a la OECD (2013)	
Tabla 3. Criterios considerados para la determinación de efectos crónicos en el desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> Características físicas de los cristales obtenidos de los principios activos de fármacos.	
Tabla 4. Criterios para la determinación de efectos en la reproducción del cladóceros <i>Daphnia magna</i> .	25
Tabla 5. Resultados del análisis de desarrollo embrionario con <i>Danio rerio</i> para las aguas de una PTAR de la industria farmacéutica	41
Tabla 6. (a y b) Resultados de pruebas de toxicidad crónica. Efectos en la reproducción con <i>Daphnia magna</i>	
Tabla 7. Resultados de pruebas de toxicidad aguda en agua de la presa Colorines	
Tabla 8. Número de huevos y neonatos observados en el ciclo gestacional de <i>Daphnia magna</i> . Comparativo de la muestra del efluente de la PTAR, respecto a la prueba testigo o control	
Tabla 9. Criterios para la determinación de efectos en la reproducción de los cladóceros <i>Daphnia magna</i> . Comparación con los resultados de la prueba control	51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista de huevos viables y no viables	19
Figura 2. Rasgos morfológicos del desarrollo embrionario empleados como indicadores de efectos asociados a las formas de acción de los contaminantes emergentes	22
Figura 3. Estadio de Gástrula (<i>Danio rerio</i>)	23
Figura 4. Ciclo del desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> calibrado por IMTA	24
Figura 5. Observación de grasa ovárica.	26
Figura 6. Ciclo del desarrollo gestacional de <i>Daphnia magna</i> calibrado por IMTA	28
Figura 7. Cultivo del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i>	32
Figura 8. Preparación de perlas de alginato con algas inmovilizadas empleadas para probar el funcionamiento de un prototipo de cámara de exposición	35
Figura 9. Formación de la gástrula y definición del polo animal y vegetal en huevos de <i>Danio rerio</i> a las 7 h de exposición a las muestras de la presa Colorines.	38
Figura 10. Desarrollo gestacional del embrión de <i>Danio rerio</i> a las 25 h de exposición a las muestras de la presa Colorines.	39
Figura 11.. Alevines y fase terminal de los embriones de <i>Danio rerio</i> a las 72 h de exposición a las muestras de la presa Colorines.	40
Figura 12. Imágenes del desarrollo embrionario de organismos expuestos al efluente de la PTAR de una industria farmacéutica, contrastadas con el control	42
Figura 13. Rasgos anómalos de la reproducción en hembras de <i>Daphnia magna</i> expuestas a agua de la presa Colorines	44
Figura 14. Frecuencia del ciclo reproductivo de hembras de <i>Daphnia magna</i> , expuestas a aguas de la presa Colorines	45
Figura 15. Tendencia de la tasa reproductiva de hembras expuestas al agua de la presa Colorines	47

Figura 16. Comparación del comportamiento reproductivo de <i>Daphnia magna</i> entre el sistema control y la muestra del efluente de una PTAR de la industria farmacéutica	50
Figura 17. Imágenes de organismos expuestos al efluente de la PTAR de la industria farmacéutica, contrastadas con el control	52
Figura 18. Crecimiento del cultivo de <i>B. plicatilis</i> y la diferencia de su distribución en el cultivo.	54
Figura 19. Organismos en diferentes fases de madurez en el cultivo de <i>B. plicatilis</i>	55
Figura 20. Imágenes de hembras en fase R3 y rasgos de eclosión de huevos adheridos	56
Figura 21. Diseño del Rotifases para aislamiento de hembras en fase R3 del rotífero <i>B. plicatilis</i>	57
Figura 22. Cámara de exposición conteniendo perlas de alginato	58
Figura 23. Montaje de cámara de exposición	58
Figura 24. Resultados de la exposición de las algas inmovilizadas contenidas en la cámara de exposición al Cu II.	59
Figura 25. Comportamiento de la respuesta de <i>Vibrio fischeri</i> a metales y compuestos orgánicos asociado al uso de medio de dilución de distinta composición.	61
Figura 26. Modelo Metodológico para la prueba presuntiva o exploratoria	62
Figura 27. Modelo metodológico para la prueba definitiva con concentración inicial del 100%	62
Figura 28. Modelo metodológico para la prueba definitiva con concentración inicial del 45 o 50%	63

Herramientas biológicas para el análisis de toxicidad y detección de efectos asociados a contaminantes, en sistemas acuáticos epicontinentales. Aplicación, adaptación, y validación de tecnologías (3ra. parte)

PROYECTO INTERNO TC 1324.1

1. INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

Para cada grupo de herramientas de medición, es una condición indispensable lograr métodos de evaluación confiables, calibrados, analíticamente robustos y suficientemente sensibles. Con los siguientes propósitos: detectar cualquier forma de acción de los xenobióticos en los sistemas vivos y lograr evidencias de los efectos más relevantes para la construcción de una matriz de información, que ayude en el discernimiento de las causas, relevancia y efectos ambientales

(Zacharewski, 1997; Ankley *et al.*, 1998; Routledge *et al.*, 1998; Kortenkamp, 1999; Matsui, 2000; Tanaka *et al.*, 2001; Witters *et al.*, 2001; Kolpin *et al.*, 2002).

El presente proyecto dio continuidad al iniciado en el año 2011 sobre el desarrollo y adaptación de diversas herramientas biológicas, que permitan la evaluación de los posibles efectos de la amplia gama de xenobióticos que actualmente residen en los ecosistemas, incluidos tanto los contaminantes convencionales enlistados en normas, como los compuestos emergentes.

El proyecto consideró diversas líneas o desarrollos experimentales, algunos de ellos, orientados al establecimiento de técnicas que permitan atender problemas ambientales que son potencialmente graves en México. También incluyó desarrollos y adaptaciones para la transformación de los procedimientos de prueba, para la evaluación de la toxicidad que conforman las Normas Mexicanas (NMX-AA-089-SCFI-1995 y NMX-AA-112-SCFI-1995) en apoyo a la CONAGUA, ya que el marco normativo debía adaptarse al modelo de las normas ISO. Lo anterior, requirió la transformación de formas de cultivo, mantenimiento de organismos, protocolos de prueba y la generación de nuevos criterios para el control de calidad analítica en los métodos, para la evaluación de toxicidad aguda para *Daphnia magna* y *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*).

Los compuestos emergentes, no generan efectos que puedan ser evaluados por medio de las pruebas de toxicidad aguda convencionales. Debido a que su forma de acción no produce mortalidad ni efectos de corto plazo, tienden a expresarse a lo largo del ciclo de vida de una especie, afectando la reproducción y el funcionamiento general de su metabolismo, al interactuar (estimulando o inhibiendo) con los sistemas hormonales que son comandados por las glándulas del sistema endócrino. Estas alteraciones producen cambios observables en organismos que presentan una complejidad orgánica dependiente de funciones hormonales, como es el caso de vertebrados, algunos grupos de invertebrados y plantas, por lo que la presencia de esta clase de compuestos en los cuerpos de agua, solo puede verificarse por medio del empleo de pruebas crónicas de reproducción, de desarrollo gestacional, o empleando indicadores bioquímicos y/o moleculares relacionados con la función hormonal.

A nivel internacional, las agencias de Protección Ambiental tales como EPA y la Comunidad Europea, tiene clasificados a un amplio grupo de sustancias emergentes y Agentes de Disfunción Endócrina (ADE), originadas tanto en fuentes industriales, como aquellas que son constituyentes de productos de cuidado personal, de alimentos industrializados, fármacos y plaguicidas, entre otros, sustancias que son de alto riesgo ambiental y a la salud, así como de orden prioritario para su control (EPA 1980, European Commission, IARC).

Debido a la relevancia de estas sustancias, el proyecto incluyó la adaptación metodológica de dos procedimientos de prueba que permitieran establecer el análisis y ampliar los alcances de las pruebas de reproducción convencionales, clasificadas como pruebas crónicas. Para ello, se efectuó la búsqueda de nuevos indicadores de efecto, asociados a la forma de acción de compuestos emergentes, integrando el análisis de los ciclos reproductivos y gestacionales de dos especies de prueba, del pez *Danio rerio* y del cladóceros *Daphnia magna*.

El primero de estos métodos fue calibrado en el año 2012 desarrollando pruebas con fármacos, y en el año 2013 el método fue calibrado aplicándolo para la evaluación de muestras de campo. El desarrollo del método para el uso del ciclo gestacional con *Daphnia magna* se inició en 2013 con el análisis de muestras ambientales.

Así mismo, el proyecto dio continuidad a los avances logrados por la línea de trabajo a lo largo de la última década, entre los que se cuentan las pruebas de toxicidad con *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Panagrellus redivivus*, *Hydra attenuata*, entre otros, modelos funcionales o pruebas de detección de toxicidad aguda, que en la mayoría de los casos ponen en evidencia la presencia de contaminantes que afectan de forma terminal a los organismos, ya sea por su dosis o por la cinética en que opera una vez dentro del organismo expuesto. Esta clase de pruebas han sido muy útiles en el monitoreo ambiental, ya que con ellas, pueden establecerse condiciones de descarga que minimicen el daño a cuerpos receptores, así como la construcción de bases de datos para la evaluación inicial de sustancias químicas de uso ambiental. De forma conjunta, las pruebas crónicas desarrolladas en este proyecto, permiten estructurar una batería de prueba completa capaz de detectar tanto efectos agudos como crónicos, asociados tanto a contaminantes convencionales como emergentes, gracias a la diversidad de metabolismos incorporada en dicha batería, así como también a la variedad de indicadores de efecto involucrados.

En cuanto a las pruebas de evaluación de toxicidad *in situ* con *Pseudokirchneriella subcapitata*, el desarrollo se inició en el año 2011, en el que se logró la selección y formulación del medio de alginato, para lograr la porosidad adecuada que permitiera el contacto de los contaminantes con las algas adsorbidas en el medio inmovilizante. Durante el 2012, se contrastó la sensibilidad de las algas inmovilizadas con aquellas en estado libre, aplicando el método acreditado en IMTA para la detección de toxicidad usando diversos tóxicos, y en 2013 se trabajó sobre el diseño de la cámara de exposición para su uso en cuerpos de agua, generándose el primer prototipo y evaluando su respuesta al tóxico de referencia de uso regular en pruebas en laboratorio.

Para 2013, también se dio continuidad al desarrollo del método de prueba para análisis de aguas salobres y/o costeras con el rotífero *Brachionus plicatilis*,

organismo que se distribuye en las aguas costeras de México. Su cultivo ha resultado factible, bajo las adaptaciones efectuadas en 2012 (previas al presente proyecto), así como por su probable sensibilidad documentada en algunos reportes de la literatura internacional (EPA, 1985; Snell & Persoone, 1989; Alayo y Iannacone, 2002). En esta etapa del estudio se pretendía encontrar una estrategia para separar a los organismos recién nacidos de los adultos, considerando que para otras especies de rotíferos de agua dulce son los neonatos los que se emplean para la determinación de efectos tóxicos, sin embargo, en el caso de esta especie, las pautas metodológicas sugeridas en diversos artículos no fueron funcionales, por lo que fue necesario comprender primero el ciclo reproductivo de la especie para determinar el patrón y las alternativas adecuadas a la especie *Brachionus plicatilis*.

Una tarea más que se sumó al presente proyecto fue la adaptación metodológica a norma tipo ISO de la NMX-AA-112-SCFI, prueba de toxicidad aguda con *Vibrio fischeri* para la transformación del protocolo, cambio en los controles de calidad y la elaboración del protocolo para su publicación y puesta a consideración del comité de normas para su consulta pública.

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

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

En la tabla 1 se observan los aspectos que fueron abordados para los años 2011, 2012, y 2013. Los avances y trabajos efectuados durante 2013 son los temas que constituyen el contenido de este informe así como los productos entregables, que consisten en 1 artículo y 2 desarrollos tecnológicos, uno correspondiente a un procedimiento de prueba calibrado y listo para su uso en investigación, y el segundo, correspondiente a la evaluación de un protocolo modificado que permitió la transformación del método de prueba de la NMX-AA-112-SCFI, prueba de toxicidad aguda con *Vibrio fischeri*, que se ha sometido al comité de normas para consulta pública.

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

Prueba	Fases de desarrollo o adaptación tecnológica				
	Optimización del cultivo	Montaje procedimiento de prueba	Calibración interna	Ámbito de sensibilidad ^a . Identificación de nuevos Indicadores de efecto ^b .	Pruebas de campo ^c . Elaboración de protocolo de prueba ^d . o de prototipo ^e
<i>Danio rerio</i> letalidad	2009	2010	2010	2011 ^a .	2012 ^d .-2013 ^c
<i>Danio rerio</i> desarrollo embrionario	2009	2011	2011	2012 ^{a,b} .	2013 ^{d, c}
<i>P. subcapitata</i> algas inmobilizadas	R	2010 - 2011	2011	2012 ^a .	2013 ^e
<i>Daphnia magna</i> , prueba de reproducción y ciclo gestacional	-	2013	2013	2013 ^b	2013 ^c
Desarrollo del método de prueba con <i>Brachionus plicatilis</i>	2012	2013			
Adaptación metodológica para normas tipo ISO (Apoyo a CONAGUA, generación de NMX y calibración para alta en IMTA)					
Adaptación a ISO NMX-087-AA <i>Daphnia magna</i>	2011-2012	2011-2012	2011-2012	NA	2012 ^d
Adaptación a ISO NMX-112-AA <i>Vibrio fischeri</i>	R	2012	2012	2013 ^a	2013 ^d

R= Resuelto previamente

1.1 Contexto Internacional.

El creciente interés por la aplicación de pruebas biológicas se ha universalizado, y actualmente, operan requerimientos regulatorios que incluyen datos relacionados a pruebas de toxicidad con peces e invertebrados, especialmente en toma de decisiones relacionadas a la evaluación de riesgo ambiental y clasificación de peligrosidad. Por ejemplo, en la Unión Europea, los requerimientos para nuevas sustancias son incluidas en los anexos del Council Directored 67/548/EEC en apego a las leyes, regulaciones y procedimientos administrativos que aplican a la clasificación de sustancias de uso ambiental que se suponen peligrosas (EC, 1967). En estos casos, la cantidad de datos solicitados relacionados con posibles efectos biológicos o de seguridad ambiental, se incrementan en función de la cantidad de la sustancia puesta en el mercado, y son sujetas a esta solicitud todas

aquellas sustancias cuya producción excede de una tonelada por año (European Commission, 1992).

En estas disposiciones internacionales, creadas para regular la autorización de uso y producción de nuevas sustancias, por lo general, se incluye un grupo de pruebas de evaluación de efectos biológicos como son: toxicidad aguda con dáfidos (*Daphnia magna* CL₅₀ a 48h), crecimiento o inhibición de algas (*Pseudokirchneriella subcapitata* CE₅₀ a 96h) y mortalidad en peces (CL₅₀ a 96h). Una vez que estas evaluaciones son realizadas por parte de los productores, los datos son manejados por la European Chemical Bureau (ECB), de Italia, para estimar las dosis de seguridad aceptables, que por lo regular, se basan en predicciones de riesgo que tienen por objeto establecer la dosis de efecto no observable (NOEC). Estas dosis y la clasificación de peligrosidad que se haga de la sustancia, son incorporadas a la Base de Datos de la ECB, desde donde es controlada su producción y comercialización.

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

Actualmente las regulaciones en muchos países de Europa, Estados Unidos y Canadá, requieren de evaluaciones de toxicidad aguda y crónica con peces e invertebrados, tanto para la autorización de producción y comercialización internacional de sustancias puras (empleadas principalmente como materia prima en la industria), como para el control ambiental, basado en la evaluación de riesgo y en los programas de control de descargas. Éstos tienen como fin último y de

largo plazo la mejora y vigilancia de la calidad de los ambientes de producción alimentaria, ya que, de ellos depende la sanidad de los productos de consumo que se obtienen.

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

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

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

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

Dada la importancia de los peces en el monitoreo de la contaminación a nivel internacional, se han implementado regulaciones y guías metodológicas para la aplicación y manejo de pruebas de toxicidad con peces como son las de la OECD, mismas que se diversifican en guías para prueba aguda (OECD 203), evaluación de toxicidad sobre estadios de desarrollo (OECD 210), prueba de toxicidad con alevines (OECD 212) y de crecimiento con juveniles (OECD 215). Estas guías se encuentran en activa transformación, en el intento de lograr con ellas métodos adecuados para abordar los problemas ambientales asociados a las sustancias químicas que actualmente aquejan a muchos países, y con un enfoque cada vez

mayor a la aplicación de indicadores que permita hacer un pronóstico de largo plazo, que ponga en evidencia las formas de acción de los contaminantes emergentes y agentes de disfunción endocrina, los cuales por lo general, están contenidos en mezclas complejas.

Con este objetivo, los grupos de expertos de la OECD han desarrollado y modificado protocolos de prueba incorporando respuestas de evaluación (end points) cada vez más sofisticadas, pero a su vez, más útiles para el pronóstico y control de sustancias, tal es el caso del uso de técnicas embrionarias y moleculares como PCR, que permite la identificación de errores en la secuenciación genómica asociada a una disfunción de órganos, sistemas o incluso de una función como es la reproducción (Sumpter, 1995, Muncke, 2007).

Con base en el escenario descrito anteriormente se consideró de gran relevancia incursionar en la instrumentación y adecuación de dos modelos funcionales con pez cebra *Danio rerio*, a fin de adaptar los protocolos y someter a prueba cada parte de su desarrollo, con el fin de lograr el establecimiento del método de prueba dentro de un marco de gestión de la calidad.

