



NORMA MEXICANA

NMX-AA-087-SCFI-2010

**ANÁLISIS DE AGUA - EVALUACIÓN DE TOXICIDAD
AGUDA CON *Daphnia magna*, Straus (Crustacea -
Cladocera) - MÉTODO DE PRUEBA
(CANCELA A LA NMX-AA-087-SCFI -1995).**

**WATER ANALYSIS-ACUTE TOXICITY EVALUATION WITH
Daphnia magna, Straus (Crustacea - Cladocera)
TEST METHOD**



NMX-AA-087-SCFI-2010

PREFACIO

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

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



NMX-AA-087-SCFI-2010

- INSTITUTO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE TAMAULIPAS, A.C.
Centro de Investigación y Tecnología en Saneamiento Ambiental (CITSA)
- INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO
- INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
- LABORATORIO DE CALIDAD QUÍMICA VERACRUZANA, S.C.
- LABORATORIO DE QUÍMICA DEL MEDIO E INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO DE SERVICIOS CLÍNICOS Y ANÁLISIS TOXICOLÓGICOS S.A. DE C.V.
- LABORATORIO FERMI, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO IDECA, S.A. DE C.V.
- LABORATORIO SERVICIOS AMBIENTALES
- LABORATORIOS ABC QUÍMICA, INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS, S.A. DE C.V.
- MERCURY LAB, S.A. DE C.V.
- MÓNICA OROZCO MÁRQUEZ
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO CANGREJERA
- PEMEX PETROQUÍMICA COMPLEJO PETROQUÍMICO MORELOS
- PERKIN ELMER DE MEXICO, S.A.
- PROTECCIÓN AMBIENTAL Y ECOLOGÍA, S.A. DE C.V.



NMX-AA-087-SCFI-2010

- PROYECTOS Y ESTUDIOS SOBRE CONTAMINACIÓN INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.
- SERVICIOS DE AGUA Y DRENAJE DE MONTERREY, I.P.D.
Laboratorio Central de Calidad de Aguas
- SISTEMA DE AGUAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO DEL GOBIERNO DEL DISTRITO FEDERAL
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA,
UNIDAD IZTAPALAPA
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
Ciencia y Tecnología Ambiental,
Depto. Biotecnología
UNIDAD AZCAPOTZALCO
Depto. de Ciencias Básicas,
Área de Química
- UNIVERSIDAD DEL NORESTE, A.C.
UNELAB - Centro multidisciplinario de servicios ambientales y de alimentos
- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Química
Instituto de Biología
Instituto de Ingeniería



ÍNDICE DEL CONTENIDO

Número de Capítulo		Página
1	OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN	1
2	PRINCIPIO	1
3	REFERENCIAS	2
4	DEFINICIONES	2
5	EQUIPO Y MATERIAL	7
6	REACTIVOS (grado analítico)	9
7	MUESTREO	9
8	PROCEDIMIENTO	11
9	EXPRESION DE RESULTADOS	23
10	INFORME DE LA PRUEBA	23
	APÉNDICE NORMATIVO A	26
	APÉNDICE NORMATIVO B	29
	APÉNDICE NORMATIVO C	34
11	VIGENCIA	35
12	BIBLIOGRAFIA	38
13	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES	38
	APÉNDICE INFORMATIVO D	39



NORMA MEXICANA

NMX-AA-087-SCFI-2010

ANÁLISIS DE AGUA - EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA CON *Daphnia magna*, Straus (Crustacea - Cladocera) - MÉTODO DE PRUEBA (CANCELA A LA NMX-AA-087-SCFI -1995).

WATER ANALYSIS-ACUTE TOXICITY EVALUATION WITH *Daphnia magna*, Straus (Crustacea - Cladocera) TEST METHOD

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

La presente norma mexicana establece el método para la medición de toxicidad aguda, utilizando al organismo dulceacuícola *Daphnia magna*, Straus 1820 (Crustacea - Cladocera).

Este método es aplicable para la evaluación de toxicidad aguda en aguas y en sustancias solubles en agua. En cuerpos de agua dulce, aguas residuales industriales y municipales, efluentes agrícolas y sustancias puras o combinadas disolubles o lixiviados y la fracción solubilizable en suelos y sedimentos. Es de aplicación nacional.

2 PRINCIPIO

Este método se basa en la medición de la toxicidad aguda, mediante la definición de la concentración efectiva media (CE_{50}), donde la respuesta que se evalúa es la ausencia de movilidad o muerte, bajo condiciones de exposición controlada del crustáceo del Orden Cladocera *D. magna*, durante 48 h.



3 REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de la presente norma mexicana, se deben consultar las siguientes normas mexicanas, o su versión vigente:

NMX-AA-044-SCFI-2001	Determinación de cromo hexavalente en aguas residuales, naturales y superficiales. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 1 de agosto de 2001.
NMX-152-IMNC-2005	Metrología en Química. Vocabulario. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 13 de Diciembre de 2005.

4 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta norma mexicana se establecen las siguientes definiciones:

4.1 Aclimatación:

Adaptación fisiológica del organismo de prueba a las condiciones ambientales de control de laboratorio.

4.2 Agua desionizada:

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

4.3 Agua dura reconstituida o de dilución:

Es agua desionizada a la que se le adicionan sales inorgánicas para obtener agua dulce sintética libre de contaminantes y con características deseables de pH y dureza para el organismo de prueba. Con ella se preparan las distintas diluciones o concentraciones de pruebas exploratorias o definitivas. Así como los sistemas de control positivo y negativo.



4.4 Agua intersticial:

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

4.5 Cladóceras:

Suborden de crustáceos branquiópodos, al que pertenecen las comúnmente llamadas "pulgas de agua". Tienen el cuerpo cubierto por un caparazón dispuesto en dos valvas que cubren el tronco y los apéndices.

4.6 Concentración efectiva media (CE₅₀):

Es la concentración de sustancias puras, combinadas, cuerpos receptores, efluentes, lixiviados y la fracción soluble de los de suelos y sedimentos que afecta al 50 por ciento de la población expuesta, por un periodo de exposición de 48 h. En esta norma, el efecto medido es la inmovilidad o muerte de los organismos.

4.7 Dáfnidos:

Es el nombre en castellano que reciben los organismos del género *Daphnia* conocidos como "pulga de agua".

4.8 *Daphnia magna*:

Es un crustáceo del Suborden Cladocera de 1mm a 1,5 mm de longitud los neonatos, y de 4 mm a 6 mm los adultos (ambos, visibles a simple vista). Es un representante importante de las comunidades dulceacuícolas con gran sensibilidad a una amplia gama de compuestos tóxicos, siendo ésta una de las características principales para que sea usado internacionalmente en pruebas de toxicidad. Asimismo, su ciclo de vida corto y fácil cultivo en laboratorio, permite realizar pruebas rápidas y económicas (Véase figura 1).

