

INFORME FINAL 2011

Proyecto TC1105.1

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



**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.**

INFORME FINAL 2011

PROYECTO INTERNO TC 1105.1

**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
Sonia González Rebollar**

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
1. INTRODUCCIÓN	1-4
2. OBJETIVO	5
3. METODOLOGÍAS	
3.1 Pruebas con <i>Danio rerio</i>.	
3.1.1 Mantenimiento de adultos reproductores	5-6
3.1.2 Obtención de larvas y huevos	6
3.1.3 Prueba de toxicidad aguda con alevines <i>D. rerio</i>	7
3.1.4 Prueba de alternación del desarrollo embrionario (ADE) con huevos de <i>D. rerio</i>	8
3.1.5 Pruebas de eficiencia de desinfección de huevos de <i>Danio rerio</i>	8-9
4.RESULTADOS	
4.1 Prueba de toxicidad aguda con alevines <i>D. rerio</i>	9-11
4.2 Separación y purificación de principio activo de fármacos	9-13
4.3 Resultados de las pruebas de eficiencia de desinfección de huevos de <i>Danio rerio</i>	13-17
5. CONCLUSIONES PRELIMINARES	28
6. BIBLIOGRAFÍA	29-30
7. ANEXOS	31
ANEXO A	
A.1) Certificado de registro INPI. Paquete tecnológico de métodos analíticos. Protocolos de prueba para el desarrollo de la prueba de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i> adaptado a la norma ISO 6341,1996 y NMX- AA-87-SCFI-2010 y adecuado al sistema de gestión de la calidad que rige en laboratorios acreditados	32-34
A.2) Certificado de registro INPI Protocolos de prueba adecuados al sistema de gestión de la calidad que rige en laboratorios acreditados, para el desarrollo de pruebas de Toxicidad aguda con <i>Vibrio fischeri</i> .	35-36
ANEXO B.	
Anteproyecto de Norma PROY-NMX-AA-112-SCFI-2009 ANÁLISIS DE CALIDAD DEL AGUA Y SEDIMENTOS. EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA CON <i>Vibrio fischeri</i> , (Beijerinck 1889), P. Baumann <i>et al</i> , 1980 (antes <i>Photobacterium phosphoreum</i>). MÉTODO DE PRUEBA.	37-67

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Etapas de desarrollo de protocolos recientes y su avance	4
Tabla 2. Recuperación de principios activos	16
Tabla 3. Resultados de los experimentos de desinfección	17
Tabla 4.	18
Tabla 5.	18
Tabla 6.	22

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Figura 1. Vista de huevos viables y no viables	5
Figura 2. Estadio de Gástrula (<i>Danio rerio</i>)	6
Figura 3. Figura 3. Carta control. Prueba de letalidad con alevines de <i>Danio rerio</i> , 2010-2011.	10
Figura 4. Apariencia de las sustancias purificadas	11
Figura 5. Método para la purificación del principio activo a partir de fármacos comerciales	12
Figura 6. Purificación de ranitidina	21
Figura 7. Porcentaje (%) de organismos muertos, no viables y viables, registrados en los experimentos de desinfección	28
Figura 8. Figura 8. Vistas de los efectos de los tratamientos de desinfección empleados.	25
Figura 9 . Efectos teratogénicos del metanol en embriones de <i>D. rerio</i> .	27
Figura 10 . Efectos teratogénicos de la Floxasina en embriones de <i>D. rerio</i> .	28
Figura 11 . Efectos del Bisfenol A en embriones de <i>D. rerio</i> .	29

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.

PROYECTO INTERNO TC 1105.1

1. INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

Para cada grupo de herramientas de medición, el lograr métodos *ex situ* o *in situ* confiables, calibrados, analíticamente robustos y lo suficientemente sensibles para detectar cualquier forma de acción de los xenobióticos en los sistemas vivos, es una condición indispensable, y así mismo, cuanto más realista pueda ser el esquema metodológico de dichos protocolos, para lograr evidencia de efectos

mucho más acertados serán los elementos que se empleen en la construcción de una matriz de información que ayude en el discernimiento de las causas, relevancia y efectos ambientales, de otra manera esto no se lograra con la asertividad necesaria. (Zacharewski, 1997; Ankley *et al.*, 1998; Routledge *et al.*, 1998; Kortenkamp, 1999; Matsui, 2000; Tanaka *et al.*, 2001; Witters *et al.*, 2001; Kolpin *et al.*, 2002).

En vista de lo anterior el presente proyecto se efectuó para desarrollar y/o adaptar herramientas biológicas con alcances de aplicación en el contexto ambiental actual donde los compuestos convencionales, emergentes y los procesos de florecimientos algales ocupan ya un papel crucial en los problemas ambientales de los cuerpos de agua en México.

Con base en ello 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*, ente otros, modelos funcionales o pruebas de detección de toxicidad aguda, que en la mayoría de los casos ponen en evidencia la presencia de contaminantes que afectan de forma terminal a los organismos, ya sea por su dosis o por la cinética en que opera una vez dentro del organismo expuesto. Esta clase de pruebas han sido muy útiles en el monitoreo ambiental ya que con ellas pueden establecerse condiciones de descarga que minimicen el daño a cuerpos receptores así como la construcción de bases de datos para la evaluación inicial de sustancias químicas de uso ambiental, entre otros.

Tabla 1. Etapas de desarrollo de protocolos recientes y su avance

	Fases de evolución de los desarrollos o adaptaciones tecnológicas				
	Adecuación al cultivo	Montaje y adecuación metodológica	Calibración interna	Sensibilidad, ámbito de respuestas y de aplicación	Pruebas de campo
<i>Danio rerio</i> letalidad	2009	2010	2010	2011	2011
<i>Danio rerio</i> desarrollo larvario	2009	2010-2011	2010	2011	
Pruebas con algas inmobilizadas (<i>P. subcapitata</i>)	R	2010 - 2011	2011		
Tasa de alimentación con cladóceros (<i>D. magna</i>)	R	2010-2011	2011		
Factores limitantes	R	2011			

R= Resuelto previamente

Más recientemente, a partir de 2009, se han incorporado desarrollos con nuevos modelos funcionales, aptos para evidenciar los efectos asociados a compuestos emergentes y procesos de florecimientos algales, entre ellos se encuentra el análisis de letalidad y de desarrollo larvario con peces *Danio rerio*, protocolos de respuesta subletal aptos para pruebas en laboratorio y en campo (in situ) con microalgas (*P subcapitata*) y cladóceros (*D. magna*), y la adaptación del método de evaluación de factores limitantes para el análisis de crecimientos algales. La adaptación de cada desarrollo a lo largo del presente proyecto, cubrió una nueva fase de evolución que es distinta para cada procedimiento (Tabla 1).

Los nuevos modelos funcionales deben ser adecuados para la detección de otros niveles de efecto de mayor relevancia ecológica que permitan la detección de respuestas tempranas asociadas al desarrollo del individuo (crecimiento y reproducción) y la evaluación de efectos bajo las condiciones ambientales que persisten en el sitio (evaluaciones *in situ*), toda vez que en ocasiones las respuestas o efectos de los contaminantes se exacerban o reducen en condiciones controladas de laboratorio (Allan, *et al* 2006; Crane *et al.*, 2007; Warfe *et al.*, 2007).

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 en toma de decisiones relacionadas a la evaluación de riesgo ambiental y clasificación de peligrosidad. Por ejemplo, en la Unión Europea, los requerimientos para nuevas sustancias son incluidas en los anexos del Concil Directorated 67/548/EEC en apego a las leyes, regulaciones y procedimientos administrativos que aplican a la clasificación de sustancias de uso ambiental que se suponen peligrosas (EC, 1967). En estos casos, la cantidad de datos solicitados relacionados con posibles efectos biológicos o de seguridad ambiental se incrementan en función de la cantidad de la sustancia puesta en el mercado, y son sujetas de esta solicitud todas aquellas sustancias cuya producción excede de una tonelada por año (European Comission, 1992).

En estas disposiciones internacionales, creadas para regular la autorización de uso y producción de nuevas sustancias, por lo general se incluye un grupo de pruebas de evaluación de efectos biológicos como son: toxicidad aguda con dáfnidos (*Daphnia magna* 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 Ispra Italia, para estimar las dosis de seguridad aceptables, que por lo regular se basan en predicciones de riesgo que tienen por objeto establecer la dosis de efecto no observable (NOEC). Estas dosis y la clasificación de peligrosidad que se haga de

la sustancia, son incorporadas a la Base de Datos de la ECB desde donde es controlada su producción y comercialización.

Las pruebas biológicas, y más específicamente las pruebas con invertebrados y peces, también son clave como herramientas para el control de efluentes. Tal es el caso de del programa WET (Whole Effluent Toxicity) que opera en los Estados Unidos y del WEA (Water Environmental Assessment de la; OSPAR), que es su contraparte en Europa. Ambas organizaciones, mediante estos programas han aportado datos y orientado sus pautas de regulación de efluentes mediante la evaluación de toxicidad con peces. Actualmente, la problemática en torno a las sustancias clasificadas por sus efectos en la reproducción y desarrollo como Agentes de Disfunción Endocrina (ADE) o contaminantes emergentes, ha generado la necesidad de buscar indicadores biológicos más aptos para la detección de estas sustancia y así mismo el diseño de protocolos que permitan el desarrollo de pruebas semi-controladas, como es el caso de los ensayos *in situ* (Moreira *et al* , 2004) . Para ello, la combinación de pruebas con algas, cladóceros y peces, para el análisis de cuerpos de agua dulce, continúan son los niveles taxonómicos más adecuados, sin embargo se requiere avanzar en la búsqueda y protocolos que permitan discernir o evidenciar la presencia de contaminantes que actúan de forma más sutil en los sistemas biológicos como es el caso de los emergentes, contenidas en fármacos y productos de cuidado personal, principalmente. En Europa, la comunidad científica se ha encausado al uso de embriones, al análisis de los estadios de desarrollo y genética del pez Medaka (*Oryzias latipes*) y del pez cebrá (*Danio rerio*), los cuales son empleados como modelos biológicos que permiten discernir las formas de acción de estas sustancias y así mismo determinar su presencia en el ambiente y el riesgo potencial al hombre, toda vez que el proceso de desarrollo y su genética, son afines al ser humano, y así mismo han propuesto la aplicación y desarrollo de pruebas de toxicidad para análisis *in situ* empleando indicadores de efecto subletal como son cambios en la tasa de alimentación con cladóceros (*Daphnia magna*) y/o cambios en el crecimiento de la población empleando una especie modelo (*P. subcapitata*) (Moreira *et al* ., 2004, 2006)

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

Estas acciones de regulación sobre sustancias de producción antropogénica y la creación de programas internacionales de monitoreo ambiental son de gran

alcance comercial y por tanto económico, ya que las disposiciones internacionales de este orden no solo se enfocan al control de la producción o de los ambientes afectados confinados a las fronteras de estos países, estas acciones apuntan al control de la comercialización de productos y alimentos provenientes de otros sitios, los cuales deberán cumplir con estándares ambientales adecuados de acuerdo a los criterios de calidad establecidas por organizaciones internacionales (Escher and Hermens, 2002), por lo que México debe responder generando la base tecnológica que permita el manejo de las herramientas analíticas basadas en pruebas biológicas agudas y su avance a pruebas subletales y de exposición *in situ*, que eventualmente sean de utilidad para el control ambiental de México así como para lograr también el cumplimiento del marco de las regulaciones internacionales mencionadas.

2. OBJETIVO

Desarrollar y adaptar metodologías basadas en la respuesta biológica para la detección de efectos asociados a contaminantes convencionales y emergentes, entre otros, en ambientes epicontinentales, costeros y en aguas de uso antropogénico, que sean de utilidad en estudios ecotoxicológicos, de evaluación de riesgo ambiental de factores determinantes para los florecimientos algales potencialmente tóxicos en cuerpos de agua

3. METODOLOGÍAS

El desarrollo del proyecto abordo diferentes vertientes experimentales encausadas al refinamiento metodológico de los protocolos en creación y/ o adaptación a fin de evolucionar en sus diversas fases de avance, en este sentido las metodología y los diseños experimentales desarrollados, que quedan explícitos en este apartado, pueden considerarse también como resultados, toda vez que el objetivo del presente proyecto es el diseño de protocolos cuya optimización se pone a prueba a través de ensayos de evaluación de los diseños experimentales, cuyos datos se presentaran en el apartado de resultados.