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

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

2. OBJETIVO

Desarrollar, adaptar y aplicar metodologías basadas en la respuesta biológica para la detección de efectos asociados a contaminantes convencionales y emergentes en ambientes acuáticos, que sean de utilidad en estudios ecotoxicológicos y de evaluación de riesgo ambiental.

3. METODOLOGÍA

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

3.1 Pruebas con *Danio rerio*.

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

3.1.1 Mantenimiento de adultos reproductores

El cultivo se mantiene en agua dulce natural filtrada para eliminar carga orgánica o residuos de cloro, debe tener una dureza de 80 a 100 mg/L como CaCO₃).

Los organismos empleados fueron obtenidos a partir de cultivos de laboratorio, y mantenidos en condiciones controladas a 25 ±2 °C, con un fotoperíodo de 16h luz/8h oscuridad, bajo una intensidad luminosa de 1000 lux, y alimentados dos veces al día con alimento en hojuela balanceado JBL Novogrand a una proporción de 0.3g/20 organismos, y suministro de alimento vivo (*Artemia* sp) cada tercer día.

Los peces adultos reproductores se mantuvieron en acuarios de 40L, separados hembras de machos, con una densidad poblacional de no más de 20 organismos

por acuario. Se empleó agua filtrada del cárcamo mediante sistema en línea para la eliminación de residuos orgánicos, cloro, algas y bacterias.

3.1.2 Obtención de huevos.

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

Los huevos fecundados escapan de la depredación de los padres al atravesar las paredes de la canasta plástica y se depositan en el fondo del acuario o en un receptor de huevos o refractario previamente desinfectado que ocupa el fondo. Por la mañana, los huevos fecundados se sacan del acuario de apareamiento, ya sea por sifoneo o extrayendo el recipiente receptor, para su limpieza y desinfección empleando medio E3 (Muncke y Eggen, 2006).

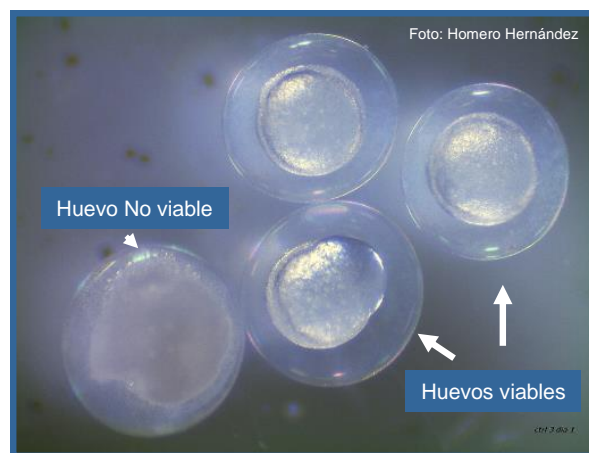


Figura 1. Vista de huevos viables y no viables

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

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

La prueba de desarrollo embrionario con *Danio rerio* se efectuó con base el protocolo de la OECD 236 del 2013 considerando las pautas de otros procedimientos que le son comunes United States Environmental Protection Agency (USEPA, 1996). Fish acute toxicity test, freshwater and marine. Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.1075. EPA 712-C-96-118, y OECD 212, y 210). Este procedimiento se enfoca a determinar efectos agudos en embriones, por lo que se da seguimiento a las alteraciones del desarrollo de tipo letal, las cuales son básicamente cuatro, cada una se va manifestando en distintos momentos del ciclo embrionario de acuerdo a lo indicado en la tabla 2.

Adicional a estos rasgos de letalidad, algunos autores como McGrath, (2012) y Amico y colaboradores (2012), consideraron que el desarrollo embrionario de *Danio rerio* y el uso de otros indicadores de daño de tipo crónico, son una herramienta de gran utilidad en estudios de embrio-toxicidad de drogas y sustancias químicas, por lo que, el método de embrio letalidad debe complementarse integrando nuevos indicadores que pongan en evidencia esta clase de efectos.

Tabla 2. Criterios para la determinación de efectos en el desarrollo embrionario de peces, de efecto de acuerdo a la OECD (2013)

Indicador de efecto	Edad de desarrollo						
	4h	8h	12 h	16h	24 h	36 h	48 h
1. Huevos coagulados	+	+	+	+	+	+	+
2. Inhibición de la formación de somitas				+	+	+	+
3. La cola se mantiene adherida al saco vitelino					+	+	+
4. Ausencia del latido cardiaco						+	+

Nota: Si cualquiera de los criterios señalados se cumple en el tiempo adecuado del desarrollo (2 a 4) o se presentan huevos coagulados (1), se considera que el embrión está muerto

Actualmente estos rasgos o indicadores de cronicidad no están considerados dentro de los protocolos mencionados, sin embargo, se encuentran en proceso nuevas propuestas y programas de intercalibración internacional entre grupos de investigación, en las que se incluyen aspectos de cronicidad. Estos programas pretenden evaluar la confianza analítica de las nuevas variables, y la pertinencia

de su inclusión de nuevos protocolos, proceso que requerirá de un tiempo razonable.

Tabla 3. Criterios considerados para la determinación de efectos crónicos en el desarrollo embrionario de *Danio rerio*.

Indicador de efecto	Edad de desarrollo								
	4h	8h	12h	16h	24h	36h	48h	72h	< 72h
Observaciones en el embrión									
1. Saco vitelino alterado en tamaño o forma	+	+	+	+	+	+	+	+	
2. Movimiento embrionario (letargo, inmóvil o normal)				+	+	+	+	+	+
3. Formación de edema pericárdico o del ventral del saco vitelino					+	+	+	+	+
4. Formación de ojos. Ubicación, tamaño y pigmentación						+	+	+	+
5. Condición de la cola. Tamaño y estructura						+	+	+	+
6. Pigmentación corporal						+	+	+	+
7. Eclosión en tiempo, desfasada o sin eclosión								+	+
Observaciones sobre el alevín									
8. Movilidad y patrón de nado									+
9. Deformación espinal lateral o dorso ventral (Lordosis).									+
10. Supervivencia después de 5 días de nacidos									+

En IMTA, dando continuidad a las investigaciones de McGrath, (2012) y Amico y colaboradores (2012), se ha instrumentado la metodología y la identificación de indicadores de cronicidad asociados a la presencia de xenobióticos en general, los cuales también responden a la forma de acción de productos farmacéuticos, integrando las variables que se señalan en la tabla 3 y la expresión anatómica puede observarse en la figura 2, la cual incorpora también algunos indicadores sugeridos por dichos autores.

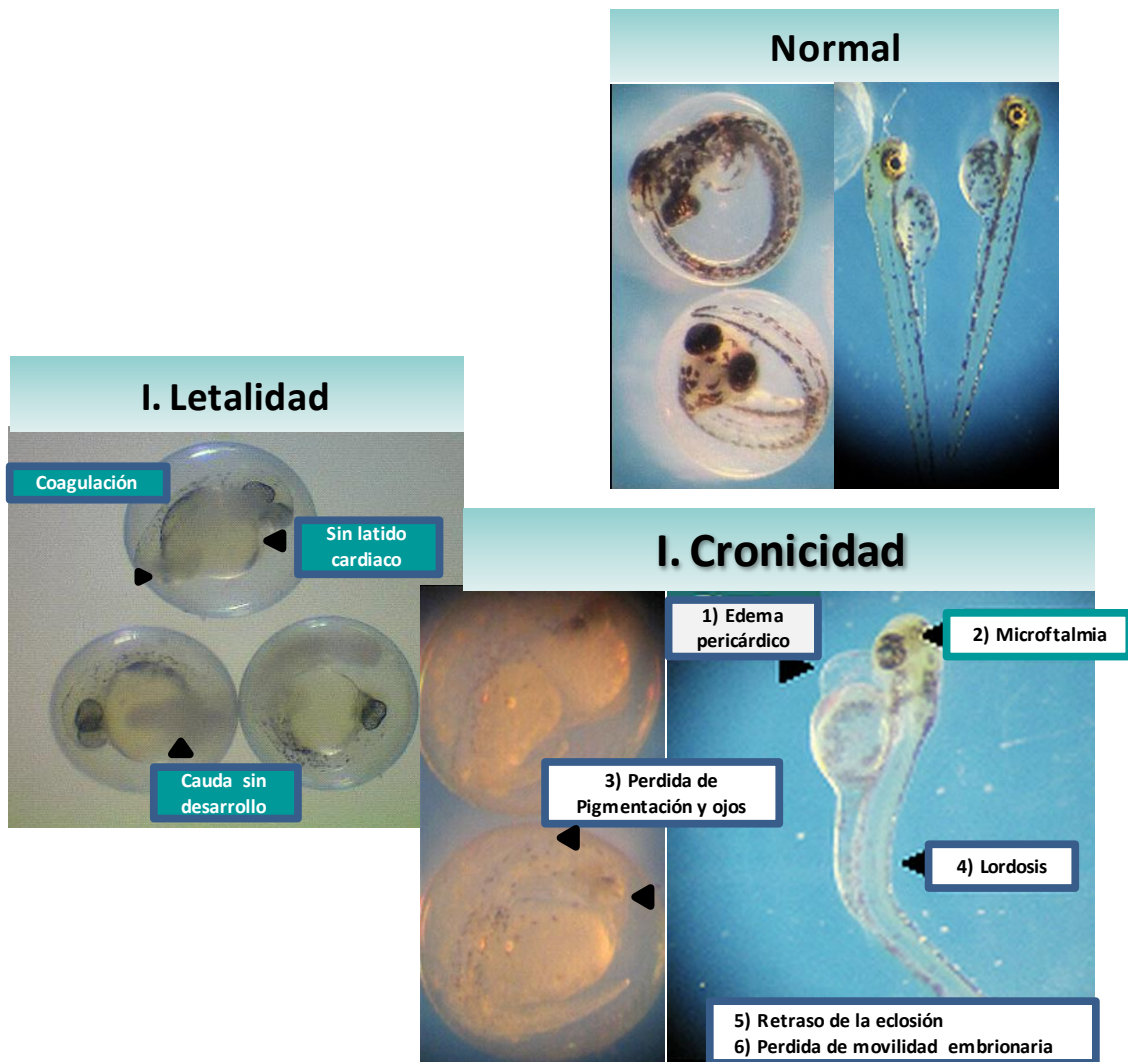


Figura 2. Rasgos morfológicos del desarrollo embrionario empleados como indicadores de efectos asociados a las formas de acción de los contaminantes emergentes

3.1.4 Preparación de la prueba

Partiendo de una muestra problema, se prepara una serie de diluciones empleando agua semidura reconstituida como medio de dilución y un control negativo con el agua antes mencionada. Se emplea un factor de dilución de 1:1 para preparar la serie de concentraciones, o en caso de que se considere necesario, se pueden usar concentraciones diversas que permitan obtener evidencia adecuada de los efectos en el desarrollo.

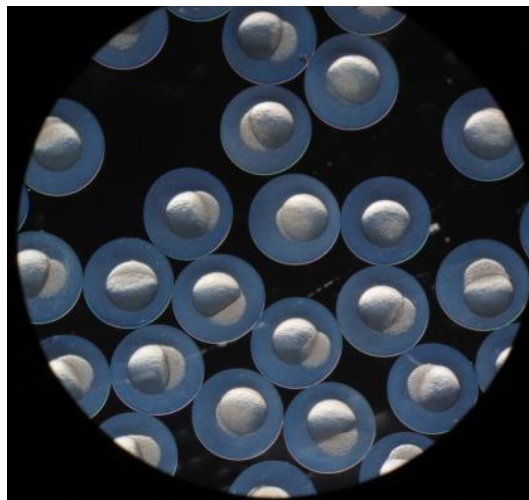


Figura 3. Estado de Gástrula en huevos de *Danio rerio*

El protocolo base de prueba consiste en emplear placas de 16 pozos con capacidad de 4 mL cada pocillo en cuyo interior se colocan 2 mL de la muestra para evaluación o medio de desarrollo (control) por triplicado. En cada pocillo se colocan de 3 a 5 huevos provenientes de un stock recién fecundado que se encuentre en etapas iniciales de desarrollo o gástrula (figura 3).

Después del montaje de la prueba se efectúan revisiones cada dos horas durante las primeras 6 h de la experimentación, a fin de determinar si el estado de los huevos es el adecuado hasta ese momento.

Posteriormente, se llevan a cabo revisiones al microscopio cada 24 h, para revisar la morfología del organismos a fin de determinar alteraciones del desarrollo o retraso del mismo, contrastando con las imágenes obtenidas de la calibración del ciclo de desarrollo efectuado en el laboratorio del IMTA (figura 4) y que fue contrastado con la información documentada en la literatura (Kimmel *et. al.*,1995; Braunbeck & Lammer, 2006), así como el tiempo de eclosión, el cual debe ser de

72 h, bajo condiciones controladas de temperatura (26 °C) y un fotoperiodo luz:oscuridad de 16:8h.

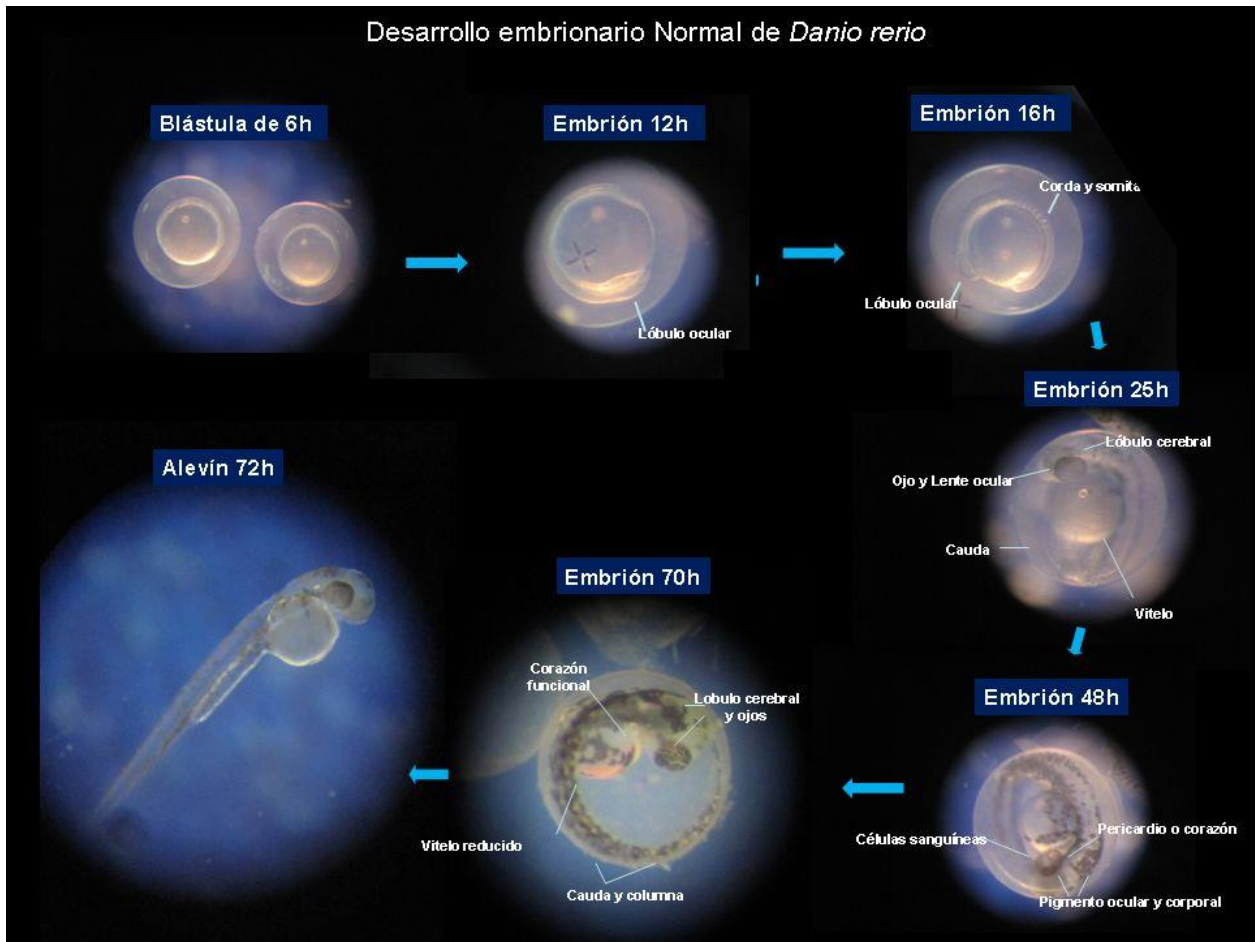


Figura 4. Ciclo del desarrollo embrionario de *Danio rerio* calibrado por IMTA

3.2 Prueba de reproducción y ciclo gestacional con *Daphnia magna* (21 días)

La prueba de reproducción con el cladóceros *Daphnia magna* tiene como base los principios señalados en el método señalado por la OECD 211: *Daphnia magna* Reproduction Test del 2008, y asimismo con base en las estrategias de control de cultivo y manejo del cladóceros, que son explícitas en los protocolos de empleo para la prueba aguda como el de la OECD 202/2004 y la NOM-AA-087-2010.

La prueba de reproducción se ha enfocado a la determinación del efecto que una muestra tiene en la reproducción del cladóceros, verificando los cambios en la producción de neonatos a lo largo de la etapa reproductiva de la daphnia, acotada a los 21 primeros días de vida del cladóceros, contrastando su número con la producción de neonatos observada en una prueba control o testigo.

El análisis efectuado en IMTA además de este indicador integra tres indicadores más (tabla 4) relacionados al ciclo gestacional de los neonatos. Estos indicadores permiten analizar a detalle el proceso reproductivo, determinar el momento del ciclo gestacional o de vida de la hembra reproductora en que el proceso decae, y determinar cuales son las probables deficiencias del organismo asociadas a la reducción en la producción de neonatos.