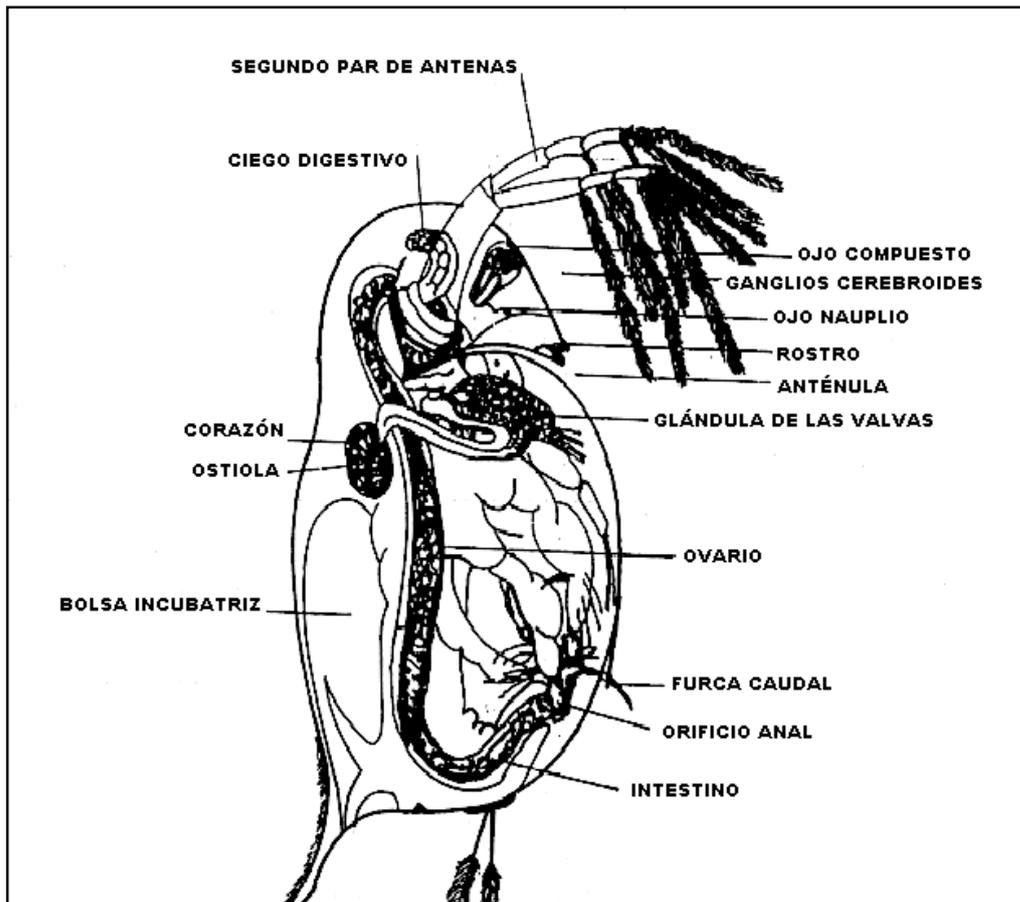


FIGURA 1. Morfología general de *Daphnia magna*

4.9 Dureza:

Es la medida de la concentración de iones de calcio y magnesio en agua, expresada en mg/L de carbonato de calcio o equivalente.

4.10 Efecto agudo:

Es un efecto adverso que se induce en los organismos por exposición a un material de prueba, durante un periodo menor o igual a 48 h. Para fines de este método de prueba, el efecto agudo estará referido a la inmovilidad o muerte.



4.11 Efecto crónico:

Es la respuesta a un estímulo que se produce durante una gran parte del ciclo de vida del organismo expuesto, generalmente se manifiesta en su crecimiento y reproducción para el caso de los dáfidos.

4.12 Elutriado:

Disolución acuosa obtenida por la adición de agua a una sustancia sólida (sedimento y/o suelo), la cual se agita por un tiempo determinado. Posteriormente la mezcla obtenida se centrifuga, se filtra o se decanta el sobrenadante para obtener la fase líquida.

4.13 Extracto:

Disolución obtenida por un proceso químico entre un solvente(s) y una sustancia sólida (sedimento y/o suelo) para obtener los compuestos presentes en la muestra sólida.

4.14 Fotoperiodo:

Es la duración de los periodos de iluminación y oscuridad en un lapso de 24 h.

4.15 Inmovilidad:

Ausencia de movimiento absoluto de cualquier parte del cuerpo de los dáfidos o muerte después de estimularlos indirectamente por movimiento o iluminación con luz blanca. Es recomendable no manipular a los organismos con pipetas, pinzas o cualquier objeto en la revisión de las 24 h, cuando así corresponda.

4.16 Lixiviado:

Es el líquido producido por la percolación del agua a través de cualquier material permeable, desechos sólidos o columna de suelo y que contiene sólidos disueltos o en suspensión, componentes que se adicionan por arrastre o reacción.



4.17 Neonatos:

Son los dáfidos de edad menor a 24 h que son utilizados en pruebas de toxicidad.

4.18 Prueba de toxicidad (bioensayos de toxicidad):

Es la exposición controlada de organismos a sustancias puras, combinadas y aguas provenientes de cuerpos de agua, para evaluar su efecto. Una prueba de toxicidad, usualmente mide la proporción de organismos afectados por su exposición a concentraciones específicas de dichas sustancias y aguas.

4.19 Tiempo de exposición:

Es el período al que se someten los organismos de prueba a las disoluciones de sustancias puras, combinadas o muestras de agua residual o cuerpos de agua en un bioensayo de toxicidad.

4.20 Toxicidad:

Potencial inherente o capacidad de una sustancia para causar efectos adversos en organismos vivos.

4.21 Toxicidad aguda:

Es el efecto que se manifiesta en los organismos de prueba, luego de exponerlos a las muestras problema por una sola vez, durante un período de 48 h.

4.22 Tóxico:

Es cualquier sustancia (pura o combinada) o efluente, que al entrar en contacto con los organismos produce daños estructurales, alteraciones bioquímicas o fisiológicas o incluso la muerte. La intensidad de su efecto depende de la concentración y del tiempo de exposición.

4.23 Tóxico de referencia:

Sustancia químicamente pura, utilizada en ensayos de toxicidad y cuyo efecto a una serie de dosis predeterminadas es conocida. Este es empleado como testigo en el control de la sensibilidad de los organismos de prueba, lo que permite respaldar las mediciones de toxicidad efectuada a muestras. La determinación regular de la toxicidad de dicha sustancia de referencia, permite dar seguimiento a la estabilidad de la respuesta de los organismos de prueba.

4.24 Toxicología acuática:

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

4.25 Unidades de toxicidad:

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

5 EQUIPO Y MATERIAL

5.1 Equipo

- Agitador magnético;
- Autoclave;
- Balanza analítica;
- Conductivímetro;
- Controlador de fotoperiodo (temporizador o Timer);
- Luxómetro;
- Oxímetro;
- Potenciómetro;
- Refrigerador (de 0 °C a 4 °C);
- Termómetros (entre el rango de -50 °C a 50 °C), y
- Mecheros.

5.1.1 Equipo complementario

- Centrífuga;
- Congelador, y
- Microscopios de campo claro o estereoscópico.

5.2 Material

- Cámara de Neubauer;
- Cajas Petri;
- Cubre boca;
- Frascos ámbar con tapón de plástico;
- Vasos de precipitado 100 mL, 500 mL y 1000 mL;
- Bidón de plástico de 20 L;
- Guantes de látex desechables;
- Matraces Erlenmeyer de 1000 mL;
- Matraces volumétricos de diferentes capacidades;
- Pipetas graduadas de 1 mL, 5 mL y 10 mL;
- Pipetas Pasteur de vidrio;
- Pipetas Pasteur con bulbo desechables;
- Pipetas volumétricas de diferentes capacidades;
- Micropipetas automáticas de 1 μ L a 1000 μ L de capacidad (volumen fijo o ajustable);
- Probetas graduadas de 50 mL y 100 mL;
- Propipetas;
- Recipientes de polietileno, polipropileno o de vidrio borosilicato de 2 L, y
- Recipientes de vidrio o plástico no tóxico con capacidad mínima de 40 mL.

