

Capítulo 1. Conceptos Generales

Alicia Ronco, Maria Consuelo Díaz Baez, Yolanda Pica Granados

1.1 Marco conceptual

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A pesar del limitado alcance de la información proveniente de los ensayos de toxicidad para su extrapolación a escala ambiental, los estudios con organismos en laboratorio, en condiciones controladas y estandarizadas para la evaluación de respuestas, han venido siendo las fuentes de información predominantes para la evaluación ecológica de los efectos de los contaminantes tóxicos. La ecología de poblaciones debe conectar

información toxicológica con modelos poblacionales para predecir efectos a esa escala. Por otra parte, las evaluaciones ecotoxicológicas realizadas en ecosistemas deben tener en cuenta características como: interacciones entre poblaciones de distintas especies, cambios estructurales y cambios funcionales, observables en el contexto del ecosistema. Sin embargo, las evaluaciones a este nivel tienen una serie de restricciones relacionadas con el elevado costo y tiempo asociados, el limitado número de diseños estandarizados, de puntos finales de evaluación y la cantidad de información sobre efectos tóxicos requerida para su parametrización (Sutter, 1993).

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

1.3 Definiciones

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CL50: concentración letal media, concentración del material en agua, suelo o sedimento que se estima letal para el 50% de los organismos de ensayo. La CL50y sus límites de confianza (95%) son usualmente derivados de análisis estadístico.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REFERENCIAS

Bartell, S.M., Gardner, R.H. & O'Neill, R.V., 1992, *Ecological Risk Estimation*, Lewis Publishers, Boca Raton.

Butler, G.C., 1978, *Principles of Ecotoxicology*, SCOPE 12, John Wiley and Sons, New York.

Day, K.E., Ongley, E.D., Scroggins, R.P. & Eisenhauer, R.P., 1988, "Biology in the New Regulatory Framework for Aquatic Protection", *Proceedings for the Alliston Workshop*, National Water Research Institute (Burlington, Ontario) and Environment Canada (Ottawa).

Environment Canada, 1999, *Guidance Document on Application and Interpretation of Single-Species Tests in Environmental Toxicology*, Method Development and Application Section, Environmental Technology Centre, EPS 1/RM/34.

Faustman, E.M. & Omenn, G.S., 1996, "Risk Assessment", en: *Casarett and Doull's Toxicology*, C.D. Klaassen editor, Chapter 4, McGraw-Hill, international edition.

Sutter, G.W., 1993, *Ecological Risk Assessment*, Lewis Publishers, Boca Raton.

Capítulo 2. Monitoreo Ambiental

Alicia Ronco, Maria Consuelo Díaz Baez, Yolanda Pica Granados

2.1 Conceptos generales

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

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

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

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

Donde:

- N = número de muestras.
- t = t de *Student* para un intervalo de confianza dado.
- s = desviación estándar general.
- U = nivel aceptable de incertidumbre.

2.2 Muestreo

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

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

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

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

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

Tipos de muestras:

- **Puntual o simple:** muestra recolectada en un sitio específico durante un periodo corto, de minutos a segundos. Representa un instante en el tiempo y un punto en el espacio del área de muestreo. Las muestras *puntuales discretas* son aquellas que corresponden a un sitio seleccionado, a una profundidad y tiempo definidos. Una muestra *puntual integrada en profundidad* corresponde a la que es recolectada a profundidades definidas de la columna de agua, en un sitio y tiempo seleccionados. El diseño del muestreo deberá tener en consideración descargas cíclicas o temporales del cuerpo receptor en estudio.

- **Compuesta o integrada o balanceada:** provee un muestreo representativo de matrices heterogéneas, en la cual la concentración del o los analito (s) de interés pueden variar su concentración en el espacio o el tiempo. Las muestras compuestas pueden combinar porciones de varias muestras simples o las provenientes de sistemas automáticos de extracción. Las muestras integradas en el tiempo recurren a muestreadores con bombeo a un flujo continuo constante de muestra o la mezcla de volúmenes iguales recolectados a intervalos regulares. Existen muestreadores continuos que permiten recolectar submuestras variando el caudal de bombeo en función de las variaciones de flujo del cuerpo o conducto de agua. Hay sistemas automáticos comerciales provistos con control de temperatura para la preservación de la muestra durante el periodo de muestreo. Su utilización deberá tener en cuenta un cuidadoso diseño en función del propósito del estudio y características del sistema de muestreo empleado.

Tipos de método de recolección:

- **Manual:** este método de recolección es el más simple e involucra equipamiento mínimo. Sin embargo, puede resultar laborioso en programas de muestreo extendidos en el espacio o el tiempo.

- **Automático:** existen diversos sistemas automáticos de extracción de muestra. Su utilización depende de la disponibilidad de dichos sistemas y de su posible localización en el campo de manera segura.

- **Matrices sorbentes de muestreo (membranas o cartuchos):** ofrecen alternativas de interés que dependen del analito en estudio.

2.2.1 Obtención de muestras, traslado y conservación

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

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

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

El material de los envases debe ser químicamente inerte, fácil de lavar, resistente al calor y al congelamiento. Se recomienda el uso de recipientes de vidrio, polivinilo, polietileno, polipropileno u otros polímeros inertes. Debe decidirse previamente si los recipientes serán llenados completamente hasta el borde o parcialmente (dejando un espacio de aire), teniendo en cuenta el tipo de muestra, la forma de preservación y el ensayo biológico que se realizará. Sin embargo, el llenado parcial de recipientes puede ocasionar agitación durante el transporte, provocando desagregación de partículas, arrastre de componentes gaseosos, oxidación, etcétera. Contrariamente, el llenado total de recipientes puede ocasionar agotamiento del oxígeno disuelto, acompañado de una descomposición de materia orgánica anaeróbica, conduciendo a la formación de metabolitos tóxicos.

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

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

2.2.2 Almacenamiento de muestras

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

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

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

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

Las muestras que se almacenan congeladas deben descongelarse inmediatamente antes del uso. Se recomienda utilizar agua corriente o un baño de agua a temperatura que no exceda los 30 °C, agitando suavemente para evitar el sobrecalentamiento local. Es esencial que el descongelado sea completo antes del uso, ya que el proceso de congelado puede afectar la concentración de algunos componentes en la parte interna de la muestra, que es la que se congela al último. No se recomienda el tratamiento en microondas.

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

2.2.3 Acondicionamiento de las muestras

En general, los bioensayos se llevan a cabo con la muestra original. En algunos casos, sin embargo, una excesiva cantidad de material particulado, lodos o sedimentos interfieren con el comportamiento de los organismos utilizados en las pruebas (por ejemplo: deterioro de los filtros de alimentación de *Daphnia*, limitación de la entrada de luz a cultivos de algas). Para evitar que ese tipo de efectos se vea reflejado en los

resultados en la prueba hay que tratar de eliminar estas interferencias. Sin embargo, la aplicación de métodos de filtración, sedimentación o centrifugación, entre otros, puede involucrar riesgos de pérdida de componentes asociados con partículas.

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

Ajuste de pH:

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

Preconcentración:

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

Eliminación de cloro:

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

2.3 Tratamiento de las muestras durante los ensayos

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

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

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

Sin embargo, si el cambio en el pH durante el ensayo ocurriera debido al efecto de un proceso vital e inherente, necesariamente acompañado del consumo de CO₂ (tal como lo es la fotosíntesis en el crecimiento de las algas), en ese caso sería razonable no realizar ajustes. El permitir la transición de pH en un intervalo amplio no sólo aumentará la aplicabilidad y la importancia indicativa del ensayo, sino que además ofrece la oportunidad de desencadenar los efectos de compuestos químicos que, de otro modo, podrían haber permanecido no detectados.

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

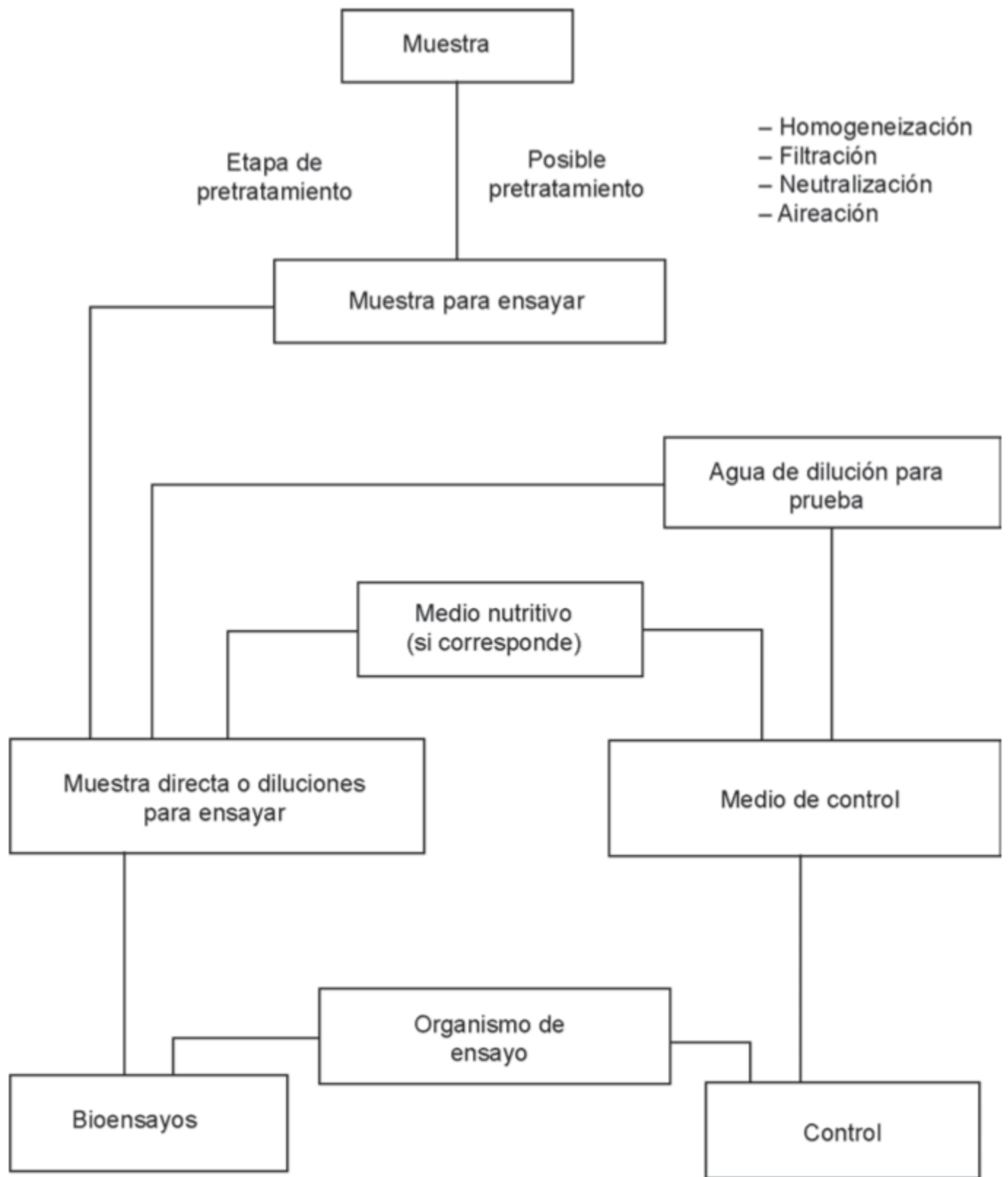


Figura 2.1. Diagrama general para el tratamiento de las muestras durante los bioensayos.

2.4 Equipamiento de muestreo

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

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

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

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

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

REFERENCIAS

APHA, 1998, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edition, American Public Health Association, Washington, D.C.

Díaz-Báez, M.C., Cruz, L.E., Rodríguez, D., Pérez, J. & Vargas, C.M., 2000, "Evaluation of Three Water Concentration Techniques as a Prior Step to Test Acute Toxicity", *Environ. Toxicol.*, 15 (4): 345-351.

Dutka, B.J., 1996, *Bioassays: a Historical Summary of those Used and Developed in Our Laboratories at NWRI*, National Water Research Institute, Environment Canada, Burlington, ONT., 93 pp.

Environment Canada, 1990, *Guidance Document on Application and Interpretation of Single-Species Tests in Environmental Toxicology*, 1999, Method Development And Application Section, Environmental Technology Centre, Environment Canada, EPS 1/RM/34.

ISO 5667-16:1998, *Water Quality-Sampling-Part 16: Guidance on Biotesting of Samples*.

Ronco, A.E., Gagnon, P., Díaz-Báez, M.C., Arkhipchuk, V., Castillo, G., Castillo, L.E., Dutka, B.J., Pica Granados, Y., Ridal, J., Srivastava, R.C. & Sánchez, A., 2002, "Overview of Results from the Watertox Intercalibration and Environmental Testing Phase II Program: Part I. Statistical Analysis of Blind Sample Testing". *Environ. Toxicol.* 17 (3), 232-240.

USE PA, 1993, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*, 4th ed., EPA/600/4-90/027F, Office of Research and Development, Washington, D.C.

Capítulo 3. Elementos Básicos Requeridos para la Implementación de Pruebas en Análisis Rutinarios

Alicia Ronco, Maria Consuelo Díaz Baez, Yolanda Pica Granados

3.1 *Requerimientos generales*

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

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

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

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

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

3.2 *Selección de especies de prueba*

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

- Alta y constante sensibilidad a tóxicos.
- Alta disponibilidad y abundancia.
- Estabilidad genética y uniformidad en las poblaciones.
- Representatividad de su nivel trófico.

- Significado ambiental en relación con el área de estudio.
- Amplia distribución e importancia comercial.
- Facilidad de cultivo y adaptabilidad a las condiciones de laboratorio.

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

3.3 Suministros básicos

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

Material de laboratorio:

- Acuarios, bombas de acuario, conexiones, tuberías.
- Recipientes para crianza.
- Material de vidrio de laboratorio, vasos de precipitado, matraces, kitsatos, tubos de ensayo, viales de centelleo de borosilicato, botellas para soluciones, tubos para centrífuga, cristalizadores.
- Pipetas volumétricas y graduadas, pipetas con propipetas o peras de goma, pipetas automáticas con puntas descartables.
- Cápsulas de Petri, de vidrio o descartables.
- Microplacas de 12 pozos, del tipo de las usadas en cultivo de tejidos.
- Recipientes para almacenamiento de soluciones (bidones, garrafones).
- Mecheros.
- Gradillas para tubos.
- Elementos para pesar (recipientes, espátulas).
- Film de laboratorio para sellado (Parafilm o similar).
- Film transparente (Duraseal o similar).
- Papel filtro.
- Filtros con tamiz de malla para separación de organismos.

- Recipientes para refrigeración (para hielo o refrigerantes).
- Reglas para medición con escala al cm o mm.
- Gasa, algodón.
- Asas bacteriológicas.
- Hemocitómetro o cámara de conteo.
- Pinzas.
- Toallas de papel.
- Bolsas plásticas.

Equipamiento:

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

Instrumental:

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

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

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

3.4 Cronograma de actividades y listado general

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

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

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

3.5 Formatos para la recolección de resultados

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

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

3.6 Cuadernos diarios

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

- Preparación de reactivos (patrones, medios, agua de dilución, etcétera).
- Recepción y salida de muestras.
- Recepción de organismos de fuentes externas al laboratorio.

- Información de referencia (tasas reproductivas).
- Análisis físicos y químicos complementarios (pH, oxígeno disuelto, otros).
- Pruebas de sensibilidad.

3.7 Preparación del material de vidrio u otros recipientes de ensayo

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

- Lavar con agua caliente y una solución jabonosa (se aconseja el uso de detergentes no iónicos).
- Enjuagar tres veces con agua de la red.
- Enjuagar tres veces con una solución de HCl o HNO₃ al 10%.
- Enjuagar dos veces con agua de la red.
- Enjuagar una vez con acetona (para la remoción de compuestos orgánicos).
- Enjuagar tres veces con agua deionizada.

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

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

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

REFERENCIAS

ISO 5667-16 (UNE-EN ISO), 1998, "Water Quality, Sampling", Part 16: *Guidance on Biotesting of Samples*.

APHA, 1998, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed., American Public Health Association, Washington, D.C.

Dutka, B.J., 1996, *Bioassays: a Historical Summary of those Used and Developed in our Laboratories at NWRI*. National Water Research Institute, Environment Canada, Burlington. 93 pp.

ANEXO 1

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

Tabla 3.1. Listado de materiales para establecimiento de cultivos.

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

Tabla 3.2. Material biológico.

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

Tabla 3.3. Listado de materiales generales.

Descripción	Núm.	Prueba
Bombas de acuario 50 L	3	<i>Hydra/Artemia/</i> algas
Pipetas Pasteur y bulbos	15	Todas
Jeringa de 20 mL	1	<i>Daphnia</i>

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

Tabla 3.4. Listado de reactivos.

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

Descripción	Cantidad(g)	Prueba
Cloruro de sodio R.A (NaCl)	1 000	<i>Hydra/Artemia</i>
EDTA Sal Disódica Na ₂ EDTA. •2H ₂ O	500	<i>Algas/Hydra</i>
Buffer N-tris(hidroximetil) metil-2ácido aminoetano sulfónico ²⁻ (2Hidroxil-1-1-bis [hidroximetil] etil amino etanosulfónico Sigma Chem.T4152)	100	<i>Hydra</i>
Cloruro de calcio dihidratado. Ca Cl ₂ •2H ₂ O Sigma Chem. C3881	500	<i>Hydra/Algas</i>
Pastillas Coglan's o Isodine de yodo para desinfección bucal	1 fco.	<i>Hydra</i>
Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)	10	Tóx. Ref. daphnia/hidra
Vitamina B12 de 99% pureza. Sigma Chem.V.2876	1	<i>Daphnia</i>
Tiamina hidrocloreto, Sigma Chem.T.4625	5	<i>Daphnia</i>
Biotina, Sigma Chem.B.4501	1	<i>Daphnia</i>
Sulfato de calcio dihidratado, CaSO ₄ •2H ₂ O	500	<i>Daphnia</i>
Cloruro de potasio, KCl	500	<i>Daphnia</i>
Sulfato de magnesio, MgSO ₄	500	<i>Algas/Daphnia/cebolla</i>
Sulfato ferroso heptahidratado FeSO ₄ •7H ₂ O	500	<i>Algas</i>
Nitrato de sodio, NaNO ₃	500	<i>Algas</i>
Cloruro de magnesio hexahidratado MgCl ₂ •6H ₂ O	500	<i>Algas</i>
Ácido bórico ACS H ₃ BO ₃	500	<i>Algas/cebolla</i>
Cloruro de manganeso tetrahidratado, MnCl ₂ •4H ₂ O	500	<i>Algas</i>
Cloruro de zinc granular, ZnCl ₂	500	<i>Algas</i>
Cloruro de cobalto hexahidratado, CoCl ₂ •6H ₂ O	100	<i>Algas</i>
Cloruro de cobre dihidratado, CuCl ₂ •2H ₂ O	500	<i>Algas/cebolla</i>
Molibdato de sodio dihidratado, Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	500	<i>Algas</i>
Cloruro férrico hexahidratado, FeCl ₃ •6H ₂ O	500	<i>Algas</i>
Fosfato de potasio di y monobásico, K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	500	<i>Algas</i>
Bicarbonato de sodio NaHCO ₃	500	<i>Algas</i>
Sulfato de zinc P.A.>99,5% pureza, certificado, marca Fluka 96 500	250	Tóx. Ref. <i>L. sativa</i> , micronutriente cebolla
Sulfato de cobre pentahidratado, CuSO ₄ •5H ₂ O	100	Tóx. Ref. cebolla/algas
Nitrato de calcio hidratado, Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	2	<i>Cebolla</i>
Nitrato de potasio, KNO ₃	2	<i>Cebolla</i>
Sulfato de manganeso, MnSO ₄	2	<i>Cebolla</i>
Fe EDTA•3H ₂ O	2	<i>Cebolla</i>

Tabla 3.5. Listado de equipos e instrumentos.

Descripción	Cantidad	Prueba
Sistema de control de temperatura ambiente (18-22 °C)	1	Uso general
Balanza analítica	1	Uso general

Autoclave o sistema de esterilización	1	Algas
Centrifuga	1	Uso general
Campana de flujo laminar o mechero	1	Algas
Heladeras (refrigerador y congelador)	1	Uso general
Plancha de agitación y calentamiento	1	Uso general
Base de agitación orbital o vórtex	1	Algas
Medidor de pH	1	Hydra/Daphnia caracterización de muestras
Medidor de conductividad	1	Caracterización de muestras
Medidor de oxígeno disuelto	1	Uso general
Sistema de filtración	1	Algas/Hydra
Microscopio o lupa estereoscópica (10x)	1	Hydra/Daphnia
Microscopio óptico (100x)	1	Algas

ANEXO 2

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

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

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

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

Nombre del laboratorio: _____

Fecha de inicio: _____

Nombre del técnico: _____

Fecha de término: _____

Informar el número de *Daphnias* vivas

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

D.S.: desviación estándar.

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

Nombre del laboratorio: _____

Fecha de inicio: _____

Nombre del técnico: _____

Fecha de término: _____

Informar el número de organismos que presentan diferentes morfologías

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

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

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

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

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

Nombre del laboratorio: _____
 Nombre del técnico: _____

Fecha de inicio: _____
 Fecha de término: _____

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

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

D.S: desviación estándar.