Tabla 4. Criterios para la determinación de efectos en la reproducción del cladóceros *Daphnia magna*.

	Indicadores	Valor guía
1	Número total de neonatos por hembra (del 7° al 21° día de vida)	>60 neonatos totales
2	Edad de madurez sexual	Día 8 al 10
3	Número de puestas o partos de neonatos (del 7° al 21° día de vida)	6 a 7
4	Acumulación de grasa ovárica	Continuamente a partir del 7° día

Valor guía= se ha obtenido a partir de la calibración del método en el laboratorio de IMTA considerando también la información científica en torno al tema.

Los indicadores que se manejaron en este análisis, además del número total de neonatos fueron:

- 1) La edad de madurez sexual, la cual ocurre entre los 7 y 11 días en condiciones óptimas de desarrollo para un cultivo sano.
- 2) El número de puestas o partos observados a lo largo de los primeros 21 días de vida de los cladóceros. En *D. magna* las puestas en organismos

sanos ocurren cada tercer día, (60 a 72h) tiempo en el que ocurre el ciclo gestacional (figura 5).

- 3) Presencia de grasa ovárica. Este rasgo se empieza a presentar cuando el organismo inicia la maduración del ovario alrededor del 7° día de vida. La grasa es la reserva de energía que permite al organismo mantener activa la producción de neonatos y poder producir los huevos que continuamente se producen en el ovario. Sin esta reserva de energía, la reproducción se retarda o se hace menos eficiente en relación al número de neonatos producidos en cada puesta. Los cambios en la cantidad de grasa pueden suceder por mala calidad o alimento insuficiente, o por procesos de daño metabólico que impiden la adecuada asimilación y la generación de esta reserva grasa.

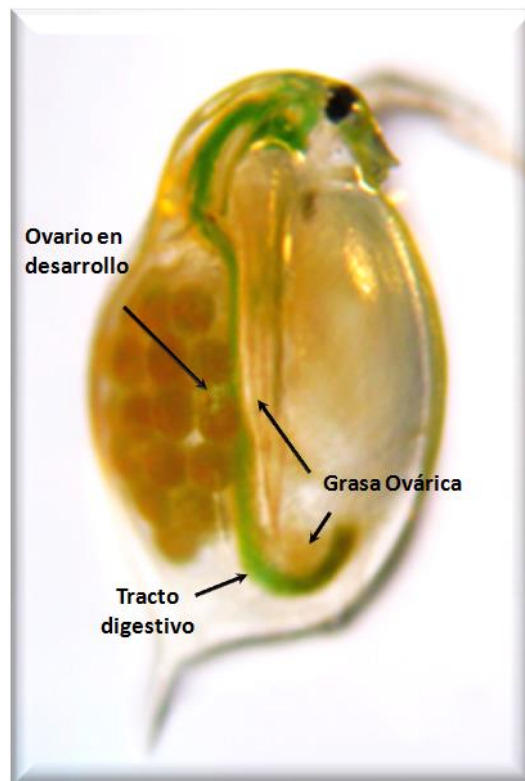


Figura 5. Observación de grasa ovárica. Masa granulosa color salmón que se ubica en la base del tracto digestivo y a lo largo del ovario y tubo digestivo

De acuerdo a las observaciones efectuadas en el laboratorio de Calidad del Agua del IMTA, sobre el ciclo gestacional de *D. magna*, se han definido cinco principales etapas las cuales suceden a lo largo de un periodo de 60 a 72 h.

El ciclo que se presenta en la figura 6 opera en hembras que ya han tenido su primer puesta, y radica principalmente en dos aspectos en el desarrollo del ovario, y en la evolución del huevo dentro de la cámara incubatriz, los cuales se van correspondiendo el uno al otro a lo largo del ciclo gestacional de la siguiente manera:

Primera Etapa

Ovario : Se observa ovario en desarrollo de forma delgada y recta.

Huevos: Generalmente recién salidos del ovario en rosario propio de la etapa 5. Son esféricos y aún están cerrados

Segunda etapa

Ovario: Se observa engrosamiento y granulaciones o sinuosidades ligeras

Huevos: Los huevos abren el cascaron y adquieren forma de pera donde las cabezas de los embriones emergen

Tercera Etapa

Ovario: Se ensancha formando sinuosidades a manera de resorte y su volumen puede verse como una sobra engrosada junto al tracto digestivo

Huevos: Los embriones se encuentran fuera del cascaron se observan alargados y las manchas faciales se evidencian dentro de la cámara incubatriz

Cuarta Etapa

Ovario: La forma sinuosa adquirida por el ovario aumenta su volumen y se densifica impidiendo la visión del tracto digestivo.

Huevos: Los embriones se observan con una estructura de mayor tamaño, similar al del neonato, hay movilidad de estos dentro de la cámara incubatriz.

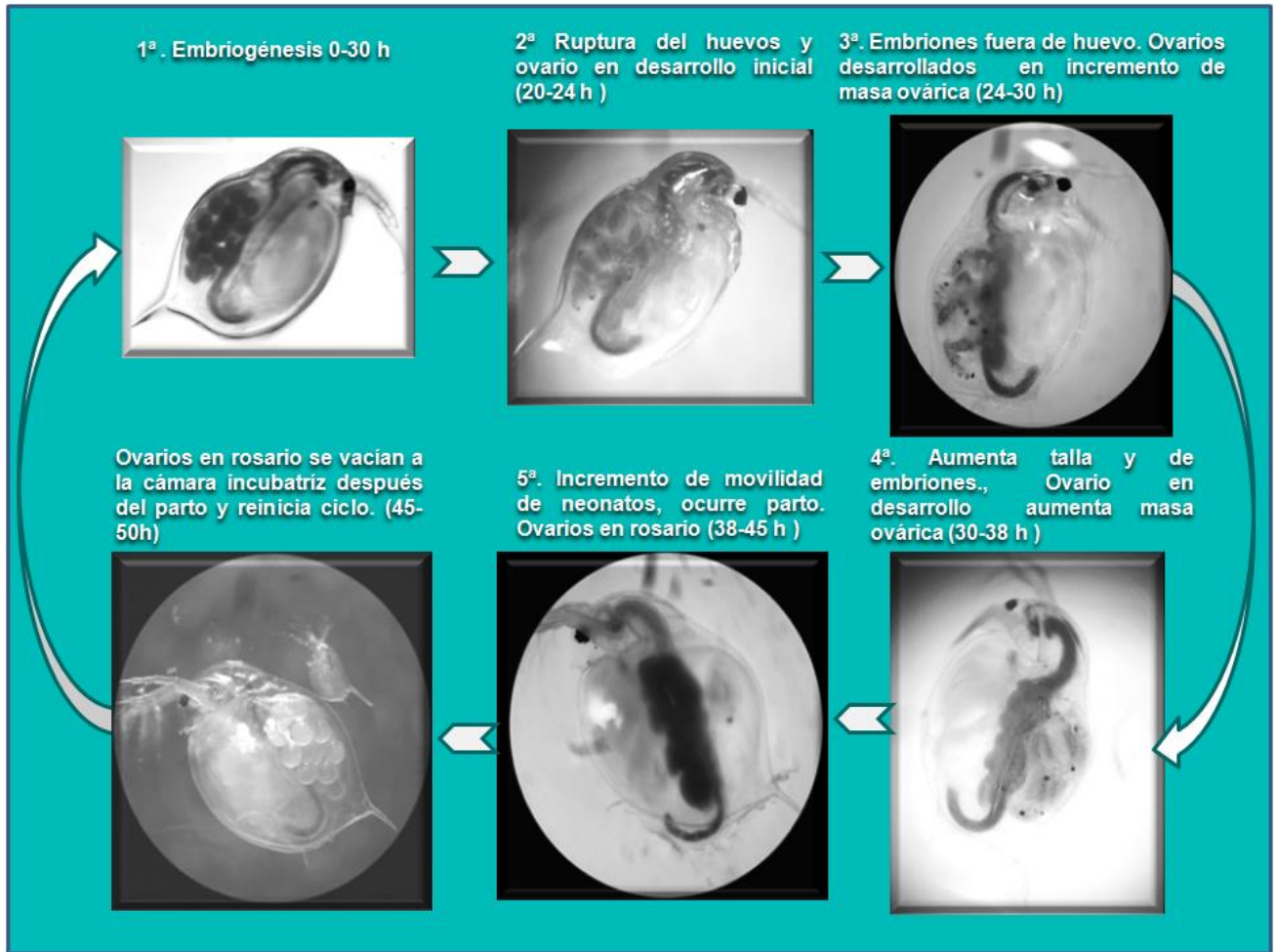


Figura 6. Ciclo del desarrollo gestacional de *Daphnia magna* calibrado por IMTA

Quinta Etapa.

Ovario: Se hace más ancho a manera de un saco globoso con grandes sinuosidades, densificado y ocupa casi 1/3 del espacio abdominal de la daphnia. A su forma se le da el nombre de ovario en rosario. El ovario contiene los huevos maduros listos para concluir su desarrollo en la cámara incubatriz. Este desarrollo del ovario solo se presenta cuando la hembra está en óptimas condiciones y es capaz de generar puestas abundantes de más de 20 neonatos, en caso contrario, el ovario en rosario no se forma, solo se observa un ovario desarrollado similar al de la etapa 4.

Huevos: Los embriones adquieren las características completas del neonato, los cuales tiene gran movilidad dentro de la cámara incubatriz, y estimulan a la hembra a que abra la cámara para que salgan.

Sobreviene el parto de los neonatos y, momentos más tarde, el ovario en rosario expulsa los nuevos huevos maduros a la cámara incubatriz para que concluyan en ella su ciclo de desarrollo

Durante todo el ciclo gestacional la hembra se alimenta, mantiene el tracto digestivo lleno de algas y hay acumulación constante de grasa en el ovario y espacios abdominales. Estos dos rasgos son importantes para que el ciclo gestacional se mantenga activo y en óptima producción de neonatos.

3.2.1 Cultivo y obtención de neonatos de *Daphnia magna*

El cultivo de *Daphnia magna* se mantuvo a 20 ± 2 °C con un fotoperiodo aproximado de 16 h luz/8 h oscuridad bajo intensidad de luz de 600 a 1000 lux.

Las hembras del cladócero se mantuvieron en recipientes de 2 L en una densidad de 1 org/100mL, empleando agua reconstituida dura como medio de vida (APHA, 1995) adicionada con vitaminas.

Para su mantenimiento se aplicó un ciclo de renovación del agua de forma parcial, por lo menos dos veces por semana, y cada 15 días un recambio mayor sustrayendo aproximadamente la mitad o tres cuartas partes del volumen contenido en cada recipiente.

La limpieza se efectuó cada tercer día, removiendo por sifoneo las exhubias y los restos de alimento algal depositado en el fondo. Durante esta limpieza también fueron retirados los neonatos, los cuales son destinados tanto al desarrollo de pruebas como a la apertura de nuevos cultivos.

Cuando se planea la realización de las pruebas, un día antes de su preparación se eliminan todos los neonatos presentes en el cultivo para garantizar que aquellos encontrados al día siguiente, para el montaje de las pruebas, tengan menos de 24 h de nacidos.

3.2.2 Preparación y desarrollo de prueba

La prueba de reproducción con *Daphnia magna* se inicia climatizando la muestra a temperatura ambiente. La prueba involucra el desarrollo de la determinación de toxicidad aguda, y solo se da continuidad a la prueba de reproducción y ciclo gestacional cuando no se observan efectos en la prueba aguda. El sistema experimental se prepara con la muestra en su estado original, al 100%, y se contrastan los efectos con una prueba control.

El sistema experimental consiste en colocar tres vasos para la muestra problema, el mismo número de vasos para la prueba control (agua dura) y para el control positivo (solución Cr VI 0.16 mg/L). En cada vaso se adicionaron 30 mL del líquido correspondiente indicado previamente y se colocaron 10 neonatos en cada uno de ellos.

A las 48h se revisan los sistemas de prueba verificando el porcentaje de mortalidad encontrado en cada vaso. En este paso se debe observar mortalidad en el control positivo, ya que este control permite verificar la adecuada sensibilidad de los organismos de prueba.

Para los otros dos sistemas, el de la muestra problema y el de la prueba control, se da continuidad a la experimentación seleccionando tres daphnias, una de cada vaso de la prueba inicial en los cuales se contenían 10 organismos. Las daphnias elegidas son colocadas en un vaso de precipitado de vidrio de 100 mL el cual contenía ese mismo volumen de la muestra problema. Se eligieron tres más provenientes de los vasos de la prueba control y se colocaron también en otro vaso de precipitado con 100 mL de agua dura. A estos organismos se les da seguimiento diario para verificar la evolución de su proceso reproductivo

Este sistema experimental se mantiene bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo que el cultivo de daphnia. Los organismos son alimentados cada tercer día, con el concentrado algal de un cultivo axénico de microalgas suministrando 2.4 a 4×10^6 células por cada daphnia bajo estudio, manteniendo las proporciones de alimentación que se manejan para el mantenimiento del cultivo masivo del cladóceros.

Cada tercer día se restituye el volumen del recipiente a 100 mL adicionando más agua de la muestra problema o agua dura del control, respectivamente.

Los organismos se revisan cada 24 horas para verificar su estado general, así como para tomar nota sobre los indicadores del proceso reproductivo antes mencionados. Se toman datos sobre el día en que se inicia la expresión de rasgos del proceso de maduración sexual como son la acumulación de grasa y la

maduración del ovario que producirá la primera puesta. Así mismo la revisión diaria permite verificar el número de neonatos, de huevos, características del ovario y la etapa gestacional en la que el proceso reproductivo se encuentra.

Además de la toma de los registros numéricos, se obtienen evidencias fotográficas de los rasgos más relevantes y contrastantes entre las muestras problema y la prueba control.

3.3 Desarrollo del método de prueba con *Brachionus plicatilis*

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

Una de las herramientas utilizadas para evaluar el efecto de los contaminantes sobre los componentes biológicos de los sistemas acuáticos son los bioensayos o pruebas de ecotoxicidad, éstos nos ayudan a conocer tempranamente, los posibles impactos sobre los organismos silvestres, y eventualmente sobre las comunidades, al ser empleados para el monitoreo del ambiente acuático. Este tipo de pruebas biológicas de toxicidad han sido sugeridas por Agencias Internacionales de Protección Ambiental (Iannacome *et al.*, 1998; EPA, 1985), así como en México por la SEMARNAT y CONAGUA (NMX-AA-87-SCFI-2010; NMX-AA-112-SCFI-1995)].

Uno de los organismos sugeridos por los Drs. S.S.S.S Sarma y Nandini Sarma de la UNAM, campus Ixtacala, (expertos en ecología y taxonomía del zooplancton), para la integración de una batería de pruebas de toxicidad de utilidad en el análisis de aguas salobres y costeras son los rotíferos y en especial *B. plicatilis*. Sin embargo, es necesario avanzar en el desarrollo del protocolo de prueba a fin de

lograr un procedimiento adecuado para obtener datos analíticos de alta confiabilidad.

En vista de esta necesidad, durante el 2012, se efectuó la investigación necesaria para el refinamiento de las condiciones del cultivo, cumpliéndose así con la primera fase del montaje de un protocolo de prueba, que tenía como objetivo determinar la dieta ideal y la salinidad óptima para el desarrollo del cultivo del rotífero *B. plicatilis*. Resultado de ello, se obtuvo la información necesaria para definir que el cultivo debe mantenerse a una salinidad de 10 ppmil y alimentarse diariamente con un cultivo axénico de microalgas de la especie *Senedesmus sp* en concentraciones del cultivo no mayores de 2.4×10^6 cel/mL.

El cultivo de rotíferos se mantiene en recipientes de 4 L con aireación continua y con un fotoperiodo de luz:oscuridad de 8:16 h respectivamente.

3.3.1 Determinación del proceso reproductivo del rotífero *B. plicatilis*

Para determinar las características del crecimiento del cultivo de los rotíferos, se llevó a cabo el seguimiento del comportamiento de su densidad. Se empleó un cultivo mantenido en condiciones óptimas de desarrollo. Con ayuda de una cámara para conteo de zooplacton, se efectuaron los conteos de organismos y observaciones al microscopio durante 10 días, para determinar si hay presencia de huevos adheridos al cuerpo de los adultos y los cambios que acontecen en su estructura y apariencia.

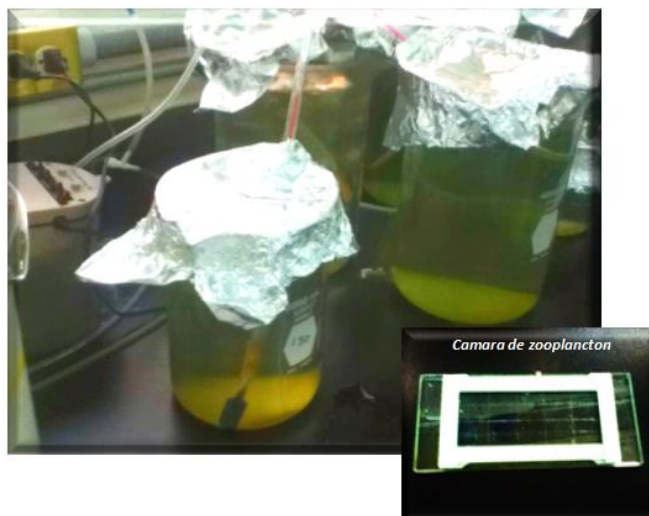


Figura 7. Cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis*

Los conteos se llevaron a cabo en alícuotas de 1mL, tomando 10 en la parte más superficial del cultivo, 10 a media profundidad y 10 al fondo, esta información permitiría reconocer cuales son las preferencias de distribución para las diversos estadios del ciclo reproductivo de los rotíferos, y las pautas y conductas asociadas con la reproducción que fueran relevantes para definir las estrategias más adecuadas para la recolección de organismos de empleo en pruebas (figura. 7).