6 REACTIVOS (GRADO ANALÍTICO)

- Acido bórico (H_3BO_3);
- Acido etilen diamino tetra-acético (EDTA);
- Acido nítrico (HNO_3);
- Acido sulfúrico concentrado (H_2SO_4);
- Acetona (C_3H_6O);
- Agua desionizada;
- Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$);
- Cloruro de calcio di hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$);
- Cloruro de manganeso tetra hidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$);
- Cloruro de potasio (KCl);
- Cloruro de sodio (NaCl);
- Detergente libre de fosfatos;
- Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) Reactivo utilizado como tóxico de referencia. Debe tener una pureza mínima del 99.95 %;
- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4);
- Fosfato di básico de potasio (K_2HPO_4);
- Hidróxido de potasio (KOH);
- Nitrato de cobalto hexa hidratado [$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$];
- Nitrato de sodio ($NaNO_3$);
- Oxido de molibdeno (MoO_3);
- Selenito de sodio (Na_2SeO_3);
- Sulfato de cobre penta hidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$);
- Sulfato ferroso hepta hidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$);
- Sulfato de magnesio hepta hidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), y
- Sulfato de zinc hepta hidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$).

7 MUESTREO

Las muestras de agua se colectan y almacenan en recipientes nuevos y limpios de vidrio ámbar o polipropileno, de boca angosta de capacidad mínima de 500 mL. Deben ser llenados totalmente y cerrados perfectamente. Los envases no deben volver a utilizarse para muestras de toxicidad. Los recipientes deberán tener tapa de teflón, polipropileno de alta densidad o baquelita, en caso



contrario puede emplearse un cuadro de papel aluminio colocado en la boca y cuerda del frasco para evitar el contacto con los plásticos de la tapa.

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

Para muestras sólidas, a partir de las cuales se obtienen extractos, lixiviados o agua intersticial, se sugiere emplear recipientes de vidrio nuevos y limpios, de boca ancha con capacidad mínima de 500 mL, ámbar o claro cubierto con papel aluminio, tapa de baquelita o plástica con contratapa de teflón, de no ser posible el empleo de esta última, sustituir por un cuadro de papel aluminio colocado en la boca y cuerda del frasco antes de cerrar. El llenado del frasco debe ser al 75 % de su capacidad, eliminando en lo posible el excedente de líquido.

Las muestras deben mantenerse cerradas y a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis, sin la adición de preservadores químicos.

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

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

Si se obtienen extractos de sedimentos con disolventes, su análisis debe efectuarse antes de seis semanas.

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

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

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

7.1 Muestreo en cuerpos de agua

El muestreo en corrientes, lagos, lagunas, presas y otros cuerpos de agua debe llevarse a cabo tomando una muestra instantánea o simple del volumen requerido, siguiendo los lineamientos descritos en las normas oficiales mexicanas aplicables al muestreo y las consideraciones relacionadas en el capítulo 7 del presente documento.

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

8 PROCEDIMIENTO

8.1 Antes de iniciar el análisis, las muestras líquidas deben retirarse de la refrigeración para que alcancen la temperatura ambiente; posteriormente, agitar para lograr la homogeneización sin abrir el recipiente.

8.2 Sólo deben utilizarse neonatos de la 3ª generación en adelante, provenientes de hembras grávidas. Se debe evitar el uso de neonatos de hembras de más de 40 días de vida.

8.3 Para garantizar que los organismos de prueba se encuentran en condiciones óptimas y asegurar la calidad de los resultados que se obtengan de la aplicación de este método, es indispensable realizar actividades previas en el laboratorio para estar en condiciones de iniciar en tiempo y forma (véase Apéndice Normativo A).

8.4 Agua dura de dilución

8.4.1 Uso de agua dura



El uso del agua reconstituida es necesario porque:

- Es de composición química conocida.
- Permite resultados reproducibles.
- Permite crecimiento y reproducción adecuada.

Para cultivos de *D. magna* se utiliza agua reconstituida cuya dureza sea de 250 mg/L \pm 25 mg/L y el pH de 8,0 \pm 0,2. Su preparación debe efectuarse al menos, con 24 h de anticipación, cuidando que se efectúe tal y como se indica en el punto siguiente, ya que de ello depende en gran parte tanto el cultivo óptimo de los organismos como la culminación exitosa de la prueba.

8.4.2 Preparación de soluciones stock

8.4.2.1 Disolución de cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Disolver 11,76 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L.

8.4.2.2 Disolución de sulfato de magnesio pentahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Disolver 4,93 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L.

8.4.2.3 Disolución de bicarbonato de sodio (NaHCO_3).

Disolver 2,59 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L.

8.4.2.4 Disolución de cloruro de potasio (KCl).

Disolver 0,23 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L.

Por cada litro de agua dura que se quiera elaborar, mezclar 25 mL de cada una de las soluciones stock, en orden de 8.4.2.1 a 8.4.2.4 y aforar a 1 L con agua desionizada.

El agua dura una vez elaborada se mantiene en aireación hasta que se alcanza la saturación del oxígeno disuelto. Después, conservarse a temperatura ambiente o en refrigeración, cuidando que para el momento de las pruebas se encuentre a 20 °C \pm 2 °C.



8.4.3 Adición de selenito de sodio (Na_2SeO_4)

El suministro del selenito de sodio como nutriente, puede emplearse en caso de observarse deficiencias del desarrollo en el cultivo. Este nutriente, es de uso exclusivo para lotes reproductores. Cuidar que el agua dura para hacer las diluciones en las pruebas no contenga selenito.

La disolución stock de selenito de sodio se prepara pesando 0,001 g del compuesto y se aforan a 100 mL con agua destilada. Se guarda en un envase de vidrio ámbar y en refrigeración a $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$. Por cada litro de agua dura se agregarán 0,2 mL de la disolución stock.

Para detectar la calidad óptima del agua reconstituida, se deben colocar durante 24 h, 10 neonatos en una muestra de 30 mL. Si al término del tiempo no se registra mortandad, el agua puede ser utilizada en el cultivo y en las pruebas.

8.5 Prueba con el tóxico de referencia

El tóxico de referencia utilizado en esta norma mexicana es el dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), que se prepara pesando 50 mg de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ aforados a 100 mL con agua desionizada. Una vez preparada esta disolución madre, deberá valorarse el contenido de cromo hexavalente para determinar la concentración real del tóxico de referencia, de acuerdo al método NMX-AA-044-SCFI-2001 (véase 3 Referencias). Esta disolución debe conservarse en oscuridad y refrigeración a $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ hasta por doce meses.

A partir de esta disolución madre, se elabora tanto la serie de concentraciones o diluciones necesarias para el cálculo de la CE_{50} del tóxico de referencia para un tiempo de exposición de 48 h (véase 8.6.2 y 8.6.2.1.), así como la concentración de la dilución que se empleará como control positivo.

El ámbito de respuesta aceptable de la CE_{50} para el dicromato de potasio a las 48 h será de 0,6 mg/L a 2,1 mg/L, lo cual es equivalente a 0,21 mg/L y 0,74 mg/L como cromo VI, respectivamente.

El dicromato de potasio empleado como tóxico de referencia en esta norma no podrá ser sustituido por otro, a menos que el empleo de alguna otra sustancia esté respaldado por ejercicios inter laboratorios, o comparaciones periódicas,



respecto al tóxico especificado en esta norma. En cualquier caso, los reactivos deberán tener una pureza mínima del 99,95 %.