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

3.1 Pruebas con *Danio rerio*.

De empleo, en este proyecto, para dar continuidad a pruebas de sensibilidad en el análisis de efectos en el desarrollo embrionario y en el análisis de de muestras de campo y calibración con pruebas de letalidad con alevines.

3.1.1 Mantenimiento de adultos reproductores

El cultivo se mantiene en agua dulce natural filtrada para eliminar carga orgánica o residuos de cloro y que cumple con una dureza de 80 a 100 mg/L como 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

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

3.1.2 Obtención de las larvas y 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.

En caso de requerir alevines para llevar a cabo las pruebas de letalidad, los huevos deben dejarse eclosionar, por lo que se trasladan a acuarios de eclosión donde permanecerán bajo condiciones controladas hasta las 72 h, tiempo en que emergen los alevines.

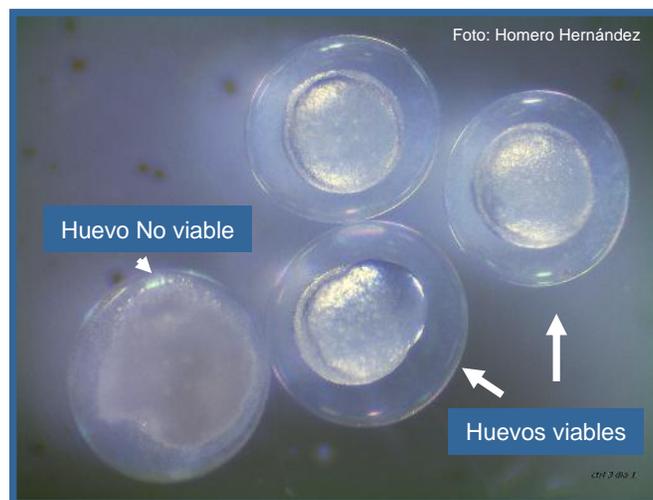


Figura 1. Vista de huevos viables y no viables

Cuando el material biológico se requiere para pruebas de desarrollo embrionario, los huevos se limpian, se revisa al microscopio su estado de desarrollo inicial y se separan aquellos que son viables y útiles para los fines de dichas pruebas (figura. 1).

Procedimientos de prueba

3.1.3 Prueba de toxicidad aguda con alevines *D. rerio*

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

Partiendo de una muestra problema, se prepara una serie de diluciones empleando agua semidura reconstituida como medio de dilución y un control negativo con el agua antes mencionada. Se recomienda utilizar un factor de dilución de 1:1 para preparar la serie de concentraciones, o en caso de que se presenten valores de respuesta estrechos, se pueden usar concentraciones diversas que permitan obtener una curva dosis-respuesta adecuada para la correcta interpolación del valor de la LC_{50} .

Para cada dilución se debe contar con al menos tres réplicas, cada una de las cuales constará de 10 organismos en un volumen de 150mL de muestra. Se evaluará la mortalidad al término del bioensayo (48 horas), haciendo anotaciones sobre el número de organismos afectados (que se observan con movilidad o desplazamientos anormales).

Durante el tiempo de la prueba, los alevines de *D. rerio* no se alimentan y tampoco es necesario inyectar aire, a menos que se trate de muestras con carga orgánica muy elevada. El tiempo de exposición de la prueba fue de 48h en las cuales la temperatura se mantuvo a 26 ± 2 °C. Una vez concluido el tiempo de exposición, se revisaron los recipientes para establecer el número de organismos vivos por replica y por dilución. La información registrada se empleo para el cálculo de la CL_{50}

Determinación de la CL_{50}

Los resultados de efecto de mortalidad en los alevines se expresan a través de la CL_{50} (concentración letal media) y las unidades pueden estar en por ciento, en caso de aguas naturales o mezclas de descarga, ml/L, o mg/L en caso de soluciones preparadas en laboratorio con tóxicos o sustancias específicas, o en Eq. mg/ml, para el caso de extractos de sólidos o de sustancias no solubilizables, o cualquiera otra unidad acorde con el tipo y manejo de muestra que se desee analizar.

Los cálculos para la determinación de la CL_{50} así como la elaboración de las curvas asociadas, son realizados a través del análisis PROBIT con ayuda del programa US EPA 1,5.

Para los fines del presente proyecto, la prueba con alevines se continuo llevando a cabo para la determinación de efectos de las soluciones sintéticas de fenol, empleadas como tóxicos de referencia, con el fin de incrementar el numero de datos que constituyen la carta control del procedimiento en calibración.

3.1.4 Prueba de alternación del desarrollo embrionario (ADE) con huevos de *D. rerio*

Las pruebas de alteración del desarrollo embrionario se destinaron a la evaluación de los efectos teratogénicos de diversas sustancias entre ellas se encuentran diversas soluciones desinfectantes que se probaron con el fin de seleccionar aquella que se incorporaría al pretratamiento de huevos de manera rutinaria en el protocolo a fin de obtener material apto para el análisis de efectos por exposición a sustancias contaminantes como el Bisfenol A, cromo, metanol, y fármacos conteniendo estradiol (hormona esteroideal), analgésicos como el naproxeno, diclofenaco y paracetamol, bloqueadores de estimulo vagal como la ranitidina, y antidepresivos como la fluoxetina, así como a muestras ambientales del influente y efluente de la planta de tratamiento industrial de RECICLAGUA , de la Cd. de Toluca.

Para el análisis de los diversos fármacos se emplearon productos grado farmacéutico que para la mayoría de los casos fueron de marca genérica, solo el estradiol se adquirió de laboratorio. Para la liberación de los principios activos de cada formulación fue necesario el montaje de un método químico de separación que se presenta como un resultado del presente proyecto (ver 4.2).

A través de los ensayos con las diversas sustancias antes mencionadas, se fueron reforzando o ampliando la lista de rasgos de alteración morfológica de utilidad para determinar los efectos posibles de los contaminantes. Esta fase del proyecto dio continuidad a los avances logrados durante las fase de montaje y adecuación metodológica llevada a cabo en el 2010 (Tabla 1).

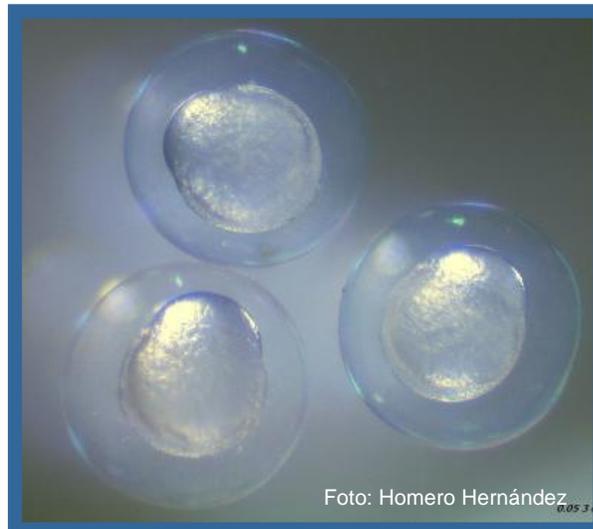


Figura 2. Estadio de Gástrula (*Danio rerio*)

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

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

3.1.5 Pruebas de eficiencia de desinfección de huevos de *Danio rerio*

El experimento para la evaluación de desinfectantes, se llevó a cabo mediante el empleo de huevos recién fecundados de *Danio rerio* a fin de probar su eficiencia en la eliminación de hongos, bacteria y protozoarios que con regularidad de desarrollan en la superficie de los huevos e interfieren en la evolución del desarrollo larvario de *D. rerio* en pruebas de laboratorio, y así mismo la selección de una fórmula que no afecte la sensibilidad, viabilidad y sobrevivencia de los embriones y cuya composición sea sencilla de eliminar del medio a fin de evitar residuos que interfieran con los componentes de las muestras y sus efectos durante las pruebas de exposición.

Después del análisis la literatura especializada. tanto en pruebas de desarrollo con peces como de acuicultura, se encontraron solo dos propuestas técnicas para la prevención de infecciones en huevos de peces, la primera es una formulación

aplicada en estudios de efectos en desarrollo con *D. rerio* propuesto por Muncke y Eggen, 2006 en el que se elabora un medio de nombre E3, la formulación es similar a la que propuso Rocha y colaboradores en 2002, con el nombre de MBS. Esta última incorpora contenidos de sales de entre 2 a 20 veces superiores a lo sugerido mas recientemente por Muncke y Eggen, (2006) además de antibióticos y fungicidas, con todo ello, si bien se garantiza la acción desinfectante, su composición contiene sustancias no convenientes, por el riesgo de residuos, para los fines de uso de este material biológico en la evaluación de teratógenos ambientales. La segunda, es la formulación de mayor uso en acuicultura de peces de consumo y de ornato que emplea la acriflavina como principio activo en la basta mayoría de los productos comerciales destinados para ese fin.

Ambas formulaciones fueron probadas, así como el uso de agua salinizada, que se ha empleado exitosamente en el laboratorio, como sistema séptico de limpieza y eliminación de infecciones en invertebrados, cuando se ha presentado eventualmente en cultivos de *Hydra attenuata* y *Daphnia magna*. El agua levemente salinizada ha sido también sugerida por Streisnger (2007), toda vez que los huevos, y en general los peces de *D. rerio* tiene tolerancia osmótica a dosis bajas de salinidad (< 0.1%) (Báez, 2005).

Las soluciones desinfectantes probadas fueron las siguientes

Desinfectante 1. Consiste en la preparación del medio E3, éste que se elabora con cuatro sales : 5 mMNaCl, 0.17 mMKCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄. Por separado se prepara una solución de Azul de Metileno al 5% para adicionarse a la primera y lograr una concentración de 0.0001%.

Los huevos se enjuagan en un primer momento con medio E3 adicionado con azul de metileno y posteriormente se enjuagan nuevamente con medio E3 libre del colorante. Los huevos desinfectados se mantuvieron en esta solución a lo largo de las 72 h que duró el periodo de evaluación.

Desinfectante 2. Consiste en una solución salina preparada con 1.5 ml de Solución de Sales Stock que se lleva a 1L de agua destilada (60 mg/L como concentración final). Las Solución de Sales Stock consiste en 40 g de instant Ocean disuelto en 1 litro de agua destilada. En esta solución se mantiene los huevos por 20 minutos y posteriormente se enjuagan con agua filtrada del medio de mantenimiento para las revisiones del experimento y hasta la eclosión de los alevines (72h).

Desinfectante 3. Se adicionaron dos gotas de la solución comercial de acriflavina de 1.1g /0.1L (Try-cure®). en cuatro litros de agua filtrada. Los huevos se mantuvieron en esta solución por 20 minutos y posteriormente se enjuagaron tres

veces hasta eliminar la solución. Los huevos se mantuvieron en agua natural filtrada a lo largo de las 72 h de duración del experimento.

El agua para la preparación de las sales de los desinfectantes 1 y 2, así como el agua de enjuague y mantenimiento fue esterilizada por filtración en un sistema Millipore con una membrana de 0.2 micras de abertura.

Montaje y lectura de experimento

Para el experimento se procedió al montaje de cámaras de reproducción para obtener los huevos (3.1.2). Por la mañana los huevos fueron recolectados, revisados bajo el microscopio y se seleccionaron 250 huevos viables para cada lote experimental.

Cada lote fue sometido al tratamiento desinfectándose con una de las soluciones antes señaladas. En forma paralela, se preparó un lote control en el cual los huevos fueron lavados y mantenidos en solo agua filtrada sin exposición a desinfectantes.