Adicionalmente se llevó a cabo un segundo experimento, con el fin de verificar las observaciones hechas durante los conteos en el análisis del crecimiento del cultivo, el cual consistió en verificar si el proceso de maduración de los rotíferos se compone de tres fases desde su nacimiento hasta la muerte (R1, R2 y R3).

Se definió la primera fase como R1 en la cual el rotífero es un neonato recién salido del huevo, la fase R2 corresponde a un juvenil en proceso de maduración que aún no ha formado huevos, y la R3 es el adulto con presencia de huevos adheridos a su abdomen.

Para lograr la verificación de la existencia de las tres fases, se prepararon 5 sistemas experimentales, empleando una réplica para cada uno, en viales conteniendo 15 mL de medio de cultivo y cinco rotíferos con huevos (Fase R3) en cada uno de ellos. Diariamente, durante cinco días, se efectuó la lectura al microscopio del contenido de cada vial para determinar las fases en las que cada organismo se encontraba.

3.4 Desarrollo de pruebas con algas inmovilizadas

La técnica de análisis para la exposición de algas a tóxicos o muestras que se presumen contaminadas, se ha efectuado en laboratorio mediante el empleo de algas libres, de acuerdo a los protocolos calibrados publicados por Pica y colaboradores (2002; 2006). Si bien los resultados que de estos procedimientos surgen son analíticamente robustos, para su empleo en exposiciones *in situ*, es necesario lograr un mecanismo inmovilización de algas para poder exponerlas en campo y recuperarlas para determinar los efectos. Debido a ello, es necesario instrumentar un método adecuado para su exposición *in situ*

Con el fin de lograr dicho alcance se ha tomado como base el desarrollo efectuado por Moreira *et al.*, (2004) quienes emplearon la inmovilización de las algas en medios porosos para poder colocar las algas en campo y determinar los efectos asociados a la carga contaminante presente en el ambiente acuático.

Con apoyo de esa información, durante las etapas previas del proyecto, se evaluó el uso de alginatos como medio inmovilizante, debido a que son sustancias que tiene porosidad y son inertes a compuestos químicos, sin embargo, era necesario

determinar el tipo de compuesto y las proporciones en su preparación a fin de que se lograra la porosidad, textura y forma adecuada de las perlas en que las microalgas serían inmovilizadas.

La experimentación previa permitió determinar que la inmovilización de algas de la especie *Pseudokirchneriella subcapitata* debería ser efectuada con alginato de sodio (1.3 % de peso/volumen) y CaCl_2 (2 % de peso/volumen), en un volumen suficiente para preparar el número de perlas requerido, tomando en consideración que cada perla tiene un volumen medido de aproximadamente 0.6 mL. Ambas soluciones deben ser esterilizadas por medio de una autoclave durante 15 min a 121 °C y una presión de 15 lb.

Los medios ya esterilizados deben ser almacenados a una temperatura de 4°C y aislados de la luz. Estos medios deben ser utilizados de forma inmediata o dentro de los 10 días posteriores a su preparación.

Para la preparación de las perlas con algas inmovilizadas (*P. subcapitata*) se mezclan 0.75 mL del un inóculo algal, obtenido de un cultivo axénico de *P. subcapitata* mantenido en medio AAP (USEPA,1992), recién cosechado y concentrado, por medio de centrifugación a 2500 rpm por 10 minutos y 4.25 mL del alginato de sodio, manteniendo siempre la relación de inóculo 15% (V/V) con el alginato, ya que si se cambia el volumen del inóculo, las perlas no toman la forma esférica que se requiere. Esta mezcla homogénea se vacía a una bureta de 10 mL para controlar el tamaño y mejor diámetro de la perla.

Para llevar a cabo un mejor conteo del número de perlas que se obtienen; se trabajó cada cinco mL de volumen, los cuales se dejan gotear en vasos de precipitado de 300 mL con la solución de CaCl_2 en movimiento a unas 300 rpm con magneto durante 45 minutos. Tanto el tiempo como el movimiento permiten una mejor gelificación de las perlas de alginato. Es importante mantener una distancia de 25 cm desde la punta de la bureta hasta donde comienza el contacto de la perla con el medio del CaCl_2 . Después de que el tiempo de formación ha transcurrido, las perlas se enjuagan y almacenan con agua destilada en tubos de centrifuga estériles de 50 mL protegiéndolos de la luz con papel aluminio a 4°C, por un tiempo no mayor de 15 días.

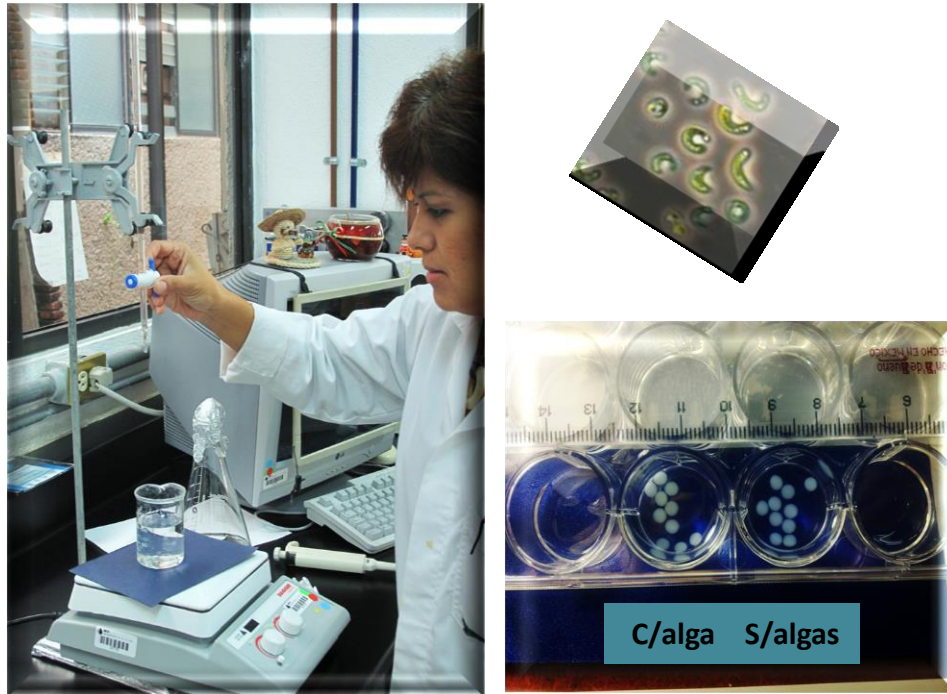


Figura 8. Preparación de perlas de alginato con algas inmovilizadas empleadas para probar el funcionamiento de un prototipo de cámara de exposición

Con dichas perlas se efectuó el montaje de pruebas empleando un prototipo de cámara de exposición que permitiera su colocación en campo. Dicha cámara debe ser de materiales translucidos para evitar el efecto de sombra sobre las algas expuestas y así mismo fuera posible colocar un número de más de 100 perlas para pruebas en campo.

El prototipo se probó sumergiendo la cámara en una mezcla con nutrientes y sulfato de cobre, sal empleada como tóxico de referencia en las pruebas convencionales con algas libres, a fin de determinar si la respuesta es compatible con los resultados de efecto esperados.

3.5. Adaptación del método de análisis de toxicidad aguda con *Vibrio fischeri* a protocolo ISO y sus repercusiones técnicas.

Este análisis experimental inició en el año 2012, teniendo como resultado la propuesta de algunos aspectos metodológicos que debían resolverse en relación a soluciones, materiales y un bosquejo de lo que debería ser el protocolo de prueba adecuado para la actualización de la NMX-AA-112-SCFI y que no se encontraban disponibles por las comercializadoras de sistemas automatizados que llevan a cabo dicha prueba.

Fue en el año 2013 en que MODERN WATER, INC., solicitó al IMTA el apoyo para evaluar las nuevas soluciones que permitirían desarrollar adecuadamente el protocolo bosquejado en el 2012, para la actualización de la NMX-AA-112-SCFI considerando su hibridación con el método ISO 11348-3, a través de un ejercicio de intercomparación para la valoración del desempeño de la solución FDB (Freeze Dried Bacteria Solution).

La adaptación al método de norma implica principalmente dos cambios radicales en los principios metodológicos de la técnica, los cuales son de sumo interés dada su posible repercusión sobre la comparatividad de los resultados entre ambos métodos, el cambio de sensibilidad ante la presencia de metales y el impacto que este cambio tendrá sobre los tiempos y costos de análisis.

El relación al primero aspecto, la solución de dilución, la cual MODERN WATER INC, deseaba evaluar, añade a la solución de NaCl que se emplea en la norma aún vigente, emitida en 1995, dos sales más, el Cloruro de potasio (KCl) y el Cloruro de Magnesio hexa hidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), esas dos últimas sales suelen ligarse con los metales pesados en solución contenidos en una muestra provocando que la biodisponibilidad de estos elementos se reduzca al lentificar el transporte de los metales al interior de la célula bacteriana (Forstner, 1979). Este cambio hace también más lento el proceso de intoxicación del organismo y, en consecuencia, también se posterga el efecto máximo en el metabolismo bacteriano, por lo que, el tiempo de exposición en pruebas de laboratorio debe ser mayor cuando se emplean las solución de tres sales, que cuando se utiliza la solución con sólo NaCl, ya que sólo de esta manera los datos resultarían comparables entre ambas técnicas.

Con base en esta información, en el 2012 y 2013 se efectuó experimentación para demostrar dicha hipótesis empleando la prueba con *Vibrio fischeri*, como se indica en el procedimiento de prueba aún vigente (NMX-112-AA-SCFI-1995) y ordenando dos lotes de análisis, uno en el que se emplea la solución regular de NaCl y el otro con la solución conteniendo las tres sales. Los análisis de ambos lotes se efectuaron para la determinación de la CE_{50} para Cr VI, Zn II y Fenol.

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

La adecuación del procedimiento concluyó en el diseño del protocolo en los dos modelos que se presentan en la propuesta del protocolo de prueba para la NMX-AA-112-SCFI que ha sido puesto a consideración del comité de normas para su envío a consulta pública en el año 2014. El contenido global de la propuesta de dicha norma puede consultarse en el Anexo D.

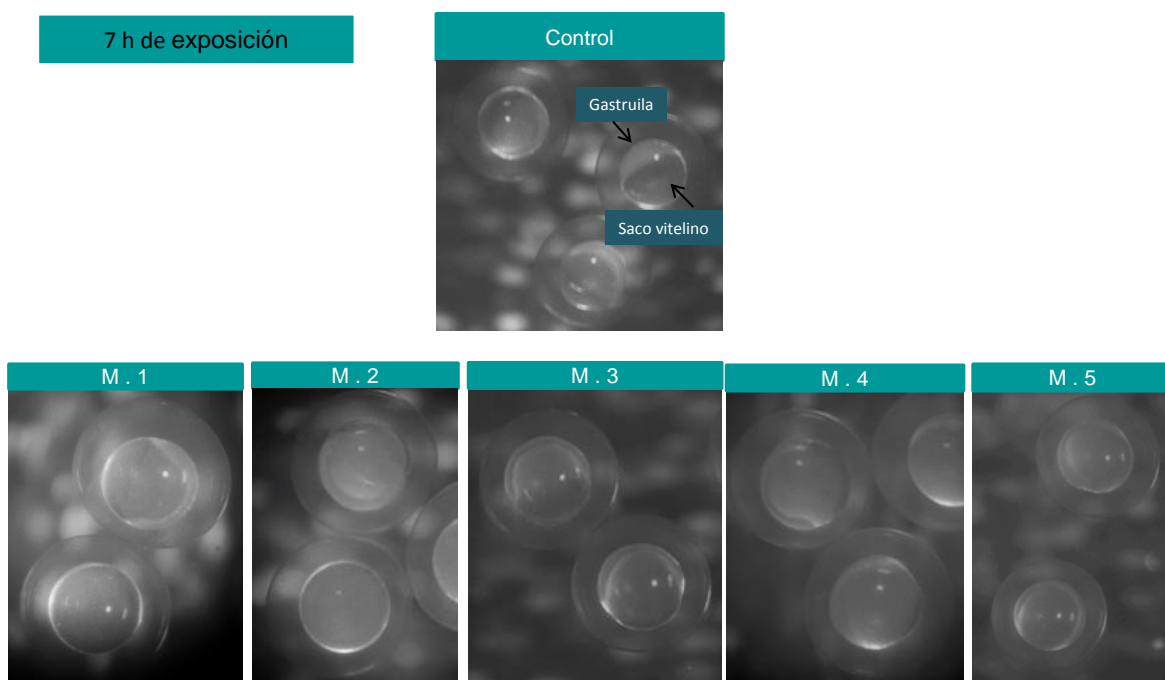
4. RESULTADOS

4.1 Pruebas de campo para la calibración de la prueba de alteración del desarrollo embrionario (ADE) con huevos de *D. rerio*.

4.1.1 Prueba de campo en la presa Colorines

Durante el mes de julio de 2013 se llevó a cabo la evaluación de las aguas de la presa Colorines llevando a cabo la prueba de efectos en el desarrollo embrionario del pez *Danio rerio*.

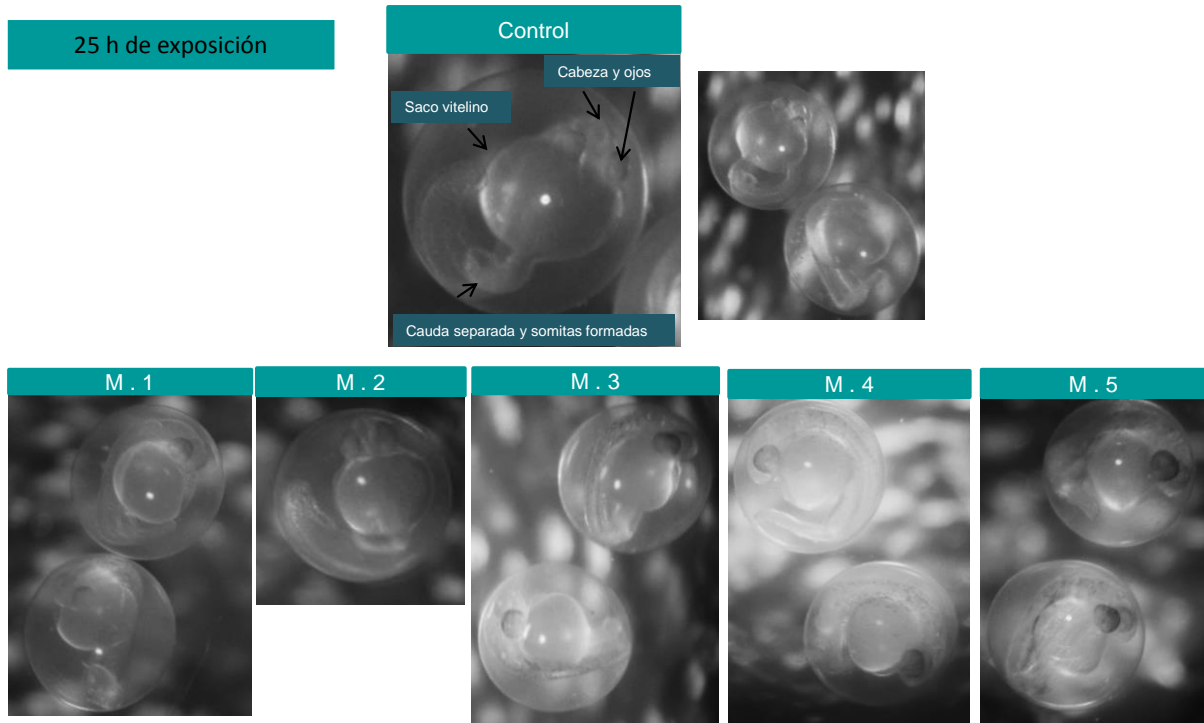
El análisis de los efectos se enfocó a la detección de alteraciones estructurales o desvíos de los tiempos de desarrollo gestacional de los embriones de *D. rerio*, los cuales se contrastan con las observaciones de un sistema control y con las imágenes del ciclo embrionario presentadas en la figura 4.



Observación: Todas las muestras presentan una condición normal del desarrollo de los huevos. Al tiempo de 7h de desarrollo se observa la formación de la gástrula, la cual es una capa granulosa que a la vista opaca al huevo en una de sus mitades, a este polo se le llama polo animal, en el se desarrollará el embrión. En el polo vegetal, no hay división de células por ello su consistencia es tersa, este sector del huevo constituirá el vitelo en el cual se almacenas las sustancias nutritivas necesarias para que el embrión, en condiciones normales, concluya su desarrollo al término de las 48 h.