8.6 Desarrollo de pruebas

8.6.1 Separación de organismos de prueba

Los neonatos utilizados para pruebas deberán tener menos de 24 h de nacidos. Veinticuatro horas antes de iniciar la prueba en los lotes reproductores deben mantenerse únicamente las hembras. Previo al montaje de los bioensayos son separados los nuevos neonatos, juntándolos en un recipiente limpio. Para ello se sugiere emplear pipetas despuntadas o cualquier otro medio que permita su trasvase por medio de succión. Posteriormente colocar 10 neonatos en cada uno de los recipientes de prueba que contendrán a las diversas diluciones de exposición.

Si el análisis no va a ser efectuado inmediatamente, mantener la muestra de acuerdo al capítulo 7 de esta norma mexicana hasta que sea procesada. Cuando las muestras de sedimentos lleguen congeladas al laboratorio, debe descongelarse a temperatura ambiente.

Las muestras para análisis, deben ser evaluadas a partir de una prueba exploratoria y posteriormente, si es necesario, efectuar una definitiva.

Cuando la muestra contenga más de una tercera parte de sólidos o lodos suspendidos que interfieran con la visibilidad de los organismos en los recipientes de prueba, es recomendable mantener la muestra en reposo hasta que se asiente la mayor parte de los sólidos y tomar para el análisis sólo la fase del sobrenadante. Si posteriormente es necesario evaluar los sólidos, esto se hará mediante tratamientos especiales como la extracción, aireación u otros, tomando en cuenta lo señalado en el capítulo 7, párrafo 8, respecto al pretratamiento.

8.6.2 Prueba exploratoria

La prueba exploratoria es de utilidad tanto para discriminar entre muestras tóxicas de inocuas, así como para determinar si el intervalo de concentraciones o diluciones que se deben aplicar para la determinación de la CE_{50} de una muestra en una prueba definitiva.



Para el análisis discriminatorio, la muestra sólo se analiza al 100 %. Si se observa mortandad en ella de al menos un 20 % a las 48 h de exposición, deberán prepararse diluciones de la muestra. Se sugiere considerar por lo menos 5 concentraciones o diluciones, tomando una escala logarítmica como son al 100 %, 10 % y 1 % etc. o empleando cualquier otro factor de dilución. En esta prueba, hay que considerar el análisis de los controles positivo y negativo (véase 8.8.2 y 8.8.3).

A las 24 h es necesario hacer una revisión de los recipientes de modo que si se observa el 100 % de mortandad en ellos pueda suspenderse y reiniciarse a una concentración menor. Al término de las 48 h se toman las lecturas finales para definir las nuevas concentraciones que se aplicarán (véase 8.6.2.1) para la prueba definitiva (véase 8.6.3). Se recomienda excluir de dicha selección las concentraciones en que se observen valores de 100 % y 0 % de efecto.

En ocasiones, la CE_{50} puede calcularse a partir de los resultados a las 48 h de la prueba exploratoria. En estos casos los resultados pueden considerarse válidos como prueba definitiva.

El diseño de la prueba exploratoria se presenta en la tabla 1.

TABLA 1.- Condiciones de la prueba con *D. magna*.

	CONDICIÓN
Tipo de prueba	Estática sin renovación de la disolución de prueba
Duración	24 h y 48 h para la prueba exploratoria y 48 h para la prueba definitiva
Calidad de luz	Fluorescente, blanca y fría
Luminosidad	600 lx - 1000 lx
Fotoperiodo	16 h luz / 8 h oscuridad*
Volumen de los recipientes de prueba	40 mL como mínimo
Edad de los organismos	Menos de 24 h de nacidos
Número de réplicas por dilución	2 para la prueba exploratoria y 3 para la prueba definitiva
Número de réplicas en el control positivo	3
Número de réplicas en el control negativo	3
Número de organismos por recipiente	La densidad de neonatos en los recipientes de prueba no debe ser mayor de 1 por cada 2 mL.
Aireación de los recipientes de prueba	No
Agua de dilución	Reconstituida dura de 250 mg/L \pm 25 mg/L
Temperatura	20 °C \pm 2 °C
Alimentación	No
Volumen total (agua reconstituida más muestra)	Mínimo 30 mL
Respuesta evaluada	Inmovilidad a 48 h
Control Negativo	Sobrevivencia \geq 90 %
Control Positivo	Con una concentración de dicromato de potasio cercana a la CE ₅₀ y con un efecto del 33% al 57% de inmovilidad o mortandad, leído a las 48 h de exposición.

* Si se conoce la presencia de compuestos foto degradables, incubar las pruebas preferentemente en oscuridad.

8.6.2.1 Determinación del intervalo de concentraciones

Una vez registradas las observaciones obtenidas en la prueba exploratoria, se determina el intervalo de concentraciones que debe ser usado en la prueba definitiva. Ver los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Suponer que al final de la prueba exploratoria, se obtienen las siguientes mortandades:

TABLA 2.- Relación hipotética de concentración y % de mortandad

Concentración (%)	No. de organismos expuestos (A)	No. de organismos muertos (B)	Mortandad (%)
1,00	30	0	0,00
10,00	30	3	10,00
50,00	30	9	30,00
100,00	30	21	70,00

$$\% \text{ Mortandad} = \frac{A}{B} \times 100$$

Donde:

A es el número de organismos expuestos por concentración.

B es el número de organismos muertos por concentración.

En este caso, teóricamente la CE_{50} a las 48 h está entre la concentración al 50 % y al 100 %, por lo cual es factible seleccionar para la prueba definitiva las concentraciones entre 50 % y 100 %. Sin embargo, aquí es importante considerar lo siguiente:

El estado que presentan los organismos al final de la prueba exploratoria en la concentración al 50 %. Esto es, si los organismos, a diferencia de los testigos (los cuales, en condiciones normales tienden a moverse activamente por toda la columna de agua) mueven muy lentamente su segundo par de antenas y además permanecen en el fondo o en la superficie, seguramente a las 48 h van a estar completamente inmóviles.

En este caso, es erróneo seleccionar para la prueba definitiva, el 50 % como la concentración mínima, ya que es más adecuado utilizar valores todavía menores. Por ejemplo 40 % y 30 %.

Ejemplo 2:

Suponer ahora, que al final de la prueba exploratoria se obtienen los siguientes valores de mortandad:

TABLA 3.- Relación hipotética de concentración / % de mortandad

Concentración (%)	Mortandad (%)
1,00	0,00
10,00	80,00
50,00	100,00
100,00	100,00

En este caso, como se puede apreciar se tiene un efluente extremadamente tóxico ya que 10 % del mismo ocasiona una mortandad del 80 % en los organismos expuestos.

En este sentido y al igual que en el ejemplo 1 de este apartado, teóricamente se tiene que seleccionar para la prueba definitiva a 1 % y 10 % como las concentraciones mínima y máxima, respectivamente (ya que la finalidad de la prueba es obtener la CE_{50} , la cual está definida como la concentración en este caso de un efluente, que origina un efecto letal en el 50% de los organismos expuestos). Sin embargo y para el caso de este ejemplo, si los organismos en la concentración al 1 % presentan un movimiento similar al de los testigos, es adecuado considerar a este como el valor mínimo durante la prueba definitiva, en caso contrario dos concentraciones menores a esta (tal vez 0,5 % y 0,25 %) pueden ser utilizadas en la prueba definitiva.

Del mismo modo, se tiene que observar detenidamente a los organismos que quedan vivos en la concentración al 10 %, ya que si se encuentran muy afectados esto es, en el fondo y con movimientos apenas perceptibles, es adecuado que en la prueba definitiva se consideren concentraciones todavía menores a esta (por ejemplo 5 % y 2,5 %).