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

Posteriormente se llevaron a cabo revisiones al microscopio cada 24 h, para cuantificar el número de huevos viables, en los que el desarrollo evolucionaba hasta lograr su eclosión a las 72h, aquellos no viables, caracterizados por el desarrollo suspendido en etapas tempranas ya fuera por los procesos infectivos que atacan en estas etapas o por otras causas y aquellos muertos, que se diferenciaron de los no viables con base en el bloqueo de la evolución de su desarrollo en etapas avanzadas en las que el organismo ya había adquirido estructuras corporales como ojos, cauda y saco vitelino diferenciado o aquellos que no lograron la eclosión a las 72 h,

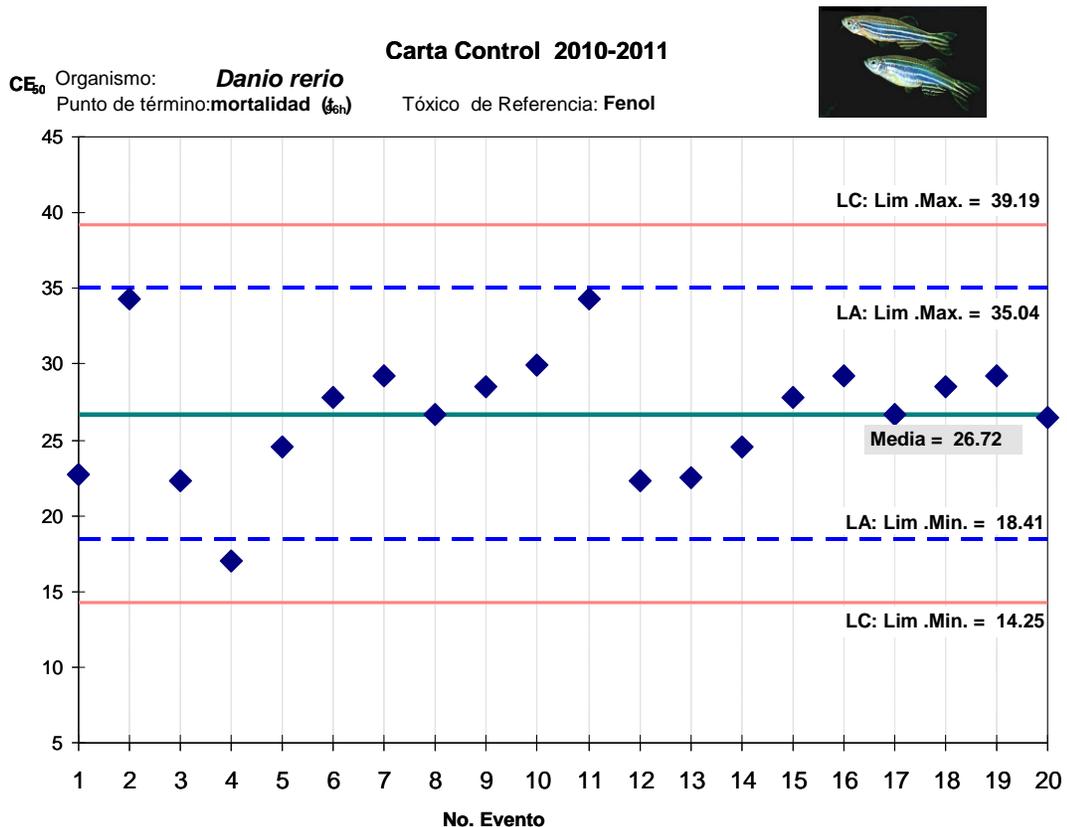
El experimento se replicó en tres eventos.

4 RESULTADOS

4.1 Prueba de toxicidad aguda con alevines *D. rerio*

Mediante el planteamiento experimental de éste proyecto, se dio continuidad a la calibración del método de letalidad con alevines de *Danio rerio*, mediante la verificación de la respuesta al tóxico de referencia Fenol, anteriormente seleccionado para este fin. A lo largo del proyecto 2011 los registros de calibración interna se duplicaron, contando actualmente con una carta control de 20 datos (tabla 2).

En relación a la CL_{50} obtenida para la carta control del Fenol después de dos años de obtención de datos útiles para la calibración del método, los valores continúan siendo consistentes con los reportados en los trabajos de Maldonado (2003) y Boop (2006) quienes reportaron para este mismo tóxico CL_{50} de 24 a 29 mg/L. En comparación con los valores obtenidos durante 2010, la CL_{50} ha sido prácticamente la misma, pasando de 26.70 mg/L a 26.72 mg/L, sin embargo el coeficiente de variación se ha reducido de 18.53 a 15.55%, manteniéndose en un ámbito adecuado que demuestra la consistencia analítica del manejo de la especie y del método de evaluación empleado (Figura 3).



Evento	CL ₅₀ Fenol mg/L	Evento	CL ₅₀ Fenol mg/L
1	22.7	13	22.5
2	34.292	14	24.52
3	22.283	15	27.8
4	17.05	16	29.2
5	24.56	17	26.7
6	27.8	18	28.5
7	29.2	19	29.2
8	26.7	30	26.5
9	28.5	Media	26.72
10	29.9	Desv. Est.	4.16
11	34.29	Coef. Variación	15.55
12	22.28	Media +2sd	35.04
		Media - 2sd	18.41

Figura 3. Carta control. Prueba de letalidad con alevines de *Danio rerio*, 2010-2011.

4.2 Separación y purificación de principio activo de fármacos

Para el análisis de los diversos fármacos se emplearon productos grado farmacéutico que para la mayoría de los casos fueron de marca genérica, solo el estradiol se adquirió de laboratorio.

En un inicio, los experimentos se planearon a partir de la pulverización y disolución de las tabletas en agua induciendo un cambio de pH que favoreciera su desintegración, sin embargo la disolución del excipiente aún en intervalos de cambio de pH extremos, no fue posible, el producto se mantuvo prácticamente entero y por tanto probablemente encapsulando a la sustancia o principio activo de nuestro interés, haciendo imposible la definición confiable de la concentración de exposición del compuesto que permitiera asociarse con los efectos que pudieran observarse, por ello fue indispensable trabajar sobre un método que permitiera la liberación y purificación del principio activo para que se esa manera fuer posible el control de la concentración de exposición empelada en el sistema de prueba.

Debido a lo anterior, la investigación sobre los efectos teratogénicos de los fármacos se postergo hasta lograr diseñar un protocolo que permitiera la liberación del principio activo a partir de la formulación comercial. Se tenía como alternativa adquirir el principio activo de manera directa como sustancia pura sin embargo en ocasiones no corresponde con lo empleado en producción de

productos genéricos que es la forma química de riesgo real. Tal fue el caso de la ranitidina, la cual en su forma pura se estructuraría en cristales, sin embargo lo observado fue la formación de residuos resinosos asociados a la utilización de hidrocloreto de ranitidina en la formulación. (Fig. 6),

Como resultado de ello se analizó la información farmacéutica de cada producto y sus bases químicas a fin de determinar la forma apropiada de tratar el fármaco hasta obtener el principio activo lo más puro posible, y a partir de este producto depurado se elaboraron las soluciones de prueba con concentraciones de exposición más precisas para el análisis de sus efectos teratogénicos, los cuales se efectuaron de acuerdo al método descrito en 3.1.4.

Para lograr recuperar o disociar el principio activo, se procedió a analizar las características de los compuestos y la base química de su estructura en productos farmacéuticos, con base en ello se planeó el siguiente método que ha sido muy eficiente en el procesamiento de analgésicos, ranitidina y fluoxetina (Fig. 4)

El método empleado se llevó a cabo pesando 5 tabletas de cada fármaco, las cuales fueron disgregadas en un mortero, hasta obtener un polvo fino y homogéneo; que se colocó en un matraz, se le añadió 30ml de metanol y se agitó por 5min. Posteriormente la solución se depuró con papel filtro purificado montado en un embudo, agregando 10ml más de metanol. (Fig. 5)

El filtrado se pasó por una columna Octadecyl C18 Bakerbondspe 7020-02. JT Baker® previamente activada con 2:2 metanol-agua milliQ. A la cual se le adicionó 10ml más de metanol, para así obtener una separación confiable de los principios activos de los distintos fármacos.

Para la cristalización de las sustancias de interés, se efectuó una evaporación mediante el evaporador rotatorio, en un medio precalentado a 60 °C y a 70 rpm; la obtención del compuesto sólido, se logró a sequedad total. Los cristales recuperados fueron pesados y recuperados raspando las paredes del matraz, para con ellos elaborar las soluciones de prueba con las que se llevarían a cabo los experimentos con huevos de *D. rerio* (Fig.4) .

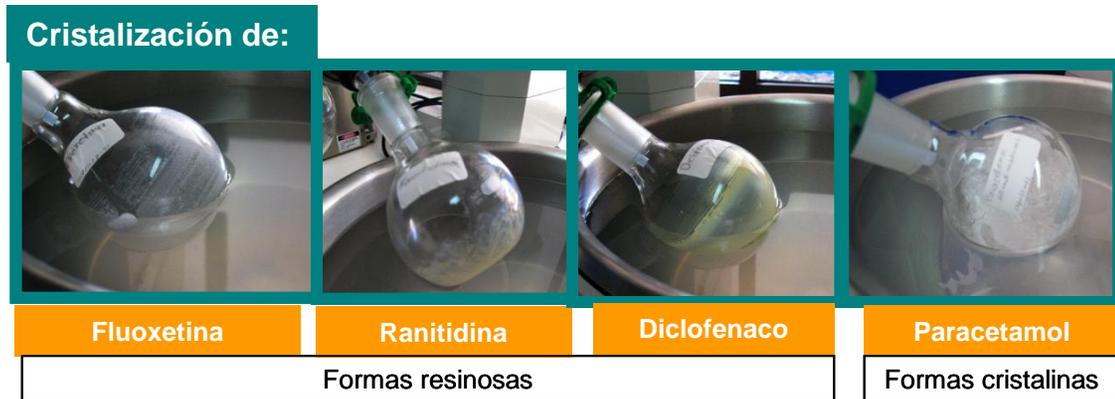


Figura 4 . Apariencia de las sustancias purificadas

El método de recuperación del principio activo permitió niveles de recuperación aceptables, que van del 33. al 79 %, de acuerdo al balance de pesos que se efectuó para estimar dicho valor. En general el método respondió adecuadamente para los fármacos trabajados hasta el momento, sin embargo cada sustancia y formulación es distinta por lo que no necesariamente el protocolo descrito puede aplicarse universalmente y en ocasiones requerirá de ajustes o cambios sustanciales.

Tabla 2. Recuperación de principios activos

	Naproxeno 500 mg	Paracetamol 500mg	Diclofenaco 100mg	Ranitidina 300mg	Fluoxetina 20mg
Peso inicial de las 5 tabletas (g)	3.175	2.99	2.77	2.2	1.1
Contenido total esperado(g)	2.5	2.5	0.5	0.15	0.1
Peso recuperado (g)	1.99	0.83	0.32	0.063	0.045
% Recuperación en relación a la concentración total esperada	79.6	33.2	64	42	45



Figura. 5. Método para la purificación del principio activo a partir de fármacos comerciales

Por ejemplo, en el caso de la ranitidina, sabiendo que su forma pura debería manifestarse en forma cristalina, el encuentro de una resina llamo la atención y se pensó que el procedimiento no habría resultado lo suficientemente específico para dicho activo, sin embargo la literatura señala que en su forma como hidrocloreto se presenta como resina la cual al disociarse por calor libera al activo. A partir de esta información se dedujo que la formulación del fármaco genérico contenía a esta forma química de ranitidina, que es la mas usual en las formulaciones y se procedió a depurarla mediante adición de metanol caliente y posterior desecación por rotovaporación lográndose la formación de cristales (Duglas & Bird, 1990) (Fig.6).



Figura 6 . Purificación de ranitidina

4.3 Resultados de las pruebas de eficiencia de desinfección de huevos de *Danio rerio*.

Los resultados de los tres experimentos de desinfección efectuados se presentan en la tabla 3. En ella se observa que del total de 250 huevos expuestos a cada tratamiento, en general los organismos viables (aquellos que logran la eclosión al término de las 72h en que se completa su ciclo de desarrollo), en por lo general mayor en huevos con cualquiera de los tres tratamientos de desinfección.

Tabla 3. Resultados de los experimentos de desinfección

	No. de organismos		
	Muertos	No viables	Viables
EXPERIMENTO 1			
SIN DESINFECCIÓN	55	87	108
D1 (E3)	3	35	212
D2 (A. Salinizada)	9	42	199
D3 (Acriflavina)	38	64	148
EXPERIMENTO 2			
SIN DESINFECCIÓN	68	150	32
D1 (E3)	0	18	232
D2 (A. Salinizada)	0	29	221
D3 (Acriflavina)	39	62	149
EXPERIMENTO 3			
SIN DESINFECCIÓN	48	93	109
D1 (E3)	0	4	246
D2 (A. Salinizada)	0	12	238
D3 (Acriflavina)	27	47	176

Por lo general, los huevos no desinfectados tienen tasas sumadas de mortalidad o de inhibición de su viabilidad en las etapas tempranas (<24 h de desarrollo) de entre el 50 y 80% (Fig.7) notándose que en ocasiones se agudiza el problema, como fue en el caso del experimento 2, en que de 250 huevos solo 32 lograron la eclosión (tabla 3).