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

Nombre del laboratorio: _____
 Nombre del técnico: _____

Fecha de inicio: _____
 Fecha de terminación: _____

Informar la longitud en mm

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

D.S. desviación estándar.

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

Nombre del laboratorio: _____
 Nombre del técnico: _____

Fecha de inicio: _____
 Fecha de terminación: _____

Informar la longitud en cm

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

D.S. desviación estándar.

Capítulo 4. Protocolos de Ensayo

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

Maria Consuelo Díaz Baez, Alicia Ronco, Yolanda Pica Granados

4.1.1 Principio

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

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

4.1.2 Reactivos y materiales

Bulbos de *Allium sp* (cebolla amarilla)

Para la elaboración de las pruebas se deben seleccionar bulbos de 1,5 cm de diámetro, secos y sin formación de hojas y/o raíz. Pueden ser obtenidos del mercado local o adquiridos a través de algún proveedor.

Previo al montaje de la prueba, los bulbos deben limpiarse eliminando la epidermis seca y removiendo, con un bisturí o instrumento punzante, los restos de tejido y raíces del área radicular (figura 4.1.1). No se deben dañar las raíces primordiales. Con el fin de eliminar los restos de tejidos es conveniente colocar los bulbos en agua destilada por dos horas y secar.

Medio de crecimiento

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

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

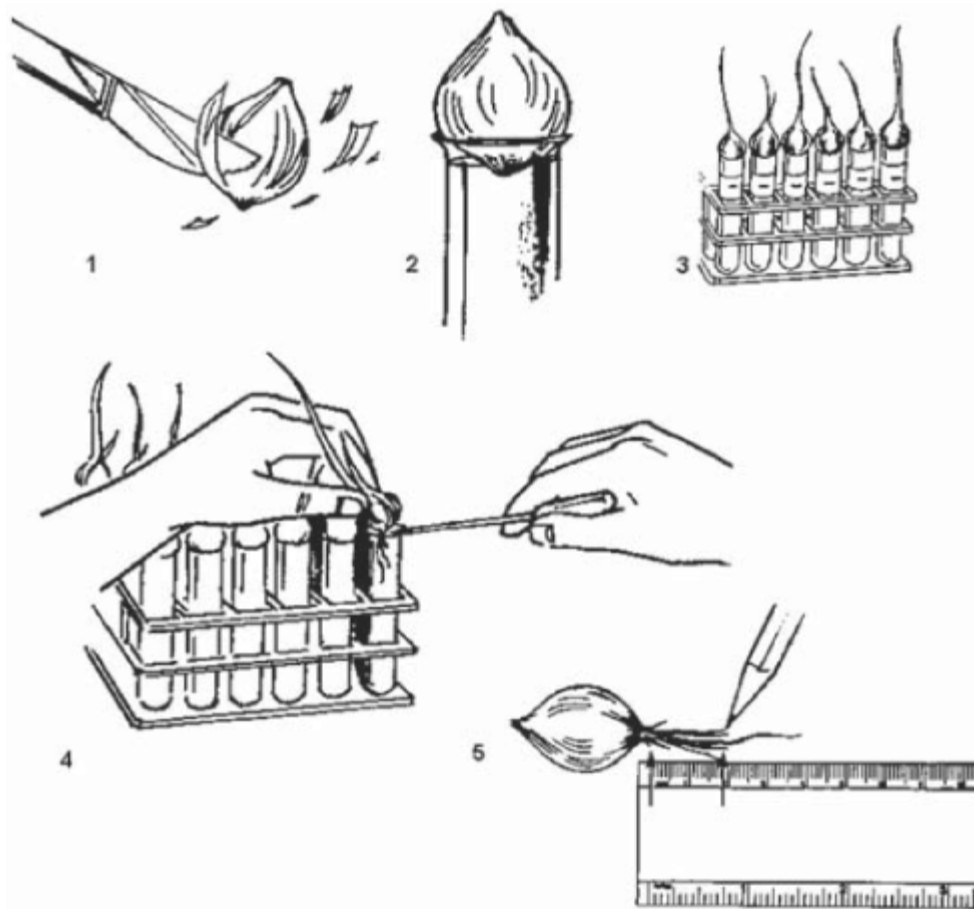


Figura 4.1.1. Esquema gráfico de los pasos a seguir en la prueba con *Allium cepa*. 1) limpieza y pelado de bulbos, 2) ubicación de bulbos en tubos para exposición a las soluciones de ensayo, 3) colocación de tubos en soporte, 4) agregado de soluciones a tubos durante el ensayo, 5) medición de longitud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

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

Masa de sal para disolver en un litro de agua destilada

Reactivo	mg
Ca (NO ₃) ₂ •4H ₂ O	236,1
KNO ₃	202
MgSO ₄ •7H ₂ O	246
KH ₂ PO ₄	136,1
Fe EDTA•3H ₂ O	67,6

Elementos traza

Reactivo	mg
MnSO ₄	0,55(*)
CuCl ₂	0,0645(*)
NaMnO ₄	0,001(*)
ZnSO ₄	0,0007(*)
H ₃ BO ₃	0,23(*)

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

utilizar agua dura o agua de la llave como medio de crecimiento. En el caso de usar cualquiera de estas opciones el control negativo y el agua utilizada para preparar las diluciones de los compuestos químicos o las muestras deberá ser la misma.

Materiales

- Tubos de ensayo de vidrio de 10 cm de largo y 1,5 cm de diámetro (o recipientes de mayor tamaño, dependiendo del tipo de bulbos a utilizar).
- Gradillas o soportes para tubos bisturí.
- Reglilla para hacer mediciones en cm o mm.

Almacenamiento de los bulbos de cebolla

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

4.1.3 Procedimiento de la prueba

Preparación de diluciones

Generalmente se sugiere el empleo de una serie de cinco concentraciones, un control negativo y uno o dos controles positivos. Para su preparación se emplea el método de dilución en forma secuencial aplicando un factor de 0,2 o 0,3.

Cuando se va a llevar a cabo una evaluación presuntiva puede emplearse una serie de diluciones logarítmicas, por ejemplo: 100; 10; 1; 0,1; 0,01, etcétera, lo cual permitirá establecer el intervalo de concentración conveniente para la determinación de la concentración inhibitoria media (CI50).

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

Ensayo

Cuando se trabaja con bulbos de diámetro pequeño, las pruebas se realizan en tubos de ensayo de 10 cm de longitud x 1,5 cm de ancho; en el caso de bulbos de mayor diámetro pueden utilizarse tubos o recipientes de mayor volumen, dependiendo del tamaño de los mismos. Es importante destacar que la profundidad de los recipientes debe ser tal que, al término de la prueba, la elongación máxima no alcance el fondo del recipiente (Fiskesjö, 1985).

En la prueba se utilizan cinco concentraciones de la muestra, un control negativo, y uno o dos controles positivos (ver capítulo 6 "Aseguramiento y control de calidad de bioensayos"), cada una con doce réplicas. El

ensayo se inicia con el llenado de los tubos con cada una de las diluciones y controles; este llenado deber hacerse hasta el borde del tubo. A continuación se colocan los bulbos limpios sobre la boca del tubo, cuidando que la zona radicular quede inmersa en el líquido (figura 4.1.1 [2]).



Condiciones de la prueba

Temperatura 20 °C	Iluminación indirecta	Volumen de prueba 15-20 mL
Tiempo de prueba 72 h	Control positivo Cu (II)	

Control negativo
Agua dura o de la llave
o medio de crecimiento
12 réplicas

Control positivo
Solución de
Cu (II)
12 réplicas

Soluciones de prueba
Cinco concentraciones
12 réplicas

72 h de
incubación

Control negativo
Agua dura o de la llave
o medio de crecimiento
12 réplicas

Control positivo
Solución de
Cu (II)
12 réplicas

Soluciones de prueba
Cinco concentraciones
12 réplicas

Registro de signos de fitotoxicidad
Disminución de la longitud de las raíces
Medición de elongación, descarte de valores extremos



Control negativo

*Cálculo del % de inhibición del crecimiento
de las raíces*
Cálculo de la CI_{50}

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

Los tubos se colocan en una gradilla, la cual se localiza sobre una mesa que no presente vibraciones y se mantienen a temperatura ambiente (20 °C) por un periodo de 72 horas. Debe evitarse la iluminación directa.

Dos veces al día durante el periodo de prueba se debe restablecer el volumen perdido por evaporación o absorción. Para restablecer este volumen se utiliza la muestra o dilución correspondiente. Se recomienda inclinar el bulbo sin sacar las raíces del tubo, adicionando cuidadosamente el volumen con ayuda de una pipeta Pasteur (figura 4.1.1 [3 y 4]).

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

4.1.4 Expresión de resultados

Medición

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

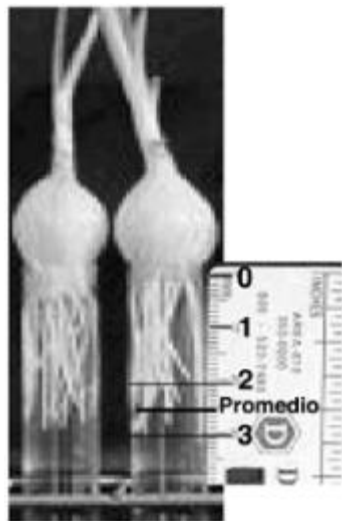


Figura 4.1.3. Elongación de las raíces de bulbos de cebolla después de un proceso de hidratación.

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

1 Tipo de ensayo	Estático
2 Temperatura	20 °C; ambiente
3 Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
4 Iluminación	Indirecta
5 Recipientes	Tubos de ensayo de 10 × 1,5 cm de diámetro
6 Número de réplicas	12
7 Material biológico	Bulbos de aproximadamente 1,5 cm de diámetro

8 Condición de los bulbos	Pelar los bulbos y la base, evitar dañar el anillo radicular
9 Agua de dilución	Agua de la llave O canilla O medio de crecimiento
10 Número de concentraciones	Cinco
11 Duración de la prueba	72 h
12 Efecto medido	Inhibición de crecimiento de las raíces
13 Control negativo	Agua de la llave o medio de crecimiento
14 Control positivo	Cobre(II) a partir de una solución de CuSO ₄
15 Resultado final	CI50

tubo; se ubica el valor de longitud mínimo y máximo donde incide la mayoría de las raíces y el punto medio se define como el promedio. Se efectúa la estimación en cada tubo y se obtiene el promedio matemático de diez réplicas (los dos valores más extremos se descartan). Para obtener el porcentaje de efecto de inhibición se debe realizar la siguiente operación:

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

Con estos valores se construye una gráfica de concentración en función del porcentaje de inhibición y se calcula la CI50 mediante cualquiera de los siguientes métodos: Probit, promedios móviles o Sperman & Karber (ver capítulo 5 "Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad").

REFERENCIAS

Fiskesjö, G, 1985, *The Allium Test as Standard in Environmental Monitoring*, Hereditas, 102: 99-12.

Fiskesjö, G., 1993, "The *Allium* Test in Wastewater Monitoring". *Env. Toxicol. Wat. Qual.*, 8: 291-298

Fiskesjö, G., 1997, "*Allium* Test for Screening Chemicals; Evaluation of Cytological Parameters", in: *Plants for Environmental Studies*, Wancheng, W.; J. W. Gorsuch, J. S. Hughes eds., CRC Press, Florida, pp. 308-329.

2. Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

Maria Consuelo Díaz Baez, Yolanda Pica Granados, Alicia Ronco

4.2.1 Principio

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

El género *Daphnia* se ubica dentro del orden cladóceros de la clase crustácea, y especies como *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* y *Daphnia similis*, son utilizadas extensivamente en pruebas de toxicidad, por lo cual existe una extensa información sobre las técnicas de cultivo, los requisitos de temperatura, luz y nutrientes, así como su respuesta a muchos tóxicos. Específicamente, los ensayos de toxicidad con *Daphnia magna* (ver figura 4.2.1 en anexo fotográfico) permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros.

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

4.2.2. Materiales, reactivos y equipos

Material biológico

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

Materiales de laboratorio

- Acuarios de 3 L de capacidad.
- Vaso de precipitado de 2 000, 1 000 y 600 mL.
- Pipetas volumétricas y graduadas de 1, 2, 5, 10 y 20 mL.
- Matraz aforado de 100 mL.
- Pipetas Pasteur y bulbos de látex.

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

Reactivos

- NaHCO_3
- MgSO_4
- KCl
- $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Biotina.
- Tiamina.
- Vitamina B12
- Na_2SeO_4
- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
- Agua deionizada o destilada.

Equipos

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

4.2.3 Cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba

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

Los organismos se mantienen en agua reconstituida con una dureza entre 160 y 180 mg CaCO₃/L. El agua se prepara en el laboratorio (APHA, 1998) y puede suplementarse con una solución de vitaminas y selenio cuando se detecten problemas en la reproducción, o se presente una alta mortalidad entre los 14 y 21 días por malformación de las antenas (ver figura 4.2.2 en anexo fotográfico).

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

Agua dura reconstituida (APHA, 1998)

Para su preparación se recomienda colocar en un garrafón: 19 L de agua deionizada o destilada y adicionar 2,4 g de MgSO₄, 3,84 g de NaHCO₃ y 0,16 g de KCl. Agitar hasta disolver completamente las sales. Paralelamente, disolver 2,4 g de CaSO₄•2H₂O en 1L de agua deionizada o destilada. Es necesario tener en cuenta que la disolución de esta sal puede requerir un periodo de tiempo prolongado. Terminada la solubilización de la sal, incorporar la solución de CaSO₄•2H₂O al garrafón, lo cual permitirá obtener veinte litros de agua dura reconstituida.

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

Cuando se determine la necesidad de suplementar el agua dura, deben prepararse por separado las soluciones de biotina, vitamina B12, tiamina y selenito de sodio (Na₂SeO₄) (Elendt & Bias, 1990), de la siguiente forma:

Solución de biotina	0,0075 g/L
Solución de vitamina B12	0,010 g/L
Solución de tiamina	0,075 g/L
Solenito de sodio (Na ₂ SeO ₄)	0,010 g/L

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

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

Temperatura	20± 2 °C
Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
Intensidad luminosa	600-1000 lux (luz blanca fría) en la superficie del líquido
Fotoperiodo	16 horas luz/8 oscuridad
Recipientes de mantenimiento	Los cultivos se mantienen en recipientes de 2 L de vidrio transparentes y deben permanecer tapados
Alimentación	Cultivos puros de <i>Selenastrum capricornutum</i> u otras algas verdes unicelulares
Dosis de alimento	La cantidad de alimento suministrada se calcula de la siguiente manera $V = A \times B / C$ donde: V = volumen a ser adicionado, A = número de organismos B = número de células por <i>daphnia</i> (1,5 x 10 ⁶ células por <i>daphnia/día</i>), C = densidad celular de la suspensión algal El alimento es suministrado diariamente
Suplemento alimenticio	Los cultivos pueden suplementarse con las soluciones de vitaminas y selenito
Densidad poblacional	No mayor de 12 individuos/L
Limpieza	Diariamente se deben retirar las exubias (mudas) y los restos que se encuentren en el fondo de los recipientes. Cada viernes se cambia el agua de los acuarios, los cuales deben

lavarse con una esponja o un paño de tela, enjuagar varias veces con agua desionizada. No se deben emplear jabón ni otros detergentes

Recolección de neonatos

Diariamente se retiran los neonatos con una pipeta Pasteur de plástico, con una abertura lo suficientemente ancha como para no ocasionar daños a los neonatos.

Una vez terminada la preparación del agua reconstituida se mide el pH, el cual deberá oscilar entre 7,6 y 8,0. Posteriormente, se airea el líquido de forma permanente hasta el momento de su uso (mínimo 24 h). El aire utilizado debe estar libre de grasas y aceites.

Se recomienda que antes de utilizar el agua se determine: 1) la concentración de oxígeno (la cual debe estar por encima de 6 mg/L), y 2) y la dureza (que debe encontrarse dentro del intervalo preestablecido de 160-180 mg CaCO₃/L). En caso de que alguno de los parámetros de control se encuentre fuera de los intervalos mencionados, el agua deberá desecharse.

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

Limpieza y mantenimiento

Para el mantenimiento del cultivo se sugiere aplicar un ciclo de renovación definido a criterio del analista. El ciclo permite mantener un cultivo de organismos en etapas óptimas de reproducción. Algunos autores (CETESB/L5.018,1991) recomiendan mantener lotes de individuos separados por edad, desde 0-1 semana hasta cuatro o cinco semanas de la siguiente forma:

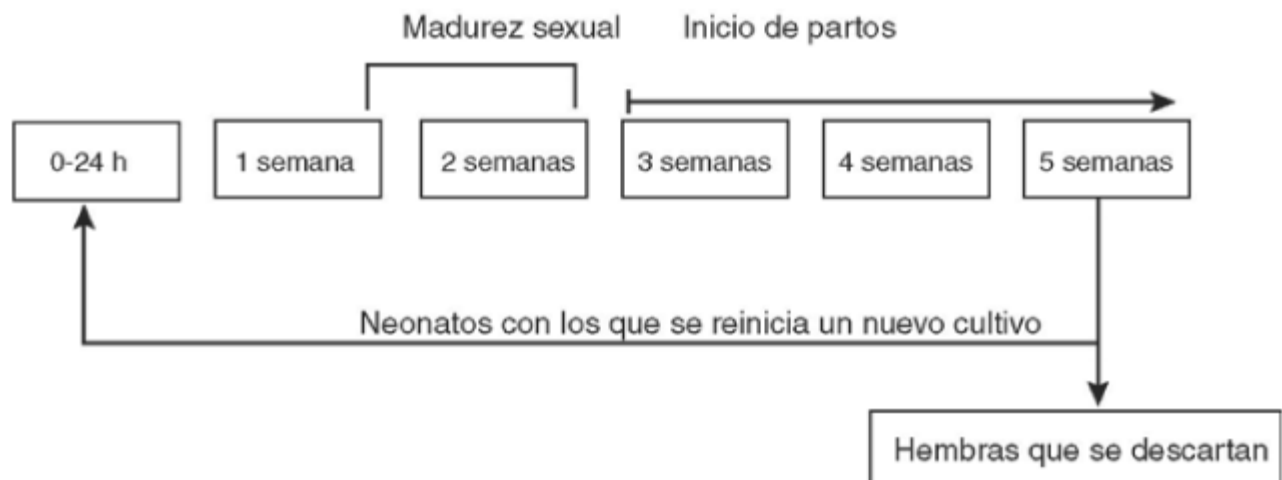


Figura 4.2.3. Cultivo de organismos-ciclo de renovación.

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

Con igual periodicidad se deberá efectuar la limpieza y el suministro de alimento. Para la limpieza se emplea un sifón con el cual se remueven las mudas y los restos de alimento depositados en el fondo de los recipientes. Al finalizar, se recupera el volumen de agua en cada recipiente, adicionando y/o haciendo el recambio de 1/3 del volumen con agua reconstituida fresca.

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

Se recomienda desechar los organismos mayores a cuatro o cinco semanas, reemplazarlos e iniciar un nuevo cultivo con los neonatos colectados ese día.

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

Alimentación

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

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

$$V = (A \times B) / C$$

Donde:

- V = volumen del concentrado algal.
- A = número de *daphnias* por acuario.
- B = dosis óptima recomendada (1,5 x 10⁶ células por *daphnia*/día).
- C = concentración (número de células/mL) de la suspensión de algas (para su determinación se utiliza una cámara de Neubauer, cuyo manejo se presenta en el protocolo de prueba con *Selenastrum capricornutum*).

Tabla 4.2.2. Medio de cultivo o medio Bristol.

Solución de macronutrientes

Compuesto	Solución núm	Solución madre (g/L)	mL de La solución madre por L de solución
NaNO ₃	1	25	10
CaCl ₂ •H ₂ O	2	2,5	10
MgSO ₄ •7H ₂ O	3	7,5	10

K ₂ HPO ₄	4	7,5	10
NaCl	5	2,5	10
KH ₂ PO ₄	6	17,5	10
KOH	8	3,1 g/100 mL	
EDTA		5,0 g/100 mL	1
FeSO ₄ •7H ₂ O	9 0,498	g/100mL	1
H ₂ SO ₄		0,1mL/L	1
H ₃ BO ₃	101,142	g/100mL	1
Solucion de elomenlos Iraza			1mL/L
Compuesto		Solucion madre (g/100 mL)	
ZNSO ₄ •7H ₂ O		0,882	
MnCl ₂ •4H ₂ O		0,144	
MoO ₃		0,071	
CuSO ₄ •5H ₂ O		0,157	
Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O		0,049	

Control del cultivo del organismo de prueba

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

a) Prueba de sensibilidad

Los cambios en el estado fisiológico del cultivo pueden ser detectados mediante la evaluación periódica de la respuesta de los individuos a un determinado tóxico de referencia. Aunque existen varios tóxicos recomendados, uno de los más utilizados es el cromo (Cr VI) a partir de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇). Para determinar si la sensibilidad del cultivo es adecuada es necesario, previo a iniciar las pruebas rutinarias, evaluar la respuesta de los organismos ante la exposición al tóxico de referencia. La concentración en la cual se produce la muerte del 50% de la población de neonatos (concentración letal media o CL₅₀) deberá encontrarse dentro del intervalo anteriormente establecido.