Ejemplo 3:

Suponer que al final de la prueba exploratoria no se observa mortandad en ninguna de las concentraciones como se muestra en la Tabla 4.

TABLA 4.- Relación hipotética de concentración / % de mortandad

Concentración (%)	Mortandad (%)
1,00	0,00
10,00	0,00
50,00	0,00
100,00	0,00

En este ejemplo, el efluente presenta un efecto agudo no detectado después de 24 h de exposición de los organismos de prueba. Por lo que tendrá que esperar la lectura de las 48 h.

En caso de que los organismos a pesar de no estar inmóviles, si presentan cierto grado de afectación (el cual, para fácil identificación debe ser comparado con los testigos) en cualquier concentración, excepto en la muestra al 100 %, debe observarse en cuál de ellas se evidencia la afectación y a partir de esa, considerar el valor máximo que debe ser preparado para la prueba definitiva.

8.6.3 Prueba definitiva

En el caso de la prueba definitiva, se requiere un mínimo de 5 diluciones. Estas se elaboran considerando un factor de dilución de 0,5 o cualquiera otro de utilidad, además de los controles positivo y negativo

El conteo de inmovilidad o mortandad para el cálculo de la CE_{50} , debe efectuarse a las 48 h.

8.7 Medidas de seguridad

El material desechable de uso en pruebas de toxicidad no debe ser reutilizado en nuevos análisis.



Para la preparación de las diferentes disoluciones, debe contarse con medidas de seguridad para evitar entrar en contacto directo con las muestras de aguas residuales. Se recomienda utilizar pro pipetas, guantes de látex desechables y cubre bocas.

Al finalizar la prueba exploratoria, deben efectuarse observaciones a los organismos que continúan vivos para determinar de acuerdo al estado de afectación, si es adecuado o no modificar el intervalo seleccionado para la prueba definitiva.

Es importante señalar, que los organismos sobrevivientes que fueron utilizados en pruebas, no deberán reutilizarse ni para nuevas pruebas ni para establecer nuevos cultivos.

8.8 Control de calidad analítico

El control de calidad analítico del método de prueba con *Daphnia magna* se evalúa mediante la determinación de la CE_{50} de un tóxico de referencia y del empleo de controles positivos y negativos. El método y las condiciones de prueba deben ser los descritos en la presente norma mexicana.

El laboratorio deberá efectuar el análisis del tóxico de referencia, dependiendo del número de análisis y su periodicidad, cada vez que se inicia un nuevo lote de reproductoras o de forma periódica, con el fin de verificar la sensibilidad de los organismos respecto a los valores de CE_{50} de la carta control y de sus límites de confianza.

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

8.8.1 Concentración Efectiva media (CE_{50}) del tóxico de referencia

El tóxico de referencia debe ser el dicromato de potasio. Este valor, a las 48 h debe encontrarse en el ámbito de 0,6 mg/L a 2,1 mg/L, que es equivalente a 0,21 mg/L y 0,74 mg/L como Cromo VI, respectivamente.



8.8.2 Control positivo

Provee evidencia de que los organismos de prueba cuentan con la sensibilidad necesaria. El control positivo es una disolución de dicromato de potasio, cuya concentración corresponderá al valor promedio de la CE_{50} histórica que caracteriza la respuesta de los cladóceros al tóxico y que es esquematizada en la carta control. En general, una concentración equivalente al valor de la CE_{50} histórica obtenida por el laboratorio de análisis y empleada en el control positivo, debe generar un efecto de inmovilidad de entre el 33 % al 57 % de la población expuesta; ámbito de respuesta que se aplicará como guía para el control de calidad analítico del método de prueba.

8.8.3 Control negativo

El agua reconstituida con dureza de $250 \text{ mg/L} \pm 25 \text{ mg/L}$, es la disolución empleada como control negativo, no deberá adicionarse disolución de selenito de sodio.

Este control es de utilidad para dar seguimiento del estado óptimo de salud de los organismos de prueba, por lo que en él la mortandad no deberá exceder del 10 %.

8.8.4 Pruebas replicadas

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

El resultado de la prueba de significancia es empleado para poder evidenciar la precisión del análisis y respaldar la confianza analítica de la medición, por lo que la aceptación de los resultados estará sujeta también a que las diferencias numéricas de los análisis replicados de la muestra seleccionada, sean no significativas.

8.8.4.1 Análisis de significancia estadística en pruebas replicadas

La prueba de significancia estadística para el análisis de las diferencias de la CE_{50} de los análisis replicados puede ser efectuada de la siguiente manera:

8.8.4.1.1 Cálculo de factores:

Réplica1	Réplica 2
$F_1 = \frac{CE_{50\ 1}}{\text{Min IC}_1}$	$F_2 = \frac{CE_{50\ 2}}{\text{Min IC}_2}$

Donde:

F es el factor para establecer los límites, con un 95% de confianza, del valor de CE_{50}

CE_{50} . es definido como CE_{50} en el reporte impreso de la prueba

Min IC es el límite inferior del intervalo de confianza

8.8.4.1.2 Relación de factores:

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

8.8.4.1.3 Relación entre los valores de CE_{50} de las réplicas de acuerdo a:

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

8.8.4.1.4 Significancia:

A partir de los cálculos anteriores, si la resultante de $CE_{50\ \max.} / CE_{50\ \min}$ excede el valor obtenido para $F_{1,2,3}$, entonces las diferencias entre las CE_{50} de las muestras replicadas, es **significativa**, mientras que en el caso de ser menor o igual, la diferencia será **no significativa**.

8.8.5 Interpretación de resultados de control de calidad analíticos

Cuando los valores de la CE_{50} excedan el ámbito aceptable para el tóxico de referencia y para el control positivo, o cuando la mortandad excede el criterio óptimo en el control negativo o se detectan problemas en la reproducibilidad,



evidenciada mediante el análisis de pruebas replicadas, el laboratorio deberá revisar los posibles factores de variabilidad, entre los cuales se considera a los siguientes:

- Método de cultivo: mantenimiento de los organismos de prueba.
- Edad y estado de salud de los organismos.
- Manejo de los neonatos.
- Pericia y consistencia en la realización de las pruebas por parte de los analistas.

Una vez que se han revisado minuciosamente los factores mencionados y que se han descartado los dos últimos como los responsables de la modificación de la sensibilidad del lote de *D. magna* empleado, se debe revisar el método de cultivo. En caso extremo, se recomienda no realizar más bioensayos con dicho lote y sustituirlo con uno nuevo para la prueba, el cual también debe ser evaluado.

Las diferentes concentraciones que se preparen en las pruebas exploratorias y definitivas deben realizarse utilizando pipetas y/o matraces volumétricos de diferentes capacidades, excluyendo sólo a las muestras al 100 % y a los testigos.

9 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La determinación de la CE_{50} deberá realizarse mediante el uso del método Probit, empleando un programa académico, institucional o comercial disponible. En cualquier caso deberá determinarse la CE_{50} y el intervalo de confianza al 95 % (véase D.2).