La desinfección tiene para los tres casos un efecto favorable en viabilidad la cual pasa del un valor promedio del 33%, sin desinfección, al 80% cuando se emplea algún producto antiséptico, sin embargo, para los fines de la utilización del material biológico con fines de pruebas de desarrollo embrionario es muy importante no solo el incremento de la viabilidad si no también eliminar la mortalidad, entendida como el bloqueo del la evolución del desarrollo embrionario en etapas avanzadas (> 24 h) en las que el organismo ya había adquirido estructuras corporales como ojos, cauda y saco vitelino diferenciado o aquellos que no lograron la eclosión a las 72 h.

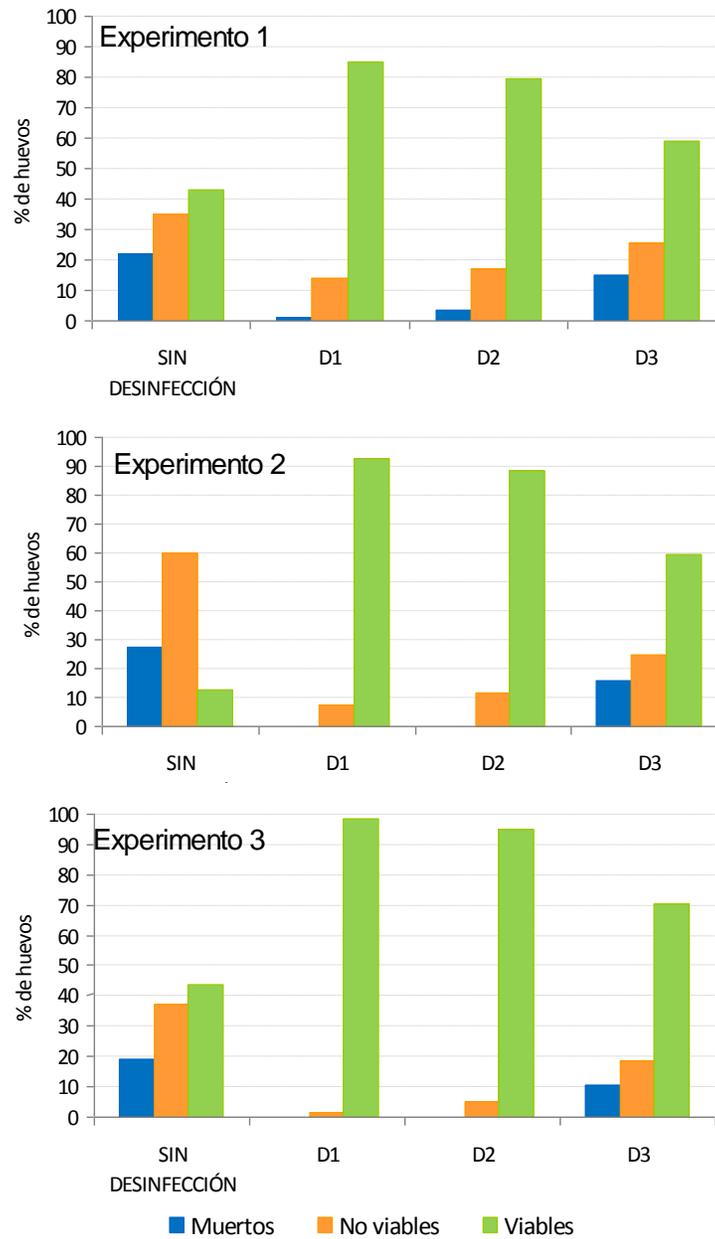


Figura 7. Porcentaje (%) de organismos muertos, no viables y viables, registrados en los experimentos de desinfección.



Figura 8. Vistas de los efectos de los tratamientos de desinfección empleados. La estrella señala a aquellos que son eficientes y no generan efectos ni riesgos en su utilización.

En este sentido los resultados mostraron que de los tres desinfectantes, la Acriflavina producía mortalidad. Si bien durante las primeras horas después de la desinfección el huevo continua su evolución regular, después de las 24 h existe un bloque del desarrollo normal. En algunos casos los organismos se tornan no viables y en otros continúan su evolución pero a tiempos alterados con retrasos de hasta mas de 24 h. En las imágenes de la figura 8, se observa que los embriones expuestos a la Acriflavina, a las 72 h en las que el desarrollo debió haberse completado, los embriones tienen un desarrollo correspondiente a menos de 48h. Si bien estas observaciones no ocurren en todos los casos, el hecho de que algunos embriones presente esta clase de daño, sugiere que la Acriflavina tiene efectos en el desarrollo embrionario del pez cebra con tasas de mortalidad y no viabilidad sumadas del 36% lo que contrasta con el 10% observado para los desinfectantes 1 y 2, elaborados con medio E3 y Agua Salinizada respectivamente (Fig. 7).

En relación a los desinfectantes 1 y 2, los registros obtenidos indican que no hay diferencias entre ambos tipos de tratamiento por lo que cualquiera de las soluciones puede ser empleada para la desinfección de huevos con fines de empleo en pruebas de teratogenicidad o de producción de alevines para determinaciones de toxicidad aguda

4.3 Efectos teratogénicos de contaminantes y fármacos analizados

Metanol

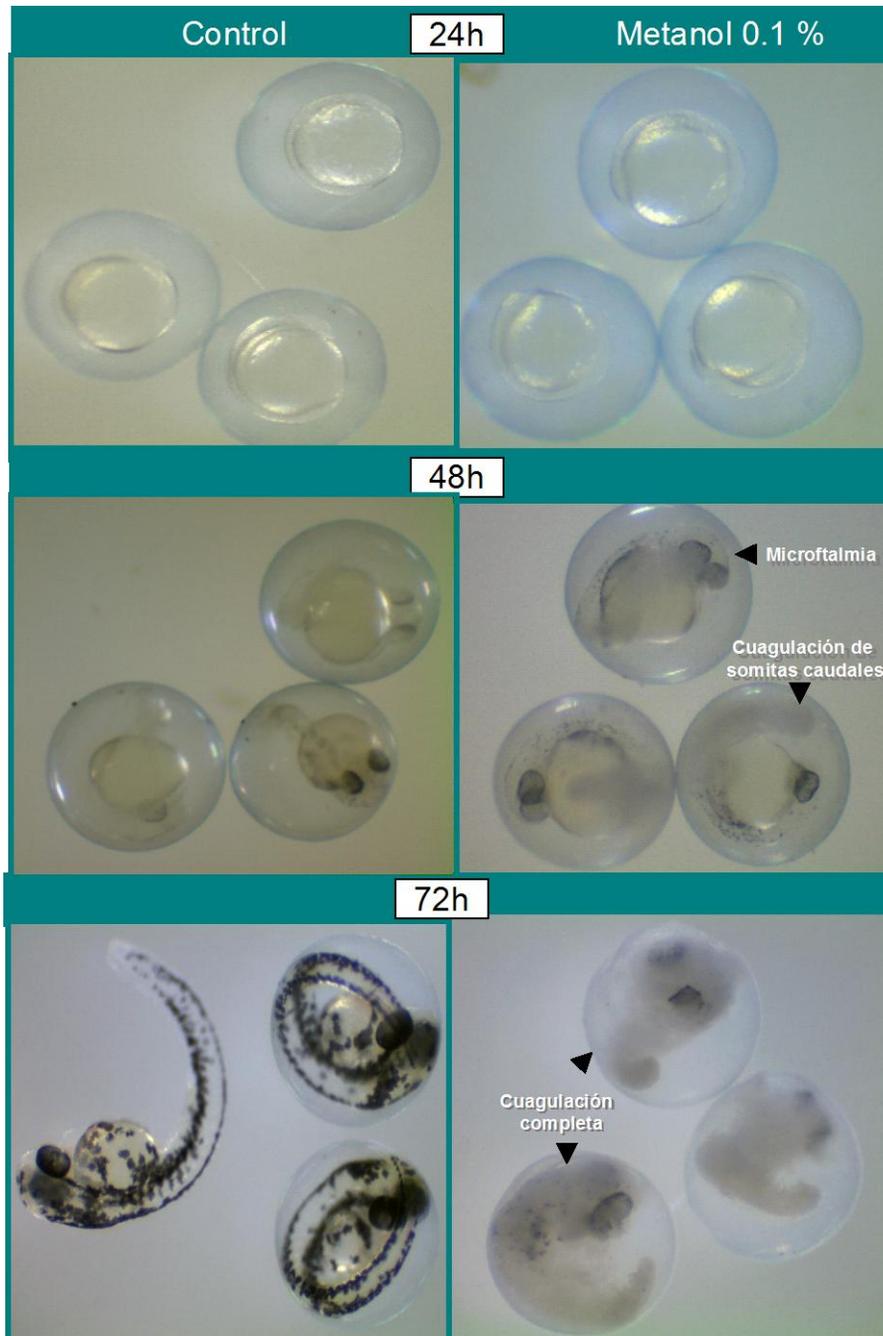


Figura 9 . Efectos del metanol en embriones de *D. rerio*.

Fluoxetina:



