

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA

**“DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA EN *Daphnia magna*
STRAUS (CLADÓCERA – CRUSTÁCEA), UTILIZANDO TÓXICOS DE
REFERENCIA”**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A
ARACELI ACEVEDO CRUZ**

Asesor

Biol. Ma. Carmen Ramírez Ramírez



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Cuando la tristeza funde a dos corazones, ni la gloria ni la felicidad será capaz de destruir esa unión. Las lágrimas son un fuego que purifica el amor, haciéndolo nítido y hermoso por una eternidad.

DEDICATORIAS.

A DIOS

Por permitirme llegar a la culminación de este sueño, por que has sido la fuerza más grande que me impulsó a seguir adelante y por que nunca me abandonaste. Gracias por todas las enseñanzas y por todas las pruebas que me has puesto, que me han ayudado a crecer y ser mejor persona.

A MIS PADRES

Luisa y Jaime. Gracias por haberme educado, por que ustedes son mi primera escuela, por apoyarme incondicional y desinteresadamente durante toda mi formación académica, por estar conmigo siempre y demostrarme que si hay vida existe esperanza y sobre todo por haberme brindado el milagro de la vida. Los amo y los admiró con todo mi corazón. Ustedes saben mejor que nadie lo que significa este trabajo para mi y por eso son parte de él, ya que sin su ayuda difícilmente hubiera podido concluirlo.

A MI JESÚS EMILIO

Mi amor, aunque físicamente no estás conmigo, quiero que sepas que vives siempre en mi corazón. En especial este trabajo es para ti, ya que es una manera de demostrarte que estoy orgullosa de ti, por que eres lo más grande y más bello que me ha pasado. Gracias por enseñarme que la vida es un milagro y a valorarla día con día. Espero que tú también te sientas orgullo de tu mamá. Nunca te vamos a olvidar, por que eres esa luz que ilumina nuestras vidas y nos motiva a seguir adelante. Te amo, mi hermoso. Confiando en Dios en que algún día nos volvamos a encontrar y estemos todos juntos.

A MIS HERMANOS

Leonor y José Luis por ese apoyo, por estar conmigo, por creer siempre en mi y por que siempre que necesito de ustedes me ayudan sin recibir nada a cambio.

A MI ESPOSO

Jorge con especial agradecimiento, por que nunca te has separado de mi, por ese amor tan grande que me demuestras en tus detalles y en tus acciones y sobre todo por que juntos hemos enfrentado situaciones muy difíciles y dolorosas, que nos han unido más y que han permitido que nuestro amor crezca. Recuerda que aunque a veces el cielo esté nublado y llueva, siempre sale el sol y no se te olvide que Dios nunca nos desampara. Estoy segura de que Él, nos tiene preparado algo muy hermoso. Te amo y te quiero mucho. Gracias por todo ese amor, por tu sentido del humor y por todo lo que hemos vivido juntos.

A BRENDA PRISCILA

Por ser esa chispa que ilumina mi vida, te quiero mucho y espero que esto sea un ejemplo para ti y que algún día, te realices como una profesional, estoy segura que así será, por que eres muy inteligente. Que Dios te bendiga y te acompañe siempre.

A MIS AMIGOS

Gabriela, Toño, Eugenia (la güera), Everlin, Sebastián, Rosa Elba, Karina y Lilia, por que ustedes me demostraron lo que es la verdadera amistad. Gracias por estar conmigo cuando más los necesite, por que nunca me abandonaron, por que siempre hubo una palabra de aliento para Jorge y para mi. Nunca voy a olvidar el amor que me demostraron, cuando yo sentí que el mundo se derrumbaba y sobre todo por que siguen ahí, que DIOS los bendiga, quiero que sepan que cuando necesiten algo, no duden en buscarme, aunque nunca voy a pagar lo que hicieron por mi.

AGRADECIMIENTOS.

A la UNAM FES Iztacala, por darme la oportunidad de formarme en ella, por todos los conocimientos adquiridos, y por que en ella conocí a gente muy valiosa que influyó de manera significativa en mi vida personal y profesional.

Al Instituto Mexicano del Petróleo por haberme permitido concluir este trabajo y por el apoyo económico.

A la Universidad Hispanoamericana, por ser mi fuente de trabajo y por que me ha permitido desarrollarme profesionalmente y sobre todo por que me ha dado la oportunidad de convivir con gente muy profesional que me motivo a concluir este trabajo.

Con especial agradecimiento al M. en C. Sebastián Ricardo Zúñiga Lagunes, por todos los conocimientos transmitidos, por tus comentarios tan oportunos, por la ayuda desinteresada y sincera y sobre todo por tu amistad. Gracias Sebas.

A mis revisores: Biol. Carmen Ramírez, al Biol. Mario Fernández, y al Dr. S.S.S. Sarma.

Con un especial reconocimiento a las M. en C. Irma Dueñas y Eugenia Heres, por haberse tomado la molestia de revisar minuciosamente el presente trabajo, y que gracias a ellas se vio enriquecido. Muchas gracias por su apoyo, por que no sólo fueron sinodales, sino amigas, por abrirme su corazón y escucharme.

Al IPN Escuela de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Ecología, en especial al Dr. Fernando Martínez Jerónimo por la donación de la cepa de *D. magna*.

A la Biol.. Sara Ramírez, del CENICA UAM Iztapalapa, por la asesoría, en el cultivo de alimento *Chlorella vulgaris*.

Al Ing. Karina Colín Hernández por su ayuda en el diseño del presente trabajo.

CONTENIDO	Pág.
ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCION	4
ANTECEDENTES	12
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVOS	19
MATERIAL Y MÉTODOS	20
RESULTADOS	24
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
REFERENCIAS	49
ANEXOS	56
1. Condiciones de cultivo para <i>Daphnia magna</i>	57
2. Determinación de la dureza	59
3. Parámetros fisicoquímicos	60
4. Método Probit	67
5. Análisis estadístico	70
6. Formatos de registro	74

ABREVIATURAS

APHA	American Public Health Association
ASTM	American Society for Testing and Materials
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
U.S.EPA	U.S. Environmental Protection Agency
DP	Dicromato de potasio
DSS	Dodecil sulfato de sodio
SZ	Sulfato de zinc
Ag	Plata
As	Arsénico
Ca,	Calcio
Cd	Cadmio
Cr	Cromo
Cu	Cobre
Hg	Mercurio
Mg	Magnesio
Ni	Níquel
Pb	Plomo
Zn	Zinc

RESUMEN

Se establecieron las condiciones óptimas de laboratorio, para implementar la metodología de toxicidad aguda, en neonatos de *Daphnia magna* de 24 horas de nacidos, con el propósito de realizar pruebas de sensibilidad, que garanticen resultados confiables y de calidad. Se obtuvieron los valores de CL_{50} (Concentración Letal Media), de cuatro tóxicos de referencia: Dicromato de potasio, sulfato de zinc, dodecil sulfato de sodio y fenol y se compararon con lo reportado por otros autores. Se realizaron pruebas exploratorias a 24 horas de exposición, para determinar el rango de concentraciones finales, que se emplearían en las pruebas definitivas. Éstas, se realizaron a 48 horas de exposición. El total de organismos por concentración fue de 30. Ambas pruebas se llevaron a cabo en un sistema estático, sin alimento y renovación del medio. Se realizó una prueba con alimento (*Chlorella vulgaris*), para comparar si el alimento ejerce o no algún efecto sobre la CL_{50} . El total de organismos por concentración fue de 60. El criterio evaluado fue la inmovilización o mortalidad de los neonatos. La CL_{50} obtenida en las pruebas definitivas para cada tóxico fue: DP: 0.37 y 0.31, SZ: 1.82 y 1.58, DSS 10.56 y 9.45 y fenol 8.37 y 6.81 mg/l sin y con alimento respectivamente. Se obtuvo la intensidad y sensibilidad de cada tóxico y se comparó mediante una prueba ANCOVA, transformando el porcentaje de mortalidad (Y) ($\sqrt{\arcsen}$). Se comparó la intensidad del efecto y su sensibilidad a los mismos con y sin alimento, a partir del modelo $y = mx + b$, donde $m =$ intensidad del tóxico y $b =$ la sensibilidad del organismo al tóxico. La sensibilidad que presentó *D. magna* sin alimento fue: DP>DSS>fenol>ZN. El DP y el DSS, en la sensibilidad de los organismos, no presentaron una diferencia significativa. Los mayores efectos y toxicidad se observaron con el DP. La intensidad tóxica se presentó: DP>SZ>DSS=fenol. En relación a la intensidad tóxica, cuando son alimentados los organismos se observó: DP>SZ>DSS≥fenol. La intensidad se incrementó con el DS, aunque en su CL_{50} , no presentó diferencias significativas. El resto de los tóxicos se comportaron de igual forma, si son alimentados o no. La sensibilidad con alimento en *D. magna* fue: DSS≥ DP>Fenol>SZ. La sensibilidad al DP aumentó y para el resto de los tóxicos disminuyó.

INTRODUCCIÓN

Los acelerados procesos de contaminación que aquejan al hombre están, sin duda ligados al crecimiento de la población mundial y al aumento y diversificación de las actividades del hombre. La contaminación es una consecuencia indeseable de los procesos productivos que afecta no sólo a la salud humana, sino también a la integridad de los ecosistemas, ocasionando daños a veces irreversibles, tales como las pérdidas de biodiversidad (Frank *et al.*, 1980).

Donde quizás el deterioro ambiental se hace más grave es en el agua, pues es un insumo básico para la subsistencia de todo organismo vivo y para las actividades productivas del humano. La contaminación del agua se define, como cualquier cambio, que puede afectar su uso posterior, dicho cambio puede ser causado por la introducción de sustancias orgánicas o inorgánicas, provenientes de derrames domésticos e industriales que cambian las condiciones asépticas del agua (Chávez y Márquez, 1985).

Desde el punto de vista de salud pública podemos definir dos tipos de contaminación del agua: a) contaminación biológica a través de virus, bacterias y parásitos y b) contaminación química que es provocada por productos químicos minerales y orgánicos consecuencia de vertidos indiscriminados de desechos domésticos, agrarios e industriales. Otro tipo de contaminación química es la causada por diversos contaminantes que entran al agua por corrosión de las tuberías, al igual que aditivos para evitar ésta y por productos secundarios de las sustancias químicas utilizadas para desinfectar y tratar el agua. La corrosión de las tuberías puede liberar metales como plomo, cadmio, hierro, zinc y níquel entre otros (Seoanez, 1995).

Para la mayoría de los organismos acuáticos es extremadamente tóxica la exposición a un exceso de metales pesados como Cd, Hg, Cr, Ni y Pb. Los iones metales tóxicos suelen penetrar a la célula a través de los mismos sistemas que utilizan los iones metálicos fisiológicamente importantes Ca, Mg, Cu y Zn. Dentro de la cadena alimentaria, los organismos fotosintéticos son las principales vías de acceso de los metales pesados hacia los animales y el ser humano. El incremento en los valores de los metales pesados en la biosfera, es el resultado de perturbaciones originadas por el hombre en el medio ambiente o por fenómenos geológicos. En las últimas décadas se ha incrementado la contaminación de la atmósfera, los ríos, los océanos y los suelos por metales pesados, como consecuencia de la actividad industrial y de la explotación minera (Nriagu y Pacyna, 1988).

En vista de la diversidad de efectos tóxicos, se emplean estudios para determinar los efectos de una sustancia tóxica. Un estudio de este tipo provee información sobre la toxicidad de una sustancia sometida a prueba. Los efectos tóxicos pueden incluir letalidad (mortalidad) y/o efectos subletales como: cambios en el crecimiento, desarrollo, reproducción, respuesta fármaco - cinética, patología, bioquímica, fisiología y conductual, sus efectos pueden ser expresados en diferentes formas, (Frank *et al.*, 1980; Alasdair y Neilson 1994).

La Toxicología estudia los mecanismos de ingreso, transformación y excreción de los tóxicos, así como el estudio de los mecanismos a nivel molecular y celular de los procesos de producción de daños y de desintoxicación. La descripción de esos procesos, tiene por objetivo principal entender las causas de la gran variabilidad que existe en la respuesta de los diferentes

individuos y especies a la agresión química. La variabilidad de las respuestas tóxicas obliga, en el estudio de la toxicología ambiental, al tratamiento de las posibilidades de daño, en lugar de la estimación cuantitativa del daño mismo. La toxicología ambiental, estudia los daños causados al organismo por la exposición a los tóxicos que se encuentren en el ambiente. Ayuda a evaluar los impactos que producen las sustancias químicas según su grado de riesgo y consecuentemente establecer normas de seguridad adecuadas para un manejo seguro (Kopplin, 2001).

Una rama de la toxicología ambiental, es la acuática que se encarga del estudio cualitativo y cuantitativo de los efectos tóxicos de diversos químicos en organismos acuáticos. Asimismo, la toxicología acuática concierne a las concentraciones o cantidades de químicos que puede esperarse encontrar en dicho ambiente (Rand y Petrocelli, 1985).

Una de las formas básicas de prevenir los problemas derivados de la contaminación es el control periódico de la calidad del agua, es decir, conocer qué sustancias tiene disueltas o suspendidas. El agua puede diluir los contaminantes al igual que transportarlos, siendo un medio excelente para acelerar las reacciones químicas entre las sustancias disueltas, cambiando la toxicidad de muchas de ellas y la biodisponibilidad a los organismos. Para conocer la presencia y concentración de las sustancias existentes potencialmente tóxicas, que puedan encontrarse en el ambiente acuático se debe realizar un análisis o evaluación específico (Harte, 1991).

Una de las evaluaciones de la contaminación del agua por sustancias químicas, se realiza mediante la aplicación de pruebas de toxicidad o bioensayos con organismos adecuados para este propósito, ya que las evaluaciones físico-químicas no resultan suficientes para la valoración de los posibles efectos sobre la vida acuática (Peter, 1993).

Las pruebas de toxicidad son estudios donde se evalúa la respuesta de los organismos que son sometidos a una serie de concentraciones de una sustancia o una mezcla de sustancias por un tiempo definido y que pueden actuar aisladamente o en combinación con otros compuestos de la mezcla. Estas pruebas evalúan la inmovilidad o mortalidad (efecto agudo) del mismo, o bien dan una respuesta retardada (efecto crónico), que pueda afectar el crecimiento, la reproducción, el comportamiento u ocasionar mutaciones en los organismos expuestos, por mencionar algunos de los efectos. Ambas pruebas resultan útiles para numerosos propósitos que incluyen: a) sensibilidad de los organismos acuáticos ante la presencia de agentes tóxicos, b) magnitud que ha de tener el tratamiento de los desechos para cumplir con los requerimientos de control de contaminación del agua, c) efectividad de estos métodos de tratamiento de desechos, d) tasa de descarga vertida permitida, e) concordancia entre las normas de calidad de agua, f) los condicionamientos a los vertidos y g) los permisos de descarga (APHA, 1995).