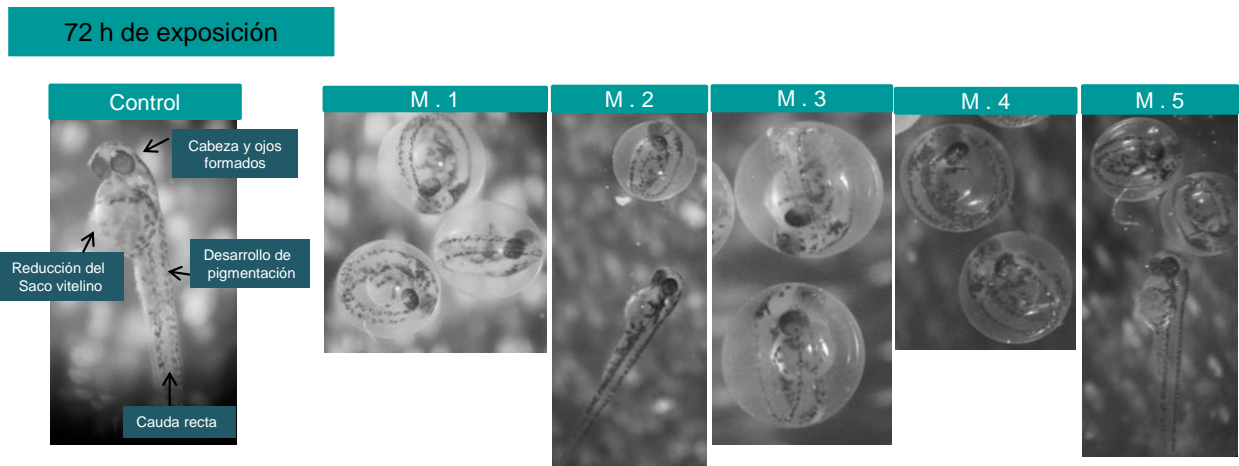
Figura 9. Formación de la gástrula y definición del polo animal y vegetal en huevos de *Danio rerio* a las 7 h de exposición a las muestras de la presa Colorines.

Las observaciones para las muestras de la presa Colorines se efectuaron a las 7, 25 y 72 h. de exposición y las imágenes capturadas se presentan en las figuras 9, 10 y 11. En estas últimas se señalan los rasgos más relevantes correspondientes a la etapa de desarrollo.



Observación: Las muestras, al igual que el control, a las 25 h presentan un desarrollo normal caracterizado por la presencia de una columna vertebral completamente formada junto con los paquetes musculares o somitas que constituyen la cola la cual se separa del saco vitelino, así como la diferenciación de la de la y desarrollo de los órganos sensoriales como son la línea lateral del cuerpo y los ojos, los cuales en esta etapa ya presentan el cristalino y un desarrollo incipiente de su pigmentación. El saco vitelino aun es predominante y traslucido al igual que el cuerpo.

Figura 10. Desarrollo gestacional del embrión de *Danio rerio* a las 25 h de exposición a las muestras de la presa Colorines.



Observación: Contrastando las imágenes de las muestras con las del control podemos observar que en todas ellas hay un desarrollo embrionario adecuado. Los alevines de *Danio rerio* eclosionan a las 70-72h con una cauda recta y un saco vitelino poco evidente el cual se absorbe horas más tarde, alrededor de las 96 h. La pigmentación de los ojos y la generación de abundantes manchas corporales se alcanzan también poco antes de la eclosión.

Figura 11. Alevines y fase terminal de los embriones de *Danio rerio* a las 72 h de exposición a las muestras de la presa Colorines.

Al revisar las imágenes previas, se concluyó que las muestras de aguas de la presa Colorinas no generan alteraciones morfológicas, ni retrasos en los tiempos de desarrollo y de eclosión de los alevines de *D. rerio*,

4.1.2 Prueba de campo. Análisis del efluente de una planta de tratamiento de la industria farmacéutica

La prueba de desarrollo embrionario con *Danio rerio* se efectuó con base en el protocolo de la OECD 236 del 2013 considerando las pautas de otros procedimientos que le son comunes United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. Fish acute toxicity test, freshwater and marine. Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.1075. EPA 712-C-96-118, y OECD (2012, y 2010).

Los resultados de la prueba del efluente se presentan en el formato de la tabla 5 y en las imágenes de la figura 12.

Tabla 5. Resultados del análisis de desarrollo embrionario con *Danio rerio* para las aguas de una PTAR de la industria farmacéutica

Resultados de la Prueba de desarrollo embrionario con el pez <i>Danio rerio</i>			
Control 063/2014		Muestra 1: Salida PTAR	
Área : Toxicología		Tipo de Muestra: Agua residual	
Fecha de muestreo: 2014/03/04		Fecha de recepción: 2014/03/04	
Fecha de análisis: 2014/03/6 al 25		Concentración de la Muestra: 100%	
Indicador de desarrollo	Propiedad del indicador	Tiempo (h) y magnitud del indicador (letra)	Observaciones particulares
Efecto Letal			
1.Coagulación	Coagulación total o parcial del embrión. Actúa en el total de los embriones (T) o en algunos(P)	No Aplica	Sin alteración
2. Cola y somitas	Falta de somitas y no hay separación de la cola del saco vitelino (V)	No Aplica	Sin alteración
Efecto Subletal			
3. Saco Vitelino	Desarrollo alterado en forma (F) o tamaño (T)	No Aplica	Sin alteración
4. Movimiento embrionario	Letargo o sin movimiento embrionario (S)	No Aplica	Sin alteración
5. Edema	Pericárdico moderado (M) o severo (S)	No Aplica	Sin alteración
	De Saco Vitelino	No Aplica	Sin alteración
6.Ojos	Tamaño Reducido (R) o sin ojos (S)	No Aplica	Sin alteración
	Pigmentación escasa (E) o ausente (A)	No Aplica	Sin alteración
7Cola	Cola acortada	No Aplica	Sin alteración
	Cola deforme	No Aplica	Sin alteración
8. Pigmentación corporal	Escasa (E) o ausente (A)	No Aplica	Sin alteración
9. Eclosión	Tiempo de eclosión o sin eclosión (SE)	Eclosión a 72 h.	Sin alteración
10. Apariencia de Alevines (marque con X)	Movilidad alterada en alevines	No Aplica	Sin alteración
	Lordosis espinal en alevines	No Aplica	Sin alteración
	Sin alteraciones aparentes	No Aplica	Sin alteración
DOSIS DE EFECTO			No Detectable
Otras Observaciones: Los organismos expuestos a la muestra 063/2014-1, Salida PTA R, presentan un desarrollo normal, similar al control, sin alteración para todo los indicadores evaluados			

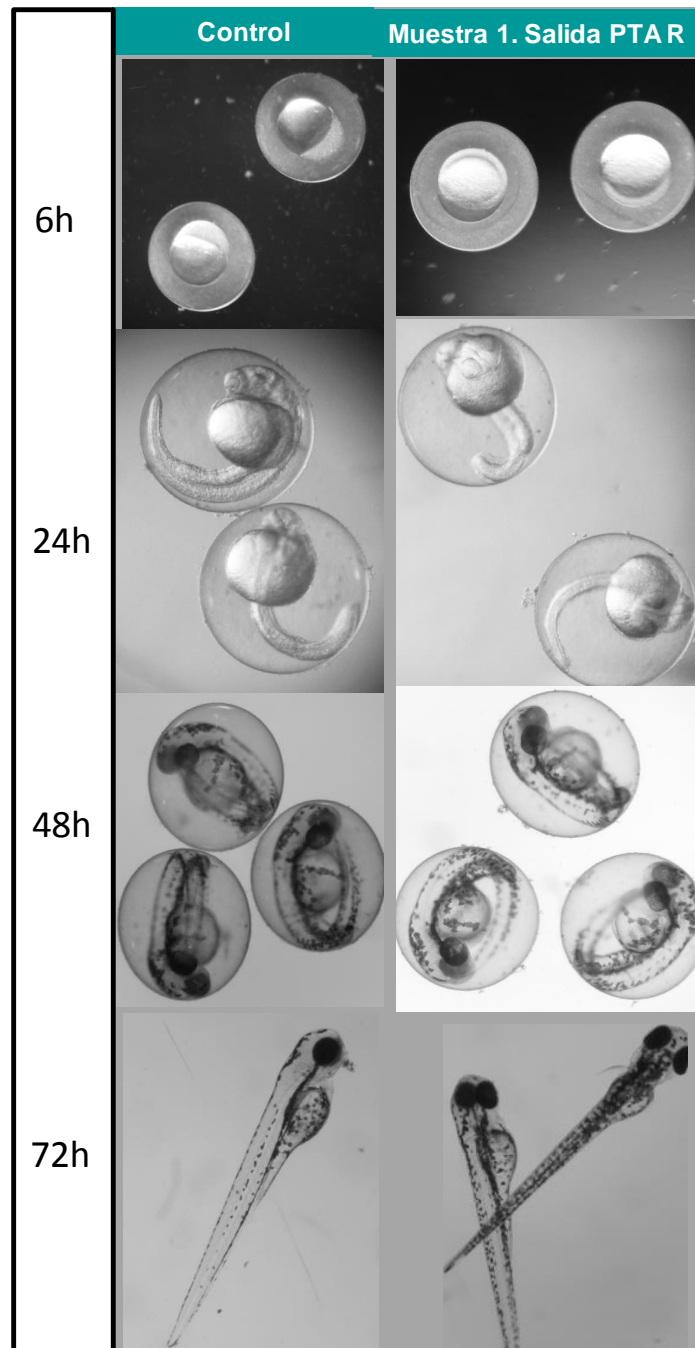


Figura 12. Imágenes del desarrollo embrionario de organismos expuestos al efluente de la PTAR de una industria farmacéutica, contrastadas con el control

El resultado de esta evaluación señala que el desarrollo de los organismos expuestos a las aguas de la PTAR es similar a la observada en el control, por lo

que es posible aseverar que las aguas de la farmacéutica no tienen contenido contaminante que interfiera con el desarrollo de *Danio rerio*.

4.2 Pruebas de campo para la calibración de la prueba de reproducción y ciclo gestacional con *Daphnia magna* .

4.2.1 Prueba de campo en la presa Colorines

En la presa Colorines, también se llevó a cabo la evaluación de los efectos en la reproducción y ciclo gestacional con *D. magna* efectuando el seguimiento a lo largo de 21 días para discernir si las aguas de la presa contienen elementos que puedan alterar la reproducción de los cladóceros. Los resultados se presentan en la tabla 6a y b. Dicha tabla presenta una primera columna que indica uno a uno los días de observaciones al microscopio y la fecha correspondiente, las cuales se interrumpen en fines de semana.

En los encabezados se indica el nombre de la muestras y las letras A, B y C que corresponden a las tres replicas que se efectuaron para cada muestra, cada réplica contiene dos organismos sujetos a experimentación a los cuales nos referiremos con las indicaciones I, II cuando definamos en que estadios del desarrollo gestacional se observa el contenido ovárico de cada daphnia.

En el encabezado hay una numeración del 1 al 6 que corresponde a las 6 etapas del desarrollo gestacional presentadas en la figura 4 de la metodología, además se encontrará una letra "N" que refiere al número de neonatos (daphnia recién nacidas) que se obtienen al término de cada ciclo de reproducción, que en condiciones óptimas tiene una duración de aproximadamente 72 h después de su salida del ovario en forma de rosario a la bolsa incubatriz donde las daphnias llevaran a cabo el resto de su ciclo gestacional hasta su nacimiento, por lo que en general se obtienen organismos cada cuarto día.

En las celdas internas de la tabla hay 7 compartimientos uno para cada fase y otro para el número de neonatos, dentro de cada celda se anota el número de huevos o embriones que corresponda seguido de la indicación I, o II para cada una de las dos daphnias en observación.

La tabla 6 contiene el seguimiento desde el primer día, para poder determinar el momento en que las hembras partenogenéticas alcanzan la madurez sexual e inicia su reproducción, por ello las primeras celdas no presentan datos.

Los resultados observados en ella indican una evolución normal para el Control y las muestra de Cortina superficie y fondo (2 y 1), sin embargo para las muestras 3, 4 y 5 se marcan en color naranja las anomalías que se presentan. Estas

anomalías se presentan posterior a la primera puesta, la cual ocurre generalmente a los 13 días al igual que en el control, con la excepción de la muestras 3 la cual se da un día después (día 14) (figura 13). Los rasgos anómalos principalmente consisten en: 1) reducción de la grasa corporal, la cual es indispensable para la reproducción y 2) evolución inadecuada del ovario, el cual debe pasar de un ovario fino no desarrollado, a uno engrosado y finalmente al ovario en rosario, condición que es el preámbulo para la salida de los huevos a la bolsa incubatriz.

Los rasgos anómalos se presentaron en las hembras expuestas a aguas de los sitios 3, 4 y 5 (Canal CFE, Puerta 2 y Canal Estadio). Las imágenes de los ejemplares que demuestra el daño se presentan en la figura 13.

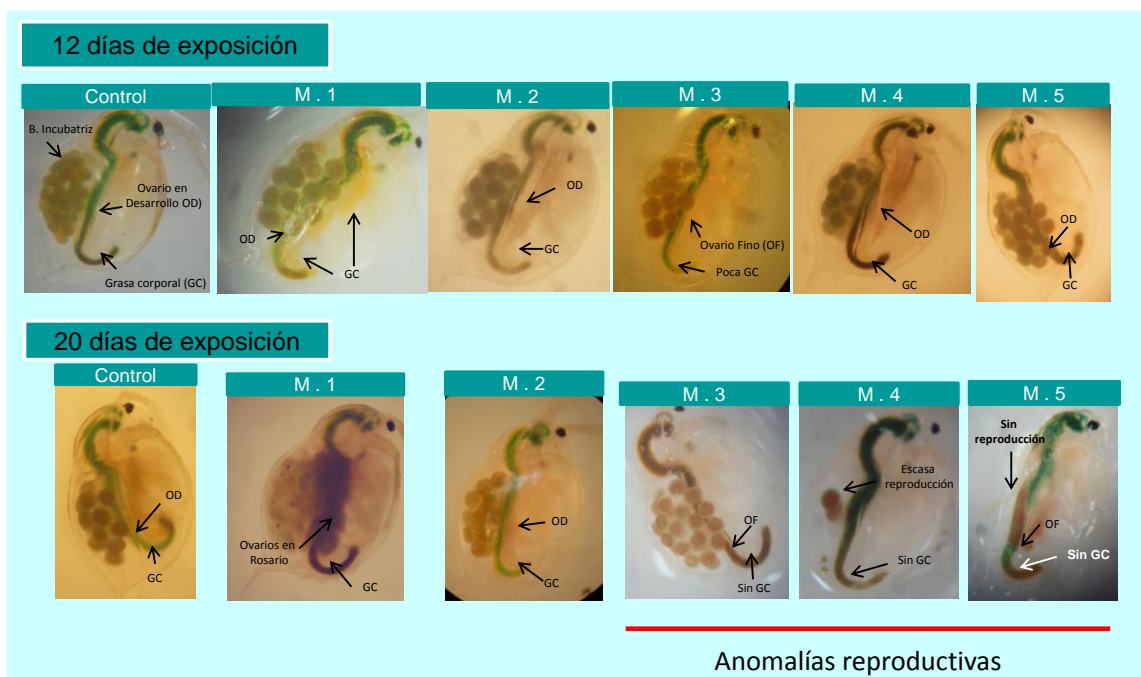


Figura 13. Rasgos anómalos de la reproducción en hembras de *Daphnia magna* expuestas a agua de la presa Colorines

La reducción o carencia de la grasa corporal es un indicador de gran relevancia debido a que constituye la reserva energética necesaria para la reproducción. Su carencia generalmente se asocia a detrimento en el suministro de alimento, ya sea por deficiencia de su cantidad o de su calidad (Prieto *et al* 2006), o al bloqueo metabólico de la asimilación por la acción de agentes contaminantes tóxicos que interfieren en dicho mecanismo. Al no haber energía de reserva disponible, el desarrollo ovárico se posterga o se inhibe, y consecuentemente, la producción de huevos y la reproducción se reducen significativamente.

En la figura 14 se observan las alteraciones en la frecuencia del ciclo reproductivo así como el deterioro de la tasa reproductiva que se manifiestan en los organismos expuestos a las muestras 3, 4 y 5. Para el control, al igual que para las muestras 1 y 2 el ciclo reproductivo se inició a los 13 días y repite cubriendo el ciclo óptimo de tres días de manera continua durante los 21 días de la observación. De esta manera se obtienen más de 60 organismos por puesta (valor total que correspondiente a la reproducción de 6 hembras)

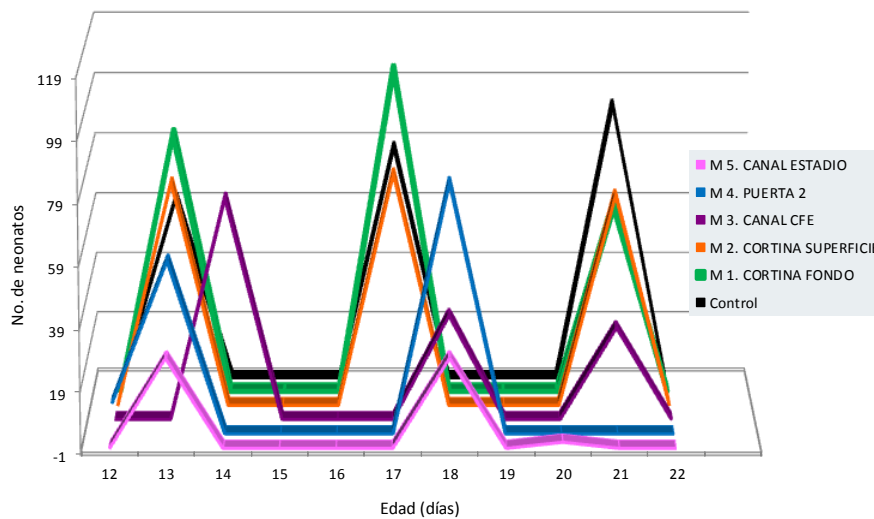


Figura 14. Frecuencia del ciclo reproductivo de hembras de *Daphnia magna*, expuestas a aguas de la presa Colorines

Al analizar estos resultados en suma con los observados para la prueba con *Danio rerio* descritos en el apartado 4.1.1, así como aquellos obtenido a partir de las pruebas de toxicidad aguda presentados en la tabla 7, se observa que si bien no hay efectos directos sobre el desarrollo de los peces, la carga contaminante de fuentes asociadas a la los sitios 3, 4 y 5 de la presa Colorines afecta de manera relevante la reproducción de algas y consecuentemente de cladóceros (*D. magna*).