Figura 10. Efectos teratogénicos de Fluoxetina

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

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

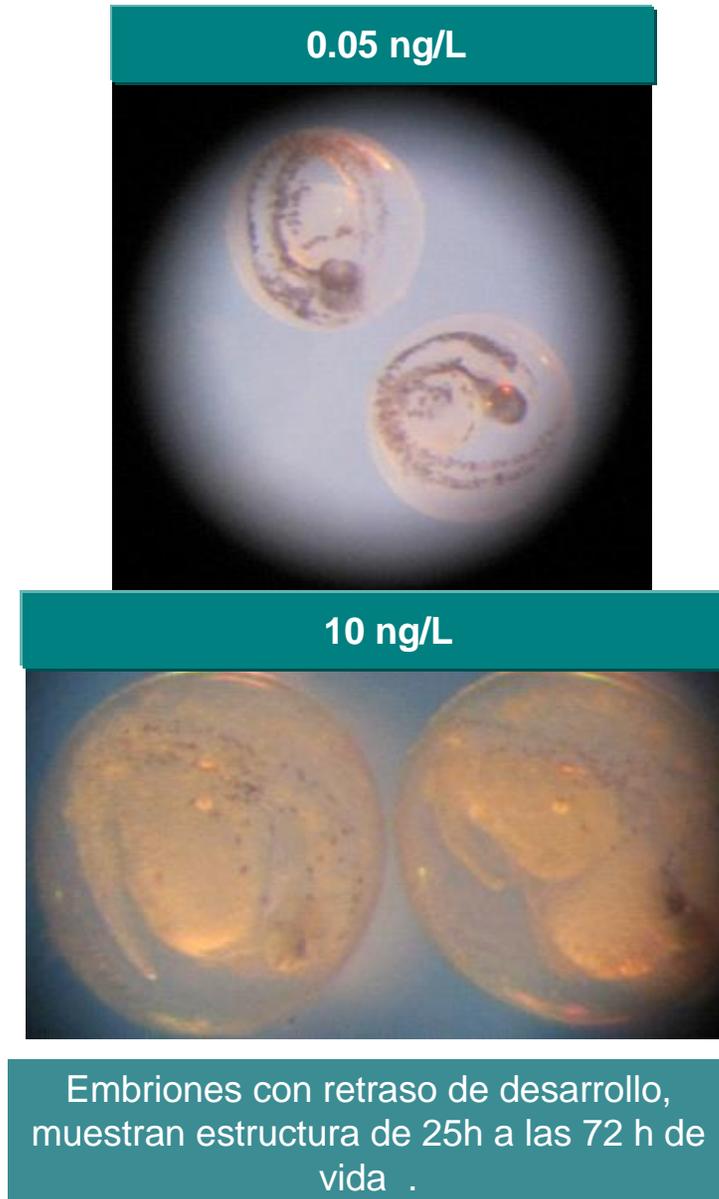


Figura 10 Efectos teratogénicos de Bisfenol A

6. CONCLUSIONES

- Los desinfectantes de mayor eficiencia fueron el No. 1 y el No. 2.
- No es recomendable el empleo de desinfectantes de uso comercial en sistemas de producción controlada de huevos y alevines de *Danio rerio* con fines de pruebas de toxicidad ambiental, ya que a pesar de que previenen las infecciones, producen efectos adversos de mortalidad embrionaria e inhibición del desarrollo.
- Los daños por manipulación de los huevos pueden producir resultados falsos positivos en las lecturas de viabilidad o mortalidad, por lo que es importante extremar cuidados en la manipulación durante la preparación de pruebas.
- La filtración del agua utilizada en la preparación de desinfectantes es indispensable para eliminar los residuos suspendidos y evitar interferencia durante el proceso de desinfección de los huevos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahel M. Moinar E., Ibric S., and Giger W. 2000. *Water Science & Technol.* 42(7) 8:15-22
- Allan, J.I. Vrana, Greenwood R., Mills G.A. Roing B. And Gonzalez. 2006. *Talanta* 69 :302-322
- Ali N. 2007. Teratology in Zebrafish Embrios: A tool for risk Assessment. Thesis Master of Science. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.68pp
- 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., GiesyJ., Earl Gray L., Guiney P., Hutchinson T., Kennedy S., Kramer V., LeBlanc G., Mayes M., Nimrod A., Patino R., Peterson R., Purdy R., Ringer R., Thomas P., Touart L, van der Kraak G. and Zachareswsski T. 1998. *Env. Toxicol & Chem.* 17(1)68-87.
- Báez Ramírez A., Prieto García F y Galán Vidal C. A. 2004. Bioacumulación y daños genotóxicos en Pez Cebra (*Danio rerio*) por arsénico en aguas de Zimapán, Hidalgo (México). *Revista AquaTIC*, 021: 62-70.
- España 21:62-70.Bauchrowitz, 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..
- Boop S. K., Minuzzo M., and Lettieri T. The Zebrafish (*Danio rerio*): an Emerging Model Organism in the Environmental Field. European Commission2006, Joint Research Centre, Institute for Environmental Sustainability. EUR 22598: 1-20
- Crane M., Burton A. Culp., M. J., Greenberg M. S., Munkittrick R, K., Ribeiro R., Salazar H. M. D St-Jean S. 2007. *Integrated Env. Assessment and Management.* 3(2)234-245.
- Douglas S. J. & Bird, F., R. 1990. Un procedimiento para la preparación de un adsorbido resinoso de ranitidina. Patente de Invención. Registro de propiedad industrial , España, No. de publicación: ES 2 011 573. Titular Glaxo Group Limited Clarges House, 6/12 Clarges Street London W1Y 8DH; GB
- 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
- Hill A., , Teraoka H., Heidemann, W., Peterson R.E. 2005. Zebra as model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Science* 86:6-19
- Ingham P. W. 1997. Zebrafish genetics and its implications for understanding vertebrate development. *Hum Mol. Genet* 6(10):1755-1760
- 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.
- Maldonado E. 2003. Experimentación en el Pez cebrá, un modelos de biología del desarrollo. (ISSN-0188-137X). Mensaje Bioquímico. Vol XXVII. Pag: 147-155
- Matsui, S., Takigami H., Matsuda T., Taniguchi N., Dachí J, Kawami H and Shimizu Y. 2000. *Water Science & Technol.* 42(12):173-179.
- Moreira-Santos, M., Amadeu M.V.M, Soares, B and Rui Ribeiro. 2004. An *in situ* bioassay for freshwater environments with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* . En línea en www.sciencedirect.com.
- Muncke J. & Eggen R. L. 2006. *Env. Toxicol. & Chem.* 25(10): 2734-2741

- Müncke 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
- Nagel R. 2002. *ALTEX* 19:1/02:38-48;
- Organization for the Economical Cooperation and Development (OECD). 1992. Fish acute toxicity test. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 203
- Rocha, A., S. Ruiz, J.M. Coll, 2002. Método sencillo para producir huevos de pez cebra *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* Vol. 17 (1-2).
- 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.
- Streisnger G. (2007). *The Zebra fish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)* University of Oregon.
- Sumpter, J.P. & Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination on the aquatic environment. *Health Persp.* 103: 103-178.
-
- Tanaka H., Yakou Y., Takahashi A, Higashitani T., & Komori K. 2001. *Water Science and Technol.* 43(2)125-132.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. Fish acute toxicity test, freshwater and marine. Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.1075. EPA 712-C-96-118.
- van der Ven L., van den Brandhof E., and Wester P. W. 2007. *Env. Toxicol & Chem.* 26(1):92-99.
- Warfe J. Adams W., E. Apitza S., Barra R., Bridges T., Hickey C & Ireland S. 2007. *Integrated Env. Assessment and Management.* 3(2) 268-274.
- 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

ANEXO A

Certificados de Registro de desarrollos tecnológicos en INPI

ANEXO A.1

Certificado de registro.

Paquete tecnológico de métodos analíticos. Protocolos de prueba para el desarrollo de la prueba de toxicidad aguda con *Daphnia magna* adaptado a la norma ISO 6341,1996 y NMX- AA-87-SCFI-2010 y adecuado al sistema de gestión de la calidad que rige en laboratorios acreditados.

CERTIFICADO

Registro Público del Derecho de Autor



GOBIERNO
FEDERAL

SEP

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

AUTORES: HERNANDEZ SALGADO HOMERO
PICA GRANADOS YOLANDA
TRUJILLO DOMINGUEZ GISSEL

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

RAMA: LITERARIA

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

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

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

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

Número de Registro: 03-2012-011312264800-01



03-2012-011312264800-01

Página 1 de 2

CERTIFICADO

Registro Público del Derecho de Autor



GOBIERNO FEDERAL

SEP

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

México D.F., a 31 de enero de 2012

EL SUBDIRECTOR DE REGISTRO DE OBRAS Y CONTRATOS


ARTURO NOE CALDERON AGUILAR



Página 2 de 2

ANEXO A.2

Certificado de registro

“Protocolos de prueba adecuados al sistema de gestión de la calidad que rige en laboratorios acreditados, para el desarrollo de pruebas de Toxicidad aguda con *Vibrio fischeri*.”

CERTIFICADO

Registro Público del Derecho de Autor



GOBIERNO
FEDERAL

SEP

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

AUTORES: PICA GRANADOS YOLANDA
TRUJILLO DOMINGUEZ GISSEL

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

RAMA: LITERARIA

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

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

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

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

Número de Registro: 03-2012-011312240300-01

México D.F., a 31 de enero de 2012

EL SUBDIRECTOR DE REGISTRO DE OBRAS Y CONTRATOS


ARTURO NOE CALDERON AGUILAR



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


INDAUTOR
Instituto Nacional del Derecho de Autor

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

México

ANEXO B.

Documentos con los Avances a diciembre 2011 de la Norma
Mexicana

PROY-NMX-AA-112-SCFI-2009

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

**PROYECTO DE NORMA MEXICANA
PROY-NMX-AA-112-SCFI-2009**

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

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

PREFACIO

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

- ANÁLISIS DE AGUA, S.A. DE C.V.
- ARVA, LABORATORIO DE ANÁLISIS INDUSTRIALES, S.A. DE C.V.
- ATLATEC, S.A. DE C.V.
- CENICA
- CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO EN ELECTROQUÍMICA, S.C.
- CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA
- CIATEC, A.C.
- COMISIÓN DEL AGUA DEL ESTADO DE MÉXICO
- COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA.
- CONTROL QUÍMICO NOVAMANN INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- ECCACIV, S. A. DE C. V.
- ENTIDAD MEXICANA DE ACREDITACIÓN, A.C.
- FASIQ INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- GRUPO ECOTEC, S.A. DE C.V.
- HACH COMPANY
- INDEX-LAB
- INTEMA, S.A. DE C.V.
- INSTITUTO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE TAMAULIPAS, A.C.
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA EN SANEAMIENTO AMBIENTAL (CITSA)

- INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO
- INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA
- LABORATORIO DE CALIDAD QUÍMICA VERACRUZANA, S.C.
- LABORATORIO DE QUÍMICA DEL MEDIO E INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO IDECA, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO FERMI, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO QUÍMICO INDUSTRIAL
- LABORATORIO SERVICIOS AMBIENTALES
- LABORATORIOS ABC QUÍMICA, INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS, S.A. DE C.V.
- MERCURY LAB, S.A. DE C.V.
- MÓNICA OROZCO MÁRQUEZ
- PERKIN ELMER DE MEXICO, S.A.
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO CANGREJERA
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO MORELOS
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO PAJARITOS
- PROTECCIÓN AMBIENTAL Y ECOLOGÍA, S.A. DE C.V.
- PROYECTOS Y ESTUDIOS SOBRE CONTAMINACIÓN INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE AGUA Y DRENAJE DE MONTERREY, S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE INGENIERÍA Y CONSULTORÍA AMBIENTAL
- SISTEMA DE AGUAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO DEL GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL

- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Ciencia y Tecnología Ambiental.

- UNIVERSIDAD DEL NORESTE, A.C.
UNELAB - Centro multidisciplinario de servicios ambientales y de
alimentos

- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Química
Instituto de Biología
Instituto de Ingeniería

ÍNDICE DEL CONTENIDO

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

PROYECTO DE NORMA MEXICANA

PROY-NMX-AA-112-SCFI-2009

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

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

1 OBJETIVO.

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

2 CAMPO DE APLICACIÓN

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

3 PRINCIPIO

La prueba se basa en la medición de la reducción de la luminiscencia emitida por la bacteria *Vibrio fischeri* posterior a su exposición a una muestra problema durante un

periodo de 5 a 30 minutos, en comparación con la luminiscencia observada en bacterias que permanecen en las condiciones óptimas del sistema control.

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

4 REFERENCIAS

Esta norma se complementa con las siguientes Normas Mexicanas y Norma Oficial Mexicana vigentes:

NMX-AA-050-SCFI-2001	Determinación de fenoles en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.
NMX-152-IMNC-2005	Metrología en Química. Vocabulario. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 13 de Diciembre de 2005.

5 DEFINICIONES.

Para fines de esta Norma Mexicana, se entiende por:

5.1 Agua desionizada

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

5.2 Agua destilada

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

5.3 Agua intersticial

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

5.4 Agua marina

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

5.5 Agua de mar artificial

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

5.6 Concentración efectiva media (CE50)

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

5.7 Elutriado

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

5.8 Extracto

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

5.9 Liofilizado

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

5.10 Toxicidad aguda

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

5.11 Toxicología acuática

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

5.12 Unidades de Toxicidad

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

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

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

6 EQUIPO Y MATERIAL

6.1 Equipo

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

6.2 Material

- Celdillas de vidrio borosilicato, desechables, compatibles con el luminómetro utilizado.
- Celdillas de vidrio para corrección de color
- Micropipetas automáticas de 1 a 1000 μL de capacidad (volumen fijo o ajustable)
- Puntas para micropipetas de polipropileno y desechables.
- Cubre boca
- Guantes de látex desechables
- Lentes de seguridad
- Matraces volumétricos de 100 mL
- Pipetas volumétricas de 10 mL
- Espátula
- Papel parafilm
- Recipientes de muestreo de vidrio ámbar de borosilicato o de polietileno de alta densidad con capacidad mínima de 20 mL, para muestras de agua, y
- Recipientes de muestreo de vidrio claro o ámbar de borosilicato de boca ancha con capacidad mínima de 500 mL para muestras sólidas (suelos y sedimentos).

7 REACTIVOS (grado analítico) Y DISOLUCIONES

7.1 Reactivos

- Bacteria liofilizada *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177).