Una de las ventajas de las pruebas de toxicidad es que ayudan a evaluar la eficiencia de un tratamiento que se aplica a un tipo de residuo tóxico líquido o sólido antes de ser arrojados al ambiente y que cumplan con las normas de protección al ambiente (APHA, 1995; NOM-AA-087, 1995). Asimismo, dichas pruebas aplicadas a muestras de los sitios receptores, permiten saber si existe biodegradabilidad o biotransformación del tóxico vertido y que pueda ser perjudicial al ambiente. Así como la presencia de otra sustancia que resulte tóxica o algún agente que pueda producir un efecto adverso en los organismos y dañar su estructura o función fisiológica o bioquímica pudiendo incluso llevarlo a la muerte (Worden, 1974; Lozano, 1997).

Dichos daños pueden ser referidos a mutaciones, efectos fisiológicos, conductuales, reproductivos etc. (Gersich, 1984; Jansen y Persoone, 1993). Sin embargo, las sustancias no presentan el mismo grado de toxicidad, es decir, algunas serán más tóxicas que otras.

Todas las sustancias químicas pueden alterar alguna función o producir la muerte en algún organismo, por lo que podría considerarse que “todas las sustancias son tóxicas”, todas las sustancias son veneno y no hay ninguna que no tenga efecto tóxico y es la dosis lo que hace la diferencia entre ser y no ser tóxico. Esta aseveración permite enfatizar la importancia de la evaluación de las sustancias químicas y las circunstancias con las cuales pueden producir efectos adversos (Lacouture, 1984).

Lo que se denomina efecto o respuesta tóxica, es un cambio orgánico permanente que debe de poder ser medido en el componente bajo estudio y tener un valor de cero cuando la dosis es cero. La medición puede hacerse a diferentes niveles: molecular, celular, órgano, organismo, pero independientemente del nivel, el efecto debe ser medible. La correspondencia entre la cantidad de tóxico y la magnitud del efecto es lo que se conoce como la relación dosis-efecto o dosis respuesta (Lu, 1985).

El factor que determina que un agente sea potencialmente dañino o inocuo es la relación entre la concentración del químico al que es expuesto el organismo y la duración de la exposición. Una medición de la respuesta del efecto, resultante de la exposición, es la relación “dosis-respuesta”. La concentración y el tiempo requerido para producir un efecto adverso varía con el químico, la especie de organismo expuesto, así como la etapa del ciclo de vida en que se encuentre y la severidad del efecto; este contacto entre el organismo y el químico es llamado exposición (Lu, 1985; Rand y Petrocelli, 1985).

En la medición de la toxicidad, los factores más significativos relacionados a la exposición son: la especie, duración y frecuencia de exposición y la concentración. Además, se ha demostrado que los neonatos y los animales muy jóvenes, o muy viejos en general, son más susceptibles a los tóxicos. Lo que se atribuye a diferencias en varias enzimas de desintoxicación. (Kopplin, 2001).

El tiempo de exposición de los animales a los tóxicos tiene un efecto profundo en el porcentaje de respuesta de la población. El tiempo de respuesta puede ser definido como el tiempo requerido para una respuesta efectiva en la dosis. Muchos factores pueden influir en la respuesta - tiempo, como la toxicidad, concentración y condiciones físicas. La penetración y translocación del sitio de acción y la actividad física y metabólica del animal de prueba (Donald y Boyd, 1967).

Una sustancia tóxica puede causar daño sólo después de ser absorbida por el organismo. La absorción puede ocurrir a través de la piel, el tracto gastrointestinal y varias rutas de menor importancia. La naturaleza e intensidad de los efectos de un producto químico en un organismo dependen de su concentración en los órganos objetivo. La concentración depende no sólo de la dosis administrada sino también de otros factores: absorción, distribución, unión y excreción. Para que un producto químico sea absorbido, distribuido y eventualmente excretado, una sustancia tóxica debe atravesar varias membranas celulares. Una membrana celular consiste generalmente en una bicapa de moléculas de lípidos con proteínas diseminadas en toda la

membrana. Existen cuatro mecanismos por los cuales puede pasar una sustancia tóxica por una membrana celular; el más importante de ellos es la difusión pasiva a través de la membrana. Los otros son la filtración a través de los canales de la membrana, transporte mediado por un portador, pinocitosis y fagocitosis por parte de la célula. Los dos últimos mecanismos son diferentes en el sentido de que la célula toma parte activa en la transferencia de una sustancia tóxica a través de sus membranas (Hodgson y Dauteman 1980).

Se sabe que muchos productos químicos sufren biotransformación (transformación metabólica) mientras están en los órganos y tejidos. Por lo tanto, la biotransformación es un proceso que, en general, convierte los compuestos originales en metabolitos y después forma conjugados. Los metabolitos y conjugados suelen ser más solubles en el agua y más polares, de aquí que sean más fácilmente excretados. En consecuencia la biotransformación puede considerarse un mecanismo de desintoxicación por parte del organismo. La tasa de biotransformación y el tipo de esta conversión de una sustancia tóxica difieren de una especie animal a otra, e incluso de una variedad a otra. Hecho que a menudo constituye la diferencia de toxicidad en los animales. La edad, el sexo del animal y las exposiciones a otros productos químicos puede alterar también la biotransformación (Reeves, 1981).

La regulación y manejo de contaminantes en ambientes acuáticos están basados en información toxicológica, que incluye la cuantificación de la respuesta biológica con una concentración del contaminante, por algún período definido de exposición. Esta regulación y manejo de sustancias y desechos tóxicos se ha realizado principalmente con microorganismos acuáticos, los cuales han demostrado que son adecuados y recomendables para la evaluación de la toxicidad aguda en muestras ambientales (agua y sedimento), principalmente en las fases de selección e identificación de las áreas más críticas, en aquellos casos que no se exige el desarrollo de ningún protocolo en particular y en las etapas iniciales de evaluación de la toxicidad (Ramírez, 1997).

La sensibilidad de un organismo a una sustancia tóxica, es una propiedad que varía considerablemente de una especie a otra, y depende de varios factores como son: su metabolismo, edad y factores ambientales. Asimismo, organismos de la misma especie, pueden responder de diferente manera, a la misma concentración del tóxico y de un tiempo a otro, aún cuando todas las otras variables se mantengan constantes (ISO 6341, 1982; Walker, 1990).

La sensibilidad del organismo de prueba empleado, esta dada por la respuesta que despliega el mismo al ser expuesto a un tóxico. Si su sensibilidad al tóxico es muy alta, la concentración necesaria para producir un efecto será muy pequeña y viceversa (Rand y Petrocelli, 1985; Zúñiga, 2002).

Sin embargo, en el caso de compuestos químicos definidos hay que tener en cuenta adicionalmente su toxicocinética, la cual considera en el tiempo la biodisponibilidad, la absorción, la depositación y acumulación en un tejido u órgano blanco, la biotransformación y la excreción o eliminación (Frank *et al.*, 1980).

La toxicocinética junto con la sensibilidad del organismo de prueba, determinan la potencia o intensidad del efecto tóxico de los compuestos evaluados. Esto es una respuesta integral del organismo. Si hay una alta biodisponibilidad de un tóxico y éste es rápidamente absorbido, se esperaría una alta toxicidad o mortalidad. Sin embargo, si la sensibilidad del organismo a éste es baja, el resultado será un nivel de toxicidad bajo. El cual solamente se vería incrementado, hasta el momento en que se eleven los niveles bioacumulados del tóxico en un tiempo prolongado. Puede ocurrir además, otro tipo de respuesta en la que existe una baja absorción, pero una alta sensibilidad del organismo, dando como resultado una alta toxicidad y mortandad (Zúñiga, 2002).

De acuerdo a Müller, (1980) y Buikema *et al.*, (1982), la selección de especies de prueba en toxicología acuática se debe basar en los siguientes criterios y requisitos a) la importancia y representabilidad ecológica y/o económica del organismo, b) su posición dentro de las tramas tróficas, que debe relacionarse directamente con otras especies importantes, c) de amplia distribución y de suficiente disponibilidad, además de que debe ser fácil de cultivar y/o mantener en condiciones de laboratorio, d) de respuesta sensible y uniforme a diferentes tóxicos y con diferentes condiciones y e) el que exista una cantidad adecuada de información sobre los principales aspectos biológicos y ecológicos de dicha especie.

Entre los microorganismos acuáticos que más se han empleado, para este fin se encuentran los microcrustáceos, llamados comúnmente pulgas de agua, pertenecientes al Orden Anomopoda, Familia Daphnidae. Entre las especies más empleadas dentro de esta familia se encuentra *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* y *Ceriodaphnia dubia* las cuales se han utilizado y estudiado por su alta sensibilidad y eficiencia (Walker, 1990).

En animales acuáticos, el proceso de capacitación de sustancias tóxicas, se efectúa mediante tres procesos principales: 1) A través de superficies respiratorias como las branquias, 2) adsorción del agua a las superficies corporales 3) a través del aparato digestivo. En los microcrustáceos, el proceso de capacitación se efectúa por adsorción en la superficie corporal (como la cutícula), seguida de difusión a través del epitelio branquial (Moreno y Devars, 1999).

Particularmente *D. magna* es considerada como especie de referencia internacional en la mayoría de los protocolos de evaluación existentes, publicados por entidades como la Organización Alemana de Estandarización (DIN, por sus siglas en inglés), la Organización Internacional de Estandarización (ISO, por sus siglas en Inglés), la Sociedad Norteamericana de Pruebas y Materiales (ASTM, por sus siglas en inglés) y la Agencia de Protección Ambiental, de los Estados Unidos de Norteamérica (U.S. EPA por sus siglas en inglés) ya que se ajusta perfectamente a los criterios de selección mencionados por Buikema *et al.*, (1982).

El empleo de *Daphnia magna* en este tipo de estudios, se fundamenta en la amplia información que se tiene sobre su biología, así como su sensibilidad a una amplia gama de tóxicos, además de su fácil cultivo en condiciones controladas de laboratorio en poco tiempo y espacio (ASTM, 1988, Muñoz y Ramírez, 1990).

Daphnia magna, habita en lagos y lagunas, se alimenta de algas microscópicas y sirve a su vez, de alimento a los peces. Los dáfidos tienen un ciclo de vida corto (3 a 4 semanas) a la

cual se le suma una fecundidad alta; una vez alcanzada su madurez, se reproduce cada 48 horas. Todos los descendientes son genéticamente idénticos, debido a que se reproducen por partenogénesis, lo que los hace ideales para pruebas de toxicidad (Goulden y Comotto, 1982; Paggi, 2002).

Con *Daphnia magna* se realizan generalmente, dos tipos de bioensayos: de toxicidad aguda y de toxicidad crónica. Las pruebas de tipo agudo, son las más sencillas y de corta duración, en la cual intervienen administraciones repetidas, generalmente sobre una base de horas o días. Estos estudios, indican las dosis que se utilizarán en estudios más prolongados. El efecto comúnmente evaluado es la mortalidad. Evaluándose la concentración del tóxico (conocido o desconocido) que es capaz de matar o inmovilizar al 50% de la población (CL_{50}) en 48 horas. Sin embargo, estas pruebas constituyen sólo la primera aproximación al conocimiento de la toxicidad de los compuestos y efluentes, ya que incluso, el no detectar respuestas letales (en tiempos de exposición cortos), no es sinónimo de inocuidad del efluente o material evaluado. Los estudios crónicos o a largo plazo, implican administraciones repetidas en un periodo de toda la vida o cuando menos una fracción importante de ella. Los fines de los estudios, son definir la naturaleza de la toxicidad de la sustancia tóxica y determinar un nivel de efecto nulo o de inocuidad (NEN). Este es el nivel de dosis máxima que no induce ningún signo de toxicidad en las especies de animales de prueba (Rand y Petrocelli, 1985; Lu, 1985).

Si una prueba de toxicidad aguda no detecta efecto alguno de mortandad o inmovilización, esto no siempre significa que el agua analizada no contenga sustancia alguna capaz de producir otro tipo de daño. Para estos casos, se utilizan las pruebas de toxicidad crónica en los que la evaluación se basa en la capacidad reproductiva o crecimiento de los individuos. Es posible, entonces, con estas técnicas dar en pocas horas una respuesta sobre la incidencia de efluentes industriales en un ambiente acuático (ASTM, 1988; EPS, 1990 a).

En todas las metodologías estandarizadas para ensayos toxicológicos con *D. magna*, se recomienda el uso de neonatos, que son juveniles que cuentan con menos de 24 horas de nacidos, y que constituyen la etapa más sensible y de respuesta más homogénea cuando se someten al efecto de compuestos tóxicos. Se ha observado además, que la talla de los neonatos de las primeras reproducciones es menor. De acuerdo a lo mencionado, se esperaría que la respuesta de intoxicación difiriera aún para la progenie de la misma hembra partenogenética mantenida con las mismas condiciones de cultivo, dependiendo de su número de reproducción consecutiva, y por lo tanto de su edad. Esto ha sido considerado en parte, en algunos métodos de prueba estandarizados que recomiendan descartar las primeras dos o tres progenies y sólo emplear para pruebas los neonatos de las subsecuentes reproducciones. Relacionado con este mismo aspecto está el de la duración adecuada de un lote activo de reproductores, pues resulta lógico suponer que la progenie de individuos viejos podría dar respuestas diferentes, además de la reducción en la fecundidad y el probable aumento en el intervalo entre reproducciones (Martínez- Jerónimo, 1995).

La sensibilidad de *Daphnia magna* ha sido evaluada mediante el empleo de tóxicos establecidos o de referencia con la finalidad de obtener la CL_{50} (concentración letal media) conocida en bioensayos de 48 y 96 horas (NOM – AA-087-1995-SCFI). Un tóxico de referencia, es un químico usado en pruebas de toxicidad, que provee resultados que pueden ser comparables

dentro y entre laboratorios. Pueden ser de un solo componente o más y son utilizados en programas que aseguren la calidad y control en pruebas de toxicidad acuática. Los tóxicos de referencia tiene como principales características las siguientes: amplio espectro tóxico, facilidad de obtención en forma pura, alta solubilidad en agua, persistencia y estabilidad en solución, estabilidad en almacenamiento y facilidad de cuantificación. La realización de dichas pruebas es importante, ya que de esta manera se asegura la confiabilidad de los resultados obtenidos (OECD, 1984).

El dicromato de potasio (DP), es considerado como un tóxico de referencia ampliamente empleado en pruebas de toxicidad acuática. Debe señalarse que en los ambientes acuáticos es importante, ya que su toxicidad se da principalmente por exposición a soluciones del compuesto, más que por formas absorbidas en partículas y en organismos bentónicos. Este tóxico se encuentra disponible en el agua intersticial, por lo que su sensibilidad es semejante a la de los individuos que se distribuyen en la columna de agua (Gendusa *et al.*, 1993). El dicromato de potasio, produce efectos citotóxicos y mutagénicos debido a su capacidad de ligarse con el DNA celular (Gorbi *et al.*, 1996). De tal manera, que es uno de los tóxicos que produce mayores impactos en los sistemas acuáticos receptores de descargas contaminantes.