Para definir este intervalo es necesario realizar por lo menos cinco pruebas con el tóxico de referencia, con estos datos se inicia la construcción de la carta control que deberá complementarse con la información generada en nuevas evaluaciones, las cuales se recomienda, se realicen de forma rutinaria una vez por mes hasta alcanzar un número de veinte. Esta carta se debe mantener actualizada con los veinte datos más recientes (US EPA, 1991). A partir de estos resultados, se determina la CL₅₀ promedio para la sustancia, así como la desviación estándar (σ) de la CL₅₀. Los límites superior (promedio + 2σ) e inferior (promedio - 2σ), corresponderán al intervalo de concentración en el cual varía la respuesta de los organismos al tóxico seleccionado (figura 4.2.4.).

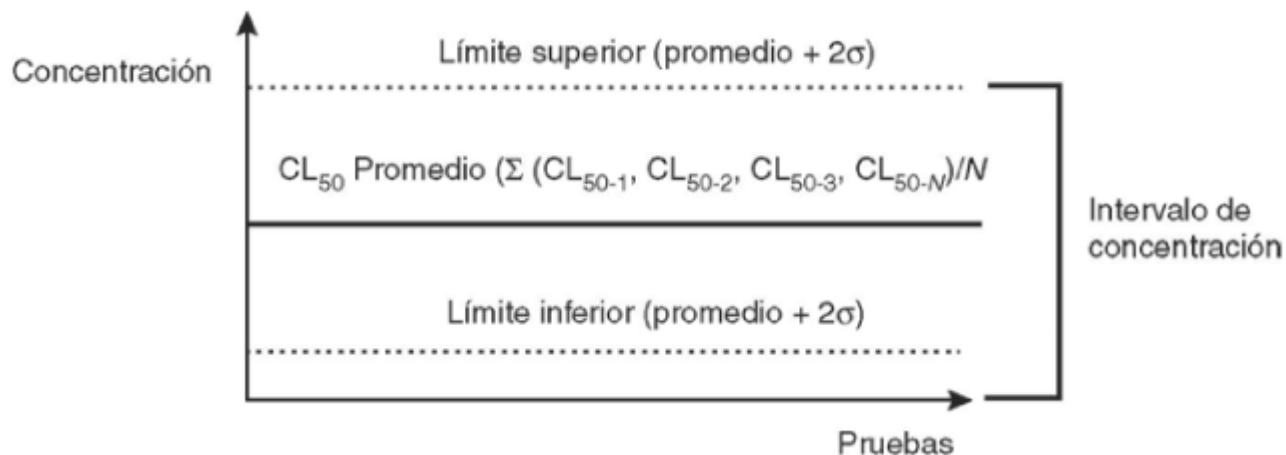


Figura 4.2.4. Modelo de construcción de la carta control para el tóxico de referencia.

Para estimaciones de punto como la CL₅₀ con un nivel de probabilidad P0,05, se espera que sólo una de veinte pruebas esté fuera de los límites del intervalo por azar. Si se produce más de un valor fuera de los límites de control, los resultados de las pruebas de toxicidad llevadas a cabo durante el mes que se produjo el valor fuera de los límites deberán considerarse provisionales y debe llevarse a cabo una cuidadosa revisión. Estos valores por fuera del control estarían indicando anomalías en la sensibilidad de los organismos de prueba.

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

b) Desarrollo óptimo del cultivo

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

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

Madurez sexual

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

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

Tasa reproductiva

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

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

Longevidad

Para determinar la longevidad, el seguimiento debe prolongarse hasta que quede con vida por lo menos el 20% del número inicial de organismos bajo observación. En el registro se debe anotar el tiempo al que se produce la muerte, valores que permitirán establecer la longevidad promedio de los individuos del cultivo. De acuerdo con Edley & Law (1988) y Girling & Garforth (1989), la longevidad de las *daphnias* provenientes de un cultivo sano puede variar entre cuarenta y sesenta días.

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

4.2.4. Procedimiento de la prueba

Para el desarrollo de pruebas de toxicidad aguda con *D. magna* se emplean neonatos (< 24 h nacidos) expuestos a diferentes concentraciones de una muestra o de un agente tóxico durante un periodo de 48 h. Como resultado de dicha exposición es posible determinar la concentración de la muestra o compuesto problema, que produce la muerte al 50% de la población de neonatos expuestos (concentración letal media o CL50), con un nivel de confiabilidad del 95 por ciento.

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

Cuando no hay un conocimiento de la toxicidad de las muestras es recomendable llevar a cabo una prueba preliminar, en la cual se prepara un amplio número de concentraciones sin réplicas (por ejemplo: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 y 100%). Para la prueba se colocan 30 mL de cada una de las diluciones en los vasos de prueba, se transfieren diez neonatos y a las 24 h se registra el número de organismos muertos. Con esta información podrá establecerse el intervalo de concentración en el cual se puede esperar el 0 y el 100% de mortalidad. Este intervalo se utiliza como guía para la preparación de las diluciones en las pruebas definitivas.

Para la preparación de las diluciones de las muestras se utiliza como medio de dilución agua dura reconstituida (180 y 160 mg/L CaCO₃), sin ningún suplemento. En la preparación del agua se deben determinar los parámetros (numeral 4.2.3) señalados anteriormente (APHA, 1998).

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

Para preparar la diluciones de la muestra se recomienda utilizar un factor de dilución de 0,5, el cual permite cubrir un amplio intervalo de dilución (por ejemplo, 100; 50; 25; 12,5; 6,25%, etcétera). Si se observa un alto

porcentaje de mortalidad durante las primeras horas del bioensayo, es necesario realizar más diluciones de la muestra y repetir el bioensayo.

Las pruebas definitivas requieren por lo menos cinco diluciones, por lo que es necesario preparar un mínimo de 100 mL por dilución. Este volumen será suficiente para el llenado de las tres réplicas (25 mL en cada uno) de cada concentración. Como recipientes se pueden emplear vasos de polietileno desechables (figura 4.2.5) de 30 mL, o vasos de precipitado de vidrio de 50 mililitros.

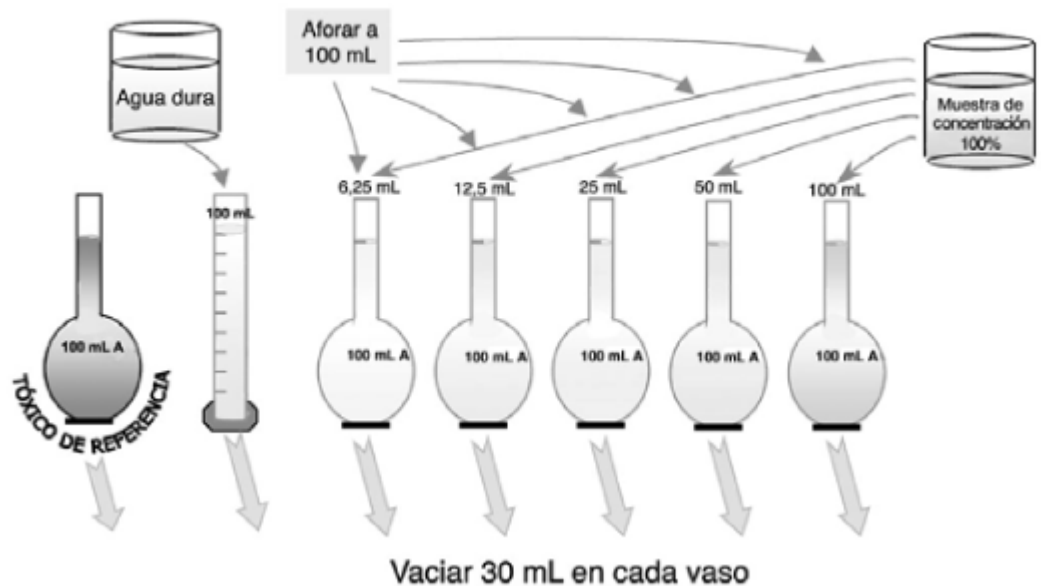
Además de las diferentes concentraciones de la muestra, se debe preparar junto con las respectivas réplicas un control negativo con agua dura reconstituida sin suplementos, y un control positivo con una solución del tóxico de referencia (Cr VI) en la concentración que, según la carta control previamente elaborada, corresponda a la CL50.

Una vez preparadas cada una de las soluciones, se transfieren diez neonatos de menos de 24 h de nacidos a cada uno de los recipientes. Para realizar este procedimiento se puede utilizar una pipeta despuntada. Terminada la transferencia se cubren los vasos con papel Parafilm y se colocan bajo condiciones controladas de iluminación y temperatura (tabla 4.2.2) por un periodo de 48 horas.

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

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

1 Preparación de diluciones



2 Preparación de prueba

20 ± 2 °C, e iluminación
600-1 000 lux por 48 h

Daphnias de <24 h de nacidas

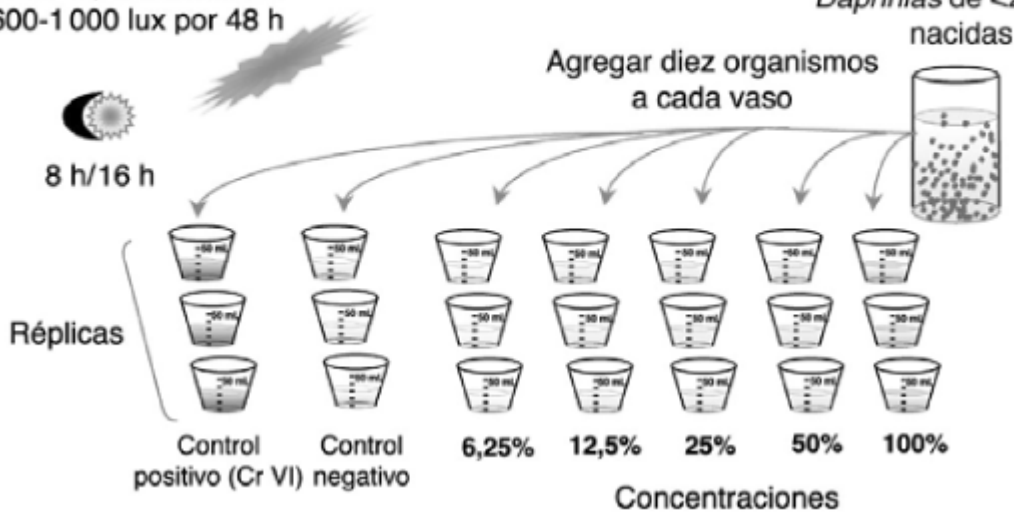


Figura 4.2.5. Procedimiento de prueba.

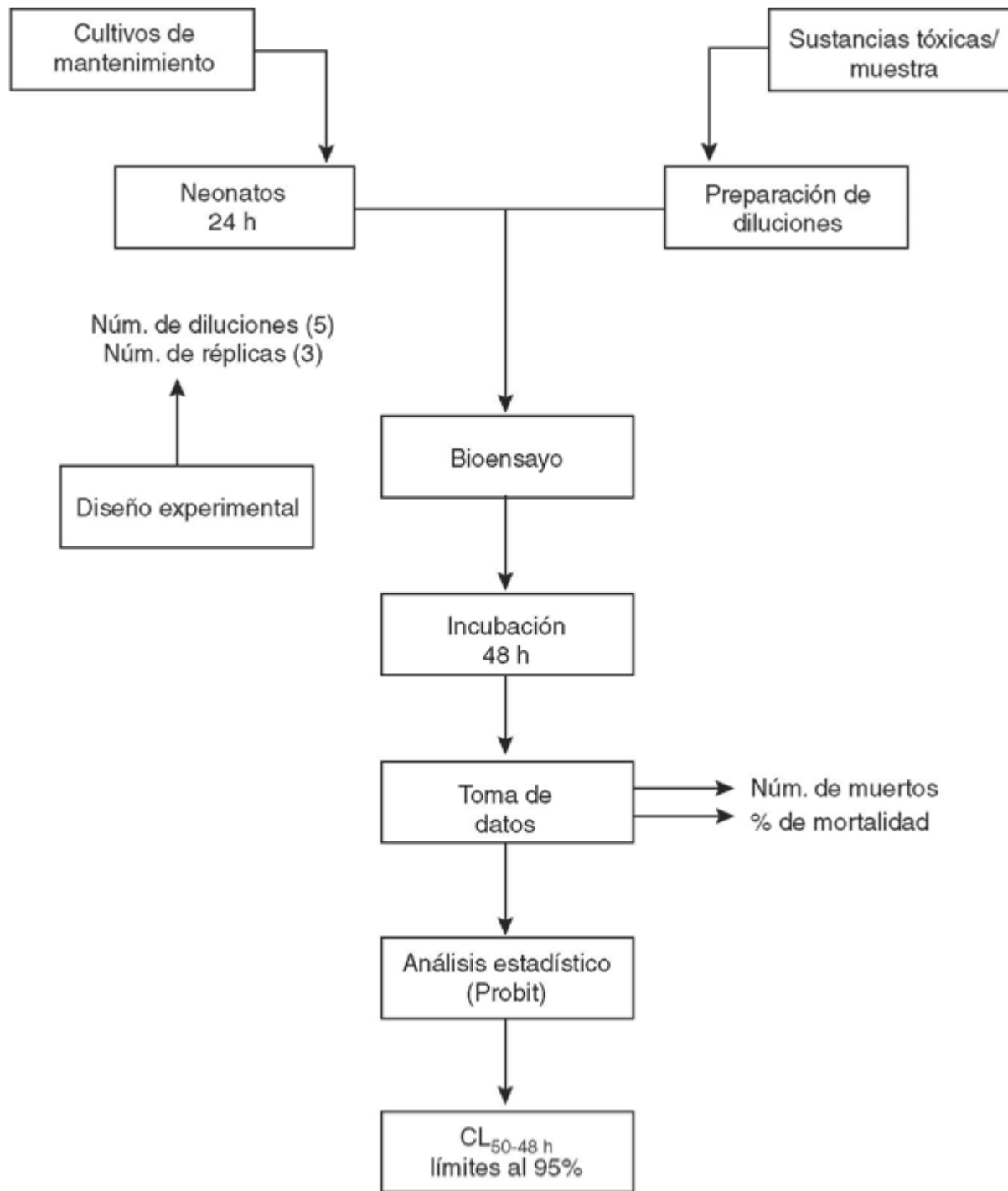


Figura 4.2.6. Diagrama de flujo de las actividades vinculadas al desarrollo del protocolo de prueba de *Daphnia magna*.

4.2.5 Expresión de los resultados

Cálculo de la CL50

Para el cálculo de la CL50 y sus respectivos límites de confianza al 95% se utiliza el método Probit, ya sea manualmente o con ayuda de paquetes estadísticos que tengan este procedimiento.

El método de análisis Probit permite estimar la CE50 o CL50 ajustando los datos de mortalidad mediante una técnica de probabilidad para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancias. El porcentaje de organismos afectados o muertos por la acción tóxica de una sustancia se transforma a unidades Probit. Esta transformación permite el ajuste a una línea de regresión, en la cual la concentración perteneciente al Probit 0,5, corresponderá a la cantidad de sustancia capaz de generar el efecto estudiado en la mitad de la población.

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

Aceptabilidad de los resultados

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

REFERENCIAS

APHA, 1998, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed., American Public Health Association, Ap. 8010G., Washington D.C., pp. 8-20, 8-23.

CETESB, 1991, *Agua-Teste de Toxicidade com D. similis Clauss 1876 (Cladocera, Crustacea), Metodo de ensaio*, L5.018, agosto, 1991, CETESB.

Dutka, B.J., 1989, *Methods for Microbiological and Toxicological Analysis of Water, Wastewaters and Sediments*: National Water Research Institute (NWRI), Environment Canada. Burlington, Ontario.

Edley, M.T. & R. Law, 1988, "Evolution of Life Histories and Yields in Experimental Population of " *Daphnia magna*", *Biol. J. Limn. Soc.*, 34: 309-326.

Elendt, B.P. & Bias, W.R., 1990, "Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing Effects of the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *Daphnia magna*", *Wat. Res.* 24 (9): 1157-1167.

Girling, A.E. & Garforth, B.M., 1989, "Influence of Variations in Culture Medium on the Survival and Reproduction of *Daphnia magna*", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42:119-125.

Goulden, C.E., Comotto, R.M., Hendrickson, J.A. Jr., Horning, L.L. & K.L. Johnson, 1982, *Procedures and Recomendations for the Culture and Use of Daphnia in Bioassay Studies*, Aquatic Toxicology and Hazard

Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster & W. E. Bishop, eds., American Society for Testing and Materials, pp. 139-160.

Gutiérrez, L.E., Lerdo de Tejada B.A., Huerto-Delgadillo, R.Y. & C.J. García, 1989, *Procedimientos de evaluación tóxica de efluentes industriales líquidos utilizando Daphnia magna Straus (Cladóceras, Crustácea)*, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, México, pp. 105.

Klüttgen, B., Dülmer, U., Engels, M. & H.T. Ratte, 1994, "A Dam and Artificial Freshwater for the Culture of Zooplankton", *Water Research*, 28 (3): 743-746.

Lewis, M.A. & A.W. Maki, 1981, "Effects of Water Hardness and Diet on Productivity of *Daphnia magna* Strauss, in Laboratory Culture", *Hydrobiology*, 85: 175-179.

US EPA Environmental Protection Agency (EPA), 1991, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluent and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*, 4th ed, Weber, C.I., ed., EPA-600/4-90-027.

3. Ensayo de toxicidad aguda (efectos letales y subletales) con *Hydra attenuata*

Yolanda Pica Granados, Alicia Ronco, Maria Consuelo Díaz Baez

4.3.1 Principio

Los pólipos de agua dulce del género *Hydra* son microinvertebrados de la clase Hydrozoa de amplia distribución geográfica y se caracterizan por ser animales pluricelulares, cuyas células se disponen en dos capas: la epidermis y la gastrodermis, separadas por una mesoglea gelatinosa, la cual encierra una cavidad digestiva continua que se comunica directamente con el exterior a través de una abertura o boca. Algunas de las células intersticiales de la epidermis dan origen a los órganos característicos de defensa y ataque. Los más conocidos son los nematocistos, que corresponden a los miembros más simples de esta clase. En el extremo inferior presentan un pedúnculo con una base que se adhiere a diferentes superficies; en el extremo anterior se encuentra la boca, rodeada de cinco tentáculos (Campbell & Bode, 1983). Su tamaño varía de 5 a 20 mm de longitud, y de 2 a 3 mm de espesor (figura 4.3.1).

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

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

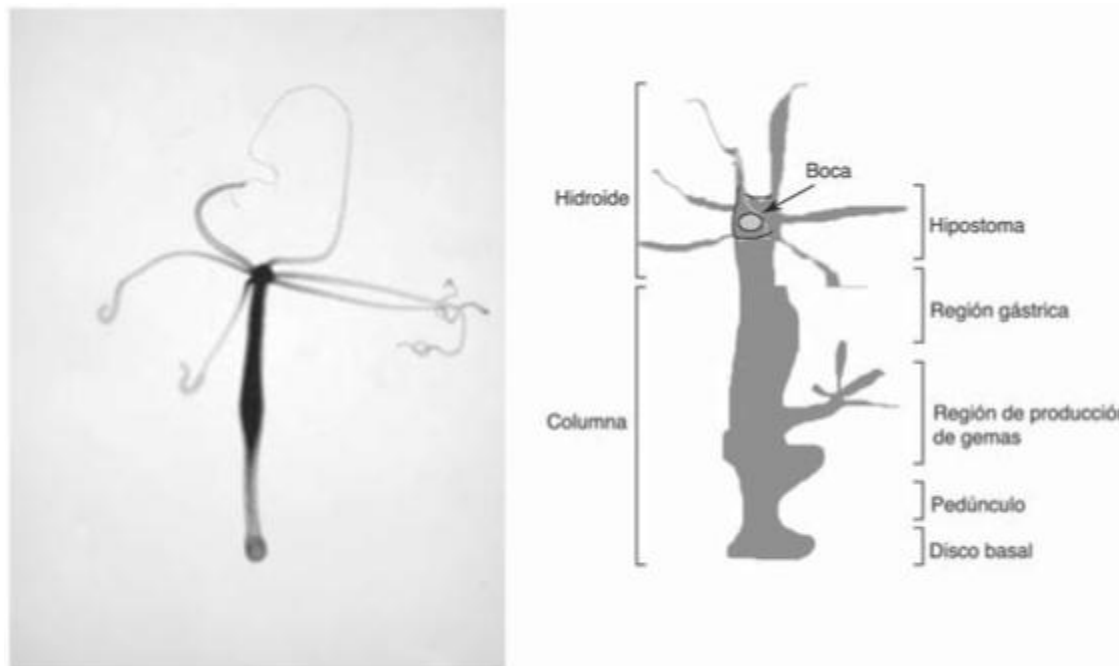


Figura 4.3.1. Morfología de *Hydra attenuata*.

Las pruebas de toxicidad con *Hydra attenuata* tienen una duración máxima de 96 h, tiempo durante el cual los organismos son expuestos al tóxico o muestran problemas. Durante el ensayo, diariamente se hace un examen microscópico y se registran los cambios morfológicos producidos. La exposición de los organismos a compuestos tóxicos da lugar a una serie de cambios morfológicos (efectos subletales) y, dependiendo de la concentración, puede producir la muerte de los individuos (efectos letales). Los resultados de las pruebas permiten, además de la estimación de la CL50 y la CE50, establecer la LOEC, la NOEC y la TOEC (Blaise & Kusui, 1997).

4.3.2 Reactivos y soluciones

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

Medio de cultivo de *Hydra*

Para el mantenimiento del cultivo y la limpieza del mismo después del proceso de alimentación, se utiliza el medio cuya formulación se presenta en la tabla 4.3.1.