Este hecho remarca la importancia de integrar la información derivada de pruebas agudas y crónicas de toxicidad a nivel multitrófico, ya que pone en evidencia que las fuentes moderadas de contaminación de la presa Colorines afectan el flujo de energía en el sistema inhibiendo, primero el adecuado crecimiento de las microalgas y, consecuentemente afectando la reproducción de los consumidores primarios, ejemplificados en este estudio por los cladóceros de la especie *D. magna*, al restringirse la disponibilidad de las microalgas de las cuales se alimentan (Conde-Procuna *et al*, 2004).

Tabla 7. Resultados de pruebas de toxicidad aguda en agua de la presa Colorines

Muestreo. Mes de Julio							
No.	Nombre	<i>Bacteria Vibrio fischeri</i>		<i>Alga Pseudokirchneriella subcapitata</i>		<i>Cladóceros Daphnia magna</i>	
		CE ₅₀ (%)	UT	CL ₅₀ (%)	UT	CL ₅₀ (%)	UT
1	Cortina Fondo	No detectable	-	84.603	1.181	No detectable	-
2	Cortina Superficie	No detectable	-	44.149	2.265	No detectable	-
3	Canal CFE 3	No detectable	-	91.381	1.094	No detectable	-
4	Puerta 2	No detectable	-	No detectable	-	No detectable	-
5	Canal Estadio	No detectable	-	100	1	No detectable	-

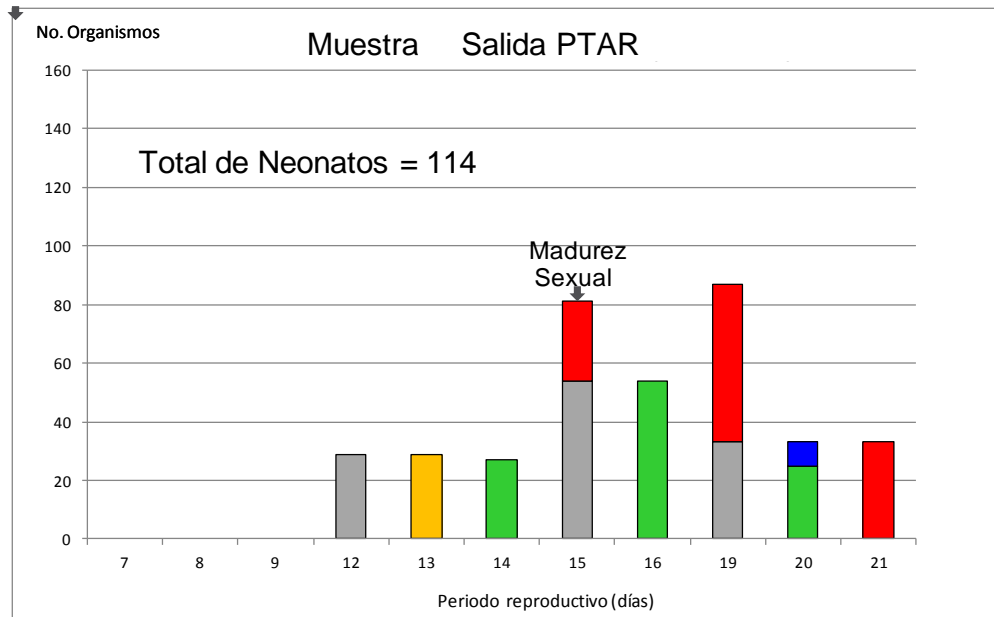
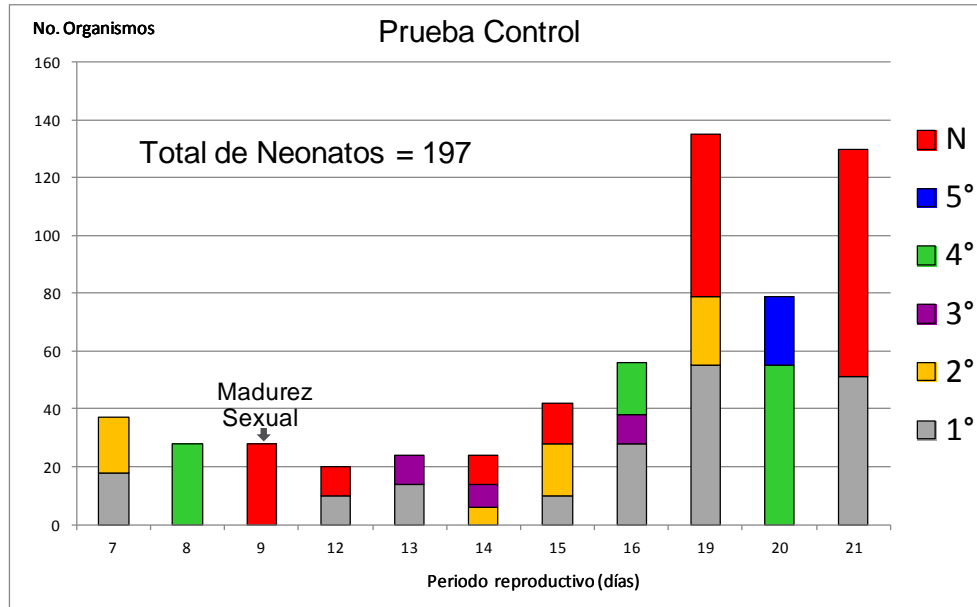
En esta misma lógica, en la que se vinculan los efectos observados para cada organismo de prueba, es evidente que los peces tienen cierta resistencia a la carga contaminante, sin embargo el daño observado a las microalgas y cladóceros sugiere que el crecimiento de las poblaciones de peces en la presa Colorines está sujeto a la restricción que ejerce la contaminación sobre las algas, y principalmente sobre cladóceros, grupo que se considera como una de las principales fuentes del alimento para las poblaciones de peces omnívoros y carnívoros (Alvear *et al*, 2007).

4.2.2 Prueba de campo. Análisis del efluente de una planta de tratamiento de la industria farmacéutica.

Los resultados de la prueba de reproducción con *Daphnia magna* para el efluente de la PTAR de una industria farmacéutica se presentan en la tabla 8 y figura 16. En ellas puede observarse que el ciclo reproductivo en la prueba control presenta sus primeros indicios a partir del 7° día de vida del cladóceros y se inicia el día 9 con la primera puesta mientras que en la muestra del efluente de la PTAR, los indicios surgen de forma postergada, en el día 12 y la primera puesta tuvo lugar hasta el día 15.

Tabla 8. Número de huevos y neonatos observados en el ciclo gestacional de *Daphnia magna*. Comparativo de la muestra del efluente de la PTAR, respecto a la prueba testigo o control.

Prueba Control o Testigo							Muestra 1. Salida PTAR 063/2014						
Día	Etapa Gestacional						Etapa Gestacional						
	1°	2°	3°	4°	5°	No Neonatos	1°	2°	3°	4°	5°	No Neonatos	
7	18	19											
8				28									
9						28							
12	10					10	29						
13	14		10					29					
14		6	8			10				27			
15	10	18				14	54					27	
16	28		10	18						54			
19	55	24				56	33					54	
20				55	24					25	8		
21	51					79						33	



No. Organismos= se refiere a número de huevos, embriones y neonatos observados en cada una de las distintas etapa del desarrollo, **Periodo reproductivo**= Se considera el periodo a partir de que existe desarrollo ovárico en el control (a partir del 7° día de vida), **N**= Neonatos.

Figura 16. Comparación del comportamiento reproductivo de *Daphnia magna* entre el sistema control y la muestra del efluente de una PTAR de la industria farmacéutica

También se observó que la transición de una etapa a otra en los huevos de la prueba control, cumplen con los tiempos del ciclo gestacional normal de modo que el periodo que transcurre de la 1° etapa 1 hasta el nacimiento es de alrededor de 48h, por ejemplo el día 12 se observaron 10 huevos en etapa 1, esos mismos huevos pasaron a la 3° etapa a las 24h (día 13) y un día después (día 14) se contabilizaron como neonatos. En el caso del agua del efluente de la PTAR de la Industria farmacéutica, la transición de la 1° etapa al nacimiento sucede en 72h en la primera puesta y en 48h en las posteriores.

El desfase de la edad de madurez sexual observada en la muestras del efluente de la PTAR, redujo el número de puestas posibles durante el periodo de los 21 días de duración de la prueba a solo 3 partos, incidencia que se contrasta con el número de puestas obtenidas para la prueba control en la cual tuvieron lugar 6 puestas durante el mismo periodo

Tabla 9. Criterios para la determinación de efectos en la reproducción de los cladóceros *Daphnia magna*. Comparación con los resultados de la prueba control

	Indicadores	Valor guía	Observaciones	
			Prueba control	Efluente de PTAR de la I. farmacéutica
1	Número total de neonatos por hembra (del 7° al 21° día de vida)	>60 neonatos totales	66	38
2	Edad de madurez sexual	Día 8 al 10	Día 9	Día 15
3	Numero de puestas o partos de neonatos (del 7° al 21° día de vida)	6 a 7	6	3
4	Acumulación de grasa ovárica	Continuamente a partir del 7° día	Continua del día 7 al 21	Sin grasa ovárica del día 16 al 21

Valor guía= se ha obtenido por calibración del método en el laboratorio de IMTA y por contraste en información publicada

En general, el resumen de indicadores presentados en la tabla 9, definen un deterioro de la capacidad reproductiva en los cladóceros expuestos a la muestra del efluente de la PTAR, en las que se registra una edad de madurez sexual postergada hasta los 15 días, un número de neonatos por puesta reducido (< de 40 neonatos), número de puestas también reducido con solo tres partos a lo largo de los 21 días de duración de la prueba

Adicionalmente en la figura 17, se presentan también las observaciones sobre las características del desarrollo de los ovarios, los cuales se mantuvieron en forma de ovarios en desarrollados y desarrollados, no se logró observar la formación de ovarios en rosario que es propio de la 5ª etapa del ciclo gestacional y que se asocia con la abundante producción de neonatos que sucede en daphnias en estado óptimo, sin embargo, en el caso de los cladóceros expuestos a la muestra del efluente de la PTAR, el potencial reproductivo es considerablemente menor al observado en el control.

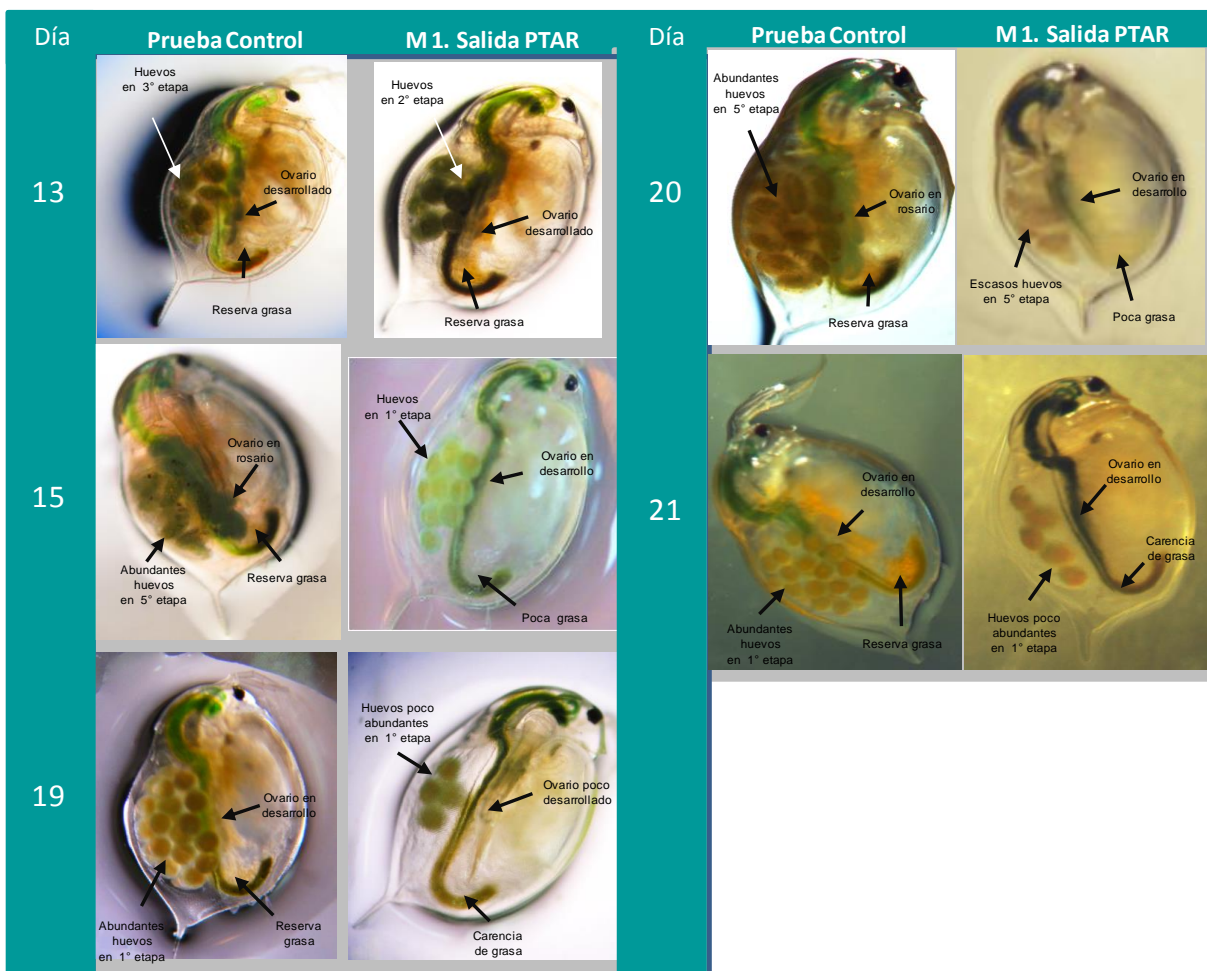


Figura 17. Imágenes de organismos expuestos al efluente de la PTAR de la industria farmacéutica, contrastadas con el control

Así mismo, se observó también la falta de grasa ovárica y abdominal, la cual deja de aparecer a partir del día 16. La falta de esta reserva limita la disponibilidad de energía para la generación de huevos, y altera consecuentemente, el potencial reproductivo de los cladóceros los cuales tienden a presentar puestas reducidas.

En cuanto al total de neonatos, cuya abundancia relativa a un sistema control, es el indicador empleado por los métodos convencionales para determinar si la diferencia de la reproducción entre la prueba testigo o control es significativamente distinta a la observada, en los organismos expuestos a una muestra bajo evaluación, se observó que las diferencias estadísticas entre ambos sistemas experimentales es significativa, por lo que se concluye que la muestra del efluente de la PTAR tiene efectos inhibitorios en la reproducción del cladóceros.

El análisis estadístico de comparación se verificó a través de la prueba de t-student para una probabilidad del 0.05%.

4.3 Análisis de ciclo reproductivo de *Brachionus plicatilis*

4.3.1. Comportamiento del crecimiento del cultivo del rotífero *B. plicatilis*

El análisis del crecimiento y ubicación preferente de la distribución de *Brachionus plicatilis* en el medio de cultivo se presenta en la figura 18

El análisis indicó que el cultivo de rotíferos requiere de cinco a seis días para que la población pueda incrementar su densidad. Durante este periodo es posible que algunos organismos adultos mueran, y los recién emergidos y/o juveniles maduren y se incorporen como reproductores, será hasta ese momento en que la población se incremente superando la tasa de mortalidad, debido a que un rotífero pone por lo menos dos huevos. Posterior a ese tiempo en el que se logra la madurez sexual, cada dos días se tenderá a duplicar el número de organismos.

En cuanto a su distribución en el recipiente de cultivo, se observó que no hay diferencias notables entre la superficie, profundidad media y fondo, sin embargo se observa cierta preferencia por el punto medio y el fondo del recipiente, en relación a la superficie.

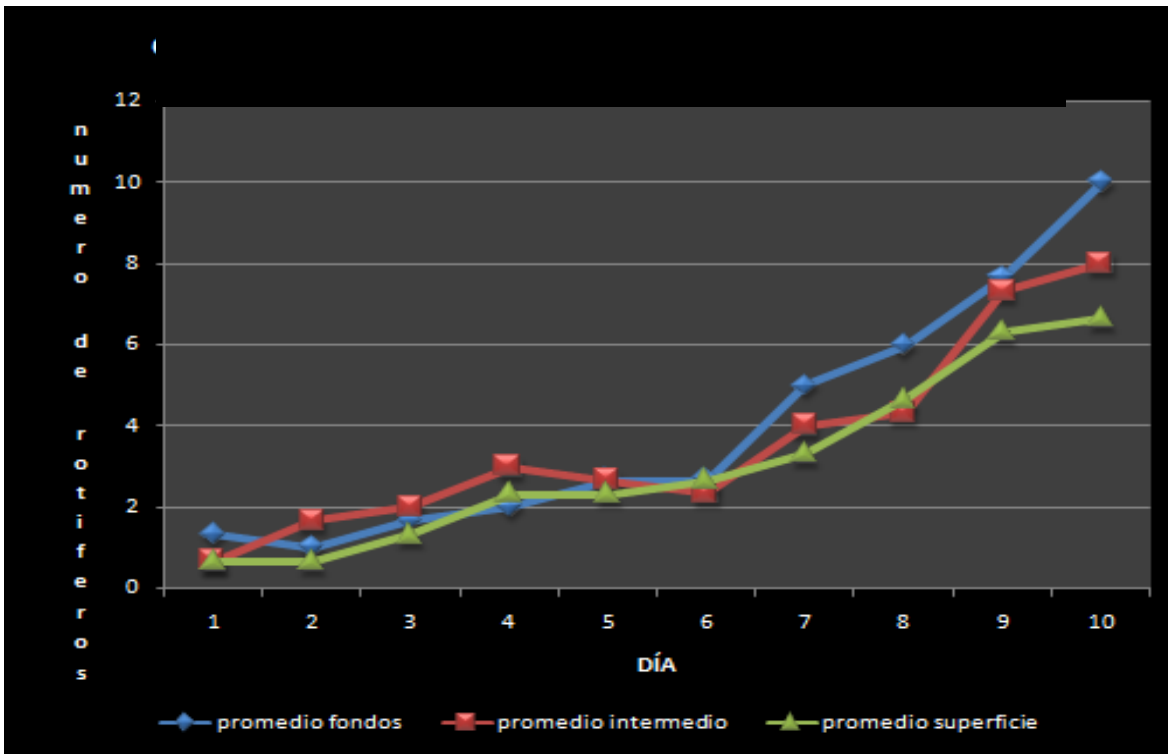


Figura 18. Crecimiento del cultivo de *B. plicatilis* y la diferencia de su distribución en el cultivo.