10 INFORME DE LA PRUEBA

10.1 Validación de resultados

Los resultados se consideran válidos, siempre y cuando:

- 10.1.1 La carta control para el tóxico de referencia, dicromato de potasio, a 48 h de exposición presente valores de la CE_{50} dentro del ámbito de 0,6 mg/L a 2,1 mg/L, (equivalentes a 0,21 mg/L y 0,74 mg/L como Cromo VI, respectivamente) y con un coeficiente de variación $\leq 20 \%$.
- 10.1.2 En el control negativo, el porcentaje máximo de mortandad o porcentaje de efecto a las 48 h de exposición, no exceda al 10 %.
- 10.1.3 En el control positivo, con una concentración de dicromato de potasio cercana a la CE_{50} histórica obtenida por el laboratorio de pruebas, genere un efecto de inmovilidad o mortandad del 33 % al 57 % de la población, a las 48 h de exposición.
- 10.1.4 Los análisis de pruebas replicadas deberán efectuarse en por lo menos una muestra de cada lote de análisis y la diferencia entre ellas deberá ser no significativa.
- 10.2 Información que debe estar contenida en la bitácora del analista.
 - 10.2.1 Referencia del método de prueba aplicado.
 - 10.2.2 Forma de almacenamiento y preservación de la muestra.
 - 10.2.3 Fecha de inicio y término del análisis.
 - 10.2.4 Tipo de prueba realizada (exploratoria o definitiva).
 - 10.2.5 Características aparentes de la muestra: olor, color, presencia o ausencia de burbujas y espuma, sólo si son relevantes.
 - 10.2.6 pH y oxígeno disuelto al finalizar la prueba en una réplica de cada dilución de la muestra, del control positivo y del control negativo.
 - 10.2.7 Concentraciones utilizadas en las pruebas exploratoria y definitiva.
 - 10.2.8 Anotación de las lecturas de inmovilidad o mortandad de organismos en cada réplica a las 24 h o 48 h, según corresponda.
 - 10.2.9 Porcentaje de mortandad o inmovilidad en cada serie de diluciones.



- 10.2.10 Respuesta obtenida expresada como CE_{50} o como Unidades Toxicológicas (UT) y los límites de confianza al 95 %.
 - 10.2.11 Firma del(los) responsable(s) de la realización de las pruebas de toxicidad.
 - 10.2.12 Cualquier detalle de operación no especificado en esta norma e incidentes que puedan afectar el resultado.
 - 10.2.13 Registrar también el tóxico de referencia utilizado en la prueba de sensibilidad y los valores de mortandad obtenidos de los controles positivo y negativo determinados en el lote de pruebas.
- 10.3 Expresión de resultados

Los resultados correspondientes a la CE_{50} a las 48 h se expresarán como sigue:

- 10.3.1 Cuando se trate de aguas de tipo residual o de cuerpos de agua y en general de mezclas complejas, los resultados se expresarán en Unidades Toxicológicas (UT).
- 10.3.2 Cuando se trate de sustancias puras, los resultados se expresarán en miligramos por litro (mg/L).
- 10.3.3 Cuando se trate de otra clase de muestras como sedimentos, suelos y otros tipos de muestras no contemplados, los resultados se expresarán en la forma que proceda



APÉNDICE NORMATIVO A

CONDICIONES AMBIENTALES PARA EL CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE ORGANISMOS DE *Daphnia magna*

Para la instalación de un cultivo de *D. magna*, es necesario contar con un área libre de sustancias tóxicas (gases, vapores, etcétera), que puedan entrar en contacto directo con los cultivos y alterar su sensibilidad y respuesta. Esta debe tener los aditamentos necesarios para mantener una temperatura y fotoperiodo controlados.

El cuidado de los organismos en cultivo conduce a tener un lote controlado de dáfidos cuya densidad no debe ser mayor de 15 organismos/L en agua dura reconstituida de dureza de 250 mg/L \pm 25 mg/L. Cada lote debe ser iniciado con neonatos de menos de 24 h de nacidos en estado óptimo, colocándolos en recipientes de boca ancha. La madurez sexual de los organismos que define un óptimo crecimiento es de 7 días a 15 días, a partir de su nacimiento. Una vez alcanzada la madurez sexual, los dáfidos producen neonatos, el número de ellos es muy variable y depende de las condiciones del manejo del cultivo y de su alimentación. Sin embargo, puede considerarse normal cuando la producción de neonatos durante su ciclo de vida es superior a 40 organismos por hembra.

A.1 Iluminación

El cultivo debe mantenerse en condiciones controladas de intensidad de luz en un ámbito de 600 lx a 1000 lx un fotoperiodo de 16 h de luz por 8 h de oscuridad.

Para la iluminación del cultivo deben utilizarse lámparas fluorescentes "luz blanca o de día" que proporcionen la luminosidad adecuada, la cual debe ser medida de forma regular con un luxómetro.

A.2 Temperatura

Mantener la temperatura ambiental de los cultivos a 20 °C \pm 2 °C.



A.3 Oxígeno disuelto

Los niveles del oxígeno disuelto se deben mantener por arriba de 2 mg/L, esto se logra mediante:

- a) La recuperación semanal del volumen de agua dura reconstituida que se pierde por evaporación y por limpieza del cultivo.
- b) El recambio de aproximadamente tres cuartas partes del total del volumen del cultivo, aproximadamente cada 15 días.

A.4 Dureza total (expresada como carbonato de calcio CaCO_3)

EL cultivo debe mantenerse en agua dura reconstituida con una dureza 250 mg/L \pm 25 mg/L.

A.5 Recambio de agua

El agua de cultivo, después de un tiempo determinado pierde sus características iniciales debido a la materia orgánica acumulada, producto de los desechos de los organismos y de residuos alimenticios, por lo cual debe renovarse de forma parcial por lo menos dos veces por semana y cada 15 días, se sugiere hacer un recambio mayor sustrayendo aproximadamente tres cuartas partes del volumen contenido en cada recipiente.

A.6 Limpieza

Todos los recipientes con cultivos, deben limpiarse al menos dos veces por semana, removiendo los restos de alimento y exubias del fondo.

Todo el material de cristalería, excepto los recipientes usados en los cultivos, debe someterse a una limpieza especial, de acuerdo a lo señalado en el Apéndice Normativo C. Lavado de material y cristalería.

A.7 Alimentación

La calidad de la alimentación es uno de los aspectos más importantes para el cultivo de organismos, ya que de ello dependen la sobrevivencia y la tasa reproductiva óptima.



El alimento puede estar constituido por cualquiera de las siguientes especies de clorofitas o su mezcla: *Chlorella vulgaris*, Beijerinck; *Ankistrodesmus falcatus*, (Corda) Ralfs; *Scenedesmus incrassatulus*, Bohlin y *Pseudokirchneriella subcapitata*, (Korshikov) Hindak 1990 (antes *Selenastrum capricornutum*, Printz of Skulberg 1964).

La alimentación se realiza hasta 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes, por ejemplo). La densidad de algas para alimentación dependerá de la edad del cultivo y debe controlarse.

Si se trata de un lote reproductor maduro, es decir, de hembras que se encuentran en estado grávido y están produciendo las descendencias de prueba, se recomienda adicionar aproximadamente de 750,000 células/mL a 800,000 células/mL en el medio de cultivo de los dáfidos. En el caso de suministrar *A. falcatus* como alimento, se recomienda adicionar de 400,000 células/mL a 450,000 células/mL.

Si se trata de un cultivo joven (menos de 10 d), se recomienda un suministro de aproximadamente de 450,000 células/mL a 500,000 células/mL para evitar acumulación de alimento en el fondo pero asegurar abundante alimento para su crecimiento. En el caso de suministrar *A. falcatus*, se recomienda la adición de 200,000 células/mL a 250,000 células/mL.

El conteo de las células algales puede efectuarse con la ayuda de una cámara de Neubauer o hemocitómetro.

El cultivo algal debe concentrarse antes de ser suministrado como alimento. La concentración puede hacerse por centrifugación, filtración o sedimentación y decantación.