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

Reactivo	Cantidad
Cloruro de calcio: CaCl ₂ •2H ₂ O	2,94 g
N-tris (hydroximetil)metil 1-2aminoetanosulfónico, 2,2 g	2,2 g
Buffer TES	
Ácido etilén-diamino-tetraacético (EDTA)	0,080 g
Agua destilada	20,0 L

Para la preparación del medio se disuelven inicialmente los compuestos en 1 L de agua, posteriormente se coloca la solución en un recipiente de polipropileno o equivalente (material inerte), y se completa a volumen (20 L) con agua destilada. El pH del medio debe ser $7,0 \pm 0,1$; en caso contrario deberá ajustarse con una solución de NaOH o HCl 1 N. El volumen preparado se almacena a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) y será suficiente para proveer medio fresco para dos semanas.

Medio de cultivo de *Hydra* sin EDTA

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

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

Cuando se analizan muestras de aguas naturales, aguas residuales o agua de poro de sedimentos, se debe adicionar a la muestra una concentración de cloruro de calcio y *Buffer* TES igual a la presente en el medio de cultivo de *Hydra*. Para adicionar estos compuestos se procede de la siguiente forma: a un volumen de 100 mL de muestra filtrada (0,22 mm) se adiciona 0,0147 g de cloruro de calcio y 0,011 g de *Buffer* TES. Se disuelven los compuestos y se ajusta el pH a un valor de $7,0 \pm 0,1$ con una solución de NaOH o HCl 1 N. Este ajuste se realiza antes de la preparación de las diluciones de la muestra.

4.3.3 Cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba

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

Alimentación y limpieza

1. Dependiendo de la calidad de los huevos de *Artemia*, 24 o 48 h antes de la alimentación se coloca media cucharadita de quistes en 500 mL de una solución salina (10 g NaCl/L). Para una óptima eclosión de los quistes se debe mantener la solución con aireación constante, iluminación continua y una temperatura de 28 ± 2 °C. Aunque existen diferentes diseños para obtener estas condiciones, la forma más simple de lograrlas es colocar una bombilla de 100 watts sobre el recipiente a una distancia conveniente para evitar exceder la temperatura óptima de eclosión. Una vez que los quistes han eclosionado y se obtienen nauplios, se procede a la desinfección de la *Artemia*, deteniendo el burbujeo de aire. Después de cinco minutos, los quistes no eclosionados sedimentan y los nauplios forman una nube que flota cerca del fondo del recipiente.

2. Una vez sedimentados los quistes se succiona la nube de nauplios mediante una pipeta Pasteur, evitando tomar los quistes no eclosionados. A continuación se los coloca en un tamiz de 125 mallas, permitiendo el drenaje del exceso de líquido. Inmediatamente se sumerge el tamiz en un recipiente circular de vidrio de 10 cm de diámetro de fondo plano, que contenga de 100 a 150 mL de una solución de NaCl (10 g/L) y media pastilla de yodo disuelta en dicha solución. Generalmente se utilizan tabletas de yodo comerciales para desinfección de aguas formuladas con tetraglicina hidropé-yodo; en caso de que exista dificultad para

obtenerlas, se pueden usar cinco gotas de una solución de yodo-povidona de uso farmacéutico, cuya formulación debe indicar un contenido de 8 a 10 g de yodo-povidona en 100 mililitros.

3. Después de diez o 15 min se drena el tamiz para eliminar el excedente de la solución y se transfiere a otro recipiente de iguales dimensiones, con medio de cultivo de *Hydra*. Se deja reposar tres min, y se enjuaga dos o tres veces repitiendo la operación de transferencia a recipientes con medio fresco. Durante este proceso los quistes no eclosionados deben ser removidos, evitando su incorporación al cultivo de *Hydra* durante la alimentación y reduciendo el riesgo de infecciones en el cultivo (ver figura 4.3.2 en anexo fotográfico).

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

5. Se recomienda realizar una limpieza intensiva una vez por semana. Para ello se deben desprender los organismos del fondo del recipiente frotando suavemente con el dedo medio de la mano; posteriormente se mueve el líquido generando un efecto de vórtice. Se espera a que las *hydras* se acumulen en el centro del recipiente y luego se las transfiere a un tamiz de 60 mallas (esta operación puede realizarse con ayuda de una pipeta volumétrica de 100 mL en posición invertida). A continuación se procede a eliminar las impurezas retenidas por el cultivo mediante el enjuague con medio fresco. Los recipientes vacíos se lavan con abundante agua destilada hasta eliminar la película mucosa formada en el fondo. Terminada la limpieza, se colocan los organismos en un recipiente limpio con medio de cultivo fresco y se cubre permitiendo la entrada de aire (Johnson *et al.*, 1990) (ver figura 4.3.3 en anexo fotográfico).

Control del cultivo

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

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

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

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

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

Se sugiere que la determinación de la tasa de crecimiento (k) se realice de forma periódica. En general, los valores de k varían entre 0,3 y 0,4. En caso de obtenerse valores menores al mencionado intervalo, es necesario efectuar acciones correctivas sobre la alimentación y limpieza del cultivo, a fin de lograr el crecimiento óptimo (Trottier *et al.*, 1997). En la tabla 4.3.2 se resumen las condiciones de cría y mantenimiento de los organismos.

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

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

4.3.4 Procedimiento de la prueba

Preparación de la muestra

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

Preparación de diluciones

Para la realización de pruebas se recomienda trabajar con un mínimo de siete diluciones seriadas de la muestra problema, y una concentración del tóxico de referencia (ver capítulo 6 "Aseguramiento y control de calidad de bioensayos"). Para las pruebas preliminares con compuestos tóxicos puros o muestras ambientales, se recomienda emplear una serie de diluciones logarítmicas (100; 10; 1; 0,1; etcétera), e identificar posteriormente el intervalo de concentraciones conveniente en el que deberá desarrollarse la prueba definitiva.

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

Sistema de prueba

Las pruebas de toxicidad se llevan a cabo en microplacas de cultivo celular de 12 pozos (figura 4.3.4). En ellas se preparan tres réplicas por cada concentración de la muestra o del control positivo y tres más para el control negativo. El llenado de los pozos se efectúa adicionando un volumen de 4 mL, se inicia con los tres pozos o réplicas del control negativo y se continúa con las diluciones de la muestra, comenzando con la de menor concentración. En paralelo, se adiciona un volumen de 3 a 4 mL de cada solución en cajas de Petri de 35 x 10 milímetros.

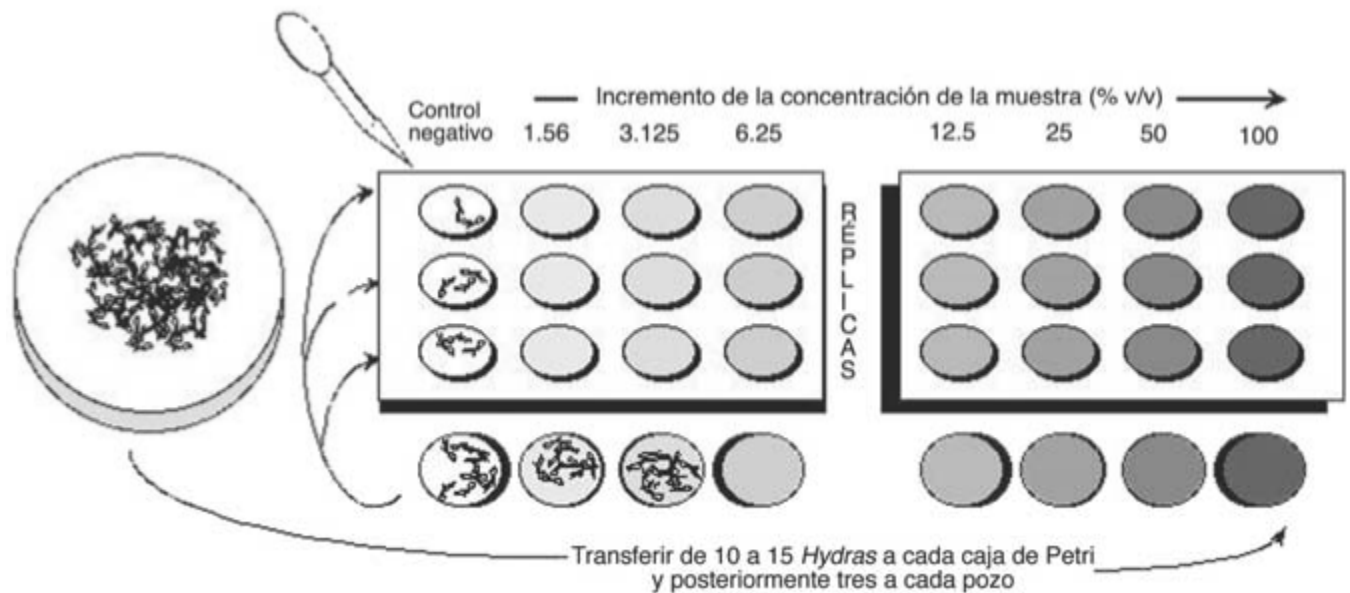


Figura 4.3.4. Disposición de las concentraciones de prueba en el ensayo y transferencia de organismos.

Transferencia de *hydras*

1. Se selecciona un grupo de organismos mantenidos sin alimentación durante 24 h. Se elimina el medio de cultivo invirtiendo el recipiente y descartando el líquido; los organismos permanecerán adheridos al fondo del recipiente. A continuación adicionar un volumen de medio de cultivo de *Hydra* sin EDTA.
2. Se vuelven a suspender los organismos y se concentran en el centro del recipiente utilizando el mismo procedimiento indicado para la limpieza intensiva. En este procedimiento se omite el empleo del tamiz para retener a los organismos flotantes, ya que puede producirse daño de la epidermis y causar hipersensibilidad de los organismos durante la prueba.
3. A continuación, se colocan las *hydras* en un recipiente de 10 cm de diámetro con medio de cultivo sin EDTA, y con la ayuda de una pipeta Pasteur se transfieren de diez a 15 organismos a cada una de las cajas de Petri. Esta transferencia permite reducir el efecto de dilución producido por el medio de cultivo sobre la concentración de la muestra. Posteriormente se colocan tres *hydras* en cada pozo, evitando aquellas que presenten gemas (figura 4.3.4).

4.3.5 Expresión de los resultados

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

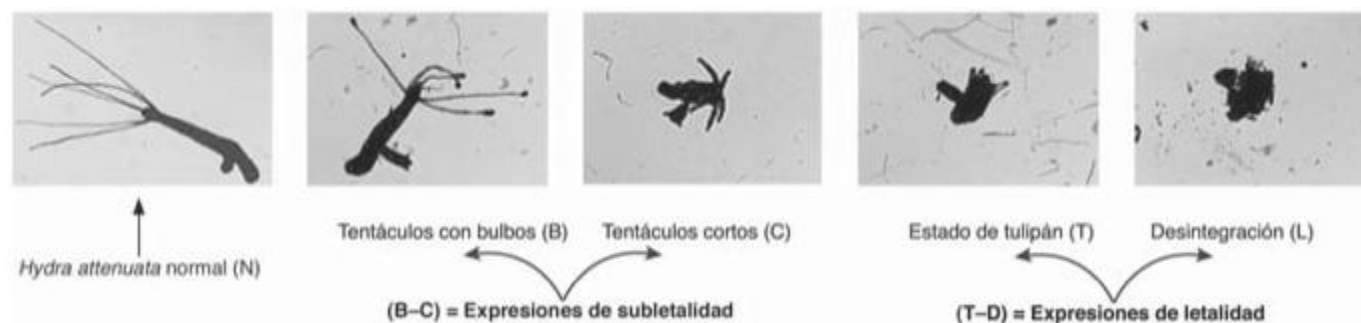


Figura 4.3.5. Microfotografías de *Hydra attenuata*, mostrando los diferentes cambios morfológicos: a) normal, b) bulbo, c) acortamiento de tentáculos, d) estadio de tulipán, e) desintegración (Trottier *et al.*, 1997).

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

A partir de los resultados registrados, obtener para cada concentración el porcentaje de efectos subletal y letal. El primero se calcula a partir de la suma del número de organismos que presentan anomalías en su morfología, ya sea del tipo reversible o irreversible, y el porcentaje de letalidad se obtendrá a partir del número de organismos con anomalías exclusivamente irreversibles. Con estos datos se estiman los valores de CE50 o de CL50, según corresponda, mediante los métodos estadísticos Probit, promedios móviles o Sperman y Karber, así como los valores de la LOEC, NOEC y TOEC (*Threshold Observable Effect Concentration*, por sus siglas en inglés), este último se calcula según:

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

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

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

1	Tipo de ensayo	Estático
2	Temperatura	21± 2 °C
3	Calidad de luz	Iluminación natural (cercana a una ventana) fluorescente 0 blanco-frío
4	Intensidad luminosa	800 lux
5	Fotoperiodo	16 h luz/8 h de oscuridad

6	Volumen del recipiente	5 mL en placas estériles de 12 pozos
7	Volumen de la solución de prueba	4,0 mL
8	Características de los organismos	Pólipos (<i>hydras</i>) sin gemas, en ayuno de 24 h
9	Densidad inicial de organismos	Tres <i>hydras</i> por pozo
10	Número de réplicas	Tres
11	Agua de dilución	Agua dura (sin suplementos)
12	Factor de dilución	0,3 o 0,5
13	Duración de la prueba	96 h, revisión cada 24 h
14	Efecto medido	Cambios morfológicos. Número de organismos normales con tentáculos, con bulbos o acortados (reversibles), o sin tentáculos y pólipos desintegrados (irreversibles)
15	Resultado final	CE50 para subletalidad y (CL50) letalidad
16	Aceptabilidad de los resultados	Morfología normal en el 100% de los organismos en el control negativo
17	Control positivo	Cr (VI) a partir de una solución de K ₂ Cr ₂ O ₇

REFERENCIAS

Blaise, C. & T. Kusui, 1997, "Acute Toxicity Assessment of Industrial Effluents with a Microplatebased *Hydra attenuata* Assay", *Environm. Toxicol. Water. Qual.*, 12:53-60.

Campbell, R.D. & H.R. Bode, 1983, "Terminology for Morphology and Cell Types", pp. 5-14, in H. M. Lenhoff, ed., *Hydra: Research Methods*, Plenum Press, New York.

Johnson, E.M., Gabel, B.E.G., Newman, L.M. & R. Giacobbe, 1990, *The Hydra Assay Manual. A Practical Guide to Supplies, Techniques and Mechanics of the Assay*, Department Anatomy, Daniel Baugh Institute, Jefferson Medical College, Philadelphia, P.A., USA, 19107, 96 p.

Trottier, S., Blaise, C., Kusui T., & Johnson, E.M., 1997, "Acute Toxicity Assessment of Aqueous Samples using a Microplate-based *Hydra attenuata* Assay", *Environm. Toxicol. Water. Qual.*, 12:265-271.

4. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga

María Cecilia Sobrero, Alicia Ronco

4.4.1 Principio

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 h de exposición) en la que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo. Es importante destacar que durante el periodo de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos (figura 4.4.1). Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es relevante para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocotilo constituyen indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta.

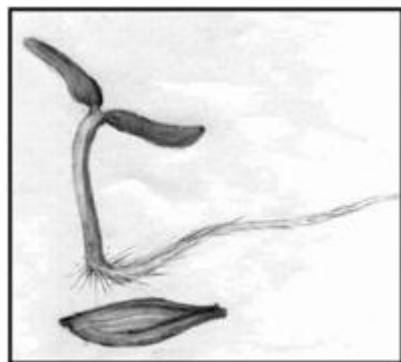


Figura 4.4.1. Morfología de la semilla y la plántula de lechuga.

A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sin embargo pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocotilo, dependiendo ello del modo y sitio de acción del compuesto. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocotilo constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar el efecto en la germinación. Este ensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales (lagos, ríos), aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas (Bowers *et al.*, 1997; Cheung *et al.*, 1989; Dutka, 1989). A diferencia de otras pruebas en las que se consideran algas o

plantas acuáticas sumergidas como organismo diagnóstico, el bioensayo con semillas permite evaluar la fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbiedad de manera directa y sin necesidad de filtración previa, reduciéndose así las interferencias debidas al pretratamiento, además de simplificar el procedimiento de prueba.

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

Este bioensayo de toxicidad ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y compuestos puros, además de la evaluación del efecto fitotóxico de pesticidas sobre especies no blanco necesarios para el registro de pesticidas (OECD, 1984; Wang, W. 1987; US EPA, 1989; Boutin *et al.*, 1993).

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

4.4.2 Reactivos y materiales

- Material biológico: semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L var. mantecosa).
- Agua dura reconstituida (APHA, 1992). Para su preparación se recomienda utilizar reactivos Grado ACS y agua destilada en vidrio o *Millipore Supera Q*.
- Cápsulas de Petri de 100 mm de diámetro.
- Papel de filtro Whatman núm. 3 (o equivalente), 90 mm de diámetro. El papel de filtro que se seleccione como sustrato de germinación debe tener las siguientes características:
 - Trama amplia y porosa que asegure una buena capacidad de retención de líquido.
 - Resistencia de la fibra del papel para que las radículas crezcan por su superficie sin atravesarlo, situación que dificultaría la remoción de las plántulas sin dañarlas.
 - Ausencia de residuos tóxicos (ej. blanqueadores).
 - Que no promueva el desarrollo de hongos (no asociados a las semillas).
- Matraces aforados de 50 mL.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL.
- Regla u otro elemento de medición.

- Pinzas.
- Toallas de papel.
- Bolsas plásticas.
- Cámara oscura termostatzada (22 ± 2 °C).

Obtención, control y conservación de las semillas

La obtención de semillas de lechuga (*L. sativa* L var. mantecosa) se realiza en semilleras locales, procurando que sean semillas sin curar (sin fungicidas o plaguicidas), con buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula e hipocotilo. Los criterios de control del material biológico y del desarrollo de la prueba se describen en el capítulo 6 "Aseguramiento y control de calidad de bioensayos".

Las semillas seleccionadas se almacenan fraccionadas a 4 °C, en oscuridad y en ambiente seco. Conservadas en estas condiciones mantienen su vigor al menos durante dos años. Un indicador de la reducción de la vitalidad y envejecimiento de las semillas es la reducción en el poder germinativo y el aumento en la variabilidad de las medidas de elongación de radícula e hipocotilo en el control negativo (ver también capítulo 6 "Aseguramiento y control de calidad de bioensayos"). En este caso se recomienda realizar las pruebas de toxicidad utilizando un nuevo lote de semillas.

4.4.3 Procedimiento para el desarrollo de la prueba

Preparación de las diluciones

Para realizar una curva dosis-respuesta se recomienda preparar un mínimo de cinco o seis diluciones de la muestra o compuesto a estudiar, de manera que se obtengan valores de toxicidad intermedios entre el 100 y 0%. Para las muestras ambientales se recomienda el uso de un factor de dilución de 0,3 o 0,5 para la preparación de la serie de diferentes concentraciones. El uso de un factor de 0,3 permite evaluar la toxicidad considerando el intervalo entre el 100 y 1% de la muestra realizando cinco diluciones (100, 30, 10, 3 y 1%). Al aplicar un factor de dilución de 0,5, es necesario utilizar mayor número de diluciones para abarcar el mismo intervalo de concentraciones (100, 50, 25, 12, 6, 3 y 1,5%), pero se obtiene mayor precisión en los resultados. Para la preparación de cada dilución se utiliza agua dura reconstituida (es posible el uso de agua mineral dura para consumo humano), realizando el control negativo con el agua de dilución empleada.

Para el caso de las muestras cuya toxicidad es desconocida, previo a la realización de la prueba definitiva, se sugiere hacer una prueba presuntiva (ensayo preliminar) utilizando diluciones logarítmicas (100; 10; 1; 0,1; 0,01) que permitan establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 y 0% necesarios para calcular la CI50.

Con el fin de controlar la sensibilidad de las semillas, simultáneamente a la evaluación de la toxicidad de una muestra debe realizarse un control positivo, utilizando, por ejemplo, una sal de Zn (II) como tóxico de referencia. La concentración de prueba de este control es la correspondiente a la CI50 para el lote de semillas en uso (ver capítulo 6 "Aseguramiento y control de calidad de bioensayos").

Protocolo de ensayo

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

- Colocar en cada cápsula de Petri un disco de papel de filtro.
- Marcar correctamente cada caja con la dilución correspondiente, así como la fecha y hora de inicio y término del bioensayo.
- Saturar el papel de filtro con 4 o 5 mL de la dilución evitando que se formen bolsas de aire.