El Zn es un constituyente esencial de varias metaloenzimas y se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos animales; cumple con funciones estructurales, catalíticas y reguladoras, necesarias para el crecimiento, el desarrollo y la diferenciación celular (Venegas-Pérez, 1996). A pesar de que el zinc es un metal esencial en los organismos, a elevadas concentraciones resulta tóxico para los organismos acuáticos (Calow, 1998). Pudiendo alterar la membrana branquial y reducir la eficiencia en el transporte de oxígeno (Manson, 1997; Calow, 1998).

La entrada del Zn en los crustáceos se incrementa cuando la biodisponibilidad es mayor, pero ésta, de igual forma se elimina, resultando en una cantidad constante en el cuerpo (Rainbow, 1997). Sin embargo, al incrementarse las concentraciones ambientales por arriba de un límite, la habilidad regulatoria se rompe y tiende a bioconcentrarse el zinc en el cuerpo.

El dodecil sulfato de sodio (DSS) es un surfactante aniónico; donde la principal acción tóxica, que se considera como la causa de muerte en los organismos es la reducción de la tensión superficial del agua inducida por el detergente. Esto modifica la permeabilidad de los epitelios branquiales, alterando los procesos de intercambio iónico y gaseoso (Espina *et al.*, 1986) y llega a destruir el epitelio branquial e intestinal (Ribelles *et al.*, 1995; Núñez, 2002), debido a una deformación de la membrana y organelos llevándolo hasta una lisis celular.

El fenol es considerado como un compuesto rápidamente biodegradable en el ambiente en una amplia variedad de condiciones. El fenol se volatiliza aceleradamente del suelo, pero no del agua. Este compuesto presenta un factor de bioacumulación bajo. El valor para *Daphnia* y algunas especies de algas, es moderado, debido a que el fenol es en seguida metabolizado por lo que no tiende a bioacumularse. El fenol puede causar problemas de disminución de oxígeno, relacionado a una alta concentración relativa en la superficie del agua. Esta es una de las causas por la que este tóxico origina la muerte en los organismos que habitan en ambientes acuáticos (Crookes, 1996).

La sensibilidad de respuesta, y por lo tanto la repetibilidad de las evaluaciones con *D. magna*, dependen en buena medida de las condiciones de cultivo, por lo que es preciso garantizar la calidad óptima de los neonatos, a fin de evitar que la respuesta observada esté sesgada por las condiciones de mantenimiento de los padres, y que sea exclusivamente reflejo del tóxico evaluado (Martínez-Jerónimo, 1995).

En vista de lo anterior, es importante realizar un control de los organismos de prueba, mediante el empleo de diferentes tóxicos de referencia con el propósito de garantizar la precisión y reproducibilidad en los resultados, evaluando su efecto y considerando algunos factores biológicos (alimentación) y fisicoquímicos que puedan influir en los mismos.

ANTECEDENTES

Las pruebas con nuevas sustancias químicas empleando *D. magna* han aumentado, como resultado del incremento de la industrialización, la alta demanda de productos químicos, así como, la gran cantidad y variedad de sustancias tóxicas de origen industrial y urbano, que son vertidos en los cuerpos de agua dando como resultado un aumento cada vez mayor de la contaminación.

Breukelman, (1932) encontró que *Daphnia magna* era más susceptible al cloruro de mercurio durante la primera descendencia. Ésta se veía disminuida a medida que la edad se incrementaba. También observó que el cese de los movimientos acuáticos (que propuso llamar inmovilización), se daba un poco después de que los movimientos de *D. magna* cesaban, pero el latido del corazón y respiración continuaban mucho más tiempo que en otra especie *Daphnia pulex*.

Posteriormente, Anderson (1944), evaluó 42 sustancias que se encontraban presentes en descargas industriales, evaluando los límites de concentraciones a las cuales se producía la inmovilización de *D. magna*. Este autor encontró que los límites de concentración se definían como las concentraciones más altas a las cuales se da la caída o inmovilización de los organismos con exposiciones prolongadas.

Otros investigadores realizaron también estudios semejantes evaluando la sensibilidad de *D. magna* con sustancias tóxicas, como por ejemplo los realizados por Freeman (1953), quien evaluó la toxicidad de diferentes sulfanatos, que estaban presentes en descargas industriales, comparando la toxicidad de los sulfanatos aromáticos y alcalinos, observando que aparentemente, los aromáticos eran más tóxicos.

Leeuwangh (1978), considera que *D. magna*, es una especie que permite establecer criterios de calidad del agua y es además, un organismo de prueba bastante apropiado para: a) evaluaciones de la toxicidad aguda de compuestos químicos, en condiciones estandarizadas (clasificación de la toxicidad), b) monitorear efluentes, y c) conducción de pruebas de carácter legal. Por su parte Nikunen y Micttinen (1985), concluyen también que la prueba de toxicidad aguda con *D. magna* resulta muy adecuada para la evaluación de la toxicidad de efluentes.

Aunado a estos trabajos, se han realizado estudios para examinar la precisión de *D. magna* en pruebas de toxicidad. Gersich *et al.*, (1986), mantuvieron controlados los factores ambientales que pudieran influir en los resultados y cuantificaron las variaciones en la CL₅₀, haciendo réplicas en iguales y diferentes tiempos. Las pruebas de toxicidad aguda que fueron conducidas en el laboratorio se hicieron con el fin de determinar la toxicidad del clorobenceno, cloroformo, p-dicloroobenceno, glicol, etileno y fenol.

Los resultados obtenidos por diferentes investigadores, son comparables y en general *Daphnia magna* es menos tolerante que otros organismos (como los peces) a sustancias tóxicas (Baudo, 1987).

Cowgill y Milazzo, (1991a) observaron la respuesta de carbonatos alcalinos y cloruro de sodio, en dos especies; *D. magna* y *Ceriodaphnia dubia*. Encontraron que *D. magna* era más tolerante, a altos niveles de alcalinidad y al cloruro de sodio que *C. dubia*. La sensibilidad de *D. magna* y *C. dubia* a varios niveles de carbonato y alcalinidad y al tóxico de referencia NaCl fueron examinados en agua reconstituida usando tres medios de cultivo: *D. magna* fue más tolerante a altos niveles de alcalinidad y al cloruro de sodio que *C. dubia*.

Oikari *et al.*, (1992), probaron diferentes tóxicos: sulfato de cobre, sulfato de cadmio, sulfato de zinc y dicromato de potasio, usando *Daphnia magna*. Los valores de CL₅₀ se obtuvieron a 48 horas de exposición con un límite de confianza del 95%. El cadmio resultó ser el más tóxico.

Para determinar la toxicidad de productos químicos y el monitoreo de efluentes industriales y sistemas de tratamiento de aguas residuales fueron probados diferentes tóxicos de referencia como: sulfato de cobre, sulfato de zinc, cloruro de cadmio, dicromato de potasio, fenol, dodecil sulfato de sodio y tolueno. Los resultados de este estudio indican que el uso de tóxicos, funciona como indicador de estrés subletal en pruebas de toxicidad, muy útil, de costo efectivo, corto tiempo de exposición, y simplicidad en el experimento (Jansen y Persoone, 1993).

Fargasová (1994), empleó a *Daphnia magna* y a *Tubifex tubifex*, que son dos organismos importantes en la cadena alimentaria, a los que calculó la CL₅₀ con diferentes metales (As, Pb, Cr, Hg y Cd) en forma de sales. Observó que *T. tubifex* es más resistente a los efectos tóxicos de los metales pesados, pero entre ambas especies existen diferencias entre la toxicidad de los metales. Además, observó que los efectos tóxicos de los metales pueden variar dependiendo de los factores ambientales (como pH, temperatura etc.) de las propiedades fisicoquímicas del agua, de los elementos probados y las especies biológicas empleadas.

Knops *et al.*, (2001), presentaron la relación entre los cambios en la fisiología energética de *Daphnia magna* y alteraciones en el crecimiento, desarrollo y reproducción, encontrando que los químicos no cambian los costos metabólicos. Sin embargo, inducen alteraciones en la ganancia neta del carbono, crecimiento y reproducción.

Por otra parte, se han realizado estudios que incluyen la estandarización de la técnica o procedimiento que se debe de seguir durante un ensayo de toxicidad empleando *D. magna*. Entre los que se encuentran, el realizado por Frear y Boyd (1967). Ellos detallan las condiciones óptimas para el cultivo de *D. magna*, bajo condiciones controladas de laboratorio, para utilizarlas en pruebas de toxicidad. Estos autores lograron mantener un cultivo inicial, con la finalidad de que las hembras se reprodujeran asexualmente por partenogénesis teniendo una población homogénea, con la cual evaluaron residuos de pesticidas. Encontraron que algunos de éstos, eran extremadamente tóxicos a *D. magna* en concentraciones menores a partes por trillón en el agua.

La Toxic Substances Controls Act (1976), (TSCA por sus siglas en inglés), y la Resource Conservation and Recovery Act (1976), (RCRA por sus siglas en inglés), dictaminaron evaluar los efectos en la biota acuática por exposición a materiales tóxicos. Debido a esto, la ASTM, (1978) publicó los lineamientos de estandarización de las técnicas y evaluó el efecto crónico en el ciclo de vida en pruebas de toxicidad, con especies acuáticas, entre ellas *D. magna*. Estas

pruebas facilitaron la comparación de los datos de toxicidad entre diferentes especies de prueba y entre diferentes sustancias químicas.

La U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA por sus siglas en inglés), desde 1980, ha conducido pruebas de toxicidad aguda, utilizando tóxicos y estableciendo métodos de prueba para la evaluación de efluentes con diferentes especies como son microcrustáceos (*D. magna*) bacterias y algas verdes (U.S. EPA, 1982).

Posteriormente, la ASTM (1988), publicó una guía para la conducción y renovación del método de prueba de toxicidad con *D. magna*, dando a conocer el uso de una técnica renovada, y aclarando su uso con otras especies de *Daphnia*. Además, este mismo documento puede sufrir modificaciones especiales de acuerdo a las necesidades y circunstancias al momento de desarrollar una prueba de toxicidad, con el propósito de comparar resultados. Este procedimiento es aplicable a muchos productos químicos, comerciales y mezclas.

La Environmental Protection Conservation and Protection Environment de Canada (EPS 1990a), han realizado trabajos, sobre nuevas pruebas de toxicidad acuática con *D. magna*, evaluando y controlando sustancias individuales y mezclas, las cuales están presentes en aguas industriales residuales y en aguas municipales. Implementaron programas en laboratorios, que aseguren y garanticen resultados, para posteriormente llevar a cabo comparaciones con otros laboratorios, con los mismos intereses. Además, de establecer el método de prueba para la determinación de la letalidad aguda de efluentes (EPS, 1990b).

Aunado a estos estudios, en México se han realizado trabajos que norman aspectos toxicológicos y evaluaciones rutinarias de productos potencialmente tóxicos. En 1994, el gobierno adoptó una nueva legislación concerniente a los niveles máximos de descarga en aguas receptoras. Esta ley federal especifica el procedimiento para un método analítico para determinar las concentraciones de tóxicos orgánicos e inorgánicos, aplicables a 28 sectores de la industria. Incluye el uso de organismos de prueba como *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* y *Artemia franciscana*, como una alternativa tecnológica para evaluar la calidad del agua (Pica-Granados *et al.*, 2000).

Como consecuencia de lo anterior, y la necesidad de reestablecer un control sobre las descargas de sustancias tóxicas a los cuerpos de agua en México, la estandarización de las pruebas se volvió urgente. En 1995, surge la metodología de análisis biológico para la determinación de la calidad de cuerpos de agua, aguas residuales y sustancias puras y combinadas. Mediante pruebas de toxicidad empleando *Daphnia magna*: Norma Oficial Mexicana, Prueba de Toxicidad Aguda con *Daphnia magna* Straus (Cladocera Crustácea) Método de Prueba SCFI (1995). En ella se enumeran los pasos a seguir para el cultivo y mantenimiento de *D. magna*; la evaluación de sensibilidad con tóxicos de referencia y el método de prueba para la evaluación de efluentes.

México participó recientemente en un programa de intercalibración y estandarización de una batería de métodos de prueba de toxicidad aguda (conocido como WaterTox) que incluía la participación de Universidades de Argentina, Chile, Colombia, Canadá, la India y Ucrania. Las pruebas incluían un estudio con lechuga (*Lactuca sativa*), *Allium sp.*, *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* y el nemátodo *Panagrellus redivivus* (Pica-Granados *et al.*, 2000).

Por otro lado, son muchos los estudios relacionados con el tipo de alimento suministrado a *Daphnia magna*, durante pruebas de toxicidad. Stephenson y Watts (1984), observaron que el tipo de alimento modifica la sensibilidad al cobre con *D. magna*, con animales alimentados con algas, ya que son menos sensibles que aquellos alimentados con diferentes dietas artificiales. La realización de pruebas de toxicidad, se llevaron al cabo comparando la mortalidad de los dáfidos en presencia y ausencia de alimento y con dáfidos de un día a siete días de nacidos, concluyeron que la falta de alimento incrementa la mortalidad de *D. magna* aún cuando estos no mueren directamente por la falta de alimento, esto puede influenciar los valores de CL₅₀.

Taylor (1985), observó que la limitación en la concentración de alimento puede afectar el crecimiento y la reproducción de los organismos, como consecuencia la producción de neonatos se ve disminuida significativamente.

Enserink *et al.*, (1990) observaron que el nivel del alimento de *Chlorella pyrenoidosa* afectó el tamaño y el cuerpo de los neonatos y la sensibilidad de crianza de *D. magna* durante pruebas de toxicidad agudas. Cox *et al.*, (1992) reportaron que tanto la cantidad, como las tallas de los neonatos de *D. magna* se modifican por las variaciones en las raciones de alimento materno.

Kungolos y Aoyama (1993), evaluaron la toxicidad de dos metales, cadmio y cromo en ausencia de alimento. Administraron el metal y observaron que el cadmio es más tóxico para *D. magna* que para otros organismos. Probaron además, durante cuatro días, diferentes concentraciones de cadmio, con alimento (*Chlorella ellipsoidea*) y sin alimento. Entre los resultados que obtuvieron se encuentran que el efecto del alimento dependía de la concentración del tóxico, en algunos casos (primer día) la presencia de *Chlorella* hacía que la toxicidad disminuyera y en otros casos (del segundo día en adelante) su presencia provocaba un alto porcentaje de mortalidad, es decir aumentaba la toxicidad. Una posible explicación a este fenómeno es que *Chlorella* sufría un significativo peligro por el cadmio únicamente en un rango de concentraciones que van de menor a mayor magnitud.

Sin embargo, Martínez *et al.*, (1994), observaron que la concentración del alimento tenía un efecto sorprendente sobre la supervivencia y reproducción en *D. magna*. El uso de diferentes especies de microalgas como alimento afecta la capacidad de *D. magna* para producir neonatos como organismos de prueba. Asimismo, observaron que las condiciones del alimento durante el cultivo de hembras para la producción de neonatos, debe ser controlada cuidadosamente, ya que los resultados pueden ser fuertemente influidos por el alimento y por los niveles en que se suministre.