La suspensión bacteriana liofilizada debe ser almacenada a una temperatura entre $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$

- Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-OH}$). Con una pureza superior o igual a 99,5%, con certificado de calidad, para ser utilizado como tóxico de referencia.
 - Sulfato de zinc hepta hidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), con certificado de calidad, para ser utilizado como tóxico de referencia
 - 3,5 Diclorofenol con certificado de calidad, para ser utilizado como tóxico de referencia. Los consideramos NO CONVENIENTE para fines de esta norma. Primero: No contamos, a nivel técnico de los grupos de trabajo, con datos suficientes que determinen intervalo y coeficiente de variabilidad tal cual se tiene para el fenol y con base al cual se determinan los criterios de esta norma para garantizar la confianza analítica. Para otros fines como trabajo no normativo pueden emplearse sin problema Zn o cualquiera otro.
- 2) Es muy importante que la solución del tóxico de referencia pueda ser valorado a fin de lograr el control de la variabilidad de la carta control, ya que con base en ella se afinan los límites de confianza y se robustece el control analítico. Se tiene a caso algún método amigable, acreditado por ema para la valoración del 3,5 diclorofenol con precisión y exactitud conocidas para las dosis manejadas en los tóxicos de referencia?.
- Metanol (CH_3OH)
 - Acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$)
 - Acido nítrico concentrado (HNO_3)
 - Agua destilada, o desionizada
 - Cloruro de sodio (NaCl) de pureza $\geq 99.5\%$, libre de metales traza
 - Cloruro de magnesio hexa hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
 - Cloruro de estroncio hexa hidratado ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
 - Cloruro de potasio (KCl)
 - Bromuro de potasio (KBr)
 - Cloruro de calcio (CaCl_2) anhidro
 - Sulfato de sodio deca hidratado ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)
 - Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
 - Fluoruro de sodio (NaF)
 - Ácido bórico (H_3BO_3)

7.2 Disoluciones

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

7.2.2 Medio de dilución para muestras de agua dulce. El mismo medio señalado en el inciso anterior agregado en una relación masa volumen (m/v): 2% de cloruro de sodio de pureza $\geq 99.5\%$ (NaCl); **0,2035% de cloruro de magnesio hexa hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y 0,003% de cloruro de potasio (KCl).** Esto quedamos en verificarlo mediante el desarrollo técnico la CONAGUA y si ustedes así lo deseaban podríamos hacer esto entre IMTA y CONAGUA . Desafortunadamente no contamos con el material, refiriéndome al medio de dilución Lumistox, entonces seguimos con este punto en pendiente. Por el momento no estoy de acuerdo hasta

– **no demostrar la conveniencia de su uso, pese a que se que va a resultar.**

7.2.3 Medio de dilución para muestras de agua salina o salobre. El medio de dilución puede ser agua de mar artificial preparada según el inciso 7.2.5 (Tabla 1), una solución de NaCl de concentración adecuada para equilibrar la salinidad de la muestra con la de las diluciones de la misma, o agua de mar natural filtrada no tóxica para *V. fischeri*.

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

Que tal si en vez de adicionar el NaCl en forma de cristales, tal cual lo hace lumistox, se piensa en preparar una solución de 22% de NaCl para que se adicione y se balance al 2% la salinidad en la muestra, tal cual sucede en Microtox?. De esta forma se reduce el riesgo de variabilidad de la salinidad, toda vez que si se adiciona y pesa la sal cada vez para cada muestra, existirá siempre un error de cuantificación que en suma sería grande al considerar el error independiente de la preparación de cada muestra. Si preparamos una solución, solo tenemos el error de esa preparación, el cual es igual para todas las muestras preparadas en el lote.

De esta forma no solo reducimos variabilidad, también hacemos posible la unificación de ambas técnicas al empelar en ambas un ajuste preparado con NaCl al 22%.

7.2.5 Agua de mar artificial. Se prepara con agua destilada o desionizada de acuerdo con la Tabla 1, con una salinidad aproximada de 35 ups.

7.2.6 Agua salobre artificial. Se prepara con agua destilada o desionizada de acuerdo con la Tabla 1, con una salinidad aproximada de 35 ups.

- **TABLA 1.- Reactivos utilizados en la preparación de agua de mar artificial (AMA) (especificada en ISO 10253) y agua salobre artificial (ASA)**

	Agua de mar artificial (AMA)	Agua Salobre Artificial (ASA)
Sal(g/L)		
NaCl	22,00	14.19
MgCl ₂ .6H ₂ O	9,7	6,26
NaSO ₄ Anhidro	3,7	2,39
CaCl ₂ anhidro	1,0	0,65
KCl	0,65	0,42
NaHCO ₃	0,20	0,13

H ₃ BO ₃	0,023	0,015
Agua destilada o desionizada	Aforar a 1L	Aforar a 1L
Conductividad (μS/cm) (20 °C)	47,000 ± 1,000	31,000 ± 1,000
Salinidad (20 °C)	31 ± 1	20 ± 1
pH	7,5 ± 0.2	7,5 ± 0.2

Quizas se elimine esta

Solución A		Solución B	
Sal	Cantidad (g/L)	Sal	Cantidad (g)
NaCl	23,90	NaSO ₄ .10H ₂ O	9,06
MgCl ₂ .6H ₂ O	10,83	NaHCO ₃	0.02
CaCl ₂ anhidro	1,15	NaF	0,003
SrCl ₂ .6H ₂ O	0,004	H ₂ BO ₃	0,0003
KCl	0,682	Agua destilada o desionizada	100 mL
KBr	0,099		
Agua destilada o desionizada	856 mL		

La solución B se adiciona lentamente a la solución A, agitando constantemente para lograr una mezcla homogénea. Después de 24 horas, filtrar la mezcla utilizando un filtro de membrana de 0,45 μm.

8 MUESTREO

Las muestras de agua se colectan y almacenan en recipientes nuevos y limpios de vidrio ámbar o polipropileno, de boca angosta de capacidad mínima de 20 mL. Deben ser llenados totalmente y cerrados perfectamente. Los envases no deben volver a utilizarse para muestras de toxicidad. Los recipientes deberán tener tapa de teflón, polipropileno de alta densidad o baquelita, en caso contrario, puede emplearse un cuadro de papel aluminio colocado en la boca y cuerda del frasco para evitar el contacto con los plásticos, esta última alternativa puede aplicarse solo en muestras con pH de 6 a 8.

Si la muestra contiene más de una tercera parte de sólidos o lodos, es necesario recolectar el doble de muestra en un mismo recipiente de mayor capacidad, para asegurar el volumen mínimo requerido para las pruebas.

Para muestras sólidas, a partir de las cuales se obtienen extractos, lixiviados o agua intersticial, se sugiere emplear recipientes de vidrio nuevos y lavados (Anexo Normativo A), de boca ancha con capacidad mínima de 500 mL, ámbar o claro cubierto con papel aluminio, tapa de baquelita o plástica con contratapa de teflón,

de no ser posible el empleo de esta última, sustituir por un cuadro de papel aluminio colocado en la boca y cuerda del frasco antes de cerrar. El llenado del frasco debe ser al 75% de su capacidad, eliminando en lo posible el excedente de líquido.

Las muestras deben mantenerse cerradas y a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis, sin la adición de preservadores.

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

Para muestras de sedimentos y suelos se recomienda mantenerlas en refrigeración de $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e iniciar su análisis dentro de las dos semanas posteriores a su colecta.

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

Para las muestras líquidas y sólidas que requieran un pretratamiento, ya sea la elaboración de extractos, elutriados, la obtención de agua intersticial, o de concentración por eliminación de los volúmenes de líquido (por ejemplo la evaporación de muestras de agua), dicho procesamiento deberá iniciarse dentro de los periodos señalados en los párrafos anteriores y, al término del pretratamiento efectuar a la brevedad el análisis de toxicidad correspondiente.

Para la medición de la toxicidad de productos químicos o derivados experimentales, que no cuenten con información sobre el tiempo de almacenamiento, esto no es una restricción para llevar a cabo dicho análisis, puesto que no existe regulación para el control de su caducidad.

El análisis de la toxicidad en efluentes o mezclas, deberá hacerse con base en muestras simples, excepto en los casos en que la autoridad permita el uso de muestras compuestas.

8.1 Muestreo en cuerpos de agua

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

Las características inmediatas que deben medirse de la muestra en el sitio de colecta son: pH, conductividad, salinidad, oxígeno disuelto y temperatura. Asimismo, anotar las características aparentes como olor, color y presencia o ausencia de espumas o burbujas. Es importante considerar esta información al momento del análisis de toxicidad en laboratorio.

9 PROCEDIMIENTO

9.1 Medidas de seguridad

El material desechable, tal como las celdillas de vidrio, pipetas Pasteur, entre otros, que hayan tenido contacto con las muestras problema, no debe reutilizarse en nuevas determinaciones.

Verificar que los equipos de incubación no señalen falla en el control de las temperaturas de $15\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$ y $5,5\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$, esto puede efectuarse por revisión del sistema de advertencia con la que algunos equipos cuentan, o también por medición directa de las temperaturas con ayuda de un termómetro calibrado. En caso de detectar alguna anomalía en las temperaturas no deben ser efectuadas pruebas.

Las bacterias deberán permanecer a temperatura de congelación (-18 °C a -20 °C) de manera continua hasta el momento de su uso, por lo que su traslado del congelador al sitio de trabajo debe efectuarse rápidamente manteniendo bajas temperaturas, ya sea en hielo o con geles refrigerantes.

Después de un período de 12 horas sin congelación (temperaturas mayores a 0 °C), las bacterias deberán desecharse.

Una vez que las bacterias liofilizadas fueron reactivadas con el medio de reconstitución, deben emplearse de inmediato. Después de 3 horas de su reactivación el volumen remanente de la solución bacteriana deberá ser desechado.

Antes de iniciar el análisis de muestras, debe efectuarse para cada sesión de trabajo la determinación de toxicidad con el tóxico de referencia (9.4). Si se observa cualquier irregularidad de la respuesta bacteriana, deberá efectuarse nuevamente dicho análisis. Si persiste la anomalía, deberá revisarse el buen estado de los reactivos, incluidos disoluciones y el tóxico de referencia. Si aún con ello no se identifica la causa de la anomalía, el lote de bacterias deberá ser descartado y sustituido por uno nuevo.

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

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

Vigilar que la temperatura en el sistema de prueba se mantenga estable, dentro de los ámbitos indicados anteriormente ($15\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$ y $5,5\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$), durante la sesión de análisis.

9.2 Preparación y acondicionamiento de las muestras

9.2.1 Preparación de muestras de agua dulce

En muestras de agua dulce será necesario que la salinidad alcance el 2%, para evitar la pérdida de bioluminiscencia de la bacteria debida al choque osmótico. Este se logra adicionando la cantidad adecuada de disolución de ajuste osmótico descrita en el inciso 7.2.4 (1 parte de la disolución más 10 partes de la muestra), o bien, adicionar NaCl (pureza $\geq 99.5\%$) en cristales a la muestra (0,2 g en 10 mL de muestra). Analizar la problemática antes

planteada sobre la variabilidad , mejor preparemos solución de 22 % de NaCl y luego adicionemos

9.2.2 Preparación de muestras de agua salobre

La muestra se ajustará a una salinidad aproximada del 2%, (31, 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ de conductividad) si tiene menos de 35 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ de conductividad (ver Tabla I), adicionando NaCl en cristales o en solución a la muestra.

9.2.3 Preparación de muestras de agua marina

La salinidad de las muestras de agua marina es generalmente mayor al 2% , y se encuentra entre 3.1 y 3.5% (ver Tabla I), por lo tanto, no se requiere ajuste osmótico. El diluyente de prueba debe ser agua de mar artificial (Tabla 1) o agua de mar natural libre de contaminantes

9.2.4 Preparación de muestras de agua intersticial de sedimentos

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

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

9.2.5 Preparación de elutriados de sedimentos y fracción soluble de suelos

Homogeneizar la muestra de sedimento colectada, mezclar con el tipo de agua que corresponda al origen de la muestra o agua de disolución en una relación 1:4 (m/v), utilizando un matraz Erlenmeyer. Agitar vigorosamente durante 60 minutos en una parrilla magnética. Centrifugar la mezcla a aproximadamente 3 000 rpm hasta obtener una separación completa de las dos fases. Utilizar el sobrenadante para el análisis.

9.2.6 Extractos de fase sólida con solventes

— En el caso de analizar muestras que hayan sido sometidas a un proceso de extracción empleando solventes químicos, deberá realizarse como testigo un ensayo paralelo del solvente a las concentraciones de la muestra de prueba. Ver APÉNDICE INFORMATIVO D.3.

9.3 Preparación de la suspensión stock bacteriana

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

9.3.2 Independientemente de la condición de cultivo o preservación en que se encuentre la bacteria, tiene que prepararse una suspensión stock con una concentración aproximada de 1×10^8 células por mililitro y mantenerla de 1°C a 7°C .