4.3.2 Verificación de las fases de desarrollo del rotífero *B. plicatilis*

Los resultados de la verificación de las fases de desarrollo se muestran en la figura 18. En ella se observa que es factible considerar que los rotíferos tienen un proceso de crecimiento definido por las tres fases que fueron determinadas por sus características morfológicas durante el desarrollo del experimento previo. R1 es la fase donde el rotífero es un neonato que acaba de salir del huevo, la fase R2 corresponde a un juvenil en proceso de maduración que carece de huevos y la R3 es el adulto con presencia de huevos adheridos.

En la figura 18 se observa que de los cinco organismos en etapa R3 con huevos inicialmente colocados en el sistema experimental, su número se reduce a solo 1 en el primer día de observación y en su lugar se obtienen 4 organismos en fase 1 y 1 en fase 2. Estos organismos resultan de los adultos maduros del inicio de la experimentación, lo que indica que los adultos solo se reproducen una sola vez y mueren después que sus huevos eclosionan.

Al segundo día, los cuatro organismos en etapa R1 evolucionan a etapa R2, estadio en el que perduran por 24 h de modo que para el tercer día se incrementa el número a 8 organismos en R3. También en este tercer día se tienen R2 probablemente derivados del R3 que perduró desde el inicio del experimento.

A partir del tercer día, en el 4° y 5° día, se incrementa el número de organismos en etapa R1, y R2, declinando el número de R3 que mueren nuevamente durante la eclosión de sus huevos. Los organismos en etapa R2 observados para el día 5, logran su etapa R3 al 6° día incrementando significativamente la población.

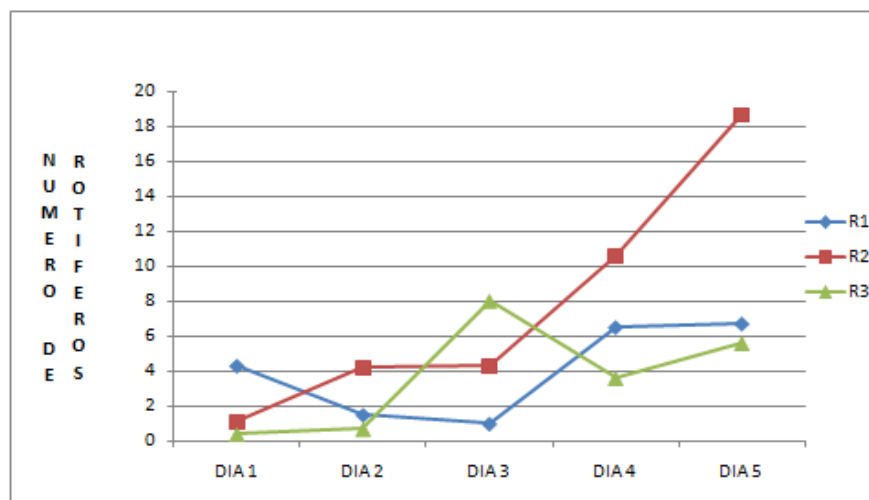


Figura 19. Organismos en diferentes fases de madurez en el cultivo de *B. plicatilis*

4.3.3 Desarrollo de un sistema para obtención de rotíferos en fase R3

A partir de la información obtenida y de determinar que el ciclo de maduración de *B. plicatilis* sucede en solo tres días, y de definir que las hembras sólo se reproducen una sola vez en su corto ciclo de vida, debido a que el huevo no se separa del cuerpo de la madre, adherido al cual eclosiona (figura 19), se consideró necesario atender dos aspectos:

- 1) Diseñar un sistema de tamices mediante el cual fuera posible recuperar hembras en la fase R3 para iniciar una prueba de exposición.
- 2) Modificar la idea original del diseño de prueba basado en el uso de neonatos, y el empleo de la mortalidad como indicador de efecto, como es común en pruebas efectuadas con especies de agua dulce, al empleo del crecimiento poblacional como el indicador más acertado, y acorde a su forma de reproducción.



Figura 20. Imágenes de hembras en fase R3 y rasgos de eclosión de huevos adheridos

Para satisfacer el primer punto, y en etapas futuras de la investigación poder probar los diseños experimentales de prueba factibles de ser empleados, se diseñó el ROTIFASES (fig. 21). El ROTIFASES está diseñado con un compartimiento dividido en dos secciones por medio de tamices, que ayudarán a aislar, en la primera sección (tamiz blanco), a los organismos en fase R3, y permitir la migración al fondo, de las otras dos fases atravesando la sección del tamiz amarillo en el cual quedarán los rotíferos en fase R1.

En estas imágenes podemos ver el diseño del compartimiento que se realizó el cual se metió en un vaso de 2L en donde se depositaron los rotíferos existentes en 20 L de medio. En la primer imagen podemos observar el separador dentro del medio, en la segunda se aprecia la sección del tamiz blanco, y en la tercer imagen corresponde a la segunda sección, las cuales están divididas con tamices de diferentes tamaños para lograr recolectar y separar las diferentes fases que presenta el rotífero *B. plicatilis*



Figura 21. Diseño del Rotifases para aislamiento de hembras en fase R3 del rotífero *B. plicatilis*

4.4 Desarrollo de prototipo de cámara de exposición para pruebas *in situ* con algas inmovilizadas.

El diseño de la cámara es de rápido montaje en la zona de estudio, se configuró por una placa con 16 espacios o pozos con capacidad de albergar 240 perlas de alginato en un solo estrato sin efecto de sobra, es de material plástico traslucido que permite el paso de la luz (figura 22). Para permitir el paso del agua y reducir la resistencia del cuerpo de la cámara, se hacen orificios frontales y traseros de aproximadamente 1 mm y además se hacen cuatro más de mayor tamaño en cada una de las esquinas del cuadrante que constituye la placa o cámara. En estos orificios se introducen cordones plásticos que se enrollan a una barra que se ancla con peso al fondo (figura 23).



Figura 22. Cámara de exposición conteniendo perlas de alginato

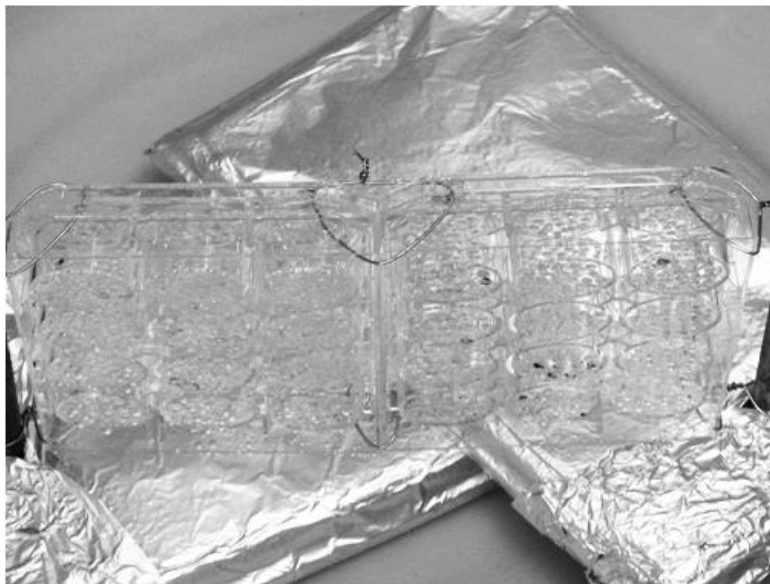


Figura 23. Montaje de cámara de exposición

La funcionalidad de la cámara fue verificada mediante la exposición de las algas, contenidas en la cámara, al tóxico de referencia (sulfato de cobre) de uso regular en pruebas de toxicidad aguda con algas libre. Para estas pruebas con algas libres el efecto inhibitorio medio (IC_{50}) se obtiene a una concentración de Cu II de 0.31 a 0.42 mg/L, valor que se contrasta con la CI_{50} obtenida en las pruebas de exposición con algas inmovilizadas dentro de la cámara en la que la CI_{50} fue de 0.38 a 0.40 mg/L (figura 24).

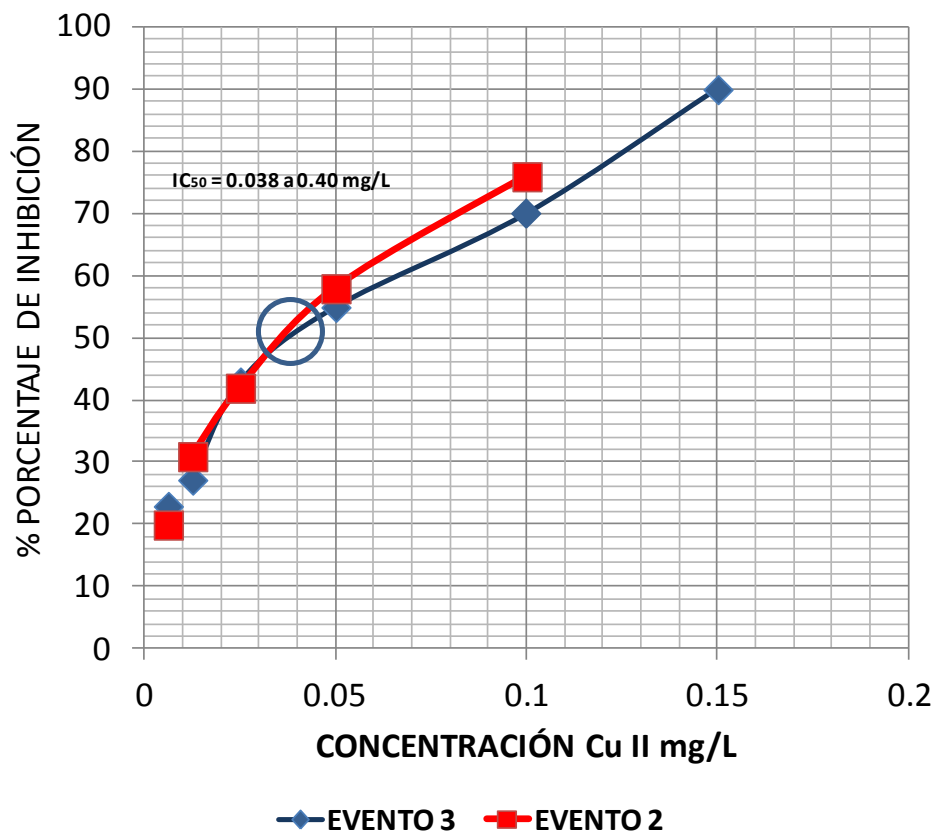


Figura 24. Resultados de la exposición de las algas inmovilizadas contenidas en la cámara de exposición al Cu II.

4.5 Adaptaciones metodológicas para la actualización de la NMX-AA:112.SCFI, Protocolo de prueba para la evaluación de toxicidad aguda con *Vibrio fischeri*.

En relación a los posibles cambios en el comportamiento de la respuesta de *Vibrio fischeri*, como consecuencia de la modificación del medio de dilución, que en la norma previa empleaba solo una sal (NaCl), a la mezcla indicada por el protocolo ISO (tres sales, NaCl, KCl y $MgCl_2 \cdot 6H_2O$), los resultados globales se muestran en la figura 25.

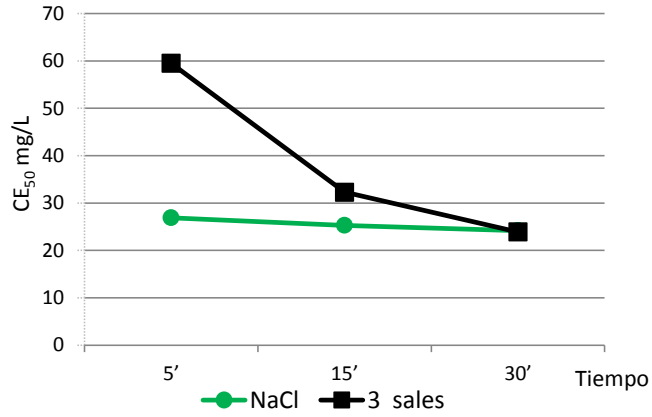
En ella se observan las tendencias que siguieron los tres tóxicos empleados para la experimentación, dos metales (Cr VI y Zn II) y un orgánico (fenol). En las primeras gráficas se muestra el comportamiento de los dos metales con las curvas que contrastan el comportamiento de la respuesta tóxica obtenida para cada tratamiento. Se observa que, en el caso de aquellos en los que se empleó como medio la solución de una sal (NaCl), la respuesta máxima de toxicidad (CE_{50}) es constante desde los 5 minutos y prácticamente no cambia en el tiempo, por ello en la NMX-112-AA_SCFI-1995 era considerado aceptable la lectura obtenida a un tiempo de exposición de 5 minutos y empleada como definitiva para el reporte de dicho parámetro, ya que responde de forma igualmente estable para metales y compuestos orgánicos, como se puede observar en el tercer gráfico de la figura 22 en la que se toma como compuesto modelo al Fenol.

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

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

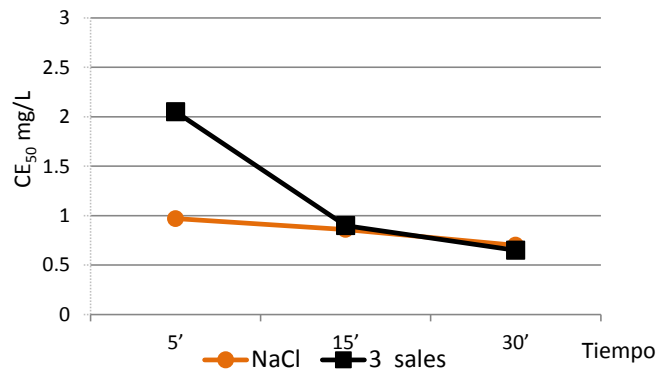
Comportamiento de la respuesta de *Vibrio fischeri* al Cr VI

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



Comportamiento de la respuesta de *Vibrio fischeri* a

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



Comportamiento de la respuesta de *Vibrio fischeri* al Fenol

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

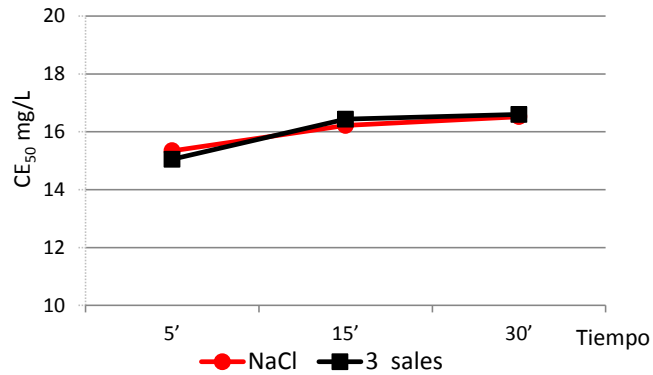


Figura 25. Comportamiento de la respuesta de *Vibrio fischeri* a metales y compuestos orgánicos asociado al uso de medio de dilución de distinta composición.