Martínez-Jerónimo y García-González (1994), observaron que el suministro de alimento es un factor importante que influye en la respuesta de los organismos al tóxico durante pruebas subcrónicas y crónicas. Probaron *Scenedesmus incrassatulus*, como alimento y DSS como tóxico en *Daphnia magna*.

Por otra parte, Cañizares–Villanueva *et al.*,(1999), elaboraron un estudio de toxicidad aguda con *D. magna* utilizando efluentes, en los cuales previamente se habían utilizado dos cultivos distintos de *Chlorella vulgaris* (algas inmovilizadas y algas en suspensión) para remover cadmio, zinc y una mezcla de ambos metales. Observaron que en general el cultivo de *Chlorella* inmovilizada tuvo un mayor porcentaje de remoción de metales y además, que los valores de CL_{50} obtenidos para los cultivos inmovilizados, fueron más altos que los obtenidos para los cultivos en suspensión.

JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas en el control de calidad de aguas residuales y vertidos tóxicos es la falta de una metodología adecuada para caracterizar el riesgo ambiental, es decir, los efectos tóxicos de las sustancias contaminantes presentes en esas aguas. Las aguas residuales y vertidos tóxicos incluyen mezclas de contaminantes complejos procedentes de descargas industriales y domésticos. Por ello, para su control es preciso desarrollar métodos cuantitativos paralelos a la caracterización química y ecológica, relativamente rápidos y económicos. Siendo las pruebas de toxicidad, adecuadas para este propósito, empleando organismos de prueba.

Las pruebas de toxicidad son una alternativa viable para la evaluación de la calidad del agua, debido a su reducido costo de realización y a la rapidez con que pueden predecir el grado de afectación por sustancias tóxicas que se presenta en un ecosistema.

Para la realización de pruebas de toxicidad con organismos, éstos se deben seleccionar tomando en cuenta criterios como son: contar con una amplia información en cuanto a su biología y ecología, poder predecir los efectos de los contaminantes en el ambiente con ellos y poder realizar comparaciones de los resultados entre laboratorios, facilidad de cultivo, mantenimiento y, sobre todo, la economía y simplicidad en las pruebas.

De acuerdo a lo anterior, *Daphnia magna* cumple con la mayoría de los puntos antes mencionados, representando ventajas en su empleo como son: alta sensibilidad a una amplia gama de tóxicos orgánicos e inorgánicos, ciclo de vida corto y un cultivo en laboratorio que permite realizar pruebas rápidas y económicas, (comparado con los peces, moluscos y macrocrustáceos). Su reproducción por partenogénesis asegura la uniformidad en la respuesta a las condiciones de la prueba. Del mismo modo, *D. magna* es un organismo representativo del zooplancton de ambientes dulceacuícolas y es parte de la base de la cadena alimentaria de esos ecosistemas. Por lo tanto, cualquier afectación que estos organismos presenten repercutirá en otros organismos en niveles superiores.

Daphnia magna es un organismo que ha sido aprobado oficialmente en pruebas de toxicidad en varios países como Francia, Noruega, Suecia, Canadá y Estados Unidos. Otros países han implementado la metodología, aunque en algunos de ellos, esta especie no es residente, como es el caso de México, en donde su hábitat se ha reportado en la parte Norte del país principalmente. La Organization for Economic Cooperation and Development 1984, (OECD por sus siglas en Inglés) menciona que es más importante tener experiencia con especies prueba, que sí son localmente encontradas en el agua. Aunque el uso de especies residentes no es necesario. Las especies de prueba que se parecen a las especies residentes con relación al hábitat, alimento, fisiología y comportamiento son preferibles y pueden ser consideradas.

La decisión de elegir a *D. magna* como organismo de prueba se justifica porque se trata de una especie de referencia internacional. Sin embargo, al ser una especie que no se distribuye naturalmente en nuestro país, se precisa que los laboratorios que quieran o puedan realizar este tipo de pruebas, cuenten con los lotes de reproductores perfectamente establecidos y controlados, pues sería imposible obtener cepas de esta especie a partir de colectas naturales.

El cultivo, mantenimiento y pruebas con *D. magna* han sido implementados basándose en diversas metodologías de otros países como Brasil (Norma CETEEBLS, 1986), Estados Unidos (ISO, 1982) y Canadá (EPS 1/RM/14 y 15, 1990 a y b). Tomando en cuenta las necesidades del país, y dando como resultado el establecimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-AA-087-1995-SCFI. Análisis de agua: Evaluación de Toxicidad Aguda con *Daphnia magna* Straus (Crustácea: Cladóceras) desde hace algunos años.

No obstante, que en México existe una Norma Oficial para realizar pruebas de toxicidad, con dicho organismo, son pocos los estudios efectuados con más de un tóxico de referencia que evalúen la sensibilidad de los organismos de prueba. Lo anterior con el objeto de asegurar un control de calidad adecuado que garantice la precisión, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados.

El efecto de algunos tóxicos de referencia en organismos utilizados para pruebas de toxicidad ha sido estudiado, reportándose algunos valores o rangos de CL_{50} para compuestos orgánicos e inorgánicos. Sin embargo, estos rangos suelen ser muy amplios como es el caso del fenol, para el cual se reportan valores que van de 7 a 20 mg/l. Por lo tanto, se hace necesario realizar nuevas pruebas las cuales permitan establecer con mayor precisión las CL_{50} . Debido a la variabilidad en la sensibilidad que presentan los mismos en general, se requiere la precisión del método a través del tiempo.

En el presente estudio se determinarán las CL_{50} de cuatro tóxicos de referencia que son comúnmente empleados y referidos en pruebas de toxicidad aguda, evaluando además sensibilidad y potencia de cada uno en *D. magna*. Se compararán los efectos con lo reportado en bibliografía y se observará el efecto que ejerce el alimento en este tipo de pruebas.

OBJETIVOS.

Objetivo general

- **Establecer la CL_{50} de diferentes tóxicos de referencia en *Daphnia magna*, mediante pruebas de toxicidad aguda.**

Objetivos particulares

- Determinar mediante pruebas de toxicidad aguda la CL_{50} del dicromato de potasio, sulfato de zinc, dodecil sulfato de sodio y fenol empleados como tóxicos de referencia.
- Establecer la toxicidad en *D. magna* en condiciones de alimento y sin alimento, de los tóxicos de referencia.

Metas

- Implementar la metodología de toxicidad aguda con *D. magna* en un laboratorio del Instituto Mexicano del Petróleo, a partir de un procedimiento normalizado.
- Contar con un cultivo stock de *D. magna* con condiciones controladas, con el fin de realizar pruebas de toxicidad futuras.

RESULTADOS

Los resultados de mortalidad y CL₅₀ de las pruebas exploratorias, definitivas y con alimento quedaron registrados en formatos de prueba, diseñados para este propósito, así como el mantenimiento y control de los organismos, la alimentación, limpieza y calidad del agua reconstituida (anexo 6).

A. Dicromato de Potasio.

PRUEBAS EXPLORATORIAS

En la primera y segunda prueba los organismos sobrevivieron a todo el intervalo de concentraciones nominales propuesto por la Norma CETEBS – 018 (1986), por lo que se realizaron más pruebas incrementándose la máxima concentración de 0.18 a 0.3 mg/l (pruebas 3, 4 y 5 Tabla 2). En la prueba 6 con intervalos de 0.04, se observó una mortalidad del 75% en la máxima concentración. Se determinó que la mortalidad al 100% de los organismos se encontraba por arriba de 0.40 mg/l, se obtuvo una CL₅₀ de 0.36 (Tabla 2).

Se calculó la CL₅₀ con el 100% de mortalidad en la máxima concentración. Por lo tanto, se incrementaron las concentraciones desde 0.2 como mínima hasta 0.5 mg/l como máxima (pruebas 7, 8 y 9; Tabla 3). El 100% de mortalidad se obtuvo en la prueba 9, con una CL₅₀ = 0.34 mg/l, y se confirmó con una última prueba (10), la CL₅₀ = 0.35 ± 0.01mg/l (Tabla 3).

Tabla 2. Pruebas exploratorias para obtener la CL₅₀ de *D. magna* con DP. Número de organismos expuestos n= 20

PRUEBA 1 y 2		PRUEBA 3		PRUEBA 4		PRUEBA 5		PRUEBA 6	
Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos
0.18	0	0.20	0	0.30	3	0.38	11	0.40	15
0.15	0	0.17	0	0.25	1	0.35	7	0.36	11
0.12	0	0.14	0	0.20	0	0.31	3	0.32	7
0.09	0	0.11	0	0.15	0	0.28	0	0.28	5
0.06	0	0.08	0	0.10	0	0.25	0	0.24	2
0.03	0	0.05	0	0.05	0	0.22	0	0.20	0
Testigo	0	Testigo	0	Testigo	0	Testigo	0	Testigo	0
CL₅₀: 0		CL₅₀: 0		CL₅₀: 0		CL₅₀: 0.37		CL₅₀: 0.36	

Tabla 3. Pruebas exploratorias para obtener el 100% de mortalidad y la CL₅₀ de *D. magna* con DP. Número de organismos expuestos n= 20

PRUEBA 7		PRUEBA 8		PRUEBA 9		PRUEBA 10	
Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos
0.44	19	0.45	18	0.50	20	0.50	20
0.40	15	0.40	13	0.45	18	0.45	17
0.36	11	0.35	7	0.40	14	0.40	13
0.32	9	0.30	3	0.35	11	0.35	9
0.28	7	0.25	1	0.30	7	0.30	6
0.24	4	0.20	0	0.25	5	0.25	2
Testigo	0	Testigo	0	Testigo	0	Testigo	0
CL ₅₀ : 0.34		CL ₅₀ : 0.36		CL ₅₀ : 0.34		CL ₅₀ : 0.35	

PRUEBAS DEFINITIVAS

Con los resultados anteriores, se llevaron a cabo las pruebas definitivas de toxicidad aguda a 48 horas de exposición con DP en *D. magna*. Se realizaron 6 pruebas, con un testigo, con un rango de concentraciones de 0.25 como mínimo y 0.50 mg/l como máximo, con intervalos de 0.05 mg/l, se obtuvo una CL₅₀= 0.37 ± 0.015 mg/l. Con un coeficiente de variación de 9.92% (Tabla 4).

El análisis estadístico (ANOVA) realizado a las diferentes pruebas, mostró que no hubo diferencias significativas (p>0.05) entre ellas.

Tabla 4. Resultados de toxicidad aguda en pruebas definitivas a 48 horas de exposición para obtener la CL₅₀ de *Daphnia magna* con DP. Número de organismos expuestos n=30.

CONCENTRACIÓN mg/l	PRUEBA 1		PRUEBA 2		PRUEBA 3		PRUEBA 4		PRUEBA 5		PRUEBA 6	
	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas
0.50	30	100	29	97	30	100	29	97	30	100	27	90
0.45	21	70	18	60	26	87	24	80	27	90	23	77
0.40	17	57	14	47	19	63	19	63	24	80	16	53
0.35	15	50	10	33	14	47	15	50	16	53	8	27
0.30	11	37	6	20	4	13	11	37	13	43	5	17
0.25	6	20	0	0	2	7	4	13	5	17	2	7
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL ₅₀	CL ₅₀ : 0.35		CL ₅₀ : 0.43		CL ₅₀ : 0.37		CL ₅₀ : 0.35		CL ₅₀ : 0.32		CL ₅₀ : 0.38	

PRUEBA CON ALIMENTO

La prueba con alimento sirvió para determinar su influencia en la toxicidad aguda del DP en *D. magna*. Se realizó con el mismo rango de concentraciones nominales que en las pruebas definitivas (Tabla 5). La CL₅₀ obtenida fue de 0.31 mg/l.

Tabla 5. Resultados de la toxicidad aguda con alimentación y 48 horas de exposición con DP en *D. magna*. Número de organismos expuestos n= 60.

CONCENTRACIÓN (mg/l)	No DE ORGANISMOS MUERTOS 48 Horas	MORTALIDAD (%) 48 Horas
0.50	59	98
0.45	57	90
0.40	54	85
0.35	49	82
0.30	20	33
0.25	6	10
Testigo	0	0
CL ₅₀ : 0.31 mg/l		

COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS DEFINITIVAS CON ALIMENTO Y SIN ALIMENTO

A partir del modelo $y = mx + b$ se obtuvieron las ecuaciones que describieron la mortalidad de *D. magna* con y sin alimento, expuestos al DP. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Las regresiones obtenidas fueron significativas con un coeficiente mayor a 0.80.

Tabla 6. Promedio de los porcentajes de mortalidad y transformados en pruebas definitivas y con alimento, empleando DP en *Daphnia magna*.

CONCENTRACIÓN (mg/l)	Promedio del porcentaje de mortalidad en pruebas definitivas y transformada	Porcentaje de mortalidad en prueba con alimento y transformada
0.50	97.33	98
0.45	77.34	90
0.40	60.47	85
0.35	43.48	82
0.30	27.87	33
0.25	10.67	10
Testigo	0.00	0
	CL ₅₀ = 0.36	0.31
	Y= 194.52 X -17.239	Y = 223.22 X -14.891
	R ² = 0.80	R ² = 0.83

El análisis de ANCOVA efectuado a los resultados de las pruebas con y sin alimento para el DP, mostró que no existen diferencias significativas ($p>0.05$) entre las pendientes y las ordenadas al origen de ambas pruebas. Por lo que la intensidad del efecto y la sensibilidad de *D. magna* expuesto al DP con y sin alimento es la misma. Lo cual corrobora que la tolerancia de este tóxico es independiente al suministro del alimento (Figura 1).

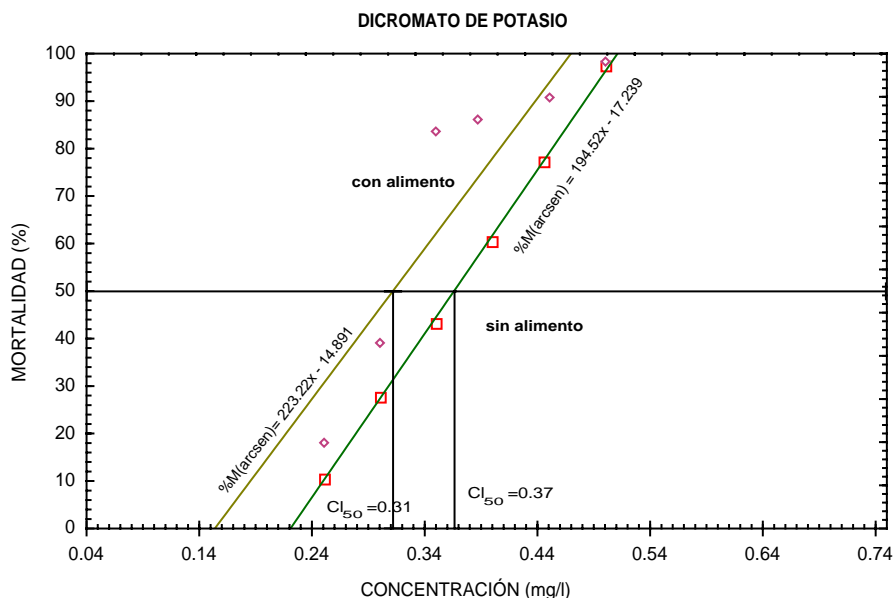


Fig.1 Toxicidad aguda del DP en *D. magna* con exposición con y sin alimento. Se incluyen los valores de la CL_{50} a 48 horas y la ecuación resultante de la regresión lineal, de los porcentajes de mortalidad transformados ($\sqrt{\arcsen}$) en ambas pruebas, donde la pendiente = a la intensidad tóxica y la ordenada al origen = sensibilidad.