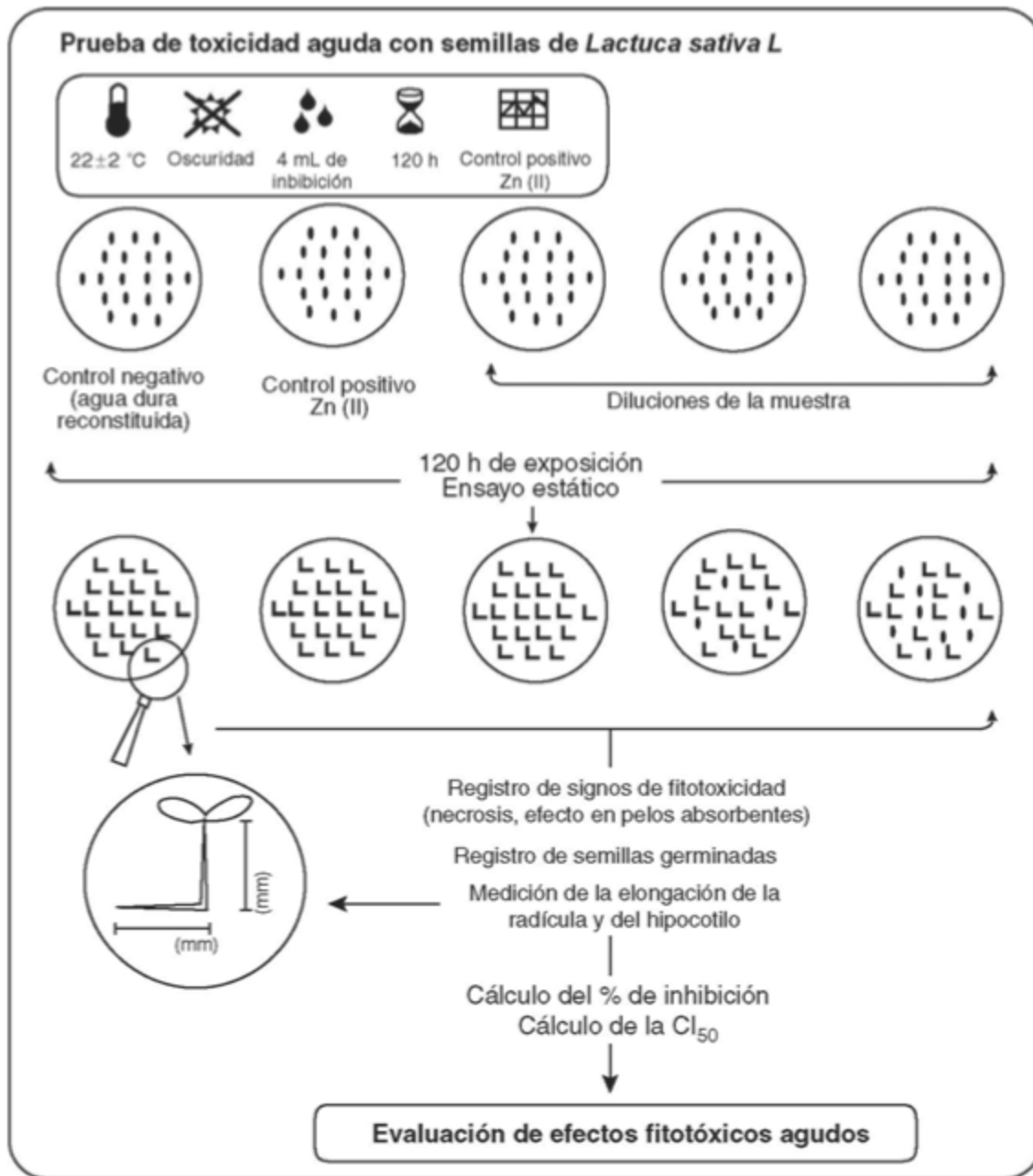


Figura 4.4.2. Esquema general del procedimiento de prueba de toxicidad con semillas.

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

1 Tipo de ensayo	Eslático
2 Temperatura	22± 2 °C
3 Calidad de luz	Oscuridad
4 Volumen de solución de prueba	4 mL
5 Agua de dilución	Agua dura reconstituida
6 Número de semillas por réplica	Veinte
7 Número de réplicas	Tres
8 Duración de la prueba	120 h
9 Efecto medido	Inhibición en elongación de la radícula e hipocotilo. Inhibición en la germinación
10 Resultado final	CE50 o CI50 0% inhibición
11 Aceptabilidad de los resultados	Germinación > 90% Control positivo y negativo de acuerdo con los valores: admitidos en las cartas control
12 Control positivo	Zn (II)

- Con la ayuda de una pinza, colocar cuidadosamente veinte semillas, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir la elongación de las raíces.
- Tapar las cápsulas y colocarlas en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad. Dado que algunas variedades de semillas de lechuga requieren oscuridad para que se produzca la germinación (semillas fotoblásticas negativas), las cajas de Petri deben cubrirse de la luz inmediatamente después de colocarlas en las cápsulas y durante el periodo de ensayo. Incubar durante 120 h (cinco días) a una temperatura de 22± 2 °C. Realizar repeticiones para cada dilución ensayada.

Medida de los puntos finales de evaluación de la fitotoxicidad

Cada punto final se evalúa comparando el efecto generado en los organismos expuestos a la muestra con respecto a la respuesta en los organismos del control negativo sujetos a las mismas condiciones de ensayo, excepto por la ausencia de muestra.

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

Efecto en la germinación

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

Efecto en la elongación de la radícula e hipocotilo

Utilizando una regla o papel milimetrado, medir cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocotilo de cada una de las plántulas correspondientes a cada concentración de tóxico o dilución de muestra y a los

controles. La medida de elongación de la radícula se considera desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocotilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocotilo se considera desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones (figura 4.4.3). La figura 4.4.4 muestra los distintos estadios de la semilla durante la prueba de germinación y elongación.

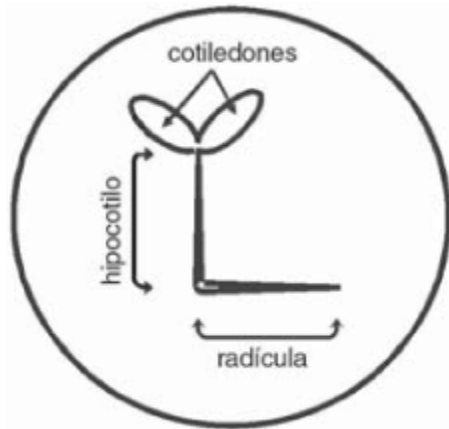


Figura 4.4.3. Esquema de plántula de *L. sativa* al finalizar el periodo de exposición.

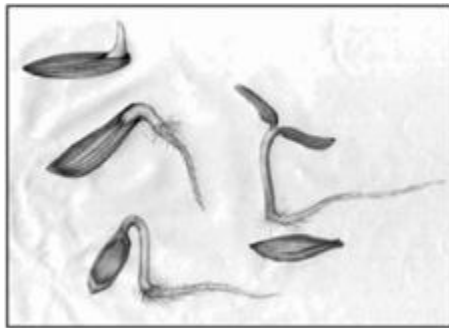


Figura 4.4.4. Estadios por los que atraviesa la semilla durante el ensayo de germinación y elongación.

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

Un procedimiento factible de realizar para facilitar la medición de la radícula e hipocotilo, es proceder a congelar las cápsulas de Petri correspondientes a todos los tratamientos y descongelarlas a medida que se van midiendo (no conservar el material luego de ser descongelado). De esta manera, las plántulas descongeladas adquieren una consistencia blanda, favoreciendo la medición. Si se procede a evaluar el efecto sobre las plantas descongeladas es importante proceder de igual manera con todas las réplicas de la prueba. Este procedimiento reduce la variabilidad en las medidas, principalmente cuando el crecimiento de las radículas es

ensortijado o no es parejo. Por otro lado, antes de congelar el material se debe realizar previamente la observación general de efectos fitotóxicos en las plantas vivas al finalizar el periodo de exposición.

Control de calidad de la prueba

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

En el control negativo:

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

En el control positivo:

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

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

- Toxicidad del sustrato: cuando se reemplaza el papel utilizado por otras marcas más económicas o se utiliza papel de filtro cualitativo en planchas, hay que tener en cuenta los posibles efectos tóxicos del papel. Si se han tenido buenos resultados con una marca o calidad determinada de papel, es conveniente no variar el sustrato de ensayo.
- Suciedad de las cápsulas: si no es posible utilizar material descartable, es importante asegurar un enjuague minucioso del material para evitar la presencia de residuos de detergente u otra solución de limpieza.
- Exceso de agua o de muestra utilizada para embeber el papel; esto determina una baja disponibilidad de oxígeno necesario para el normal desarrollo del proceso de germinación. El papel de filtro utilizado como sustrato de germinación de las semillas debe estar bien mojado, con sobrante de líquido para evitar la desecación, pero en ningún caso las semillas deben quedar sumergidas.
- Déficit hídrico durante el periodo de exposición: se recomienda envolver las cápsulas con una bolsa plástica para evitar que el papel de filtro de las mismas pierda agua durante el ensayo. Si se está experimentando con compuestos volátiles, no deben colocarse en una misma bolsa cápsulas que correspondan a diferentes concentraciones de ensayo. También se puede colocar dentro de la cámara de cultivo un recipiente con agua para generar un ambiente húmedo, reduciendo así la evaporación. Hay que tener en cuenta que la pérdida de humedad de las cápsulas genera una concentración del tóxico cuya toxicidad estamos evaluando y, por lo tanto, las conclusiones a las que arribaremos serán erróneas.
- Exposición a la luz durante el proceso de imbibición: inmediatamente después de colocar las semillas sobre el papel de filtro, se recomienda tapar y envolver las cápsulas de Petri cubriéndolas de la luz (para el caso de semillas fotoblásticas negativas).

- Temperatura de ensayo: las semillas de *L. sativa* expuestas a una temperatura superior (apenas unos grados) a la óptima para la germinación, no germinarán aunque se les coloque posteriormente a temperaturas inferiores (termodormancia o dormancia inducida por la temperatura).

4.4.4 Expresión de los resultados

Se realizan los siguientes cálculos:

- Promedio y desviación estándar de la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas de cada repetición.
- Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocotilo, con el promedio de elongación para cada dilución respecto del promedio de elongación del control negativo.
- Porcentaje de inhibición en la germinación.

Elaborar la gráfica dosis-respuesta colocando en la ordenada el porcentaje de inhibición y en la abscisa, la concentración. Mediante un método gráfico o el uso de programas estadísticos, calcular la concentración que produce el 50% de inhibición (CI50/CE50) para cada punto final evaluado. Para el caso de muestras en donde la inhibición es inferior al 50%, o para determinar el valor correspondiente al NOEC o LOEC, se realiza el análisis de comparación de medias (t *Student*, Dunnett) para verificar la significancia estadística en el porcentaje de efecto (ver capítulo 5 "Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad").

4.4.5 Interpretación de los resultados

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

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

REFERENCIAS

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

Bowers, N., Pratt, J.R., Beeson D. & Lewis M., 1997, "Comparative Evaluation of Soil Toxicity using Lettuce Seeds and Soil Ciliates", *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (2), 207-213.

Cheung, Y.H., Wong, M.H. & Tam, N.F.Y.; 1989, "Root and Shoot Elongation as an Assessment of Heavy Metal Toxicity" and "Zn Equivalent Value' of Edible Crops", *Hydrobiologia* 188/189, 377-383.

Dutka, B., 1989, *Short-Term Root Elongation Toxicity Bioassay. Methods for Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments*, National Water Research Institute (NWRI), Environment Canada.

Ellis, R.H., Hong, T.D. & Roberts, E.H., 1985, *Handbook of Seed Technology for Genebanks*, Vol.1 *Principles and Methodology*, International Board of Plant Genetic Resources, Rome, 210 pp.

Organization for Economic Cooperation and Development, 1984, *Terrestrial Plants: Growth Test. Guideline for Testing of Chemicals* N °208, OECD Publications Service, Paris.

US EPA, 1989, *Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites*, US Environmental Protection Agency, 600/3-88/029, Corvallis.

Wang, W., 1987, "Root Elongation Method for Toxicity Testing of Organic and Inorganic Pollutants", *Environmental Toxicology & Chemistry* 6, 409-414.

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

Yolanda Pica Granados, Alicia Ronco, Maria Consuelo Díaz Baez

4.5.1 Principio

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

Selenastrum capricornutum es una alga verde (clorofita) unicelular con forma de media luna (ver figura 4.5.1 en anexo fotográfico) y un volumen aproximado de entre 40 y 60 μm^3 , que puede encontrarse en sistemas acuáticos epicontinentales eutróficos u oligotróficos. Este método puede ser utilizado por sí mismo o como parte de una batería para estimar la potencial fitotoxicidad de aguas dulces superficiales o subterráneas, aguas servidas y otro tipo de muestras líquidas, tales como: elutriados o lixiviados, agua intersticial de sedimentos o cualquier compuesto puro soluble en agua. La prueba es especialmente adecuada para ser practicada en laboratorios que cuenten con una infraestructura básica, siendo un ensayo sencillo y de bajo costo.

Cuando las células son expuestas a muestras que contienen contaminantes tóxicos, su reproducción se afecta, alterando la tasa de crecimiento de la población de las algas. El efecto de inhibición de la población causada por los agentes tóxicos en una muestra luego de 72 h de exposición, bajo condiciones de temperatura controlada (24 ± 2 °C), se determina comparándolo con el crecimiento normal observado en un sistema libre de agentes contaminantes conocido como control. Dependiendo del número de concentraciones y réplicas preparadas para el desarrollo del experimento, se determina la CI50 (concentración de inhibición media), la LOEC (concentración mínima a la cual se observa efecto) y la NOEC (concentración a la cual no se observa efecto).

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

4.5.2 Reactivos, soluciones y cultivo del organismo de prueba

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

Medio de cultivo para proliferación de algas (1x)

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

a) Preparación de soluciones

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

Solución 1. Micronutrientes

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

Solución de cloruro de zinc

Verter en el frasco 70 mL de agua, agregar luego 164 mg de cloruro de zinc ($ZnCl_2$). Llevar a volumen final de 100 mL con agua y mezclar bien. A partir de esta solución transferir 1 mL mediante pipeta al frasco 1.

Solución de cloruro de cobalto

Verter en el frasco 70 mL de agua, agregar 71,4 mg de cloruro de cobalto ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$). Llevar a volumen con agua hasta completar 100 mL y mezclar bien. A partir de esta solución, transferir 1 mL mediante pipeta al frasco 1.

Solución de molibdato de sodio

Verter en el frasco 70 mL de agua, luego agregar 363 mg de molibdato de sodio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$). Finalmente, completar el volumen hasta 100 mL con agua y mezclar bien. A partir de esta solución, transferir 1 mL mediante pipeta al frasco 1.

Solución de cloruro de cobre

Verter 70 mL de agua en dos de los frascos de 100 mL; en el primero de ellos agregar 60,0 mg de cloruro de cobre ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$), luego llevar a volumen de 100 mL con agua y mezclar bien. Una vez lista esta primera solución de cloruro de cobre, tomar 1 mL, verter en el segundo frasco y completar el volumen de 100 mL con agua; 1 mL de esta segunda solución es el que se emplea para la preparación de la solución núm. 1 de micronutrientes.

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

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

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

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

	Compuesto	Fórmula	Masa en gramos (g) a volumen (mL) de solución stock
1	Cloruro de magnesio	MgCl ₂ •6H ₂ O	6,08
2	Cloruro de calcio	CaCl ₂ •2H ₂ O	2,20
3	Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0,0928
4	Cloruro de manganeso	MnCl ₂ •4H ₂ O*	0,208
5	Cloruro de zinc	ZnCl ₂ *	1 mL de la solución
6	Cloruro férrico	FeCl ₃ •6H ₂ O*	0,0799
7	Cloruro de cobalto	CoCl ₂ •6H ₂ O*	1 mL de la solución
8	Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	1 mL de la solución
9	Cloruro de cobre	CuCl ₂ •2H ₂ O	1 mL de la solución
10	Etilen-diaminotetracético: disódica	sal Na ₂ EDTA•2H ₂ O	0,150

* Estos compuestos pueden ser sustituidos por sulfatos. Por ejemplo, ZnCl₂ o ZnSO₄. Si así se hiciera, recalcular estequiométricamente las masa a utilizar.

Soluciones de macronutrientes:

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

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

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

Este medio de proliferación también puede ser empleado para otras especies de algas, tales como *Ankistrodesmus sp*, *Scenedesmus sp*, entre otras. Por cada litro de medio de cultivo que se desee preparar, se adiciona en agua destilada 1 mL de cada una de las cinco soluciones en forma ordenada. Así, se debe iniciar con la 1 hasta terminar con la 5, llevando a volumen al finalizar. Se sugiere no alterar el orden de adición de las soluciones, ya que se pueden formar precipitados difíciles de eliminar. Mezclar bien después de la adición de cada solución.

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

Frasco	Compuesto	Fórmula	Masa (g)
Solución 2	Nitrato de sodio	NaNO ₃	25,5
Solución 3	Sulfato de magnesio	MgSO ₄ •7H ₂ O	14,7
Solución 4	Fosfato de potasio	K ₂ HPO ₄	1,044
Solución 5	Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	15,0

Al final, el pH del medio deberá ser 7,5± 0,1, por lo que es necesario ajustarlo, ya sea con NaOH o HCl 1 N. Inmediatamente, filtrar el medio bajo condiciones asépticas (mechero o campana de flujo laminar) a través de

una membrana de éster de celulosa de 0,22 μm de abertura de poro y 47 mm de diámetro. El sistema de filtración y el matraz de captación deben estar estériles. Para la filtración se puede utilizar una bomba de vacío. El medio nutritivo esterilizado se inocula con las algas.

Cultivo y propagación de las algas

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

El medio inoculado se coloca a 24 ± 2 °C dentro de una cámara con iluminación superior a 2 000 lux, manteniendo aireación permanente. En el caso que no se cuente con el sistema de iluminación, se puede utilizar un sistema similar al presentado en el anexo 1. Para la aireación, se puede emplear una bomba de aire para acuarios, o se utiliza directamente el aire de la línea del laboratorio. En este último caso, se deben eliminar las impurezas intercalando filtros entre la fuente y el recipiente de cultivo. Los filtros permiten mantener condiciones axénicas, y eliminan las partículas sólidas o líquidas (polvo del aire, emulsiones de aceite, etcétera). Existen filtros especiales disponibles en el mercado de artículos para laboratorio; en el caso de no contar con ellos pueden fabricarse en el laboratorio, empacando carbón activado y lana de vidrio.

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

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

Reactivación de algas inmovilizadas

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

Para la desinmovilización se toman entre 10 y 12 perlas con algas, asegurándose de que estén libres de medio líquido; se transfieren a un tubo cónico de 50 mL; se adicionan 5 mL de citrato de sodio 0,1 M, y se sella el recipiente. A continuación se agita vigorosamente durante treinta segundos, repitiendo el procedimiento cada dos minutos hasta que la matriz se haya disuelto completamente (de veinte a treinta minutos). Con ayuda de un agitador o vórtex (a intensidad moderada) se puede reducir el tiempo de proceso a cinco minutos. Una vez disueltas las perlas, centrifugar a 3 000 rpm durante diez minutos. Eliminar el sobrenadante, conservar las

algas sedimentadas, resuspender las células en 5 mL de la solución amortiguadora utilizada para las pruebas (0,15 mg NaHCO₃/L).

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

Este medio se prepara a partir de las soluciones 1, 2, 3, 4 y 5 empleadas en la elaboración del medio nutritivo para la proliferación de algas. Para la preparación se recomienda utilizar un recipiente aforado de 1 L debidamente rotulado. Se colocan 800 mL de agua, a los cuales se adicionan 18 mL de cada una de las soluciones ordenadamente como ya se indicó. Terminada la adición de las soluciones, llevar a volumen con agua destilada y ajustar el pH a $7,5 \pm 0,1$ con NaOH o HCl 1 N.

Solución amortiguadora para las pruebas (15 mg NaHCO₃/L)

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

Medio sólido para mantenimiento de las cepas

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

Inoculación de las algas en medio sólido

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

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

4.5.3 Materiales y equipos

Materiales

- Pipetas de vidrio graduadas (5 y 10 mL).
- Pipeta automática de 100 µL con puntas estériles.
- Pipeta automática de 100-1 000 µL con puntas estériles.
- Viales de centelleo de vidrio borosilicato claro de 20 mL de capacidad.
- Papel (film) transparente.

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

Equipos

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

- Base de agitación o vórtex (opcional).

4.5.4 Procedimiento para el desarrollo de la prueba

Preparación del inóculo de algas para desarrollo de pruebas

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

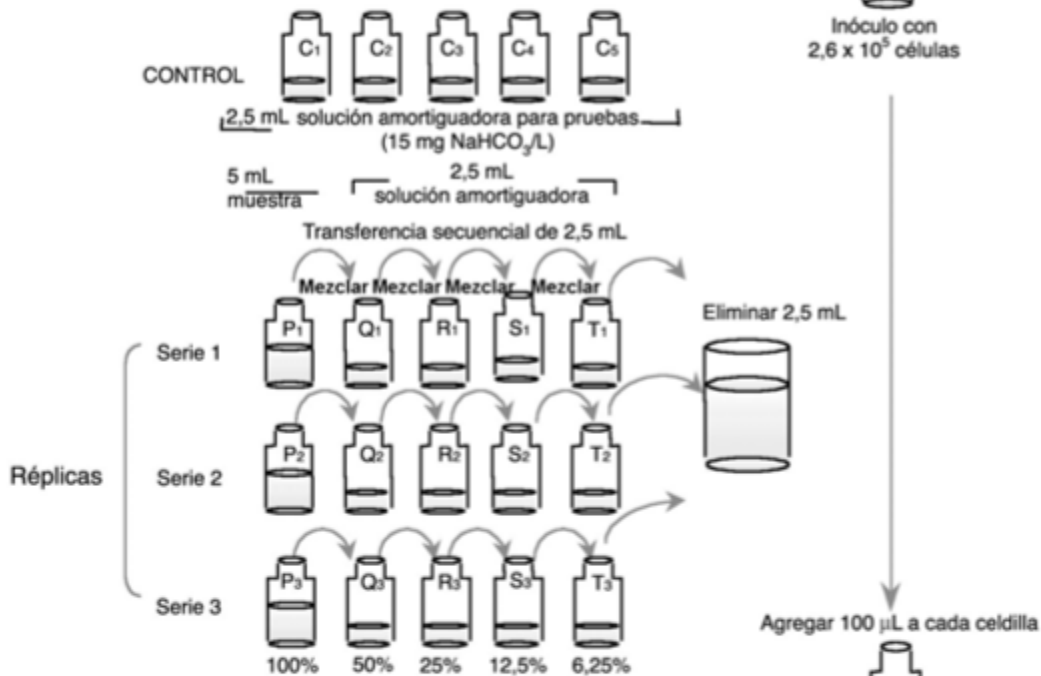
Factor de dilución (FD) = número cél./mL en el concentrado / $2,6 \times 10^6$ cél./mL.