Las microalgas concentradas se conservan en obscuridad y refrigeración a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en frascos de vidrio y pueden emplearse como alimento hasta por un período de 3 semanas, después del cual debe desecharse cualquier remanente y emplear un nuevo concentrado.

Para la preparación de los cultivos de microalgas verdes utilizadas como el alimento de los dáfidos, pueden emplearse los medios de cultivo Basal de Bold o el medio AAP (véase D.3 y Apéndice normativo B).

APÉNDICE NORMATIVO B

MEDIOS PARA EL CULTIVO DE ALGAS CON FINES DE ALIMENTACIÓN DE CULTIVOS DE *Daphnia magna*.

La calidad del alimento es uno de los aspectos determinantes para mantener un cultivo sano y cuya sobrevivencia y tasa de reproducción sean óptimas. El alimento puede estar constituido por alguna especie de microalga verde, como *Chorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Ankistrodesmus falcatus*, entre otras. Además, puede optarse por alguno de los medios de cultivo expuestos a continuación.

B.1 Medio Basal de Bold

B.1.1 Preparar 100 mL de cada una de las soluciones stock, conforme a la siguiente tabla.

Disolución stock	Reactivo(s)	Peso (g)
1	Nitrato de sodio (NaNO_3)	25,0
2	Cloruro de calcio di hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2,5
3	Sulfato de magnesio hepta hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	7,5
4	Fosfato mono básico de potasio (KH_2PO_4)	17,5
5	Fosfato di básico de potasio (K_2HPO_4)	7,5
6	Cloruro de sodio (NaCl)	2,5
7	Sulfato ferroso hepta hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) + 100 μL de H_2SO_4	0,498
8	Acido bórico (H_3BO_3)	1,142
9	EDTA	5,0
	Hidróxido de potasio (KOH)	3,1
10*	Sulfato de zinc hepta hidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,882
	Cloruro de manganeso tetra hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,144
	Oxido de molibdeno (MoO_3)	0,071
	Sulfato de cobre penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,157
	Nitrato de cobalto hexa hidratado [$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]	0,049



* Colocar uno por uno los reactivos en el orden señalado y aforar a 100 mL.

- B.1.2** Colocar cada disolución en envases debidamente rotulados y conservados en refrigeración a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- B.1.3** Para preparar 1 L del medio Basal de Bold se agrega 1 mL de cada una de las soluciones stock a 500 mL de agua desionizada o destilada en orden del 1 al 10 y se afora a 1L.
- B.1.4** Esterilizar en un matraz Erlenmeyer en autoclave durante 15 min a 15 lb.
- B.1.5** Dejar enfriar a temperatura ambiente el medio de cultivo e inocular con un cultivo precedente de densidad conocida para alcanzar un concentración inicial aproximada de $1\text{ } (10^6)$ células por mL.
- B.1.6** Colocar el cultivo junto a una fuente de luz continua y aireación constante. El cultivo puede permanecer así de 10 días a 15 días, tiempo en el cual alcanzará una densidad considerable (entre 15 millones de células/mL y 20 millones de células/mL). Posteriormente retirar y concentrar para suministro de alimento.

B.2 Medio AAP

Todos los reactivos utilizados deben tener calidad ACS, (98 % - 100 % de pureza), con excepción del CaCl_2 cuya pureza es de 95 % - 100 %. Para su preparación se emplea agua destilada o desionizada.

El medio de cultivo se prepara a partir de una serie de cinco soluciones: la primera de ellas conteniendo micro-nutrientes y las cuatro restantes con macro-nutrientes, todas ellas proporcionan las concentraciones adecuadas para asegurar un crecimiento óptimo de las algas durante el periodo de proliferación de 5 días a 9 días.

B.3 Preparación de soluciones

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

- Disolución de Micro-nutrientes

La preparación se inicia con las disoluciones de cloruro de zinc, cloruro de cobalto, molibdato de sodio y cloruro de cobre. Para ello, se emplean 5 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. Continuar con las siguientes instrucciones:

- Disolución 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 disolución transferir 1 mL mediante pipeta al frasco 1.

- Disolución de cloruro de cobalto

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

- Disolución de molibdato de sodio

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

- Disolución de cloruro de cobre

Verter 70 mL de agua en dos de los frascos de 100 mL, en el primero de ellos agregar 60,0 mg de cloruro de cobre ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), luego llevar a volumen de 100 mL con agua y mezclar bien. Una vez lista esta primera disolución de cloruro de cobre, tomar 1 mL, verter en el segundo frasco y completar el volumen a 100 mL con agua. Un mL de esta segunda disolución es la que se emplea para la preparación de la disolución No. 1 de Micro-nutrientes.

Cuando estén preparadas las disoluciones anteriores, pesar el resto de los reactivos, tomar el frasco de 500 mL etiquetado como disolución 1 y agregar cada compuesto químico en el orden fijado en la Tabla 6. La secuencia no debe ser alterada, ya que se formarán precipitados difíciles de solubilizar.

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

TABLA 6.- Preparación de la disolución No. 1 de micronutrientes.

	Compuesto	Fórmula	Masa en gramos (g) o 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 diaminotetraacético: sal disódica	Na ₂ EDTA•2H ₂ O	0,150

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

Después de haber agregado todos los componentes al frasco de la disolución 1, llevar a volumen de 500 mL con agua desionizada.

- Disoluciones de Macro-nutrientes (2-5)

Adicionar en los frascos respectivos de 500 mL restantes las cantidades de las sales indicadas en la Tabla 7.

TABLA 7.- Preparación de disolución de macro-nutrientes.

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

Mezclar bien hasta disolver, y posteriormente adicionar agua hasta alcanzar el volumen de 500 mL en cada uno de los recipientes. Las disoluciones stock pueden refrigerarse (sin congelar) hasta por un año.

B.4 Inoculación y condiciones de proliferación

Por cada litro de medio de cultivo que se desee preparar, se adiciona en agua destilada 1 mL de cada una de las 5 disoluciones 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 disoluciones ya que se pueden formar precipitados difíciles de eliminar. Mezclar bien después de la adición de cada disolución.

Al final el pH del medio deberá ser $7,5 \pm 0,1$ por lo que es necesario ajustarlo, ya sea con NaOH o HCl 1 N. Inmediatamente después, esterilizar el medio a través de filtración bajo condiciones asépticas (mechero o campana de flujo laminar) empleando una membrana de mezcla de ésteres de $0,22 \mu\text{m}$ de abertura de poro y 47 mm de diámetro. El sistema de filtración y el matraz de captación deben estar estériles. Para la filtración se puede utilizar una bomba de vacío. El medio nutritivo esterilizado se inocula con las algas, ya sea proveniente de un cultivo previo o a partir de la cepa en medio sólido.

El medio inoculado se coloca a $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ dentro de una cámara con iluminación superior a 3500 lx, manteniendo aireación por un periodo de 4 días a 9 días, hasta presentar un color verde intenso que se asocia con la fase estacionaria en la que la densidad algal es superior a 2,5 millones de células/mL (cuantificado por cámara Neubauer). Cuando el cultivo logra estas características, se retira de la aireación e iluminación y se coloca en una cámara fría, a una temperatura de $2 \text{ }^\circ\text{C}$ a $6 \text{ }^\circ\text{C}$ y por un periodo de una a dos semanas, para permitir su sedimentación.

APÉNDICE NORMATIVO C

LAVADO DE MATERIAL Y CRISTALERÍA

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

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

Los recipientes utilizados para el mantenimiento de los organismos en cultivo, deberán lavarse únicamente con agua corriente, dando un último enjuague con agua dura de dilución. Este material debe ser de uso exclusivo para los cultivos.