B.- Sulfato de zinc

PRUEBAS EXPLORATORIAS

El rango de concentraciones que se aplicó fue el propuesto por Belabed *et al.*, (1993). Sin embargo, se observó una mortalidad del 100% en las dos primeras concentraciones máximas (pruebas 1 a 4, Tabla 7), aún cuando se bajó el rango de las concentraciones de 14 hasta 6.0 mg/l. En la prueba 7 se continuó bajando el rango de concentraciones y se obtuvo una mayor homogeneidad en la mortalidad, el rango de concentraciones final fue de 0.5 a 5 mg/l. Ésta se corroboró con una prueba más (8), donde se observaron resultados similares en cuanto a la mortalidad de los organismos, no así en la CL_{50} , donde se obtuvo una $CL_{50} = 2.23$ y 1.90 mg/l respectivamente. El examen estadístico no mostró diferencia significativa entre la CL_{50} de estas últimas pruebas.

Tabla 7. Pruebas exploratorias para obtener la CL_{50} de *D. magna* con SZ. Numero de organismos expuestos n=20.

PRUEBA 1		PRUEBA 2		PRUEBA 3		PRUEBA 4	
Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos
14	20	12.0	20	10	20	8.0	20
12	20	10.0	20	8	20	6.0	20
10	20	8.0	19	6	19	4.0	17
8	19	6.0	18	4	18	2.0	11
6	13	4.0	15	2	15	1.0	7
4	7	2.0	0	1	4	0.5	0
Testigo	0	Testigo	0	Testigo	0	Testigo	0
$CL_{50}: 5.30^a$		$CL_{50}: 3.28^b$		$CL_{50}: 1.93^c$		$CL_{50}: 1.55^c$	
PRUEBA 5		PRUEBA 6		PRUEBA 7		PRUEBA 8	
Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos
8.0	20	6.0	20	5.0	20	5.0	20
6.0	17	5.0	20	4.0	16	4.0	17
4.0	14	4.0	15	3.0	11	3.0	14
2.0	10	3.0	9	2.0	9	2.0	11
1.0	3	2.0	5	1.0	4	1.0	7
0.5	0	1.0	2	0.5	1	0.5	3
Testigo	0	Testigo	0	Testigo	0	Testigo	0
$CL_{50}: 2.13^c$		$CL_{50}: 2.67^c$		$CL_{50}: 2.23^c$		$CL_{50}: 1.90^c$	

Letras iguales denotan que existen diferencias significativas ($p < 0.05$)

PRUEBAS DEFINITIVAS

Se realizaron 6 pruebas con un testigo, con un rango de concentraciones de 0.5 como mínima y 5.0 mg/l como máxima, con intervalos de 1.0 mg/l (Tabla 8). Se obtuvo una $CL_{50} = 2.075 \pm 0.099$ mg/l y un coeficiente de variación de 11.69%. El análisis estadístico de varianza (ANOVA) realizado a las diferentes pruebas, no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el resultado de las pruebas.

Tabla 8. Resultados de toxicidad aguda en pruebas definitivas a 48 horas de exposición para obtener la CL₅₀ de *D. magna* con SZ. Numero de organismos expuestos n=30.

CONCENTRACIÓN mg/l	PRUEBA 1		PRUEBA 2		PRUEBA 3		PRUEBA 4		PRUEBA 5		PRUEBA 6	
	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas
5.0	28	93	28	93	29	97	30	100	29	97	28	93
4.0	25	83	24	80	24	80	25	83	23	77	25	83
3.0	20	67	20	67	19	63	20	67	19	63	20	67
2.0	17	57	14	47	14	46	13	43	16	53	17	57
1.0	10	33	8	27	9	30	7	23	11	37	11	37
0.5	2	7	4	13	4	13	3	10	5	17	4	13
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL₅₀:	CL₅₀: 1.95^a		CL₅₀: 2.25^a		CL₅₀: 2.36^a		CL₅₀: 2.25^a		CL₅₀: 1.87^a		CL₅₀: 1.77^a	

PRUEBA CON ALIMENTO

La prueba con alimento determinó su influencia en la toxicidad aguda del SZ para *D. magna*. Ésta se realizó con las mismas concentraciones de las pruebas definitivas (Tabla 9). La CL₅₀ que se obtuvo fue de 2.98 mg/l.

Tabla 9. Resultados de toxicidad aguda de *D. magna* con alimento a 48 horas de exposición con SZ. Numero de organismos expuestos n= 60.

CONCENTRACIÓN (mg/l)	No ORGANISMOS MUERTOS 48 Horas	MORTALIDAD (%) 48 Horas
5.0	56	93
4.0	48	80
3.0	31	52
2.0	20	33
1.0	12	20
0.5	4	7
Testigo	0	0
CL₅₀: 2.98 mg/l		

COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS DEFINITIVAS CON ALIMENTO Y SIN ALIMENTO

A partir del modelo $y = mx + b$ se obtuvieron las ecuaciones que describen la mortalidad de *D. magna* con alimento y sin alimento expuestos al SZ. Los resultados se muestran en la Tabla 10. Las regresiones obtenidas fueron significativas con un coeficiente mayor a 0.94.

Tabla 10. Promedio de los porcentajes de mortalidad y transformados en pruebas definitivas y con alimento, empleando SZ en *D. magna*.

CONCENTRACIÓN (mg/l)	Promedio del porcentaje de mortalidad en pruebas definitivas y transformada	Porcentaje de mortalidad en prueba con alimento y transformada
5.0	95.50	93
4.0	81	80
3.0	65.67	52
2.0	50.67	33
1.0	31.17	20
0.5	12.17	7
Testigo	0	0
	CL ₅₀ : 2.075	2.98
	Y = 18.765 X= 6.4738	Y = 19.085 X= -1.546
	R ² = 0.978	R ² = 0.9916

El análisis estadístico de ANCOVA efectuado a los resultados de las pruebas de toxicidad con alimento y sin alimento del SZ, mostró que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre sus pendientes (18.765 y 19.085). Por lo tanto, la intensidad del efecto es la misma (Figura 2). Sin embargo, la sensibilidad del dáfhnido expuesto al SZ sin alimento es mayor (-1.54), que en las pruebas en donde no fueron alimentados.

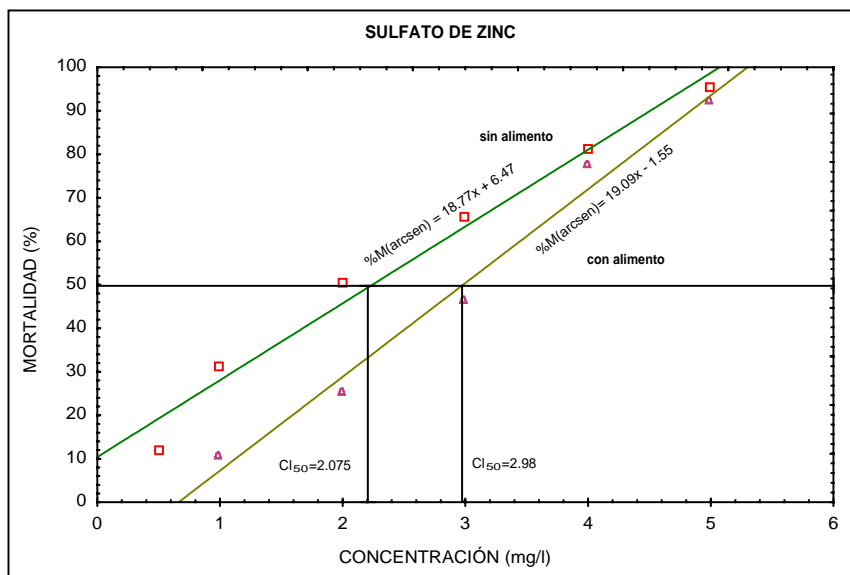


Fig.2 Toxicidad aguda del SZ en *D. magna* con exposición con y sin alimento. Se incluyen los valores de la CL₅₀ 48 horas y la ecuación resultante de la regresión lineal, de los porcentajes de mortalidad transformados ($\sqrt{\text{arcosen}}$) en ambas pruebas, donde la pendiente = a la intensidad tóxica y la ordenada al origen = sensibilidad.

C.- FENOL

PRUEBAS EXPLORATORIAS

Para este tóxico se tomó como referencia lo reportado por LeBlanc, (1980). La mortalidad del 100% se presentó en la primera concentración (prueba 1). Sin embargo, en las siguientes pruebas se bajó la concentración máxima a 17 mg/l con intervalos de 2.5 mg/l (pruebas 2 y 3). Se decidió realizar una concentración máxima intermedia entre éstas dos últimas (prueba 4). De acuerdo a estos resultados, se procedió a confirmar con 2 prueba más (prueba 5 y 6, Tabla 11). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las pruebas realizadas.

Tabla 11. Pruebas exploratorias para obtener el 100% de mortalidad y la CL_{50} de *D. magna*. Número de organismos expuestos $n = 20$

PRUEBA 1		PRUEBA 2		PRUEBA 3	
Concentración mg/l	No. organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. organismos muertos
18.0	20	17.0	20	17.0	19
16.0	16	15.0	17	15.0	17
14.0	12	13.0	15	13.0	15
12.0	12	11.0	12	11.0	12
10.0	10	9.0	9	9.0	8
8.0	4	7.0	5	7.0	3
6.0	0	5.0	3	5.0	1
Testigo	0	Testigo	0	Testigo	0
CL_{50}: 10.07		CL_{50}: 9.33		CL_{50}: 9.94	
PRUEBA 4		PRUEBA 5		PRUEBA 6	
Concentración mg/l	No. organismos muertos	Concentración mg/l	No. organismos muertos	Concentración mg/l	No. organismos muertos
17.5	19	17.5	20	17.5	20
15.0	15	15.0	17	15.0	15
13.0	12	12.0	12	12.0	11
11.0	9	10.0	8	10.0	8
9.0	6	7.5	4	7.5	7
7.0	4	5.0	1	5.0	2
5.0	1	2.5	0	2.5	1
Testigo	0	Testigo	0	Testigo	0
CL_{50}: 10.67		CL_{50}: 9.45		CL_{50}: 10.50	

PRUEBAS DEFINITIVAS

El rango de concentraciones definitivo fue de 2.5 a 17.5 mg/l con intervalos de 2.5 mg/l. Se realizaron 6 pruebas considerando un testigo. Los resultados se muestran en la Tabla 12, se obtuvo una $CL_{50} = 8.37 \pm 1.40$ mg/l. El análisis de varianza realizado a las diferentes pruebas no mostró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ellas.

Tabla 12. Resultados de toxicidad aguda en pruebas definitivas a 48 horas de exposición para obtener la CL_{50} de *D. magna* con fenol. Número de organismos expuestos n=30.

CONCENTRACIÓN mg/l	PRUEBA 1		PRUEBA 2		PRUEBA 3		PRUEBA 4		PRUEBA 5		PRUEBA 6	
	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 8 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 24 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas
17.5	29	97	30	100	30	100	28	93	29	97	26	97
15.0	27	90	23	77	24	80	26	87	25	83	22	73
12.5	19	63	19	63	21	70	21	70	21	70	19	63
10.0	14	47	12	40	18	60	18	60	18	60	17	56
7.5	8	17	6	20	15	50	13	43	12	40	15	50
5.0	5	0	2	3	11	36	9	30	7	23	9	30
2.5	1	0	0	0	5	17	3	10	2	7	3	10
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL_{50} :	CL_{50} : 10.71 ^a		CL_{50} : 10.84 ^a		CL_{50} : 7.50 ^a		CL_{50} : 8.33 ^a		CL_{50} : 8.33 ^a		CL_{50} : 7.50 ^a	

PRUEBA CON ALIMENTO

La prueba con alimento para determinar su influencia en la toxicidad aguda del fenol para *D. magna*, se realizó con el mismo rango de concentraciones nominales que en las pruebas definitivas (Tabla 13). La CL_{50} obtenida fue de 6.81 mg/l.

Tabla 13. Resultados de toxicidad aguda en prueba definitiva con alimento a 48 horas de exposición empleando fenol en *D. magna*

CONCENTRACIÓN (mg/l)	No DE ORGANISMOS MUERTOS 48 Horas	MORTALIDAD (%) 48 Horas
17.5	60	100
15.0	55	92
12.5	50	83
10.0	40	67
7.5	33	55
5.0	1	2
2.5	0	0
Testigo	0	0
CL_{50} : 6.81 mg/l		

COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS DEFINITIVAS CON Y SIN ALIMENTO

A partir del modelo $y = mx + b$ se obtuvieron las ecuaciones que describieron la mortalidad de *D. magna* con y sin alimento expuestos al fenol. Los resultados se muestran en la Tabla 14. Las regresiones obtenidas fueron significativas con un coeficiente mayor a 0.90.

Tabla 14. Promedio de los porcentajes de mortalidad transformados (arcsen) en pruebas definitivas con y sin alimento empleando fenol en *Daphnia magna*

CONCENTRACIÓN (mg/l)	Promedio del porcentaje de mortalidad en pruebas definitivas y transformada	Porcentaje de mortalidad en prueba con alimento y transformada
17.5	95.67	100
15.0	81.67	92
12.5	66.50	83
10.0	53.83	67
7.5	36.67	55
5.0	20.33	2
2.5	7.33	0
Testigo	0.00	0
	CL ₅₀ : 8.37	6.81
	Y= 5.699 X= -4.59	Y= 6.7381 X= - 9.083
	R2 = 0.995	R2 = 0.919

El análisis de ANCOVA efectuado a los resultados de las pruebas con y sin alimento para el fenol, mostró que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las pendientes. Por lo que la intensidad del efecto es la misma en ambas condiciones. Sin embargo, la sensibilidad de *D. magna* expuesto al fenol sin alimento es mayor que en las pruebas en donde los dáfhnidos no fueron alimentados (Figura 3).