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

1 Preparación de inóculo algal



2 Método de dilución de muestras



3 Preparación de prueba

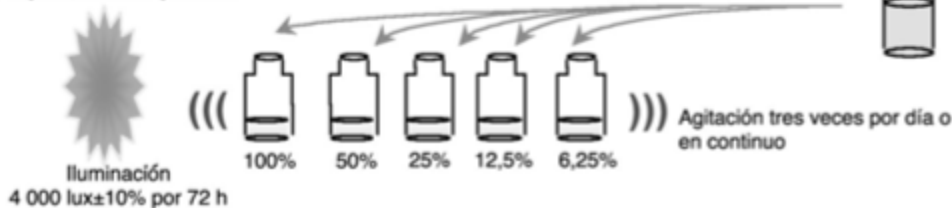


Figura 4.5.2. Esquema del procedimiento de prueba con *S. capricornutum*.

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

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

1 Cálculo del factor de dilución (FD):

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

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

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

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

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

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

$$V \text{ (mL)} = 2 \text{ mL} / 1,115 = 1,79 \text{ mL}$$

El resultado indica que deberá tomarse 1,79 mL del concentrado de algas y adicionar solución amortiguadora hasta completar un volumen de 2 mL. Esta dilución se puede realizar en tubos cónicos de centrífuga de 50 mL con ayuda de una pipeta automática.

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

Método de dilución de muestras

En las pruebas se requiere de veinte viales de borosilicato de vidrio de 20 mL similares a los utilizados en contadores de centelleo (Arensberg *et al.*, 1995). Se toman cinco, se rotulan como control (C1 hasta C5) y se adiciona en cada uno de ellos 2,5 mL de la solución amortiguadora (NaHCO_3 15 mg/L). Los viales restantes se organizan en tres series de cinco viales cada una. Cada serie constituye una réplica. Se rotulan los viales de la primera serie de la siguiente manera: P1, Q1, R1, S1 y T1; la segunda deberá rotularse de la misma forma, pero con el subíndice 2, y la tercera con el subíndice 3. En los viales rotulados P1, P2 y P3 se colocan 5 mL de solución más concentrada de la muestra (100%). Los viales restantes se utilizarán para la preparación de las diluciones seriadas de la muestra.

Para iniciar el proceso de dilución de la muestra, en cada uno de los viales restantes se colocan 2,5 mL de solución amortiguadora (NaHCO_3 15 mg/L). A continuación se transfieren 2,5 mL de la muestra (100%) del vial rotulado como P1 al vial Q1; la concentración en este vial corresponde a la primera dilución 1:2 o 50% (v/v). Se mezcla y se continúa el proceso tomando 2,5 mL del vial Q1 y pasándolo al R1, en el cual se tiene la segunda dilución 1:2 y una concentración de 25% (v/v) y así, sucesivamente, hasta llegar al vial T1; como al finalizar en el vial T1 se tiene un volumen de 5 mL, se toman 2,5 mL y se descartan. Se sigue el mismo procedimiento para las series dos y tres y, al finalizar el proceso de dilución, se mezcla el contenido de cada uno de los viales del sistema de prueba.

Terminado el proceso de dilución de la muestra, se procede a adicionar 100 µL del inóculo de algas anteriormente preparado, cuya concentración es $2,6 \times 10^5$ cél./mL, a cada uno de los viales de la prueba. La concentración final de las algas en cada uno de los viales será de 10 000 células por mililitro.

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

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

El resumen general de las condiciones de la prueba se presenta en la tabla 4.5.3 y en las figuras 4.5.2 y 4.5.3.

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

1 Tipo de ensayo	Estático
2 Temperatura	24 ± 2 °C
3 Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
4 Intensidad luminosa	$60-80 \mu E/m^2/S$ (4 000 lux)
5 Fotoperiodo	Iluminación continua
6 Volumen del recipiente	Viales de 20 mL
7 Volumen de la solución de prueba	2,6mL
8 Edad del cultivo usado como inóculo	Cuatro a siete días
9 Densidad celular inicial	10^4 células/mL
10 Número de réplicas	Tres
11 Velocidad de agitación	Manual, discontinua
12 Agua de dilución	Solución amortiguadora ($NaHCO_3$ 15 mg/L)
13 Factor de dilución	0,3 o 0,5
14 Duración de la prueba	72h
15 Efecto medido	Crecimiento (conteo)
16 Resultado final	IC50
17 Aceptabilidad de los resultados	Densidad celular en el control >16 veces la densidad inicial
18 Control positivo	Cu (II) a partir de $CuSO_4$

Diagrama de flujo ensayo *S. capricornutum*

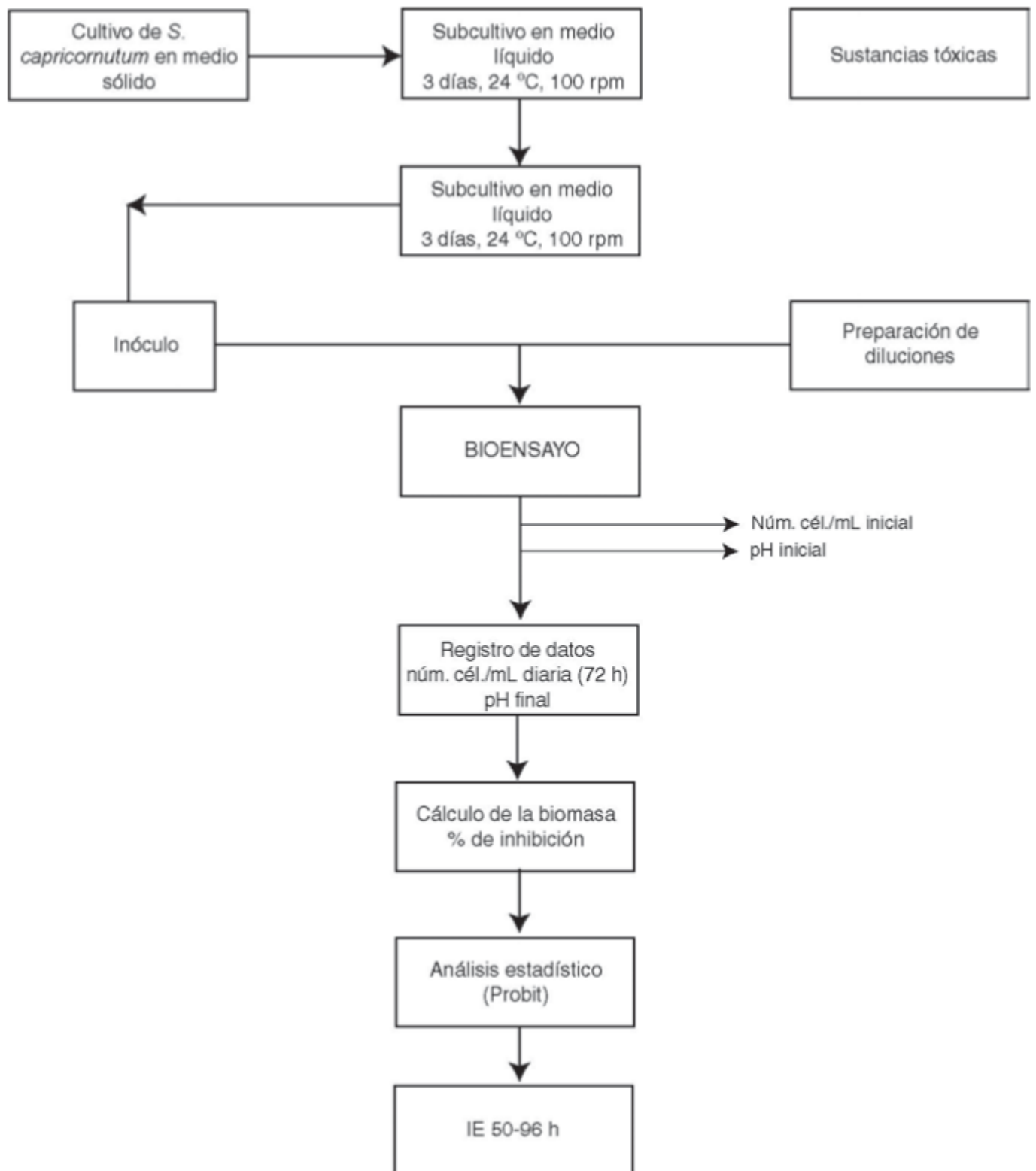


Figura 4.5.3. Ensayo de toxicidad crónica con *S. Capricornutum*.

4.5.5 Análisis de datos

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

La cuantificación se efectúa siguiendo el método de manejo recomendado para este tipo de celdas, y que se describe en el numeral 4.5.6.

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

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

4.5.6 Conteo con la cámara Neubauer

La cámara Neubauer, también conocida como hemocitómetro, consta de un cubreobjetos de cuarzo y un portaobjetos de un grosor mayor a los de uso común (figura 4.5.4). En la parte superior del portaobjetos se encuentran cuatro canales longitudinales y uno transversal central. En la parte superior e inferior del canal transversal están grabadas dos rejillas de 9 mm^2 de superficie, las cuales están a su vez subdivididas en una cuadrícula más pequeña (figuras 4.5.4 A-B) (UNAM, 1986).

Usando el objetivo de 10x de un microscopio óptico, se enfoca de forma que en el campo se cubra un cuadrado cuya área corresponda a 1 mm^2 ; generalmente se trabaja con el cuadro central. El área del cuadro central es de 1 mm^2 y se encuentra subdividida en 25 cuadrados. Cada uno de estos cuadrados mide 0,2 mm de lado, por lo que el área de cada uno será de 0,04 mm^2 (figura 4.5.4 C).

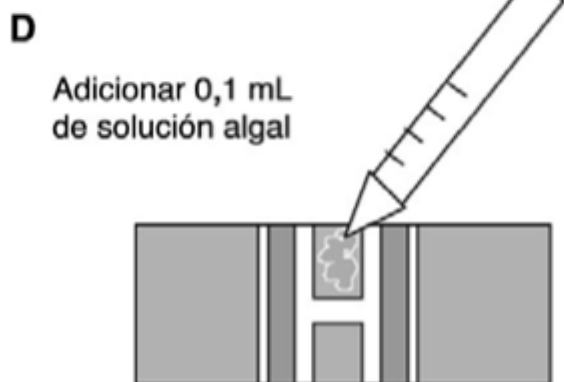
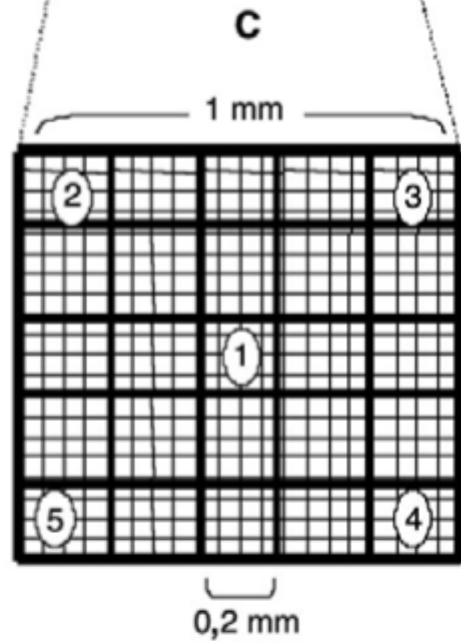
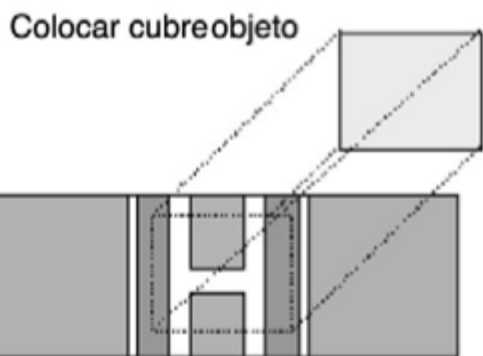
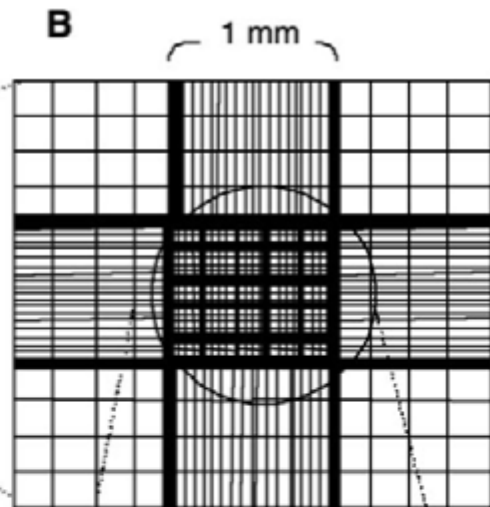
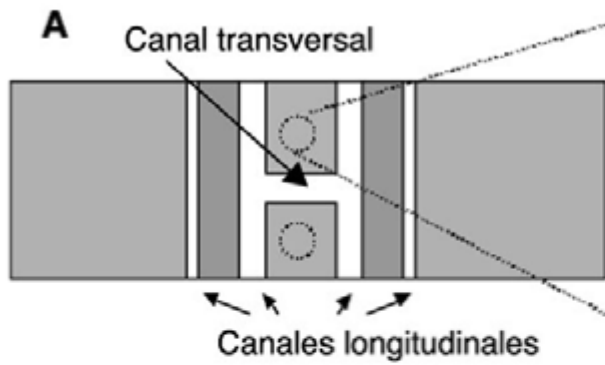
Al colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos se tiene una profundidad de 0,1mm, de forma que el volumen contenido en cada uno de los cuadrados grandes será 0,1 mm^3 (1,0 $\text{mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3$).

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

- Limpiar con papel de arroz la cámara de Neubauer.
- Colocar el cubreobjetos sobre los canales, tal como se indica en la figura 4.5.4.
- Agitar manualmente el frasco con la solución de algas a evaluar, hasta observar coloración homogénea o disolver los agregados celulares.
- Con ayuda de una pipeta serológica de 1 mL o con una pipeta automática de 100 μL , tome 0,1 mL de la suspensión de algas y coloque la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos; deje que la solución ingrese a la cámara por capilaridad, sin que pase a los canales laterales (figura 4.5.4 D). Si se forman burbujas se debe repetir la operación, lavando y secando la cámara previamente.
- Colocar la cámara Neubauer en la platina del microscopio y enfocar con el objetivo 10x.

- Localizar el cuadro central de la rejilla (ubicando la cuadrícula de 25 cuadros de 0,04 mm²), hacer un cambio de lente al objetivo de 40x y contar las células que se encuentran sobre el mismo (figura 4.5.4 C).
- Contar el número de células en el cuadrado central tomando precauciones para evitar contar dos veces la misma célula u omitir alguna.
- Para obtener resultados más exactos se recomienda tener un conteo entre doscientas y trescientas células por muestra. Cuando en el cuadro central existen menos de doscientas células, es necesario revisar más cuadros para el conteo. Se sugiere continuar el conteo en los cuatro cuadros que forman las esquinas de la cuadrícula. Si aún así no se alcanzan las doscientas células, se debe contar el total en los 25 cuadros.

Cámara Neubauer



Conteo por cuadrantes



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

- Anotar el número de cuadros contados.
- En caso opuesto, en que el número de células sea muy elevado y se dificulte su conteo, será necesario diluir la suspensión en una proporción conocida, la que deberá ser tenida en cuenta en la estimación final.

Determinación de la densidad celular

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REFERENCIAS

Arensberg, P., Hemmingsen, V.H. & Nyholm, N., 1995, *A Miniscale Algal Toxicity Test*, *Chemosphere*, 30:2103-2115.

Blaise, C., Forget, G. & Trottier, S., 2000, "Toxicity Screening of Aqueous Samples Using a Cost-Effective 72-hour Exposure *Selenastrum capricornutum* Assay", *Environ Toxicol.*, 15:352-359.

Environment Canada, 1992, *Biological Test Method: Growth Inhibition Test Using the Freshwater alga Selenastrum capricornutum*, Environmental Protection Series EPS 1/RM/24.

Hindak, F., 1990. "Studies of the Chlorococcal Algae (*chlorophyta*)", V. *Biologické Práce* (Slovenskej Akademic Vied), Bratislava, 36:1-225.

UNAM, 1986, "Biología celular", *Manual de prácticas*. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 20-28.

US EPA, 1992, *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms EPA-600/4-91-022, 3th ed.*, Philip Lewis, A., L.; Klem, D.J. & Lazorchak, J.M.

ANEXO 1

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

Materiales

- Dos pliegos de papel empleado para construcción de maquetas, color blanco, rígido y resistente (ej. cascarón), de aproximadamente 1,40 x 0,60 m.
- Cinta adhesiva de 5 a 7 cm ancho.
- Tijeras o navaja.
- Papel aluminio.
- Carrete de hilo nylon.
- Marcador indeleble color azul o amarillo.
- Guantes de látex.
- Embudo de tallo largo de plástico transparente o vidrio de 10,5 cm de abertura de boca y 10 de fondo.
- 30 cm de alambre de 1 mm de diámetro.
- Extensión eléctrica.
- *Socket* para foco con entradas para clavija de conexión.
- Bombilla de luz halógena fría 20W/11-860-120V-350mA, 1 155 lumen 50/60Hz, de triple foco (ej. *Osram dulux*).
- Conexión para anterior.

Preparación de la pantalla de iluminación

De los pliegos de papel para construcción, cortar cuatro triángulos de 60 cm por lado; posteriormente, cortar una de las esquinas de tal forma que se obtenga un polígono de 60 cm de base por aproximadamente 57 cm de altura (figura 4.5.5 A).

Forrar con papel aluminio los primeros 20 cm de la base de cada triángulo a manera de banda, la cual quedará en el interior de la cámara una vez armada (figura 4.5.5 B).

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

Colocación del sistema de iluminación

a) Sistema de filtrado

A 20 cm de la boca superior introduzca en una esquina hilo nylon resistente y cruce a la esquina opuesta, repita la operación en otra de las esquinas, de tal forma que se forme una cruz o red de soporte (figura 4.5.6 D).

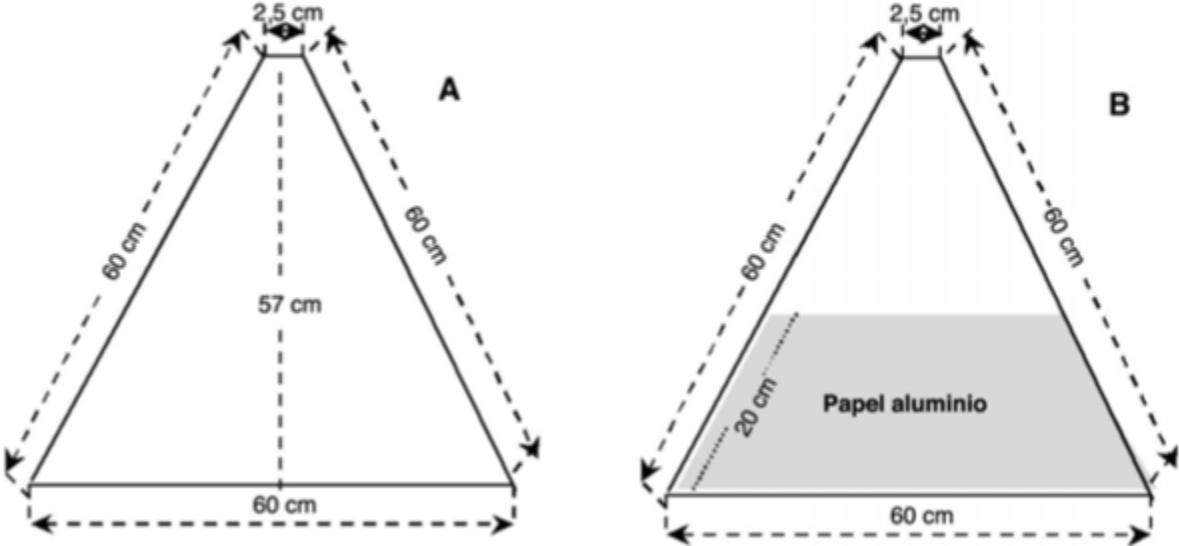
Trozar el tallo del embudo hasta su base.

Cortar el guante de cirujano, conservando la banda de aproximadamente 8 cm de la muñeca del mismo. Eliminar el resto.

Colocar la banda de látex obtenida del guante de cirujano en la boca del embudo sin tallo, de forma que cubra sólo 5 cm y dejar un espacio traslúcido de 5 cm (figura 4.5.6 D).