9.3.3 Esperar 10 a 15 minutos para que la suspensión bacteriana se estabilice.

9.3.4 A partir de suspensión stock preparar las suspensiones de prueba, de acuerdo a las siguientes dos alternativas.

A. Adicionar 10 μL de la suspensión stock en las celdillas de prueba (de 14°C a 16°C) que contienen 500 μL de solución de dilución (7.2.2) y agitar ligeramente con la mano.

B. Preparar una suspensión bacteriana de prueba, a partir de la suspensión stock, adicionando a 1 parte de la solución bacteriana, 50 partes de solución de dilución (7.2.2).

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

9.4 Evaluación de sensibilidad

El laboratorio que realice pruebas de toxicidad con *Vibrio fischeri* tendrá que validar la sensibilidad del organismo, utilizando cualquiera de los un tóxicos de referencia señalados en el (inciso 7.1 de esta Norma Mexicana). Esto se debe llevar a cabo en cuanto se presente alguno de en los siguientes casos:

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

9.5 Tóxicos de referencia

El Los tóxicos de referencia deben tener como principales características las siguientes:

- **Amplio espectro tóxico**
- **Facilidad de obtención en forma pura**
- **Alta solubilidad en agua**
- **Persistencia y estabilidad en solución.**
- **Estabilidad en almacenamiento, y**
- **Facilidad de cuantificación**

9.5.1 Fenol.- La CE50 que presenta este compuesto para *Vibrio fischeri* se encuentra entre 13 y 26 mg/L a un tiempo de exposición de 5 minutos. Este tóxico produce un efecto claro y rápido. La solución patrón de fenol se prepara a una concentración de 100 mg/L y se conserva en un frasco ámbar de 2°C a 6°C, de 3 meses a 4 meses.

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

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

Los valores de CE50 determinados experimentalmente para los tóxicos de referencia, deben quedar dentro de los intervalos mencionados, en caso contrario, se tienen elementos para suponer cualquiera de las siguientes posibilidades:

- **Condiciones inadecuadas de almacenamiento de la bacteria liofilizada, siendo las principales, tiempo y temperatura.**
- **Reconstitución inadecuada de la bacteria.**
- **Uso de la bacteria máximo de 4 horas de haber sido reconstituida.**
- **Posible contaminación de alguno de los reactivos o materiales utilizados en el ensayo.**
- **Falta de pericia del analista.**

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

9.6 Desarrollo de la prueba CONTINUAR AQUÍ

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

9.5.1 Prueba presuntiva o exploratoria

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

Ejemplo 1:

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

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

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

MUESTRA	LC	LM	%E1
Control*	95	-	-
M1	-	17	82
M2	-	80	16
M3	-	2	98
M4	-	95	0
M5	-	56	41

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

1 Dado por:

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

Donde:

LC Luz emitida por el control
LM Luz emitida por la muestra

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

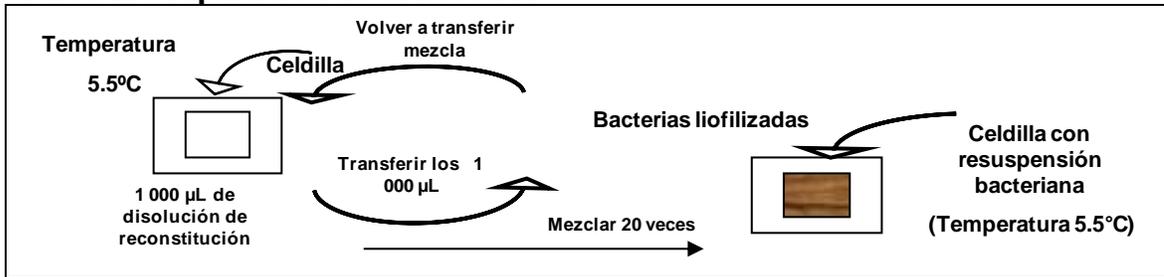
9.6.2 Prueba definitiva

- 9.6.2.1 Efectuar una serie de 3 diluciones en un patrón de dilución 1:2, obteniéndose las concentraciones al 90%, 45%, 22,5% y 11,25%, que se preparan transfiriendo volúmenes de 1000 μ L a cada celdilla, partiendo de la concentración al 90%. La última celdilla debe contener el control, es decir, únicamente medio de dilución, de acuerdo al tipo de muestra de que se trate. Ver Figura 1, parte 2.
- 9.6.2.2 En el caso de que los límites de confianza se localicen fuera de \pm 15% del valor de la CE₅₀ obtenido (considerando un 95% de confiabilidad estadística), se debe repetir la prueba para obtener mayor precisión. Con la misma finalidad, también se puede elaborar una serie con un mayor número de diluciones, o bien emplear un factor de dilución menor a 2, como puede ser: 1:1,2 ó 1:1,25 ó 1:1,33. O la que se requiera
- 9.6.2.3 Adicione el volumen necesario de de la suspensión bacteriana acorde con el equipo utilizado adicionar con una micropipeta 10 μ L de suspensión bacteriana a cada una de las celdillas de

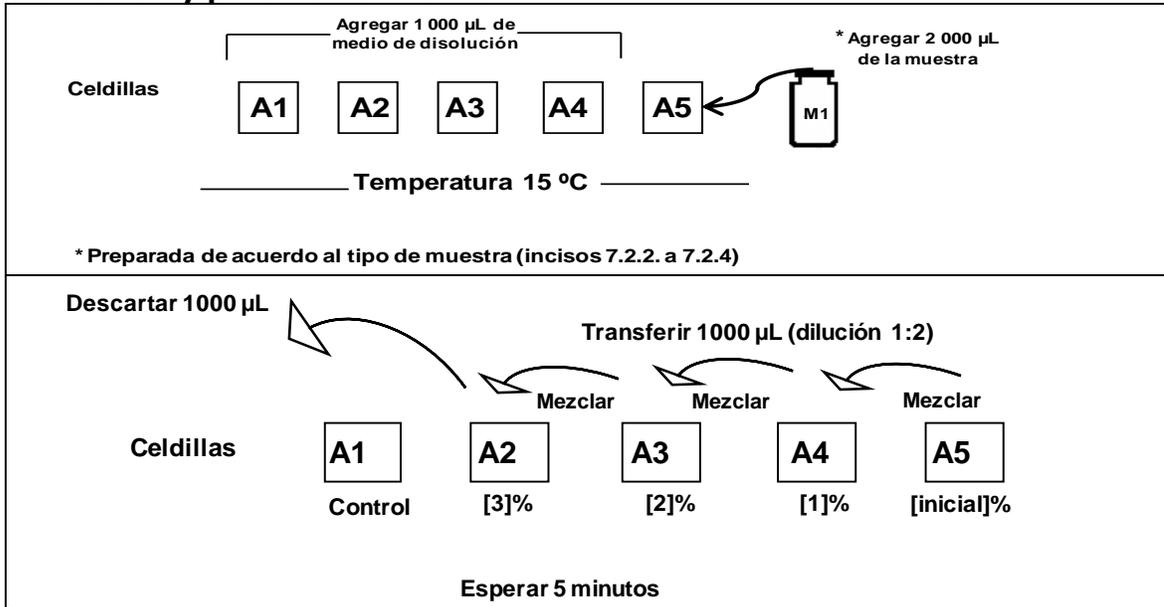
- prueba y agitar ligeramente para asegurar su correcta distribución en la disolución.
- 9.6.2.4 Inmediatamente poner en funcionamiento el cronómetro ajustado para indicar el tiempo a los 5 y 15 minutos. .(o utilice el cronometro incluido en el equipo)
- 9.6.2.5 Al sonar la primera alarma (5 minutos),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

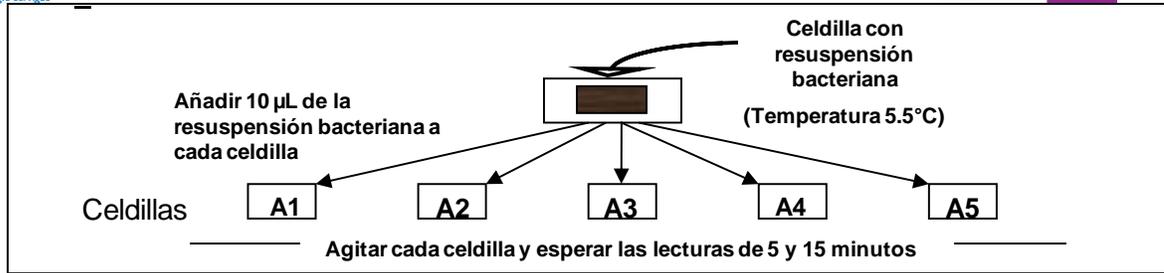
FIGURA1. Procedimiento para efectuar el análisis de muestras de agua dulce, salobre, marina, intersticial, lixiviados y extracto acuoso de sedimentos. Revisar

Parte 1. Preparación de la bacteria



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





9.7 Control de calidad analítico

El control de calidad analítico del método de prueba con *V. fischeri* se evalúa mediante la determinación de la CE₅₀ en un bioensayo de 5 y 15 minutos. El método y las condiciones de prueba deben ser los descritos en la presente Norma Mexicana.

El laboratorio deberá efectuar el análisis del tóxico de referencia, de acuerdo a los incisos 9.3 y 9.4, con el fin de verificar la sensibilidad de los organismos respecto a los valores de CE₅₀ de la carta control y de sus límites de confianza.

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

9.7.1 Control positivo

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

9.7.2 Control Negativo

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

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

9.7.3 Pruebas replicadas

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

9.7.3.1 Análisis de significancia estadística en pruebas replicadas

El resultado de la prueba de significancia estadística para el análisis de las diferencias de la CE₅₀ de los análisis replicados es empleado para poder evidenciar la precisión del análisis y respaldar la confianza analítica de la medición, por lo que la aceptación de los resultados estará sujeta también a que las diferencias numéricas de los análisis replicados de la muestra seleccionada, sean o no significativas. La prueba puede ser efectuada de la siguiente manera:

1) Cálculo de factores:

Réplica1	Réplica 2
$F1 = \frac{CE_{50} \ 1}{\text{Min IC } 1}$	$F2 = \frac{CE_{50} \ 2}{\text{Min IC } 2}$

Donde:

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

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

Min IC = límite inferior del intervalo de confianza

2) Relación de factores

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

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

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

4) Significancia

A partir de los cálculos anteriores, si la resultante de CE₅₀ max /CE₅₀ min excede el valor obtenido para F_{1,2,3}, entonces las diferencia entre las CE₅₀ de las muestras replicadas, es **significativa**, mientras que en el caso de ser menor o igual, la diferencia será **no significativa**.

9.7.4 Interpretación de resultados de control de calidad

analíticos

Cuando los valores de la CE₅₀ excedan el ámbito aceptable para el tóxico de referencia y para el control positivo, o se detecten problemas en la reproducibilidad, evidenciada mediante el análisis de pruebas replicadas, el laboratorio deberá revisar los posibles factores de variabilidad, entre los cuales se considera a los siguientes.

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

10 EXPRESION DE RESULTADOS

Al término de la prueba, la CE₅₀ debe obtenerse mediante los siguientes cálculos: O se obtendrá directamente del software del equipo u otro estadístico disponible comercialmente.

La determinación de la CE₅₀ podrá también realizarse mediante el uso del método Probit, aplicando un programa académico institucional o comercial disponible. En cualquier caso deberá determinarse la CE₅₀ y el intervalo de confianza al 95%. (Ver APÉNDICE INFORMATIVO D.2).

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

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

Donde:

rt es la Gamma al tiempo de incubación (t)
I_{tc} es el nivel de luz (I) al tiempo de incubación (t) del control (c)
I_t es el nivel de luz (I) al tiempo de incubación (t) para cada concentración de la muestra.

10.2 Graficar las Gammas contra la concentración de la muestra en papel para gráficas Log-Log (ver Figura 2); interpolar a valor de Gamma igual a 1 para obtener la CE₅₀.