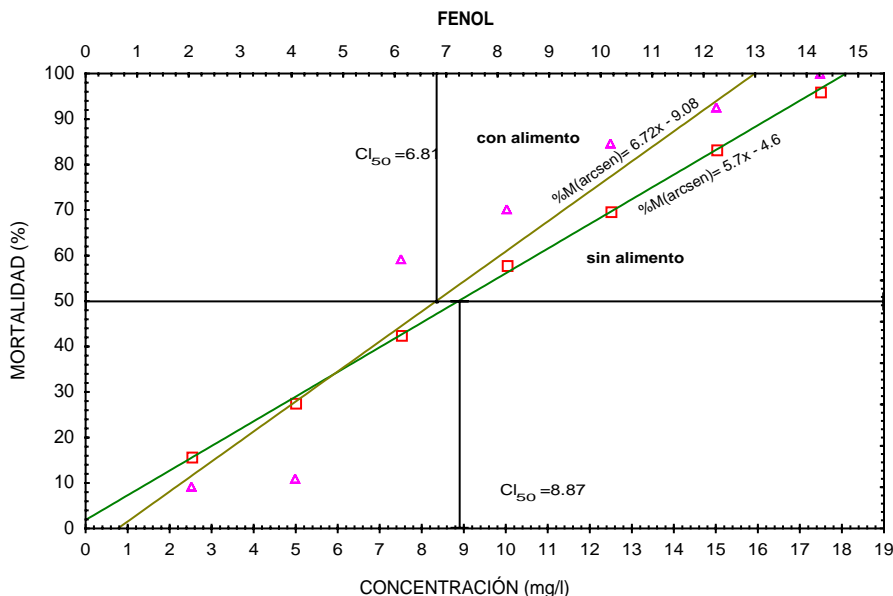


Fig. 3 Toxicidad del fenol en *Daphnia magna* con y sin alimento. Se incluyen los valores de la CL₅₀ a 48 horas y la ecuación resultante de la regresión lineal, de los porcentajes de mortalidad transformados ($\sqrt{\arcsen}$) en ambas pruebas, donde la pendiente = a la intensidad tóxica y la ordenada al origen = sensibilidad.

D. Dodecil sulfato de sodio

PRUEBAS EXPLORATORIAS

El rango de concentraciones empleado fue el establecido en la Norma Oficial Mexicana (NOM-AA-O87-1995). Éstas fueron disminuyendo hasta que se obtuvo el 100% de mortalidad, sólo en la máxima concentración (pruebas 1, 2 y 3). Se disminuyó el alto coeficiente de variación de las CL₅₀, que fue del 25% al 5% (pruebas 4, 5 y 6). En las pruebas 7 y 8 se estableció el rango de concentración definitivo, de 5 a 17.5 mg/l con intervalos de 2.5 mg/l (Tabla 15). Asimismo, el análisis estadístico mostró que hubo una diferencia significativa entre la CL₅₀ al final de las pruebas exploratorias (6, 7 y 8).

Tabla 15. Pruebas exploratorias para obtener el 100% de mortalidad y la CL₅₀ de *D. magna* con DSS. Numero de organismos expuestos n=20.

PRUEBA 1		PRUEBA 2		PRUEBA 3		PRUEBA 4	
Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos
32	20	28	20	24	20	22	19
24	20	24	20	20	19	19	15
16	7	20	16	16	10	16	10
12	5	16	11	12	5	13	5
8	2	12	5	8	2	11	2
4	0	8	3	2	0	8	0
Testigo	0	Testigo	0	Testigo	0	Testigo	0
CL ₅₀ : 19.11 ^a		CL ₅₀ :14.62 ^b		CL ₅₀ :14.22 ^a		CL ₅₀ :15.59 ^a	
PRUEBA 5		PRUEBA 6		PRUEBA 7		PRUEBA 8	
Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos	Concentración mg/l	No. Organismos muertos
20	20	17.0	20	17.5	19	17.5	20
17	20	15.0	18	15.0	15	15.0	16
14	17	13.0	13	12.5	10	12.5	11
11	12	11.0	11	10.0	5	10.0	7
8	9	9.0	5	7.5	2	7.5	4
5	5	7.0	3	5.0	1	5.0	1
Testigo	0	Testigo	0	Testigo	0	Testigo	0
CL ₅₀ : 8.28 ^d		CL ₅₀ : 10.67 ^c		CL ₅₀ : 11.72 ^c		CL ₅₀ :10.73 ^c	

Letras diferentes en la fila de CL₅₀ denotan diferencias significativas (p<0.05)

PRUEBAS DEFINITIVAS

Con estos resultados, se realizaron las pruebas definitivas de toxicidad aguda a 48 horas de exposición con el DSS con *D. magna*; se realizaron 6 pruebas definitivas considerando un grupo testigo. Los resultados se muestran en la Tabla 16, obteniéndose una $CL_{50} = 10.56 \pm 0.792$ mg/l y un coeficiente de variación de 18.37. El rango de concentraciones fue de 5.0 a 17.5 mg/l.

El análisis de varianza (ANOVA) realizado a las diferentes pruebas, a excepción de la primera prueba, no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$).

Tabla 16. Resultados de toxicidad aguda en pruebas definitivas a 48 horas de exposición para obtener la CL_{50} de *D. magna* con DSS. Numero de organismos expuestos $n=30$.

CONCENTRACIÓN mg/l	PRUEBA 1		PRUEBA 2		PRUEBA 3		PRUEBA 4		PRUEBA 5		PRUEBA 6	
	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas	Total de Muertos 48 Horas	Mortalidad % 48 Horas
17.5	30	100	30	100	30	100	30	100	30	100	29	97
15.0	28	93	25	76	22	70	23	76	22	73	22	73
12.5	18	60	21	70	17	56	16	53	15	50	17	57
10.0	17	56	18	60	11	33	11	33	11	36	11	37
7.5	15	50	12	40	7	23	6	23	7	23	5	17
5.0	2	6	2	6	1	3	3	13	4	13	2	7
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CL₅₀:	CL₅₀: 7.50^a		CL₅₀: 8.90^b		CL₅₀: 11.77^b		CL₅₀: 11.71^b		CL₅₀: 12.50^b		CL₅₀: 10.95^b	

Las letras iguales denotan que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$)

PRUEBA CON ALIMENTO

La prueba con alimento para determinar su influencia en la toxicidad aguda del DSS para *D. magna* se realizó con las mismas concentraciones que en las pruebas definitivas (Tabla 17). La CL_{50} obtenida fue de 9.45 mg/l.

Tabla 17. Resultados de toxicidad aguda en prueba definitiva con alimento a 48 horas de exposición empleando DSS, en *D. magna*. Numero de organismos expuestos $n= 60$.

CONCENTRACIÓN (mg/l)	No DE ORGANISMOS MUERTOS 48 Horas	MORTALIDAD (%) 48 Horas
17.5	60	100
15.0	58	96
12.5	54	90
10.0	42	70
7.5	7	11
5.0	0	0
Testigo	0	0
CL₅₀: 9.45 mg/l		

COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS DEFINITIVAS CON Y SIN ALIMENTO.

A partir del modelo $y = mx + b$ se obtuvieron las ecuaciones que describieron la mortalidad de *D. magna* con alimento y sin alimento expuestos al tóxico. Los resultados se muestran en la Tabla 18. Las regresiones obtenidas fueron significativas con un coeficiente mayor a 0.85.

Tabla 18. Promedio de los porcentajes de mortalidad y transformados en pruebas definitivas con alimento, empleando DSS en *Daphnia magna*.

CONCENTRACIÓN (mg/l)	Promedio del porcentaje de mortalidad en pruebas definitivas y transformada	Porcentaje de mortalidad en prueba con alimento y transformada
17.5	99.50	100
15.0	76.83	96
12.5	57.67	90
10.0	42.50	70
7.5	29.33	11
5.0	8.00	0
Testigo	0.00	0
	CL ₅₀ : 10.56	9.45
	Y = 5.845 X = -11.527	Y = 7.1541 X = -16.557
	R ² = 0.851	R ² = 0.907

El análisis de ANCOVA efectuado a los resultados de las pruebas con y sin alimento para el DSS, mostró que existen diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la intensidad del efecto, siendo mayor sin la presencia del alimento (5.85 ± 0.22) que cuando son alimentados (7.15 ± 0). Asimismo, la sensibilidad de *D. magna* expuesta al DSS con alimento es ligeramente mayor (-16.55 ± 2.06), que los daphnidos que no fueron alimentados (-11.52 ± 0) (Figura. 4).

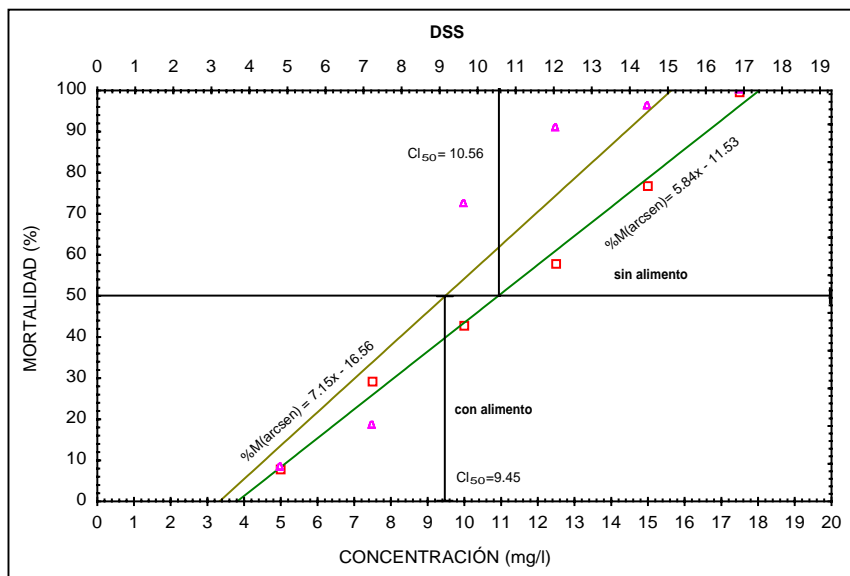


Fig. 4. Toxicidad aguda del DSS en *D. magna* con exposición con y sin alimento. Se incluyen los valores de la CL₅₀ a 48 horas y la ecuación resultante de la regresión lineal, de los porcentajes de mortalidad transformados ($\sqrt{\arcsen}$) en ambas pruebas, donde la pendiente = a la intensidad tóxica y la ordenada al origen = sensibilidad.

COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LOS CUATRO TÓXICOS

Para comparar la intensidad del efecto que tiene cada uno de los diferentes tóxicos sobre *D. magna* y su sensibilidad a los mismos con y sin alimento, se utilizó la transformación del porcentaje de mortalidad (Y) ($\sqrt{\arcsen}$) realizado anteriormente y a partir del modelo $y = mx + b$; se obtuvieron las ecuaciones que describen la mortalidad (48 horas) de los daphnidos. Donde **m** es la intensidad del efecto y **b** la sensibilidad del organismo al tóxico. Los mayores efectos y toxicidad se observaron con el DP en ambos tipos de pruebas (con alimento y sin alimento), (Tablas 19 y 20; Figuras 5 y 6).

Tabla 19. Comparación entre la intensidad y la sensibilidad de los diferentes tóxicos de las pruebas definitivas de toxicidad aguda para *D. magna* expuesto con y sin alimento.

TÓXICO	Sin Alimento		Con Alimento	
	INTENSIDAD	SENSIBILIDAD	INTENSIDAD	SENSIBILIDAD
DP	194.53 ^{a, 1}	-17.239 ^{a, 1}	223.22 ^{a, 1}	-14.89 ^{a, 1}
FENOL	5.7 ^{b, 1}	-4.6 ^{b, 1}	6.72 ^{b, 1}	-9.08 ^{b, 2}
DSS	5.84 ^{b, 1}	-11.53 ^{a, 1}	7.15 ^{b, 1}	-16.56 ^{a, 1}
SZ	18.77 ^{c, 1}	6.47 ^{b, 1}	19.09 ^{c, 1}	-1.55 ^{c, 2}

Letras diferentes en columnas denotan diferencias significativas entre los diferentes tóxicos. Números diferentes en las filas de cada tóxico denotan diferencias significativas de la intensidad tóxica (pendiente) y sensibilidad del organismo (ordenada al origen) entre las condiciones de alimentación ($p < 0.05$).

Tabla 20. Comparación entre la CL₅₀ obtenida, para los diferentes tóxicos en las pruebas de toxicidad aguda definitivas sin y con alimento para *D. magna*.

TÓXICO	Sin Alimento	Con Alimento
	CL ₅₀ Obtenida mg/l	CL ₅₀ Obtenida mg/l
DP	0.37 ^a	0.31 ^a
FENOL	8.87 ^a	6.81 ^b
DSS	10.56 ^a	9.45 ^a
SZ	2.075 ^a	2.98 ^a

Letras diferentes en las filas de cada condición de alimentación denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

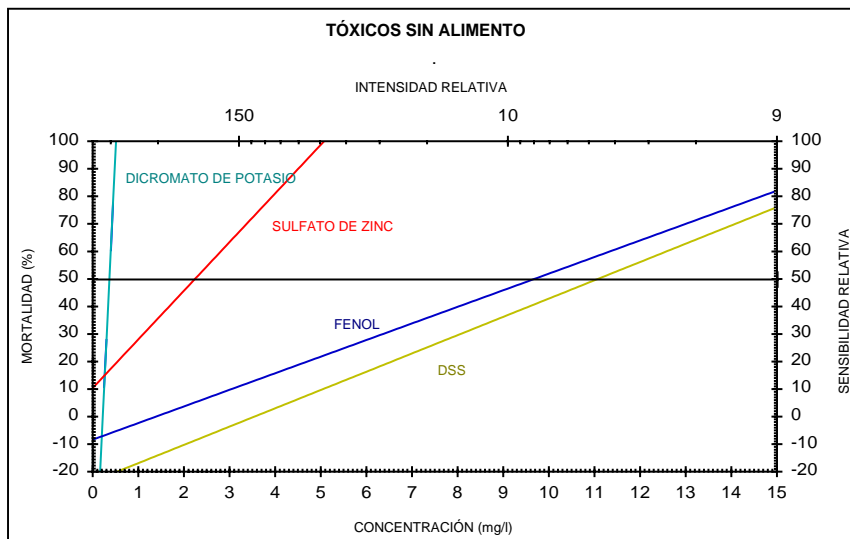


Fig. 5 Comparación entre la intensidad y la sensibilidad de los diferentes tóxicos de las pruebas definitivas de toxicidad aguda para *D. magna* expuesto sin alimento. Se grafican los modelos teóricos para mayor detalle.