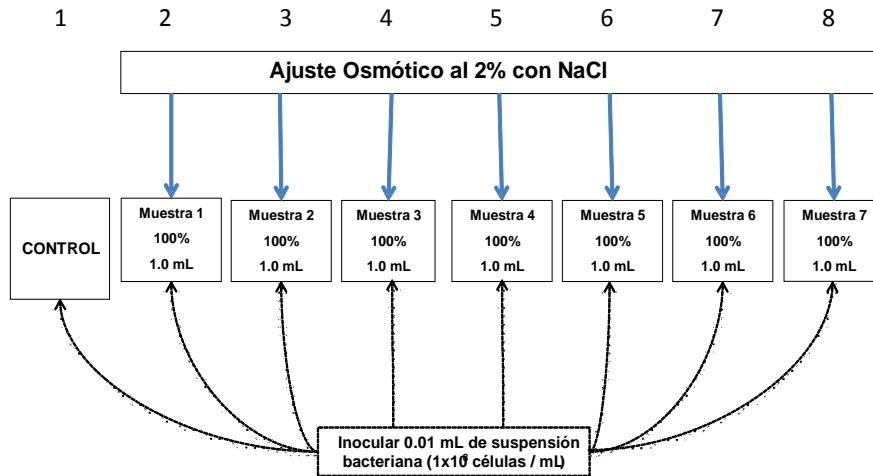


Figura 26. Modelo Metodológico para la prueba presuntiva o exploratoria

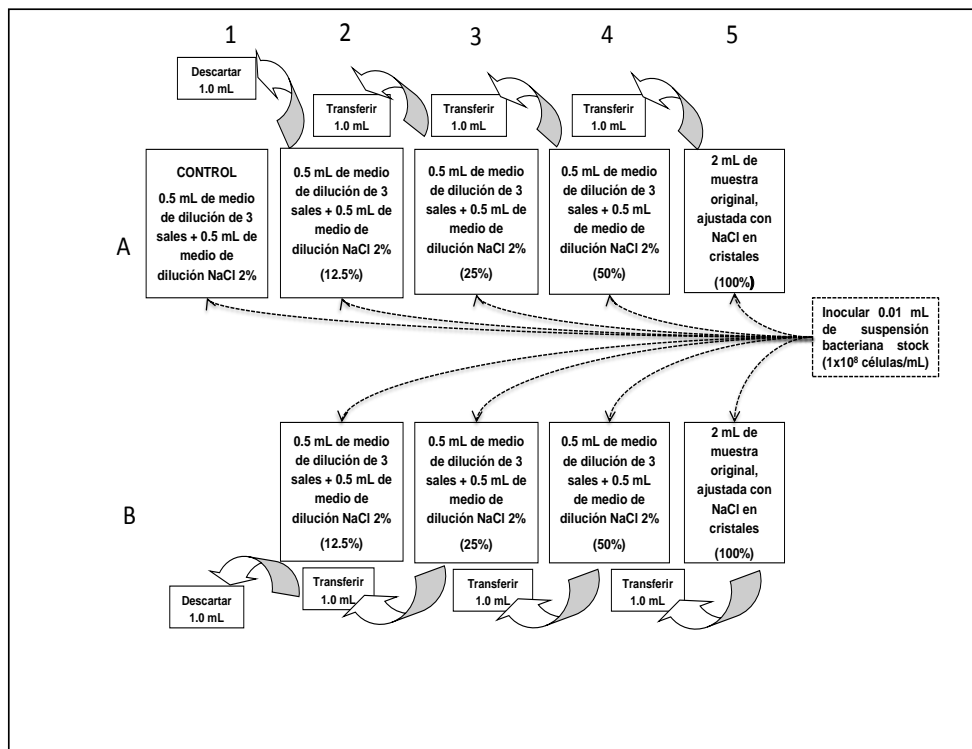


Figura 27. Modelo metodológico para la prueba definitiva con concentración inicial del 100%

Derivado de las pruebas previas, relacionadas con cambios en la sensibilidad del método para la detección de metales pesados, así como de la búsqueda de un protocolo optimizado que incorpore las bases del método ISO, sin afectar la sensibilidad, el tiempo y la economía de la prueba de rutina, se logró el diseño un protocolo que integra un conjunto de tres procedimientos de prueba escalonados. El primero (figura 26), relativo al desarrollo de pruebas presuntivas que permite identificar muestras tóxicas. El segundo protocolo rescata la posibilidad de llevar a cabo pruebas con una concentración inicial del 100%, lo cual no está previsto en el método de prueba ISO 11348-3 (figura 27). Y el tercer método, aplicable a muestras de elevada toxicidad a las que es factible diluir en un 50% y tener esta concentración como valor inicial (figura 28) y aun así obtener una curva de dosis – efecto adecuada para la determinación de la CE_{50}

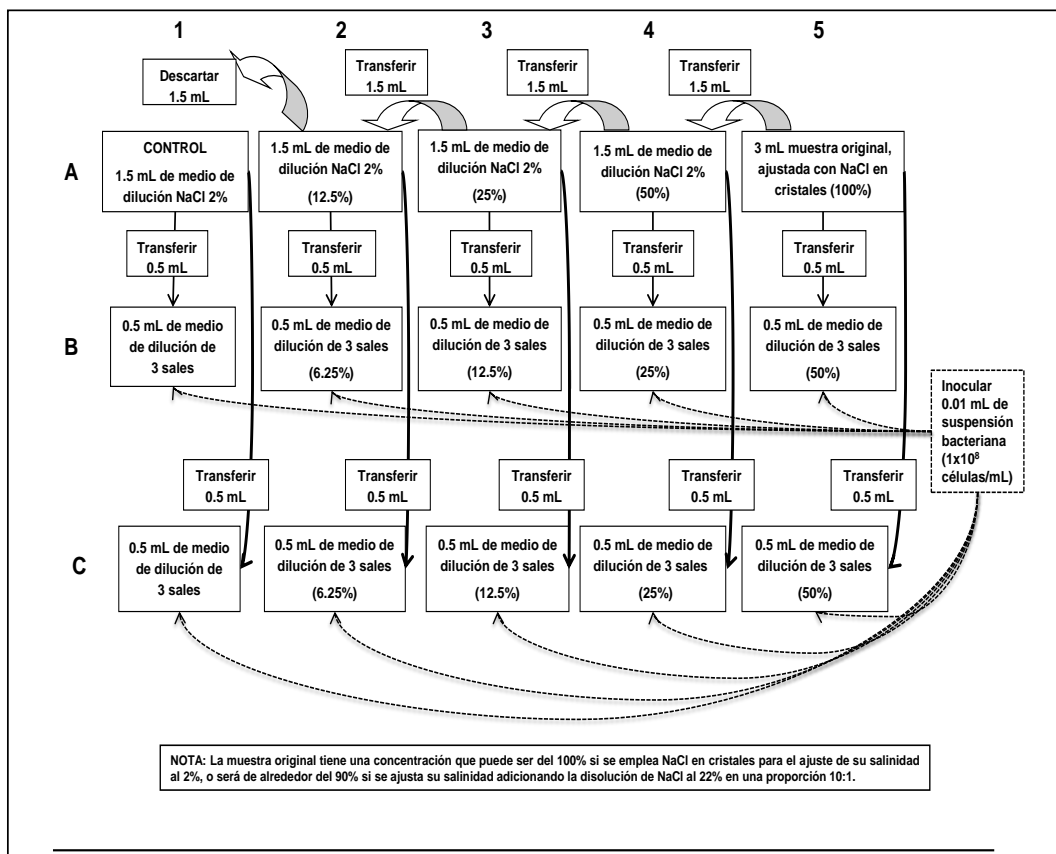


Figura 28. Modelo metodológico para la prueba definitiva con concentración inicial del 45 o 50%

Actualmente, estos métodos forman parte del anteproyecto para la modificación de la NMX-AA-112-SCFI que puede consultarse en el ANEXO D, para comprender la operación y fundamento técnico que guía dichos protocolos. Este desarrollo tecnológico constituye el documento que está en revisión por los miembros del comité de normas para ser enviado a consulta pública en el año 2014.

5. CONCLUSIONES

- Las pruebas de reciente creación como la de alteración del desarrollo embrionario con el pez *Danio rerio* y la de reproducción y ciclo gestacional con *Daphnia magna*, son herramientas de gran utilidad para la evaluación de cuerpos de agua contaminados, complementando el espectro de sensibilidades necesarios para la constitución de una batería de pruebas que incluya efectos agudos y crónicos, y asimismo, una gran diversidad de indicadores de efecto capaces de detectar compuestos contaminantes convencionales y emergentes
- En cuerpos de agua afectados principalmente por descargas municipales, el desarrollo de pruebas de toxicidad aguda con *Daphnia magna* y *Vibrio fischeri* frecuentemente presenta resultados con efectos no detectables, mientras que la prueba con *P. subcapitata* presenta efectos inhibitorios en el crecimiento de su población que son generalmente menores al 50%. Esta respuesta, si bien es moderada, debe ser tomada como indicativa de que existen sustancias nocivas cuyos efectos deben ser evidenciados mediante el desarrollo de pruebas crónicas, tanto de desarrollo embrionario como de reproducción.
- Los métodos y los indicadores empleados para los métodos de desarrollo embrionario (*D. rerio*) y de reproducción (*D. magna*) han sido evaluados con suficiencia, por lo que se considera que pueden ser incorporados como protocolos de prueba para su empleo en estudios y servicios especializados en materia ambiental.
- En relación a la prueba con el rotífero de *Brachionus plicatilis*, las estrategias de cultivo empleando medio salino a 10 ppmil, con fotoperiodo de luz:oscuridad 16:8h y con suministro de alimento diario en dosis no mayor de 2.4×10^6 cél /mL de una sepa axénica de *Senedesmus sp*, permite mantener el cultivo en crecimiento óptimo.
- El rotífero tiene un ciclo de vida de solo tres días a lo largo de los cuales cubre tres fases definidas, la primera sucede después de que los organismos salen del huevo con una talla ligeramente menor al adulto, la

segunda (R2) comprende a organismos que tiene la talla y características del adulto pero aún no forman huevos, y la tercera o R3 que corresponde a la etapa reproductiva donde el rotífero permanece con vida hasta que los huevos que mantiene adheridos a su abdomen eclosionan. Horas más tarde el adulto muere, indicando que esta especie solo es capaz de producir dos organismos a lo largo de su corto ciclo de vida.

- Debido al patrón que describe el proceso reproductivo de *B. plicatilis*, será necesario modificar la idea original del diseño de prueba basado en el uso de neonatos y el empleo de la mortalidad como indicador de efecto, al empleo del crecimiento poblacional como el indicador más acertado, y acorde a su forma de reproducción.
- El método de inmovilización de algas de la especie *Pseudokirchneriella subcapitata* en perlas de alginato, no afecta la sensibilidad de la especie ni impide el contacto de las microalgas con los xenobióticos contenidos en la muestras, dado que al exponerlos a sustancias tóxicas tales como el Cu, Cr y Zn, empleados como modelos de análisis en las diversas etapas del proyecto, se obtienen resultados inhibitorios del crecimiento algal muy similares a los obtenidos empleando la técnica con algas libres.
- El colocar las perlas de alginato con las algas inmovilizadas dentro del prototipo de cámara de exposición para exponerlas en un sistema de microescala conteniendo una solución de Cu II (empleado como tóxico de referencia), presentó resultados consistentes con los obtenidos en pruebas con algas libres, indicando que la estructura y características de dicha cámara no genera interferencias en la operación del sistema de evaluación in situ, y se encuentra en condiciones adecuadas para ser probado en estudios de campo.
- Respecto al desarrollo de un nuevo protocolo y adaptación del método de prueba para la actualización de la NMX-AA-112-SCFI, Pruebas de toxicidad Aguda con *Vibrio fischeri*, se logró la generación de un método optimizado que incorporara las bases del método ISO, sin afectar los aspectos de sensibilidad, tiempo y economía de la prueba. Se diseñaron tres protocolos escalonados, el primero relativo a la prueba presuntiva, el segundo, rescata la posibilidad de llevar a cabo pruebas con una concentración inicial al 100%, lo cual no está previsto en el método de prueba ISO 11348-3, y el tercer método, aplicable a muestras de elevada toxicidad a las que es factible diluir en un 50% y tener esta concentración como valor inicial y aun así obtener una curva de dosis –efecto adecuada para la determinación de la CE₅₀. El procedimiento está en revisión en el comité de evaluación de normas para su envío a consulta pública en 2014.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alayo, M., Iannaccone, J. 2002. Ensayos Ecotoxicológicos con Petróleo crudo, diésel 2 y diésel 6 con dos subespecies de *Brachinus plicatilis*, Muller 1786 (Rotífera: Monogononta). *Gayana* 66(1): 45-58, 2002 o *Gayana* versión On-line doi: 10.4067/S0717-65382002000100007
- Alvear, A. P., Rechencq, M., Macchi, J. P., Alonso, M. F., Lippolt, E. G., Denegri, A. M., Navone, G., Zattara, E. E., García-Asorey, I. M., P. H. Vigliano. 2007. Composición, distribución y relaciones tróficas de la ictiofauna del río Negro, Patagonia Argentina. *Ecol. Austral.*17(2): 231-246.
- Ankley, G., Mihaich, E., Stahi, R., Tillitt, D., Colborn, T., McMaster, S., Miller, R., Bantle, J., Campbell, P., Denslow, N., Diskerson, R., Folma, L., Fry, M., Giesy, J., Earl, Gray, L., Guiney, P., Hutchinson, T., Kennedy, S., Kramer, V., LeBlanc, G., Mayes, M., Nimrod, A., Patino, R., Peterson, R., Purdy, R., Ringer, R., Thomas, P., Touart, L., van der Kraak, G., Zacharewski, T. 1998. *Env. Toxicol & Chem.* 17(1)68-87.
- Bauchowitz, M. 2008. Zebra as models. Fed. Inst. *Fed. of Aquatic Science and Technology* of Switzerland. Eawag News 64e/june 2008, pag: 4-7.
- Braunbeck, T., Lammer, E. 2006. Fish Embryo Toxicity Assays. German Fed. Environm. Agency UBA Contract No. 203 85 122. 298pp..
- Conde-Porcuna, J.M. Ramos-Rodríguez, E., Morales-Baquero, R. 2004. El zooplancton como integrante de la estructura trófica de los ecosistemas lénticos. *Ecosistemas* 13 (2): 23-29. Mayo
- Environmental Protection Agency. 1980. Ambient water quality criteria for phthalate esters. Vol EPA 440/5-80-067 (1980) 112 p
- EPA (Environmental Protection Agency). 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms 3rd edition. Peltier, W. & Weber, C. (Ed).
- Environmental Protection Agency (EPA).2010. Nonphenol and Nonylphenol Ethoxylates Action Plan.U.S. August. Accessed 9/22/2011
- Escher, B. I & Hermens, J. L. M. 2002. Modes of Action in Ecotoxicology: Their Role in Body Burdens, Species Sensitivity, QSARs, and Mixture Effects *Environmental Science & Technology* 2002 36 (20), 4201-4217

- European Commission. European Chemical Agency. Annex 6 List of 146 substances evaluated in the Expert meeting. http://ec.europa.eu/environment/archives/docum/pdf/bkh_annex_06.pdf
- Guerra, A., M., Romero, L. 2009 Evaluación del crecimiento de *Thalassiosira fluviatilis* en tres salinidades diferentes. *Redvet Revista Electrónica de Veterinaria*, 10 (4): abril, España.
- Iannacone, J., L. Alvariño, W. Dale 1998b. Pruebas ecotoxicológicas como herramientas para la evaluación del impacto ambiental. *Bol. de Lima* (Peru). 113: 53-68.
- IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
- Jobling S., Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G., and Sumpter, J. P. 1998. *Env. Sci. Technol.* 32(17):2498-2506;
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203: 253-310.
- Kolpin, W. D., Furlong, E. T. Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, B. L., Buxton, T. H., 2002. *Env. Science & Tech.* 36(6): 1202-1211.
- Kortenkamp, A., Altenburgeer, R. 1999. *Science of Total Environment* 233:131-140.
- Muncke, J., Eggen, R. L. 2006. *Env. Toxicol. & Chem.* 25(10): 2734-2741
- Muncke, J. Junghans, M., Eggen, R.I. L. 2007. Testing estrogenicity of known and novel (xeno)-estrogens in the MolDarT using developing zebrafish (*Danio rerio*). *Env. Toxicol.* 22(2):185-193
- Munkittrick, Kr., Power, E. A. & Sergy, G. A. 1991. The relative sensitivity of microtox, daphnia, rainbow trout and fathead minnow acute lethality tests. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6: 35-62.
- Nagel R. 2002. *ALTEX* 19:1/02:38-48;
- NMX-AA-87-SCFI-2010, Análisis de Agua–Evaluación de Toxicidad Aguda con *Daphnia magna* Straus (Crustácea-cladóceras) - Método de prueba. Diario Oficial de la Federación del día 3 de marzo del 2011.

- MX-AA-112-SCFI-1995. Análisis de calidad del agua y sedimentos. Evaluación de toxicidad aguda con *Vibrio fischeri*, (Beijerinck 1889),). Método de prueba. Diario Oficial de la Federación.
- Organization for the Economical Cooperation and Development (OECD). 1992. Fish acute toxicity test. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 203
- Prieto, M. M., De la Cruz, L., Morales, M. 2006. Cultivo experimental del caldócero *Moina* sp alimentado con *Ankistrodesmus* sp y *Saccharomyces cerevisiae*. Rev.MVZ Cordoba. 11(1):705-714
- Routledge, E. J., Sumpter, J. 1996. *Env. Toxicol & Chem.* 15(3):241-248
- Routledge, E. J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brigthy, G., C. Waldock, M. Sumpter, J. P. 1998. *Env. Science & Technol.* 32:1559-1565.
- Snell, W. & G. Persoone. 1989. Acute toxicity bioassays using rotifers. 1.A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis*. *Aquat. Toxicol.* 14: 65-80
- Sumpter, J.P. & Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination on the aquatic environment. *Health Persp.* 103: 103-178.
- Tanaka, H. , Yakou, Y., Takahashi, A, Higashitani, T., Komori, K. 2001. *Water Science and Technol.* 43(2)125-132.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. Fish acute toxicity test, freshwater and marine. Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.1075. EPA 712-C-96-118.
- Van der Ven, L., van den Brandhof, E., Wester, P. W. 2007. *Env. Toxicol & Chem.* 26(1):92-99.
- Witters, H. E., van Genechten, Berckmanns P. 2001 *Water Science & Technol.* 43(2)117-123
- Zacharewski, P. 1997. *Env. Science & Technol.* 31(3):613-622.

7. ANEXOS

7.1 ANEXO A

Producción Científica

Publicación del Artículo en Revista Arbitrada

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

7.2 ANEXO B

DESARROLLO TECNOLÓGICO

Propuesta de protocolo de prueba para análisis de toxicidad aguda y de embriotoxicidad con *Danio rerio*.

7.3 ANEXO C1

Cartas del ejercicio de calibración

MODERN WATER, INC., para la valoración del desempeño de la solución FDB
(Freeze Dried Bacteria Solution). Calibración

7.4 ANEXO C2

Diseños experimentales para la calibración y valoración

MODERN WATER, INC

7.5 ANEXO D.

DESARROLLO TECNOLÓGICO

Anteproyecto para la actualización del protocolo de norma para
consulta pública Norma Mexicana

NMX –AA-112-SCFI