Preparación de la pantalla

Vista lateral



Vista interior

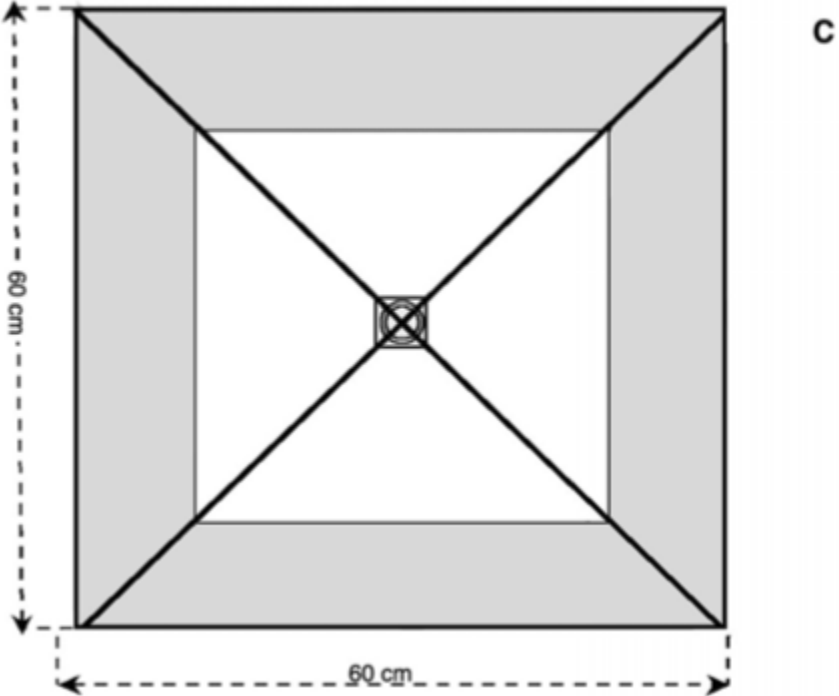
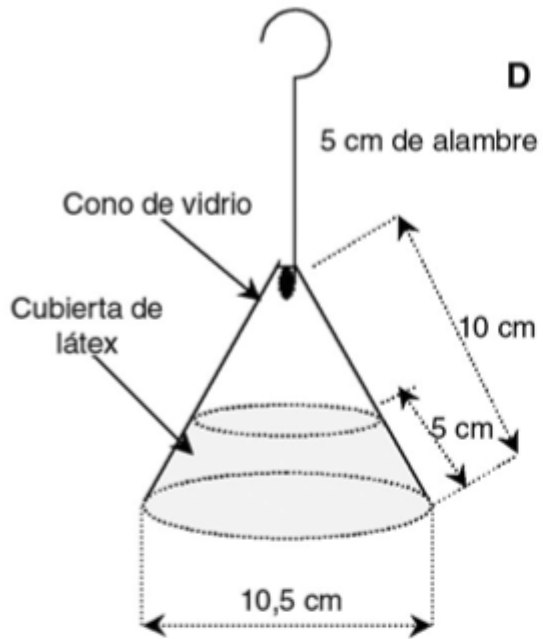
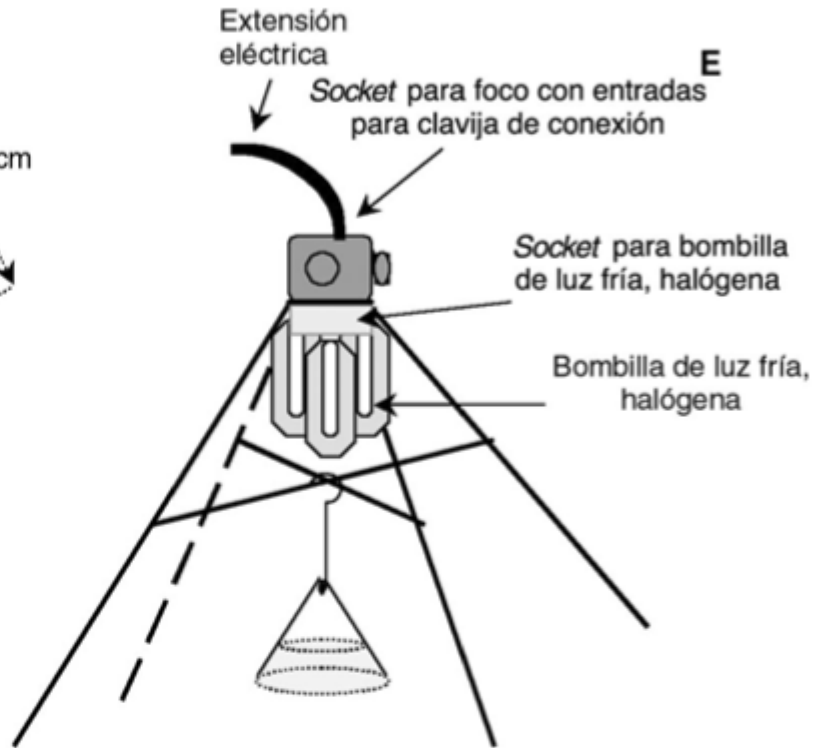


Figura 4.5.5. Preparación de pantalla de iluminación.

Sistema de filtrado de luz



Colocación de la lámpara



Base de la cámara

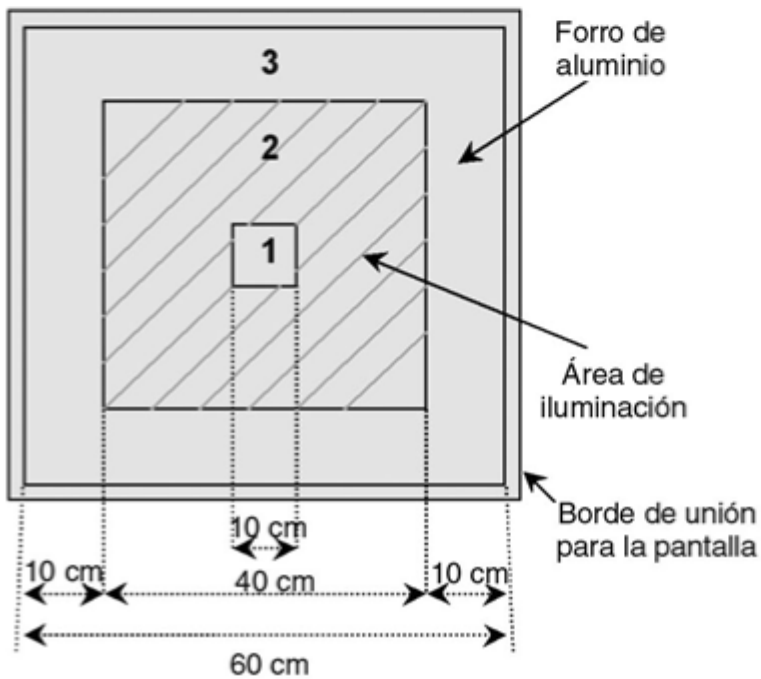


Figura 4.5.6. Colocación de sistema de iluminación.

Enderezar el alambre y enrollar uno de los extremos de tal forma que se fije en el interior del embudo. Introducir el alambre por el orificio dejado por el tallo del embudo. Dar un espacio de 5 cm y, en el extremo saliente, formar un gancho (figura 4.5.6 D). Colgar el embudo del centro de la red de sostén (figura 4.5.6 E).

Colocación de la lámpara

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

Introducir el sistema por el interior de la pirámide de tal forma que la rosca del portalámpara salga por la punta de la pirámide. Tomar la conexión múltiple y enroscar al resto del sistema por el exterior. Esto dará estructura y soporte a la lámpara (figura 4.5.6 E).

a) Base de la cámara

Cortar un cuadrado de papel para construcción de 62 cm². Forrar una cara con papel aluminio.

Ubicar el centro del cuadrado y en torno a él dibujar un cuadrado de 10 cm; después marcar dos más de forma concéntrica, el primero de 40 cm por lado y el segundo de 60 cm por lado (figura 4.5.6 F).

Trazar líneas diagonales con el marcador, en la banda que se forma entre el cuadrado 1 y 3. El área marcada señalará la zona donde siempre deberán ser colocados los viales de prueba dentro de la cámara. En esta banda, bajo el diseño antes mencionado, la iluminación será homogénea, proporcionando una intensidad luminosa de entre 2 800 y 3 000 lux.

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

Sugerencias

Cambiar la lámpara de iluminación de triple barra de forma regular cada 45 días si es que el uso es continuo, o calcular las horas de uso equivalentes. El cambio debe efectuarse, ya que el brillo de la lámpara tiende a disminuir con el uso, reduciendo la intensidad luminosa, lo que puede mermar significativamente el crecimiento de las algas durante el desarrollo de las pruebas.

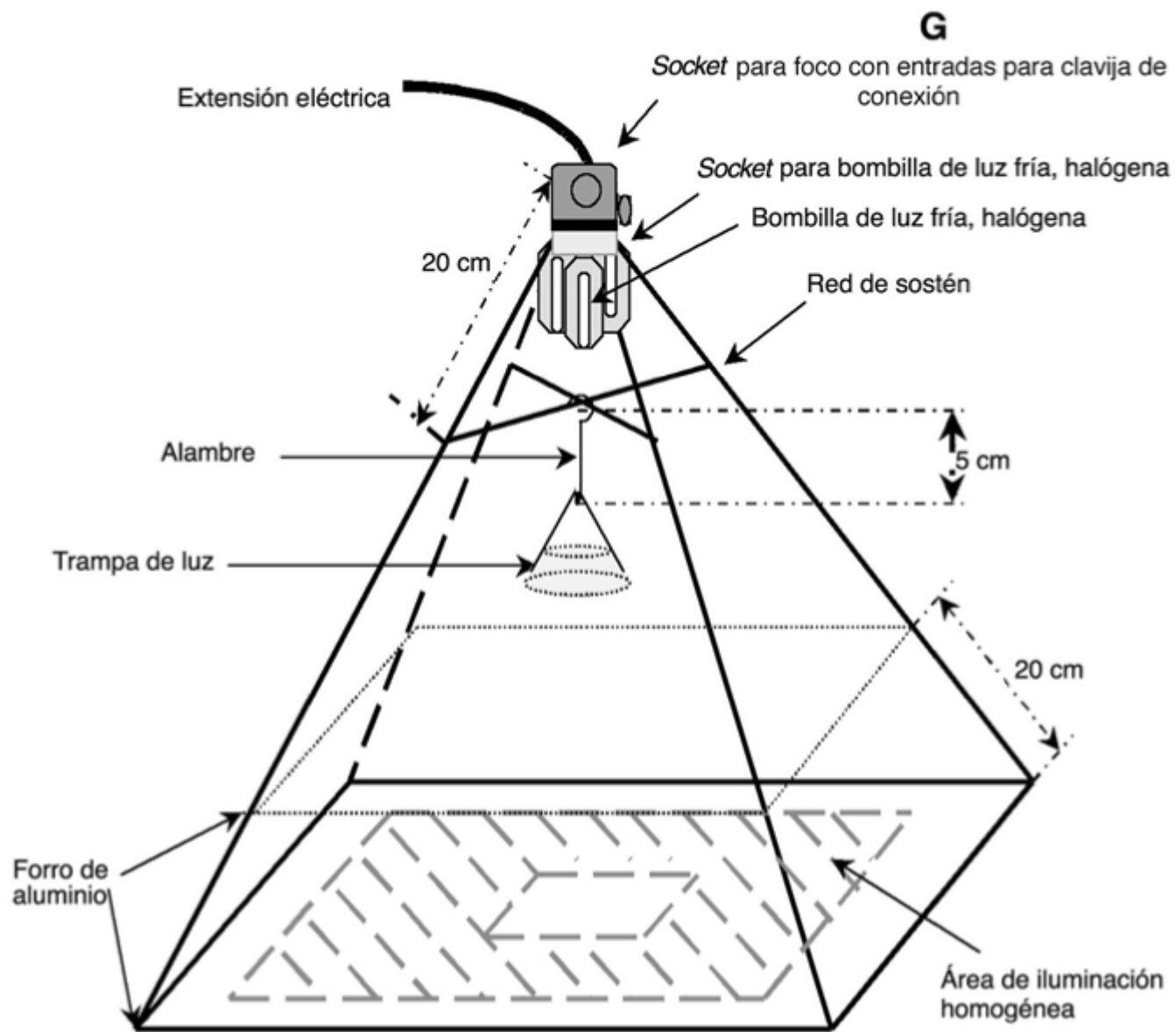


Figura 4.5.7. Vista tridimensional de la cámara de iluminación.

Capítulo 5. Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad

Maria Consuelo Díaz Baez, Gustavo Daniel Bulus Rossini, Yolanda Pica Granados

5.1 Introducción

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

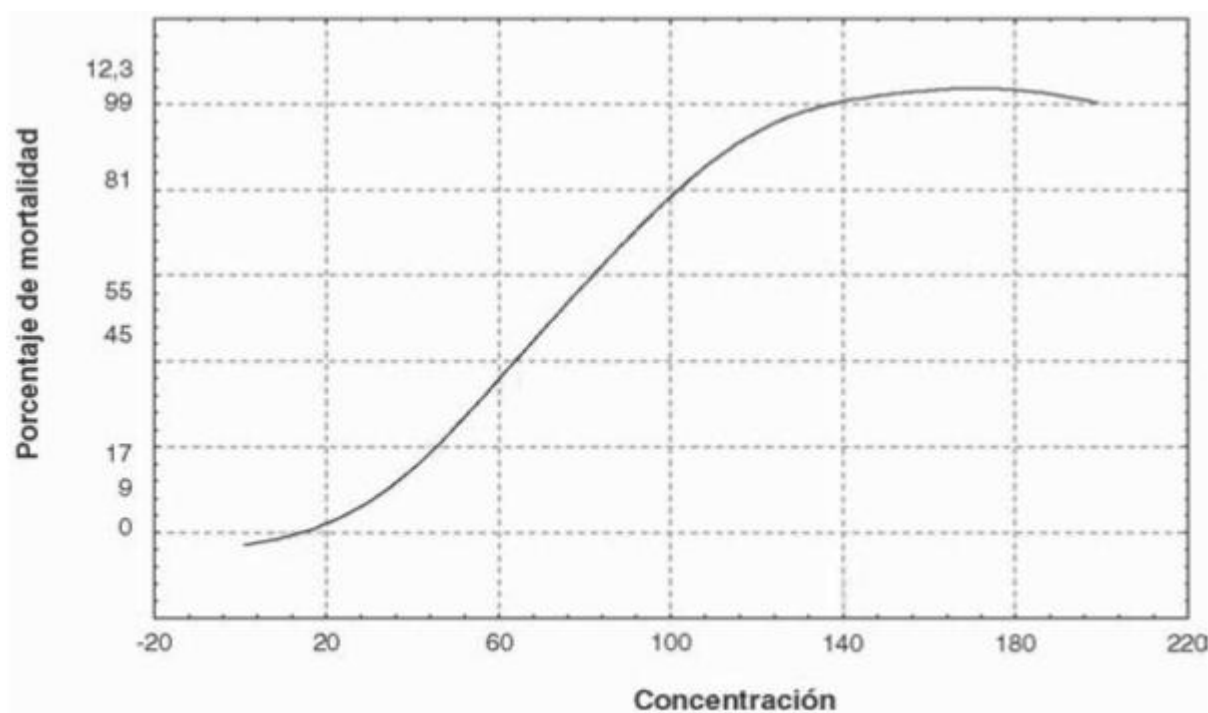


Figura 5.1. Relación dosis-respuesta.

Existen muchas formas de determinar la toxicidad, y aunque los efectos bioquímicos, fisiológicos, reproductivos y de comportamiento son de gran utilidad, el indicador comúnmente más utilizado es la muerte del organismo de prueba. La mayoría de las pruebas de toxicidad suministran una estimación de la dosis (o concentración en el alimento, aire o agua) que produce una respuesta tóxica a un nivel del 50%. Por ejemplo, la dosis letal media es la dosis o concentración que mata al 50% de la población (CL50). Otro indicador que ha ganado gran popularidad es la dosis o concentración más alta a la cual no se observa ningún efecto (NOEC).

Las estimaciones obtenidas en las pruebas de toxicidad, definidas en el capítulo 1 "Conceptos generales", son parte integral de las mismas. En ellas, la estadística desempeña un papel importante no sólo para su cálculo,

sino para la planificación y ejecución de las pruebas de toxicidad y para el análisis e interpretación de los resultados obtenidos en ellas. Por tanto, el diseño experimental, el muestreo, la modelación, la recolección de datos, las pruebas y los análisis deben ceñirse a principios estadísticos estrictos. En general, los métodos de análisis de los resultados están bien documentados, son aplicables a la mayoría de los datos obtenidos en este tipo de pruebas y pueden ser manejados por personas sin entrenamiento estadístico.

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

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

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

5.2 Pruebas de toxicidad

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

La respuesta del sujeto se valora mediante la cuantificación final de alguna características (peso del cuerpo, peso del hígado, ritmo cardiaco, etcétera), el cambio de ella (aumento en el peso corporal, disminución en la presión sanguínea) o por la ocurrencia o no de un determinado fenómeno (muerte, inhibición del crecimiento, una contracción muscular, etcétera).

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

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

5.3. Tipos de pruebas o bioensayos

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

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

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

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

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

5.4 Métodos estadísticos

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

Diseños de experimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

elaboran las mismas pruebas en diferentes laboratorios. Esto permite la evaluación de la variabilidad entre laboratorios y mejora la representatividad del resultado.

Diseño experimental

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

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

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

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

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

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

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

5.4.1 Establecimiento de una relación dosis-respuesta

Como resultado del análisis de los datos de un diseño para estimar una relación dosis-respuesta, lo que se pretende obtener son las estimaciones de los parámetros del modelo seleccionado para relacionar las variables y , a continuación, utilizar el modelo con las estimaciones de los parámetros encontrados para determinar los valores de la variable *concentración de tóxico* que causan un grado de efecto, en particular sobre los organismos expuestos. Entre estas concentraciones, la más utilizada es la que se conoce como concentración letal, efectiva o inhibitoria 50 (CL50/CE50/CI50), que es la concentración que produce la respuesta esperada sobre el 50% de los organismos expuestos.

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

5.4.1.1 Establecimiento de una relación dosis-respuesta de tipo mortalidad

La selección del método a utilizar para estimar los valores de CL50/CE50/CI50 de este tipo de pruebas de toxicidad aguda con múltiples concentraciones dependerá de la forma de la distribución de tolerancias, 1 y que tan bien las concentraciones o dosis seleccionadas la caracterizan (por ejemplo, el número de mortalidades parciales).

En general, se recomiendan los siguientes cuatro métodos para la estimación de CL50/CE50/CI50:

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

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

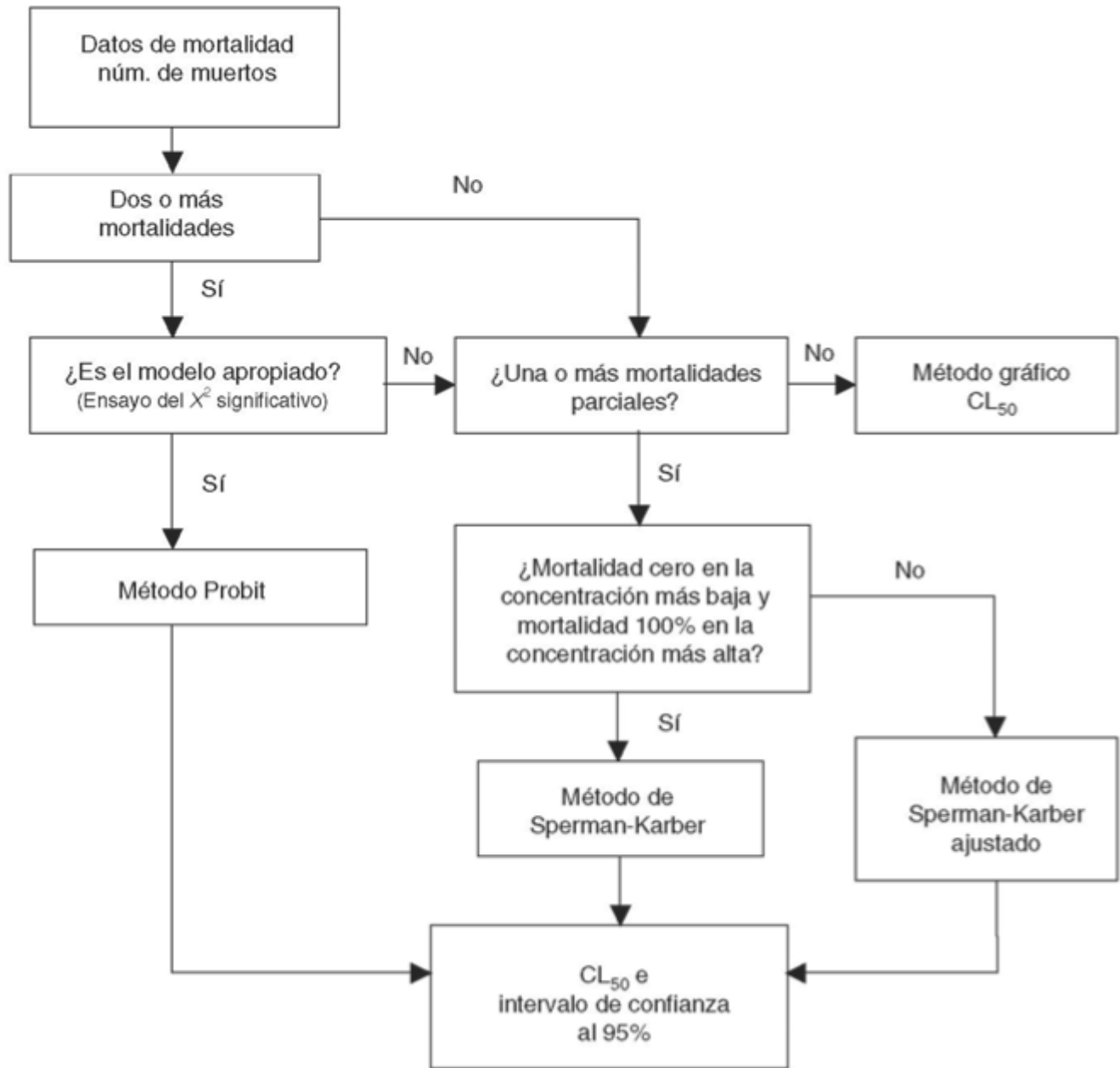


Figura 5.2. Determinación de CL50/CE50/CI50 para pruebas de toxicidad aguda con múltiples concentraciones.