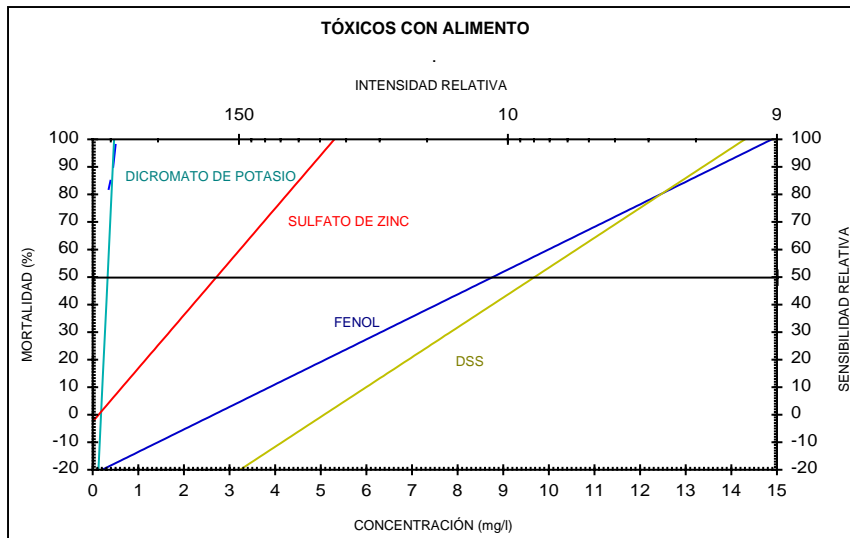


Fig. 6 Comparación entre la intensidad y la sensibilidad de los diferentes tóxicos de las pruebas definitivas de toxicidad aguda para *D. magna* expuesto con alimento. Se grafican los modelos teóricos para mayor detalle.

DISCUSIÓN

Daphnia magna es una especie de referencia internacional, empleado como organismo de prueba en estudios de toxicología acuática, debido al completo conocimiento de su biología en condiciones normales (Adema 1978, Leeuwangh, 1978). Su reproducción por partenogénesis asegura que la sensibilidad de respuesta hacia los compuestos tóxicos permanezca aproximadamente constante (Müller, 1980; Münzinger y Monicelli, 1992).

Una de las principales objeciones en la caracterización y evaluación biológica de la toxicidad acuática, producto del vertido de descargas contaminantes, radica en la variabilidad de los resultados. Es común que diferentes laboratorios analizando simultáneamente el efecto de diferentes tóxicos de referencia con neonatos de la misma especie, obtengan estimaciones de la Concentración Letal Media (CL₅₀) de hasta un orden de magnitud de diferencia y con coeficientes de variación al 150% (Weber, 1991).

Las variaciones pueden deberse a muchos factores: la salud de los organismos de prueba, las diferencias entre las camadas, la tolerancia genética a los tóxicos y cambios en la calidad del agua (U.S. EPA, 1982). De acuerdo a la variabilidad intrínseca que presentan los organismos, el valor de la CL₅₀ para una misma sustancia química va a caer dentro de un intervalo de variaciones que van a estar dadas no sólo por el organismo, sino también por las características fisicoquímicas de la sustancia (solubilidad, vías de entrada al organismo, biotransformación, altos niveles de alcalinidad, dureza, tipo de alimento, el uso de concentraciones nominales, que pueden producir una disminución de la precisión de las pruebas conducidas a diferentes tiempos) (Gersich *et al.*, 1986). Sin embargo, Goulden y Comotto (1982), puntualizan que cuando se parte de protocolos bien definidos en todos sus aspectos operativos, se reduce considerablemente la variación en resultados inter- e intra laboratorios y se aumenta la confiabilidad en este tipo de pruebas.

DICROMATO DE POTASIO

El DP debe su efecto tóxico al elemento cromo, que comúnmente se expresa como cromo hexavalente (Cr⁶⁺), que es la forma iónica en que se presenta en este compuesto.

Los valores en las CL₅₀ registrados en el presente estudio coinciden con lo reportado por Bulus y Ronco, 1996; Enserink *et al.*, 1993; Fargasová, 1994; en pruebas sin suministro de alimento. Se observó que las CL₅₀ fluctuaron de 0.14 a 1.3 mg/l (Tabla 21). Por lo que, podemos observar un amplio intervalo de respuesta, en comparación con los demás autores. Esto puede deberse a variaciones intrínsecas de los organismos (diferentes camadas, variabilidad genética etc.) (U.S. EPA, 1985; Enserink *et al.*, 1990; Cox *et al.*, 1992; Dorn, 1987). Así como a la diferencia en las condiciones de prueba empleadas por los diferentes autores, en lo referente al tipo de agua (origen, dureza, pH, etc.), la temperatura y el fotoperíodo, la duración de las pruebas, el suministro o no del alimento, la marca del compuesto químico empleado, (debido a la variación en el contenido de impureza de cada producto; en el presente estudio se empleo el tóxico catalogado como estándar primario 99.98% de pureza y libre de impurezas por metales pesados) conducen a que los resultados no sean similares al resto de los autores.

Tabla 21. Valores de CL₅₀ a 48 horas de exposición e intervalos reportados para el DP con alimento y sin alimento.

Autor, año	CL ₅₀ sin alimento mg/l	CL ₅₀ con alimento mg/l
ISO Norma Internacional, 1982	0.9 - 2.0	
Parker, 1983	1.03	
	1.02	
	0.56	
Parker, 1985	0.17	0.16
	0.21	0.24
	0.57	0.39
	0.14	0.13
	1.28	0.75
	0.79	0.93
	0.70	0.53
Elnabaraway, <i>et al.</i> , 1986	0.16	
Van Leeuwen, <i>et al.</i> , 1987	0.64	
Bulus y Ronco, 1996	0.35	
Enserink <i>et al.</i> , 1990	1.3	
Oikari <i>et al.</i> , 1992	0.20	
Enserink <i>et al.</i> , 1993	0.38	
Kungolos y Aoyama, 1993	0.25	
Jansen y Persoone 1993	0.16	
Fargasová, 1994	0.36	
Martínez-Jerónimo, 1995	0.20	
Este estudio	0.37	0.31

Otro factor importante en la variabilidad de los resultados obtenidos en este estudio y comparándolos con el resto de los autores puede ser la diferencia entre clones de *Daphnia magna*, como lo señalan Münzinger y Monicelli (1991). Ellos determinaron que diferentes clones de *D. magna* respondieron de diferente forma a los metales pesados (Cr, Ni y Zn). Por lo que afirman que éste es un factor que limita las comparaciones de resultados entre diferentes laboratorios.

Münzinger y Monicelli (1992), indican que algunos clones de *D. magna* son particularmente resistentes al cromo hexavalente y que en exposiciones crónicas, presentan parámetros poblacionales semejantes a los de organismos control, tales clones también fueron tolerantes a otros metales pesados.

El coeficiente de variación (C.V.) que se obtuvo en este trabajo fue de 9.9, lo cual señaló que efectivamente existe reproducibilidad en los resultados obtenidos, y que la cepa se mantuvo estable durante toda la fase experimental, así como las condiciones de mantenimiento. Además, indica que la reproducibilidad en la respuesta de *D. magna* se da a nivel intra e inter-laboratorio con algunos valores ya señalados (ver Tabla 21) y esto aumenta la importancia de la utilización de esta especie de prueba en

toxicidad aguda, tal como lo señala Dorn, (1987), quien evaluó la utilidad del cromo hexavalente como tóxico de referencia, analizando aspectos tales como la diferencia en la preparación de soluciones entre laboratorios, la estabilidad del tóxico durante las pruebas y la variación en las estimaciones de la CL₅₀ basadas en concentraciones nominales analíticas. Este autor encontró que hubo diferencias considerables en la preparación de las soluciones de prueba entre laboratorios. Asimismo determinó que el tóxico permanece estable durante toda la prueba como Cr⁶⁺, esto es, no se transforma a Cr³⁺, que es una forma iónica del cromo de menor toxicidad. Gendusa *et al.*, (1993) y Krassoï y Julli, (1994), a su vez, confirmaron la validez de basar las estimaciones de toxicidad con este ión, en las concentraciones nominales, evitándose así la necesidad de evaluar las cantidades efectivas del tóxico.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas definitivas, en las cuales no se observaron diferencias estadísticamente significativas, se puede concluir que el comportamiento de este químico es adecuado, y confirma su valía como compuesto de referencia en la evaluación de la calidad de respuesta de los organismos probados. Por lo tanto, su importancia al ser empleado como tóxico de referencia internacional y que se incluya dentro de la normatividad certificada internacionalmente (ISO Norma Internacional, 1982).

Con respecto a las pruebas con alimento, probando DP en exposiciones agudas, es posible suponer, que la principal ruta de entrada de los componentes tóxicos en estos organismos, sea a través de las branquias (Gendusa *et al.*, 1993). Sin embargo, en contraste con exposiciones prolongadas la incorporación de estos componentes junto con la dieta adquirió en este trabajo una mayor importancia, como lo reportó Péqueux, (1995).

Martínez, *et al.*, (1994), observaron que el suministro de alimento, es un factor importante que influye en la respuesta de los organismos al tóxico durante pruebas agudas y subcrónicas, debido a que la concentración de algas juega un papel importante en las pruebas de ecotoxicología. Mencionan que si se les administra la concentración adecuada de alimento, puede contribuir a que los organismos presenten una mayor resistencia a los efectos de los agentes tóxicos y por el contrario si la concentración de alimento es mayor a la necesaria puede observarse una influencia negativa del alimento. Lo cual puede aumentar los efectos de los tóxicos (Baird *et al.*, 1989). Por otra parte Gama *et al.*, 1999 en controversia con éstos autores, demostraron que si se ofrece una concentración de alimento menor, la resistencia a los efectos adversos de los agentes tóxicos disminuye.

La sensibilidad de *D. magna* disminuyó en un 13.6% a la exposición al DP en condiciones de alimentación, aunque la intensidad o potencia del efecto tóxico se incrementó en proporción semejante, 14.7%. Esto sugiere que la toxicidad del DP es independiente de la condición alimenticia de los organismos. Esto contrasta con lo reportado por Alasdair y Neilson (1994), quienes señalan que el alimento suministrado durante las pruebas agudas puede reducir la toxicidad de los químicos.

Kungolos y Aoyama (1993), evaluaron los efectos tóxicos agudos del cromo y cadmio en exposiciones de 1 a 4 días, con neonatos de *D. magna*, alimentándolos con *Chlorella ellipsoidea* y determinaron que la presencia de alimento aumentó la toxicidad de ambos metales.

De acuerdo a lo anterior, en pruebas de toxicidad aguda, existe controversia en cuanto a sí los animales pueden o no ser alimentados. Ambos procedimientos tienen ventajas y desventajas; como lo señala Adema (1978) y Kungolos y Aoyama (1993). Sin alimento *D. magna* no puede ser utilizado en pruebas de toxicidad por más de 48 horas. Se recomienda generalmente no alimentar a los neonatos durante las pruebas considerando que el factor más importante de variación es la cantidad y tipo de alimento. En vista de que todos estos factores complican observar el efecto del tóxico en *D. magna* parece deseable la conducción de las pruebas de toxicidad aguda en lo posible sin alimento (Maciorowski y Clarke, 1980).

De cualquier forma, el presente estudio permite definir que el comportamiento del dicromato de potasio es adecuado y confirma su valía como compuesto de referencia en la evaluación de la calidad de respuesta de los organismos a lo largo del tiempo con y sin alimento, por lo que justifica su incorporación para el control y aseguramiento de la calidad de los laboratorios que realizan este tipo de pruebas.

SULFATO DE ZINC

Para los neonatos de *D. magna*, la CL₅₀ a 48 horas de exposición, obtenida en las pruebas definitivas probando SZ, se encontró por debajo de lo reportado por otros autores (Tabla 22) (Belabed *et al.*, 1993; Jansen y Persoone 1993), hasta en un 27.113%. Sin embargo, al transformarla se encontró el dato dentro de los valores obtenidos por estos autores. Esto sugiere que el efecto tóxico del DP sobre *D. magna* se ve sensiblemente afectado por variaciones en el medio donde se desarrolla la prueba (Cox *et al.*, 1992) para este metal, además de las condiciones en las que se encuentren los neonatos (Enserink *et al.*, 1990).

Tabla 22. Valores de CL₅₀ e intervalos reportados para el sulfato de zinc en *D. magna* con alimento y sin alimento

Autor, año	CL ₅₀ sin alimento	CL ₅₀ con alimento
Belabed, <i>et al.</i> , 1993	2.84	
Jansen, y Persoone 1993	2.1	
Este estudio	2.07	2.98

El coeficiente de variación observado en las pruebas finales fue del 11.7%, por lo que podemos decir que las condiciones previas y durante la realización de la prueba fueron adecuadas.

Al ser alimentados los neonatos de *D. magna* durante las pruebas con sulfato de zinc, se observó un incremento no significativo ($p > 0.05$) en la CL_{50} del 43.96%, disminuyendo así su toxicidad, la cual se vio reflejado en la sensibilidad del organismo que es mayor hasta en un 76% ($p < 0.05$), con respecto a lo observado para el DP. Esto sugiere que se presenta un efecto aditivo del alimento sobre la sensibilidad al metal, ya que pudiera darse un incremento del metabolismo del organismo activando mecanismos de protección como metalotioneínas (Zúñiga, 2002).

Es importante señalar que una de las principales vías de entrada de compuestos tóxicos a los organismos, es por absorción a nivel de tracto digestivo. Por lo que podemos inferir que en los neonatos, esta vía se suma a la principal vía de incorporación de los metales, que es a través de los canales iónicos en branquia (Péqueux, 1995).

La tasa de incorporación de los metales en los organismos acuáticos se relaciona con la fisicoquímica del metal y por ende con su biodisponibilidad, donde las respuestas y la condición fisiológica particular del organismo pueden interactuar modificando la tasa de incorporación y su respuesta (Zúñiga, 2002; Rainbow, 1997). Esta diferencia observada en la mayor sensibilidad en el grupo con alimento, pudo ser debido a que la incorporación del Zn^{2+} se incremento posiblemente vía tubo digestivo durante su alimentación por la bioacumulación en las microalgas, afectando así simultáneamente dos órganos blanco al ser liberado el metal en éste. Sin embargo, el incremento de la CL_{50} y por lo tanto, su menor toxicidad, sugiere que el alimento disminuyó a su vez la biodisponibilidad del metal en el medio. Como lo mencionan Sarma y Nandini (1999), los cuales observaron, que las algas son capaces de detoxificar el medio de metales pesados, debido a que los microalgas muestran cierta atracción por los iones polivalentes lo que resulta en la remoción de metales pesados del ambiente

El presente estudio permitió definir que el comportamiento químico del DP es más recomendable que el SZ, siendo que el dicromato no se ve afectado sensiblemente por la condición de alimentación como lo es con el SZ. Confirmando nuevamente su valía el DP como compuesto de referencia en la evaluación de la calidad de respuesta de los organismos a lo largo del tiempo con y sin alimento. Por lo que se justifica su incorporación en el control y aseguramiento de la calidad de los laboratorios que realicen este tipo de pruebas. En la actualidad el DP se recomienda ampliamente como tóxico de referencia internacional para pruebas de toxicidad aguda en cladóceros. (Weber, 1991; Krassoi y Julli, 1994).

DODECIL SULFATO DE SODIO.