11 VIGENCIA

La presente norma mexicana entrará en vigor 60 días naturales después de la publicación de su declaratoria de vigencia en el **Diario Oficial de la Federación**.

12 BIBLIOGRAFÍA

- | | |
|--------------------------|--|
| NOM-008-SCFI-2002 | Sistema General de Unidades de Medida. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de noviembre de 2002. |
| NMX-AA-003- 1980 | Aguas residuales-Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de marzo de 1980. |
| NMX-AA-014- 1980 | Cuerpos receptores-Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 5 de septiembre de 1980. |
| ISO 80000-1:2009 | Quantities and Units-Part 9: Physical Chemistry and Molecular Physics, 1 st Edition; Geneva, Switzerland. |
| IUPAC, 2007 | Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry-The Green Book, 3 rd Ed.; RSC Publishing, Cambridge [ISBN 978-0-85404-433-7]. Page 48, Sec. 2.10. |
| APHA, AWWA, WPCF, 1987 | Standard Methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Port City Press, Baltimore, Maryland, E.U.A. 10 – 200 pp. |
| Environment Canada, 1990 | Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to <i>Daphnia magna</i> . (Método de referencia para determinar la letalidad aguda de efluentes con <i>Daphnia magna</i>) EPS 1/RM/14. 18 pp. |



- U.S EPA, 1991 Methods for Measuring the Acute Toxicity of effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organism. (Métodos para medir la toxicidad aguda de efluentes y aguas receptoras con organismos marinos y dulceacuícolas) EPA/600/4-90/DZ7.
- Anderson, B.G., 1944 The toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna*. (La toxicidad de varias sustancias encontradas en desechos industriales determinadas por el uso de *Daphnia magna*) Sewage Works J. 16: 1140-1156 pp.
- Attar, E. N y E. J. Maly, 1982 Acute toxicity of cadmium , zinc and cadmium-zinc mixtures to *Daphnia magna*. (Toxicidad aguda provocada por cadmio, zinc y la mezcla de los mismos en *Daphnia magna*) Arch. Environ Contam. Toxicol. 11 (3): 291 - 296 pp.
- Biensinger. K.E. y G. M. Christensen, 1972. Effects of various metals on survival growth, reproduction and metabolism of *Daphnia magna*. (Efectos de varios metales en la sobrevivencia, crecimiento y metabolismo de *Daphnia magna*) J. Fish. Res. Board Can 29: 1691 - 1700 pp.
- CETESB, 1991. Métodos de Avalación de Toxicidades de Poluentes a Organismos Acuáticos. (Métodos de evaluación de toxicidad de contaminantes en organismos acuáticos) Sao Paulo, SP. Brasil. s.p.
- CETESB, 1991 a. Procedimientos para utilizacao de testes de toxicidades no 3controle de efluentes líquidos. (Procedimientos para la utilización de pruebas de toxicidad en el control de efluentes líquidos) Serie Manuals. Sao Paulo, SP. Brasil, 17 p.
- CETESB, 1991 b. Implementacao de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. (Implementación de pruebas de toxicidad en el control de efluentes líquidos) Serie Manuals. Sao Paulo, SP. Brasil, 7 p.
- Díaz,-Báez, C., Pica-Granados Y., Ronco A., 2008. Ensayos Toxicológicos para la Evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México Ed. SEMARNAT 17-32 pp.



EPS, 1990. Guidance Document on control of Toxicity Test Precision Using reference Toxicants. (Guía para el control de la precisión en la prueba de toxicidad utilizando tóxicos de referencia) Report EPS 1/RM/15 Canada.

Finney, D. J., 1971. Probit analysis. (Análisis Probit) 3ª. Ed. Cambridge University Press, Londres. 333 pp.

Goulden, C.E. Y L .L. Henry, 1987. Instrucciones para el cultivo de *Daphnia* para Pruebas de Toxicidad. Guía de Trabajo. Academy of Natural Sciences. Filadelfia, Pensilvania, E.U.A. 13 pp.

Lewis, P. A. y W. B. Horning, 1988. "A Short - Term Chronic Toxicity Test Using *Daphnia magna*" (Pruebas de toxicidad crónica a corto plazo utilizando *Daphnia magna*). Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 10 th Volume, ASTM, STP 1971 - w .J .Adams, G. A. Chapman, and W. G. Landis, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia: 508 - 555 pp.

Litchfield, J. T. Jr. Y F. Wilcoxon, 1949. An amplified method of evaluating dose effect experiments. (Método simplificado para evaluar los efectos de la dosis en los experimentos) J. Pharm. Exp. Ther. 96-113 pp.

Needham, J. G., P. S .Galtssoff, F. E. Lutz y P. S. Welch, 1937. Culture Methods for Invertebrate Animals. (Métodos de cultivo en invertebrados) Cumstock Publ. Co. Reprinted by Dover Publ., Inc., Nueva York.

Pennak, R. W., 1978. Fresh Water Invertebrates of the United States. (Invertebrados dulceacuícolas de los Estados Unidos de América) 2ª ed., John Wiley and Sons, Nueva York, 365 - 367 pp.

Pielou, E. C. 1969. An Introduction to Mathematical Ecology. (Introducción a la Ecología Matemática) Willey Interscience John Willey and Sons, Nueva York.

Porcella, D.B, (1983). Protocol for Bioassessment of Hazardous Waste Sites, Environmental Research Laboratory, U.S. Environmental.

Protection Agency, Corvallis, OR, EPA 60072-83/054, NTIS Publ. No. PB83-241737. Citado por: Burton, G.A. y Pitt E. R. (2002). Stormwater effect handbook: a toolbox for watershed managers, scientist, and engineers. Lewis Publishers. CRC Press Company. 911 p.



Stephan, C. E., 1977. Methods for calculating an LC₅₀. (Métodos para el cálculo de la CL₅₀) In: Mayer y J .L Hamelink, (Eds.), Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation, ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania: 65 – 84 pp.

13 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma coincide básicamente con la norma internacional ISO 6341:1996, Water quality–Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna*, Straus (Cladocera, Crustacea) Acute toxicity test, y se diferencia en los siguientes puntos:

Se incluyeron los Apéndices Normativos A (Condiciones ambientales para el cultivo y mantenimiento de organismos de *Daphnia magna*) y B (Medios para el cultivo de algas con fines de alimentación de cultivos de *Daphnia magna*), en los que se detalla el manejo de los cultivos y lotes reproductores de *Daphnia magna*, así como el tipo y cantidad de alimentos que debe proporcionarse. Asimismo, se incluye el Apéndice Normativo C (Lavado de material y cristalería) para el cuidado y lavado del material utilizado para las pruebas de toxicidad en general (véase D.1).



APÉNDICE INFORMATIVO D

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

- D.1** La presente norma mexicana ha sido complementada con información técnica, resultado de investigaciones realizadas a nivel nacional e internacional.
- D.2** Se recomienda el uso del programa Probit elaborado por la EPA. Dicho programa, junto con sus actualizaciones, puede obtenerse en la siguiente dirección electrónica:
<http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm>
- D.3** Para la revisión detallada de medios de cultivo para algas se recomienda la consulta de: EPA, 1992 - U.S EPA. 1992 Short -term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms EPA-600/4-91-022. 3th Edition. Philip Lewis A, L., Klem D. J., Lazorchak J. M.

México, D.F., a

El Director General, **CHRISTIAN TURÉGANO ROLDÁN**.- Rúbrica.