3. Método de Spermán-Karber (no paramétrico).

4. Método gráfico.

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

5.4.1.1.1 Análisis de regresión y análisis Probit

Para el cálculo de los CL50/CE50/CI50 generalmente se usa el análisis Probit (con o sin ajuste). En un experimento típico de pruebas de toxicidad aguda se tiene la siguiente situación:

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

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

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

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

$$y = a + bx$$

Donde:

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

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

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

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

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

Para facilitar los cálculos, simplemente se puede usar un *software* como el suministrado por la *US Environmental Protection Agency* (US EPA): *Probit Analysis Program*, versión 1.5. En el anexo 5.2 se presenta un ejemplo para el cálculo de la CL50/CE50/CI50 por el método Probit. El procedimiento Probit permite encontrar estimadores m -verosímiles de parámetros de regresión y de tasas naturales (por ejemplo, tasas de

mortalidad) de respuesta para ensayos biológicos cuantales, analizando porcentajes de efecto vs. dosis dentro del marco de la regresión. Adicionalmente, hacen dos pruebas de bondad de ajuste: Pearson y Log-Likelihood Ratio. Estas pruebas son importantes, porque si los datos no se ajustan a la línea recta generada, es necesario llevar a cabo un análisis Probit ponderado o aplicar métodos no paramétricos o gráficos para poder determinar la CL50/CE50/CI50.

5.4.1.1.2 Método de Litchfield-Wilcoxon

Este método consiste en la construcción de una gráfica a partir de los datos obtenidos en pruebas de toxicidad aguda de un agente tóxico. Se utiliza papel *prob-log*, en el cual se colocan en el eje de las X el logaritmo (X) de las concentraciones usadas y en el eje de las Y el porcentaje de respuesta del efecto observado. En la literatura se presentan varios ejemplos de cálculo, como el que se puede observar en la norma sobre análisis estadísticos de CETESB (L50.17-1992).

Para el cálculo de la CL50/CE50/CI50 mediante este método, es necesario tener por lo menos, un porcentaje intermedio de efecto observado (valores entre 0 y 100% de efecto).

Elaboración de tabla y gráfico

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

Obtención de los porcentajes de efecto esperado

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

Introducción de los valores 0 y 100% de efecto observado

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

Determinación de la CL50/CE50/CI50

Mediante el uso de la recta trazada se obtiene en el eje logarítmico la concentración correspondiente al 50% del efecto observado sobre el eje probabilístico. La concentración así obtenida corresponde a la CL50/CE50/CI50.

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

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

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

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

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

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

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

$$(CL_{50}) (fCL_{50}) = \text{límite superior al 95\% de confianza}$$
$$\left(\frac{CL_{50}}{fCL_{50}} \right) = \text{límite inferior}$$

5.4.1.1.3 Método de Spearman-Kärber

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

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

Donde:

- X_k = dosis mínima a partir de la cual todas las reacciones son del 100%.
- d = distancia entre cada dos dosis.
- S_1 = suma de las fracciones de individuos que presentaron reacción.

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

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

Donde:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.4.1.1.4 Método gráfico

Además de los métodos anteriores, se puede utilizar el método gráfico para estimar la CL50/CE50/CI50. De forma similar, se parte de los datos obtenidos en las pruebas de toxicidad aguda, y utilizando papel logarítmico se grafican en el eje de las X las concentraciones (mg/L) y en el eje de las Y el porcentaje de mortalidad. Se colocan los puntos de los porcentajes de mortalidad observados (en escala lineal) en función de las concentraciones probadas (en escala logarítmica); se conectan los puntos obtenidos más cercanos al 50% del efecto observado, o sea, a la mayor concentración que no causa efecto tóxico y a la menor concentración que causa efecto tóxico. A partir de la recta trazada, se obtiene el punto de corte correspondiente al 50% del efecto observado. Este valor corresponde a la CL50/CE50/CI50 del estímulo o agente estudiado (Hubert, 1980

y 1995; Finney, 1978). Cuando no se logra hacer un ajuste adecuado de los datos, se pueden utilizar otros métodos para hacer las estimaciones de CL50/CE50/CI50.

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

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

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

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

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

REFERENCIAS

CETESB, 1992, L50.17, *Análise estatística de resultados de testes de Toxicidade Aguda*, Sao Paulo, Brasil.

Conover, W.J., 1980, *Practical Nonparametric Statistics*, 2nd ed., J. Wiley & Sons, New York.

Conover, W.J., 1980, *Practical Nonparametric Statistics*, 2nd ed., New York, Wiley.

Finney, D.L., 1978, *Statistical Method in Biological Assay*, 3rd ed., Charles Griffin & Company Ltd, London and High Wycombe.

Hubert, J., 1995, *Bioassay and its Relation to Agricultural and Environmental Issues*. Simposio Internacional de Estadística, Santa Marta.

Hubert, J., 1980, *Bioassay*, Kendall/Hunt Publishing Company, Toronto.

Martínez, R. y N. Martínez, 1995, *Diseño de experimentos*, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Montgomery, D.C., 1991, *Design and Analysis of Experiments*, 3rd ed., J. Wiley & Sons, New York.

Steel, R.G.D. y Torrie, J.H., 1985, *Bioestadística, principios y procedimientos*, 2a ed., Editorial McGraw Hill, Bogotá.

US Environmental Protection Agency, 1993, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*, 4th ed., EPA/600/4-90/027F, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati.

Zar, J.H., 1994, *Biostatistical Analysis*, 3rd ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

ANEXO 1

Ejemplo de cálculo simplificado del NOEC por prueba de hipótesis

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

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

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

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

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

Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk

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

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

Donde:

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

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

n = el total de las observaciones centradas.

Luego se computa el estadístico W según la siguiente expresión

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

Donde:

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

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

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

$$D = 106,3640$$

$$W = 0,9692$$

Los valores críticos para el estadístico W se presentan a continuación

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO 2

Ejemplo de cálculo simplificado de la CI50 por el método Probit

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

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

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

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

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

Concentración del tóxico (%)	Log10 de la concentración agente (X)	Núm. de organismos (N)	de Núm. muertos (r)	de Porcentaje mortalidad (P)	de Probit empirico (PE)	Probit calculado (Y)
100	2,0	20	15	75	5,67	5,53
50	1,7	20	9	45	4,87	4,96
25	1,4	20	5	25	4,33	4,40
12,5	1,1	20	2	10	3,72	3,84
6,25	0,8	20	1	5	3,36	3,27

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

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23

60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99a	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	9,09

a Valores entre 99,0 y 99,9.

A partir de estos datos se elabora una gráfica en papel cuadrulado, colocando en el eje x el logaritmo de las concentraciones y en el eje Y el Probit empírico (figura 5.3), y se ajusta la recta a través de estos puntos. En el gráfico se traza una línea a partir del Probit 5,0 hasta cortar la línea trazada; el valor correspondiente en el eje x se denomina m y el antilogaritmo de este valor corresponderá a la CE50 o CL50. En este ejemplo, $m = 1,72$, por tanto, CL50 = 52,5 miligramos por litro.

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

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

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

Si:

$$S = (X - x) / (PE - PE)$$

Siendo:

x_M = mayor concentración.

x_m = menor concentración.

PE = Probit empírico correspondiente a la mayor concentración.

PE = Probit empírico correspondiente a la menor concentración.

Para el ejemplo será:

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

$$S = 0,533$$

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

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

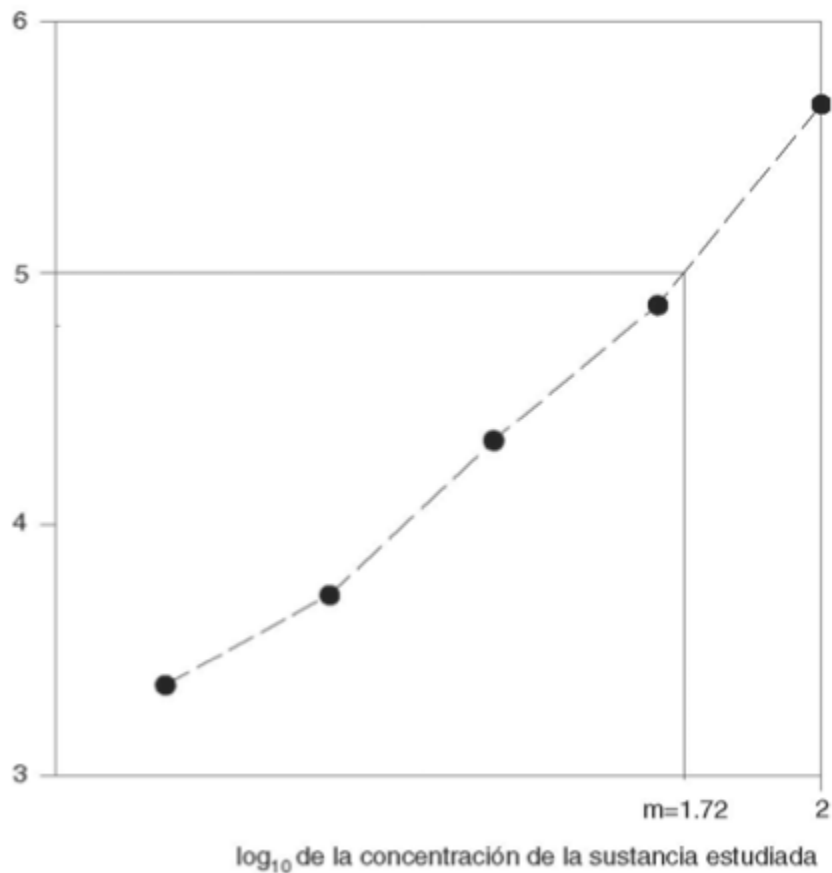


Figura 5.3. Representación gráfica del cálculo de la CL50.

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

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

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

$$\frac{(r - NP')^2}{NP' (1 - P')}$$

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

$$N = K - 2$$

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

$$n = 5 - 2$$

$$n = 3$$

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

$$7,82 > 0,482$$

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

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

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

Cálculo del intervalo de confianza

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

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

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

- Logaritmo decimal de las concentraciones (*x*).
- Número de organismos por concentración (*N*).
- Probit esperado o calculado (*Y*).
- Factor *p*, el cual se obtiene de la tabla 6.5. con el valor *Y*.
- Productos *Np*, *Npx* y *Npx²*, obtenidos de los datos de la misma tabla.
- Sumatoria de los productos correspondientes a los valores *SNp*, *SNpx* y *SNpx²*

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

<i>Y</i>	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
1	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	0,005	0,006	0,008	0,011
2	0,015	0,019	0,025	0,031	0,040	0,069	0,062	0,076	0,092	0,110

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

Tabla 5.9. Cálculo del error estándar del log10 CL50.

Log 10 de la concentración (x)	Núm. de organismos (N)	de Probit calculado (Y)	Factor (p)	Producto (Np)	Producto (Npx)	Producto (Npx2)
2,0	20	5,53	0,569	11,38	22,76	45,52
1,7	20	4,96	0,635	12,70	21,59	36,70
1,4	20	4,40	0,558	11,16	15,62	21,87
1,1	20	3,84	0,388	7,76	9,54	9,39
0,8	20	3,27	0,194	3,88	3,10	2,48
			(Σ)'	46,88	71,61	115,96

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

En el ejemplo:

$$\begin{aligned}
 S &= 0,533 \\
 x &= \Sigma Npx / \Sigma Np = 1,527 \\
 m &= 1,72 \\
 \Sigma Np &= 46,88 & \Sigma Npx &= 71,61 & \Sigma Npx^2 &= 115,96 \\
 \Sigma Np x - x^2 &= Npx^2 - \{(\Sigma Npx)^2 / \Sigma Np\} = 6,574
 \end{aligned}$$

Sustituyendo estos valores en la expresión:

Sustituyendo estos valores en la expresión:

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

Así, el EE de CL50 será:

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

Donde:

$$\log_e 10 = 2,3026$$

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

$$10^m = 52,5$$

Sustituyendo los valores en la expresión:

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

Como la:

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

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

Por tanto, la CL50 con los respectivos límites será:

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

ANEXO 3

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

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

ANEXO 4

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

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

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

<i>i</i>\n	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	0,4643	0,4590	0,4542	0,4493	0,4450	0,4407	0,4366	0,4328	0,4291	0,4254
2	0,3185	0,3156	0,3126	0,3098	0,3069	0,3043	0,3018	0,2992	0,2968	0,2944
3	0,2578	0,2571	0,2563	0,2554	0,2543	0,2533	0,2522	0,2510	0,2499	0,2487
4	0,2119	0,2131	0,2139	0,2145	0,2148	0,2151	0,2152	0,2151	0,2150	0,2148
5	0,1736	0,1764	0,1787	0,1807	0,1822	0,1836	0,1848	0,1857	0,1864	0,1870
6	0,1399	0,1443	0,1480	0,1512	0,1539	0,1563	0,1584	0,1601	0,1616	0,1630
7	0,1092	0,1150	0,1201	0,1245	0,1283	0,1316	0,1346	0,1372	0,1395	0,1415
8	0,0804	0,0878	0,0941	0,0997	0,1046	0,1089	0,1128	0,1162	0,1192	0,1219
9	0,0530	0,0618	0,0696	0,0764	0,0823	0,0876	0,0923	0,0965	0,1002	0,1036
10	0,0263	0,0368	0,0459	0,0539	0,0610	0,0672	0,0728	0,0779	0,0822	0,0862
11	0,0000	0,0122	0,0228	0,0321	0,0403	0,0476	0,0540	0,0598	0,0650	0,0697
12	-	-	0,0000	0,0107	0,0200	0,0284	0,0358	0,0424	0,0483	0,0537
13	-	-	-	-	0,0000	0,0094	0,0178	0,0253	0,0320	0,0381
14	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0084	0,0159	0,0227
15	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0076

<i>i</i>\n	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1	0,4220	0,4188	0,4156	0,4127	0,4096	0,4068	0,4040	0,4015	0,3989	0,3964

2	0,2921	0,2898	0,2876	0,2854	0,2834	0,2813	0,2794	0,2774	0,2755	0,2737
3	0,2475	0,2462	0,2451	0,2439	0,2427	0,2415	0,2403	0,2391	0,2380	0,2368
4	0,2145	0,2141	0,2137	0,2132	0,2127	0,2111	0,2116	0,2110	0,2104	0,2098
5	0,1874	0,1878	0,1880	0,1882	0,1883	0,1883	0,1883	0,1881	0,1880	0,1878
6	0,1641	0,1651	0,1660	0,1667	0,1673	0,1678	0,1683	0,1686	0,1689	0,1691
7	0,1433	0,1449	0,1463	0,1475	0,1487	0,1496	0,1505	0,1513	0,1520	0,1526
8	0,1243	0,1265	0,1294	0,1301	0,1317	0,1331	0,1344	0,1356	0,1366	0,1376
9	0,1066	0,1093	0,1118	0,1140	0,1160	0,1179	0,1196	0,1211	0,1225	0,1237
10	0,0899	0,0931	0,0961	0,0988	0,1013	0,1036	0,1056	0,1075	0,1092	0,1108
11	0,0739	0,0777	0,0812	0,0844	0,0873	0,0900	0,0924	0,0947	0,0967	0,0986
12	0,0585	0,0629	0,0669	0,0706	0,0739	0,0770	0,0798	0,0824	0,0848	0,0870
13	0,0435	0,0485	0,0530	0,0572	0,0610	0,0645	0,0677	0,0706	0,0733	0,0759
14	0,0289	0,0349	0,0395	0,0441	0,0484	0,0523	0,0559	0,0592	0,0622	0,0611
15	0,0144	0,0206	0,0262	0,0314	0,0361	0,0404	0,0444	0,0481	0,0515	0,0546
16	0,0000	0,0068	0,0131	0,0187	0,0239	0,0287	0,0331	0,0372	0,0409	0,0444
17	-	-	0,0000	0,0062	0,0119	0,0172	0,0220	0,0264	0,0305	0,0343
18	-	-	-	-	0,0000	0,0057	0,0110	0,0158	0,0203	0,0244
19	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0053	0,0101	0,0146
20	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0049

<i>i</i> \n	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
1	0,3940	0,3917	0,3894	0,3872	0,3850	0,3830	0,3808	0,3789	0,3770	0,3751
2	0,2719	0,2701	0,2684	0,2667	0,2651	0,2635	0,2620	0,2604	0,2589	0,2574
3	0,2357	0,2345	0,2334	0,2323	0,2313	0,2302	0,2291	0,2281	0,2271	0,2260
4	0,2091	0,2085	0,2078	0,2072	0,2065	0,2058	0,2052	0,2045	0,2038	0,2032
5	0,1876	0,1874	0,1871	0,1868	0,1865	0,1862	0,1859	0,1855	0,1851	0,1847
6	0,1693	0,1694	0,1695	0,1695	0,1695	0,1695	0,1695	0,1693	0,1692	0,1691
7	0,1531	0,1535	0,1539	0,1542	0,1545	0,1548	0,1550	0,1551	0,1553	0,1554
8	0,1384	0,1392	0,1398	0,1405	0,1410	0,1415	0,1420	0,1423	0,1427	0,1430
9	0,1249	0,1259	0,1269	0,1278	0,1286	0,1293	0,1300	0,1306	0,1312	0,1317
10	0,1123	0,1136	0,1149	0,1160	0,1170	0,1180	0,1189	0,1197	0,1205	0,1212
11	0,1004	0,1020	0,1035	0,1049	0,1062	0,1073	0,1085	0,1095	0,1105	0,1113
12	0,0891	0,0909	0,0927	0,0943	0,0959	0,0972	0,0986	0,0998	0,1010	0,1020
13	0,0782	0,0804	0,0824	0,0842	0,0860	0,0876	0,0892	0,0906	0,0919	0,0932
14	0,0677	0,0701	0,0724	0,0745	0,0765	0,0783	0,0801	0,0817	0,0832	0,0846
15	0,0575	0,0602	0,0628	0,0651	0,0673	0,0694	0,0713	0,0731	0,0748	0,0764
16	0,0476	0,0506	0,0534	0,0560	0,0584	0,0607	0,0628	0,648	0,0667	0,0685
17	0,0379	0,0411	0,0442	0,0471	0,0497	0,0522	0,0546	0,0568	0,0588	0,0608
18	0,0283	0,0318	0,0352	0,0383	0,0412	0,0439	0,0465	0,0489	0,0511	0,0532
19	0,0188	0,0227	0,0263	0,0296	0,0328	0,0357	0,0385	0,0411	0,0436	0,0459
20	0,0094	0,0136	0,0175	0,0211	0,0245	0,0277	0,0307	0,0335	0,0361	0,0386
21	0,0000	0,0045	0,0087	0,0126	0,0163	0,0197	0,0229	0,0259	0,0288	0,0314

22	-	-	0,0000	0,0042	0,0081	0,0118	0,0153	0,0185	0,0215	0,0244
23	-	-	-	-	0,0000	0,0039	0,0076	0,0111	0,0143	0,0174
24	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0037	0,0071	0,0104
25	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0035

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

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

38	0,916	0,925	0,938	0,947	0,971	0,984	0,987	0,989	0,990
39	0,917	0,927	0,939	0,948	0,971	0,984	0,987	0,989	0,991
40	0,919	0,928	0,940	0,949	0,972	0,985	0,987	0,989	0,991
41	0,920	0,929	0,941	0,950	0,972	0,985	0,997	0,989	0,991
42	0,922	0,930	0,942	0,951	0,972	0,985	0,987	0,989	0,991
43	0,923	0,932	0,943	0,951	0,973	0,985	0,987	0,990	0,991
44	0,924	0,933	0,944	0,952	0,973	0,985	0,987	0,990	0,991
45	0,926	0,934	0,945	0,953	0,973	0,985	0,988	0,990	0,991
46	0,927	0,936	0,945	0,953	0,974	0,985	0,988	0,990	0,991
47	0,928	0,936	0,946	0,954	0,974	0,985	0,988	0,990	0,991
48	0,929	0,937	0,947	0,954	0,974	0,985	0,988	0,990	0,991
49	0,929	0,937	0,947	0,955	0,974	0,986	0,988	0,990	0,991
50	0,930	0,933	0,947	0,955	0,974	0,985	0,988	0,990	0,991