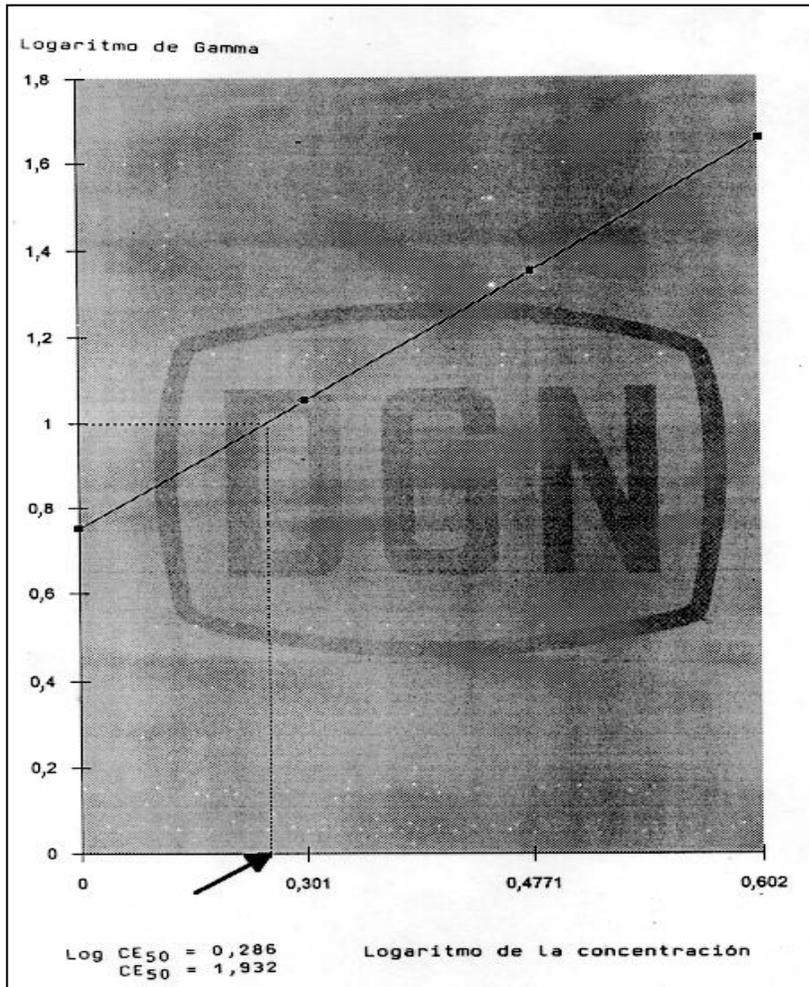


Figura 2.
 Ejemplo para graficar
 resultados en papel Log-Log.

11 INFORME DE LA PRUEBA

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

- 11.1.1 Referencia del método de prueba aplicado.
- 11.1.2 Tipo de muestra (ver inciso 2: campo de aplicación)
- 11.1.3 Forma de almacenamiento y preservación de la muestra.
- 11.1.4 Datos fisicoquímicos al inicio del análisis: pH, oxígeno disuelto, conductividad, salinidad, temperatura de agua y ambiente (inciso 8.1).
- 11.1.5 Características aparentes de la muestra: olor, color, presencia o ausencia de burbujas y espuma.
- 11.1.6 En el caso de muestras de sedimento indicar tipo de sedimento aparente (limoso, rocoso, arenoso y cualquier otro).
- 11.1.7 Fecha de inicio y término del análisis.
- 11.1.8 Tipo de prueba realizada (exploratoria o definitiva).
- 11.1.9 Concentraciones utilizadas en las pruebas definitivas.
- 11.1.10 Porcentaje de inhibición de la prueba presuntiva o exploratoria.

- 11.1.11 Respuesta obtenida (CE₅₀), expresada como Unidades Toxicológicas (UT) y los límites de confianza al 95%.
- 11.1.12 Firma del(los) responsable(s) de la realización de las pruebas de toxicidad.
- 11.1.13 Cualquier detalle de operación no especificado en esta norma e incidentes que puedan afectar el resultado.

Es importante registrar también el tóxico de referencia utilizado en la prueba de sensibilidad y la CE₅₀ obtenida para el lote de prueba.

11.2 Expresión de resultados

Los resultados correspondientes a la CE₅₀, en el rango de tiempo seleccionado, (inciso 3) se expresarán como sigue:

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

APÉNDICE NORMATIVO

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

Todos los materiales y recipientes de uso rutinario en el área, deben lavarse perfectamente antes de su uso en cualquier actividad relacionada con este método de prueba, para evitar que contengan residuos potencialmente tóxicos a los organismos. El método se describe a continuación:

- Lavar el material con detergente libre de fosfatos y enjuagar dos veces con agua de la llave.
- Sumergir por lo menos, durante 24 h el material en una disolución de ácido nítrico aproximadamente al 10 % para eliminar residuos metálicos, o si se requiere su uso inmediato, puede optarse por la aplicación de ácido nítrico concentrado.
- Enjuagar con agua destilada o desionizada hasta eliminar los residuos ácidos y escurrir.
- Enjuagar con acetona de grado reactivo analítico o superior a éste para eliminar residuos orgánicos. Enjuagar con agua desionizada y dejar secar a completamente a temperatura ambiente o en horno.
- Se sugiere optar por el secado en horno, por un tiempo mínimo de 3 h a aproximadamente 100 °C para asegurar la eliminación total de los productos de lavado.
- Guardar el material protegiéndolo de contaminación.

12 BIBLIOGRAFIA Anexar manual LumisTox?? Y otros?

- 12.1 A \bar{P} HA, AWWA, WPCF, 1989. Standard Methods for the examination of water and Wastewater. (Métodos para el análisis de agua y de aguas residuales) American Public health Association, Port City Press, Baltimore, Maryland, E.U.A. 10-200 p.± láminas.
- 12.2 Bulich, A.A. 1979. Use of luminescent Bacteria for Determining Toxicity in Aquatic Evironments. (Utilización de la bacteria luminiscente para la determinación de la toxicidad en ambientes acuáticos) aquatic toxicology. ASTM STP 667, L.L. Marking and R.A. Kimerle, Eds., American Society for Testing and Materials. 98-106 pp.
- 12.3 Bulinc, A.A. 1990. The Luminescent Bacteria Toxicity Test: its Potential as an in Vitro Alternative. (Prueba de toxicidad de la bacteria Luminiscente: su potencial como una alternativa in Vitro) Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence 5: 71-71.
- 12.4 Burton, S.a. and R. Dabbah. 1989 The Bacterial Bioluminescence Test: An Alternative Test to Compendial In Vitro Biological Reactivity Tests and a Potential Test for Comparative Biological Reactivity of Bulk Pharmaceutual Chemicals. (Prueba de toxicdad de la bacteria bioluminiscente; una alternativa para la compresión de las pruebas de reactividad biológica in Vitro, así como para la comparación de la reactividad biológica de la mayor parte de los químicos farmacéuticos) Pharmacop. Forum, 15(1): 4812-4814.
- 12.5 CETESB, 1991. Bioensaio de Toxicidade Aguda comPhotobacterium phosphoreum. Sistema Microtox. Método de ensayo. (Bioensayo de toxicidad aguda con Photobacterium phosphoreum. Sistema Microtox. Método de ensayo) Sao Paulo, SP. Brasil s.p.
- 12.6 CETESB, 1991. Procedimientos para utilizacao de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. (Procedimientos para la utilización de pruebas de toxicidad en el control de efluentes, líquidos) Serie Manuais. Sao Paulo, SP. Brasil, 17p.
- 12.7 CETESB, 1991. Implementacao de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. (Implementación de pruebas de toxicidad en el control de efluentes líquidos) Serie Manuais. Sao Paulo, SP. Brasil, 7p
- 12.8 Environment Canadá, 1992. Biological Test Method: Toxicity Test Using Luminescent Bacteria Photobacterium phosphoreum. (Método de prueba biológica: Prueba de toxicidad utulizando la bacteria Luminiscente Photobacterium Phosporeum) EPS 1/RM/24. 61p.
- 12.9 Danilov, V.S., A. D. Ismailov and N. A. Baranova. 1985. The inhibition of bacterial bioluminescence by xenobiotics. (Inhibición de la bioluminiscencia bacteriana por xenobióticos). Xenobiotica. Vol. 15 (4):271-276.
- 12.10 Dezwart, D. And W. Slooff. 1983 The Microtox as an Alternative Assay in the Acute Tocity Assessment of Water Pollutants. (el Micotox como un ensayo

- alternativo del análisis de toxicidad aguda de contaminantes de agua). Aquatic. Toxicol. 4:129-138 pp.
- 12.11 DIN 38 412 Parte 34: Determination of the inhibitory effect of wastewater on the light emission of Photobacterium phosphoreum. (Test using preserved luminescent bacteria) (Determinación del efecto inhibitorio de las aguas residuales sobre la emisión de luz de Photobacterium phosphoreum.-Prueba que utiliza una bacteria Luminescente liofilizada)
- 12.12 Dutka, B. J., G. Bitton. 1986. Toxicity Testing Using Microorganisms. (Pruebas de toxicidad utilizando microorganismos) Vol. II. CRC Press, Inc. Florida . 202 p.
- 12.13 EPA, 1991. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Método para medir la toxicidad aguda de efluentes y aguas receptoras con organismos marinos y dulceacuícolas) EPA/600/4-90/027.
- 12.14 EPS, 1990. Guidance Document on Control of Toxicity Tests Precision Using Reference Toxicants. (Guía para el control de la precisión en la prueba de toxicidad utilizando tóxicos de referencia) Report EPS 1/RM/12 Canadá.
- 12.15 Greene, J.C., W.E. Miller, M.K. Debacon, M. A. Long and C. L. Bartels, 1985. A Comparison of Three Microbial Assay Procedures for Measuring Toxicity of Chemical Residues. (una comparación de tres procedimientos de ensayos microbianos para la evaluación de la toxicidad de residuos químicos). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 14:659-667.
- 12.16 ISO.80000-1:2009. Quantities and Units-Part 9: Physical Chemistry and Molecular Physics, 1st Edition; Geneva, Switzerland.
- 12.17 IUPAC, 2007, Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry-The Green Book, 3rd Ed.; RSC Publishing, Cambridge [ISBN 978-0-85404-433-7]. Page 48, Sec. 2.10.
- 12.18 Kinne, o. 1971 Marine Ecology. (Ecología Marina). Volumen 1 Environmental Factors Part. 2. Wiley Interscience. New York
- 12.19 Mallak, F.P. and R. L. Brunner. 1983 Determination of the Toxicity of Selected Metalworking Fluid Preservatives by Use of the Microtox System and an In-Vitro Enzyme Assay. (Determinación de la toxicidad de preservativos selectos de fluidos de acabados metálicos) In B. J. Dutka and D. Liu (ed.), Toxicity screening procedures using bacterial systems. Toxicity Series, Vol. 1. Marcel Dekkar, New York. 65-76 pp.
- 12.20 McFeters, G.A., P. J. Bond, S. B. Olson and y. T. Tchan, 1983. A Comparison of Microbial Bioassays for the Detection of Aquatic Toxicants. (comparación de los bioensayos microbianos para la detección de tóxicos en el agua) Water Res., 17 (12): 1757-1762.

- 12.21 O'Brien, T.A. and G.J. Bacher. 1990. Toxicity of Industrial and Domestic Complex Effluents to three Australian Freshwater Organisms and the Microtox Bacteria. Aquatic Biology Section, Freshwater Fisheries Management Branch, Arthur Rylah Institute, Fisheries Division, department of Conservation Forests and Lands.
- 12.22 Pielou, E.C. 1969. An Introduction to Mathematical ecology. (Introducción a la Ecología matemática) Wiley Intersciences John Wiley and Sons, New York.
- 12.23 SARH. 1992. Ley de Aguas Nacionales. Publicada en el Diario Oficial de la Federación del 1 de diciembre de 1992.
- 12.24 SEDUE. 1988. Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. Publicada en el Diario Oficial de la Federación del 28 de enero de 1988.
- 12.25 Stephan, C.E., 1977 Methods for calculation an LC50. (Métodos para el cálculo de la CL50) In: Mayer y J.L. Hamelind, (Eds.), Aquatic Toxicology and hazard Evaluation, ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania: 65-84 pp.

13 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES.

Esta Norma coincide básicamente con la Norma Internacional ISO 11348-3:2007 (E), Water quality–Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminiscent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried bacteria.

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

México D.F., a

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

APENDICE INFORMATIVO D

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PARA ESTA NORMA

- D.1 Cabe mencionar que la presente norma ha sido complementada con investigación realizada a nivel nacional e internacional.
- D.2 Se recomienda el uso del programa elaborado por la EPA, junto con las actualizaciones al mismo. Dicho programa puede obtenerse en la siguiente dirección electrónica: <http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm>
- D.3 El sistema de extracción utilizado puede ser el Soxhlet o equivalente.