El coeficiente de variación observado de 18.4% durante las pruebas definitivas con DSS para los neonatos de *D. magna*, puede deberse probablemente al comportamiento mismo del detergente, (Martínez-Jerónimo y García-González, 1994). Por otra parte, esta variabilidad estuvo dentro del límite de variabilidad aceptado para las pruebas realizadas con cladóceros que es $\leq 30\%$. Considerándose como satisfactorio en comparación con las variabilidades reportadas en literatura que son mayores (Lewis y Weber, 1985; Wells *et al.*, 1998). Dentro de todo esto, la CL_{50} , 10.56 ± 0.792 mg/l, está cercano a lo reportado por Bulus y Ronco, 1996; (Tabla 23). El resultado de la CL_{50} obtenida, concuerda con lo reportado por la Norma Oficial Mexicana, ya que la diferencia es $< 30\%$ (27.172%). Esta pequeña

diferencia que se observó, pudo deberse a variaciones no importantes, en las condiciones de prueba, entre las camadas y a la calidad del compuesto empleado.

Tabla 23. Valores de CL₅₀ a 48 horas de exposición e intervalos reportados para el DSS en *D. magna* con alimento y sin alimento.

Autor, año	CL ₅₀ sin alimento (mg/l)	CL ₅₀ con alimento (mg/l)
Jansen y Persoone, 1993	31	
Martínez-Jerónimo y García-González, 1994		25.4
Martínez- Jerónimo, 1995		25.39 24.25
Norma Oficial Mexicana, 1995	14.5	
Bulus y Ronco, 1996	9.8	
Este estudio, 1998	10.56	9.45

Al llevar al cabo, la prueba con alimento, la CL₅₀ obtenida fue de 9.45 mg/l, 10.5% menor a la prueba sin alimento, en la cual no se observó una diferencia significativa ($p > 0.05$). Por lo cual, el proceso de validación de las cepas de *D. magna* empleadas en las pruebas de toxicidad con el DSS resultaron sensibles al ser alimentados durante las pruebas. Esto es debido, a que la toxicidad se incrementó en 10.5%, aumentando la potencia del tóxico en un 22.4% y la sensibilidad en un 43.6%. Esto posiblemente se debió, a que el DSS esté afectando la membrana del tracto intestinal por su ingreso adicional a través del alimento (Núñez, 2002) y a través de partículas contaminadas adicionales a la absorción directa del agua (Buikema *et al.*, 1982; Goulden y Comotto, 1982). Con respecto a la prueba con alimento, la CL₅₀ obtenida fue de 9.45 mg/l, no se observó una diferencia significativa en comparación con las pruebas definitivas en donde la CL₅₀ sin alimento fue 10.56 mg/l. El proceso de validación de las cepas de *D. magna* empleadas en las pruebas de toxicidad con los diferentes compuestos resultaron muy sensibles al ser alimentados durante las pruebas.

FENOL

Daphnia magna se ha considerado como una de las especies más sensibles, la CL₅₀ reportada para pruebas a 48 horas van de 11.2 a 15 mg fenol / litro (Tabla 24). El resultado obtenido durante las pruebas a 48 horas en los neonatos fue de 8.87 mg/l, el cual se encontró por debajo del rango reportado excepto por el referido por Bulus y Ronco, 1996.

Tabla 24. Valores de CL₅₀ e intervalos reportados para el fenol en *D. magna* con alimento y sin alimento

Autor, año	CL ₅₀ sin alimento (mg/l)	CL ₅₀ con alimento (mg/l)
LeBlanc 1980	12	
Gersich, 1984	11.2	
Gersich, <i>et al.</i> , 1986	14.5 13.3 12.9 11.2	
Elnabarawy <i>et al.</i> , 1986	1.8	
Cowgill y Millazo, 1991 a	12.5	
Cowgill, y Millazo, 1991 b	12.8	13
Jansen y Persoone, 1993	15	
Bulus y Ronco, 1996	5.5	
Este estudio, 1998	8.87	6.31

Aunque la potencia tóxica del fenol en *D. magna* fue semejante a lo observado con DSS, la sensibilidad de los neonatos fue mucho menor. La variabilidad de la CL₅₀ fue del 17.2%, siendo mayor a lo obtenido con el DP y el SZ, pero similar al DSS.

Al ser alimentados los organismos durante las pruebas, la CL₅₀ obtenida fue de 6.31 mg/l, el cual fue menor a lo observado en la CL₅₀ sin alimento (23.2%). Dicho incremento en la toxicidad del fenol, al ser alimentados no concuerda con lo obtenido por Cowgill y Millazo, 1991 b, (ver Tabla 24), en donde la CL₅₀ se incrementó con el suministro de alimento. Asimismo, la potencia tóxica del compuesto que presentan los organismos se incrementó notablemente en un 17.9%, debido posiblemente, no a la entrada del compuesto a través del alga *perse*, sino por la absorción y biotransformación rápida que sufrió el fenol en la microalga (Crookes, 1996; Lu, 1985), siguiendo diversas vías metabólicas y cuyos metabolitos derivados del fenol les sean adversos a los dáfnidos. Lo cual coincide con su sensibilidad, aumentando casi el doble de lo registrado sin alimento, 97.4%. Lo que sugiere que el alimento más el fenol, al igual que lo ocurrido con el DSS, esté afectando la membrana del tracto digestivo, modificando su permeabilidad por la absorción adicional del compuesto transportado por el alimento, aún cuando el fenol presenta un factor de bioacumulación bajo, debido a que este es rápidamente metabolizado (Crookes, 1996)

El incremento observado en la intensidad para los compuestos orgánicos cuando son alimentados, DSS y fenol, se debió probablemente a dos cosas: a) estos compuestos por su naturaleza química pueden ser más fácilmente absorbidos por la microalga, *Chlorella vulgaris*, que incrementó la mortalidad de *D. magna* al absorber el tóxico vía alimento por el tracto digestivo y b) uno de los mecanismos que utilizan los organismos para contrarrestar los efectos de los tóxicos orgánicos es la biotransformación de los mismos para su eliminación (Lu, 1985), durante este proceso los compuestos orgánicos pueden ser más o menos tóxicos.

TÓXICO RECOMENDABLE

Para poder definir cuál de los cuatro tóxicos probados era el más adecuado, para emplearlo en pruebas de toxicidad aguda y así poder llevar un control y seguimiento de los cultivos de *D. magna*, con el propósito de conducir pruebas de toxicidad, se obtuvo la regresión lineal de la transformación ($\sqrt{\arcsen}$) del porcentaje de mortalidad. Esto brindó la posibilidad de hacerlos comparables por medio de la comparación de sus pendientes (potencia tóxica) y sus ordenadas al origen (sensibilidad) (Núñez, 2002; Zar, 1999; Gersich *et al.*, 1986).

El resultado obtenido en la potencia o intensidad tóxica se determinó en el orden siguiente: **DP>SZ>DSS=fenol**, sin alimento. Asimismo, la sensibilidad que presentó *D. magna* a los tóxicos es la siguiente: **DP≥DSS>fenol>SZ**.

Stephenson y Watts (1984); Kungolos y Aoyama (1993); y Martínez-Jerónimo y García-González (1994); observaron que el alimento modifica la sensibilidad de *D. magna* a diversos tóxicos. Las pruebas con alimento determinaron que la intensidad de cada tóxico, presentó un comportamiento similar, si son alimentados: **DP>SZ>DSS≥Fenol**. Esto se debe posiblemente a la biotransformación y bioconcentración que sufren los tóxicos dentro de la microalga y en el organismo. Incrementando así su toxicidad, principalmente con el fenol y el DSS (Lu, 1985; Naylor *et al.*, 1993; Naylor, 1993; Péqueux, 1995; Sarma y Nandini, 1999).

Cañizares-Villanueva *et al.*, (1999), determinaron que la forma en el suministro del alimento también influye notablemente en los exámenes de toxicidad aguda con *D. magna*. Utilizando efluentes en los cuales emplearon dos cultivos distintos de *Chlorella vulgaris* (algas inmovilizadas y algas en suspensión) para remover cadmio y zinc y una mezcla de ambos metales, observaron que el cultivo de *Chlorella* inmovilizada tuvo un mayor porcentaje de remoción de los metales y los valores de CL₅₀ fueron mayores que los obtenidos para los cultivos en suspensión. Posiblemente, el empleo de *Chlorella* inmovilizada utilizada en la alimentación de *D. magna* en este trabajo, influyó en la intensidad del efecto tóxico del DP y del SZ y en la sensibilidad de los neonatos.

La sensibilidad de *D. magna* a cada uno de los tóxicos cambió al ser alimentados: **DSS≥DP>fenol>SZ**. La sensibilidad al DDS aumentó con el alimento en los neonatos. Tales variaciones estuvieron relacionadas posiblemente con la respuesta fisiológica del organismo en las diferentes condiciones de intoxicación y diferentes tóxicos (Venegas-Pérez, 1996).

En este sentido es importante considerar que el efecto tóxico de cualquier contaminante depende tanto de su concentración como del tiempo de exposición (Núñez, 2002). De tal manera, que son recomendables, los estudios crónicos ya que proveen información más compleja para valorar los efectos biológicos de los tóxicos ambientales.

Con respecto al tipo de microorganismo probado, se determinó que en México *D. magna* no ha sido reportada como especie local. Sin embargo, la posibilidad de probar con especies representativas es igualmente válido, ya que como lo menciona Baudo (1987), es más importante tener experiencia con especies de referencia. El uso de especies residentes no es necesario, si las especies de prueba se parecen a éstas en relación a sus hábitos alimenticios, fisiología y comportamiento (Nikumen y Micttinen, 1985).

Es importante mencionar, que uno de los pasos para utilizar un cultivo de *D. magna*, en pruebas de toxicidad, es la seguridad de una producción de un largo número de neonatos de calidad consistente (Bradley *et al.*, 1993). Esto se logró estabilizando el cultivo, manteniéndolo bajo condiciones de laboratorio constantes en términos de temperatura, luz, calidad del agua y alimento, ya que estas condiciones influyen en la respuesta de los organismos, cuando se enfrentan al efecto de compuestos tóxicos o contaminantes del agua con características tóxicas (Eledent y Bias 1990).

La estandarización de los resultados, se sugiere para una comparación de las condiciones de la prueba, incluyendo a los organismos, mediante el empleo de tóxicos de referencia (Jansen y Persoone, 1993). Asimismo, es útil en el monitoreo biológico de hidrosistemas receptores. Todas estas aplicaciones presuponen metodologías y técnicas que una vez establecidas, son fáciles de seguir. Sin embargo el éxito, el alcance en su interpretación y la confiabilidad y repetibilidad de los resultados descansan también sobre los procedimientos de reproducción de los organismos de prueba.

Los resultados de pruebas de toxicidad agudas y crónicas ayudan a pronosticar efectos a nivel de comunidad y ecosistema. Por lo tanto, la realización de estos trabajos deben incluir a) la estandarización de los protocolos de prueba, incluyendo las fuentes de suministro de organismos y su cultivo, así como el uso rutinario de tóxicos de referencia, b) la calibración del laboratorio, permitiendo la comparación con otros, c) la estimación de efectos y tiempos de recuperación a nivel de población y comunidad, una vez que se han establecido los efectos tóxicos agudos y d) la validación de los datos de toxicidad obtenidos en pruebas de laboratorio con evaluaciones en campo. En este trabajo se logró emprender las acciones antes mencionadas, siguiendo un control de cada una de las variables como lo menciona Baudo (1987). Finalmente es importante mencionar que esta prueba obtuvo la acreditación por parte de la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA), dentro del Laboratorio de Análisis Microbiológicos del Instituto Mexicano del Petróleo con el número Q-256-070/99.

CONCLUSIONES

- Los valores de la CL_{50} de los tóxicos evaluados fueron en general menores a los reportados por otros autores.
- La evaluación de la potencia toxica de los compuestos y la sensibilidad de los organismos a los mismos determinó que el Dicromato de potasio es el más adecuado para las pruebas de calidad de los cultivos de *D. magna* seguido del DSS. El sulfato de zinc y el fenol son los menos adecuados.
- La CL_{50} se ve modificada en las pruebas de toxicidad en presencia de *Chlorella vulgaris* como alimento en el siguiente orden: SZ>fenol>DP>DSS.
- La presencia de *Ch. vulgaris* incrementa la intensidad tóxica, en mayor medida con el fenol y el DSS.
- La sensibilidad de *D. magna* al DP y al SZ disminuye en presencia de *Ch. vulgaris* y la incrementa para el fenol y el DSS.

RECOMENDACIONES.

- Considerando los resultados obtenidos en el presente trabajo, se sugiere realizar de manera periódica tóxicos de referencia que se utilicen internacionalmente; para evaluar el estado de respuesta de los organismos de prueba como *Daphnia magna* y de esta manera, garantizar resultados confiables y de calidad.
- Se sugiere continuar probando, además de los tóxicos mencionados, otros que permitan realizar y mejorar el funcionamiento de la metodología existente, con la finalidad de detectar si los organismos de prueba son tolerantes o hipersensibles a los tóxicos evaluados y no afecten el resultado de las evaluaciones de toxicidad de muestras ambientales.
- Realizar estudios crónicos con y sin alimento (inmóvil y en suspensión) que provean de información más completa para poder valorar los efectos biológicos de los tóxicos presentes en el ambiente. Además de evaluar mortalidad, se deben considerar aspectos como reproducción y comportamiento.

REFERENCIAS

- Adema, D.M. 1978. *Daphnia magna* as a Test Animal in Acute and Chronic Toxicity Tests. *Hidrobiología*. **59**: 125 – 134.
- Alasdair, H. y Neilson., 1994. **Organic chemicals in the aquatic environment. Distribution, persistence and toxicity.** Chapter 7. *Ecotoxicology*. De. Lewis Publishers. USA.
- Anderson, G. 1944, **The Toxicity Thresholds of various substances found in industrial wastes as Determined by the Use of *Daphnia magna***, *Sewage Works Journal*, November, **16**: 1156 – 1165.
- American Public Health Association (APHA), 1995. **Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater.** 17 th ed; Washington, D.C, 1989; **8010**:1.
- American Society for Testing and Materials. (ASTM), 1978. **Proposed Standard Practice for Conducting Renewal Life Cycle Toxicity Tests with the Daphnid, *Daphnia magna***, Draft No. 2 E-35.21 Philadelphia, Pennsylvania.
- American Society for Testing and Materials. (ASTM), 1988. **Standard Guide for Conducting Renewal Life-Cycle Toxicity Test with *Daphnia magna***, E: 1193 – 87.
- Baird, D.J., Barber I., Bradley M., Calow P., y Soares A. 1989. **The *Daphnia* Bioassay: A Critique.** *Hidrobiología*. **188 / 189**: 403 – 406.
- Baudo, R. 1987. **Ecotoxicological testing with *Daphnia***. *Mem. Inst. Italia. Hidrobiol.* **45**: 461 – 482.
- Belabed, W., Kestali N., y Semsari S.M., 1993 **Evaluation de la toxicité de quelques métaux lourds à l'aide du tests *Daphnie***. Tribune de L'eau No. 565/5 Sep/Oct 93.
- Bradley, M.C., Naylor C., Calow P., Bair, D.J. y Soares A. 1993. **Reducing Variability in *Daphnia* Toxicity Tests.** A case for further standardization In: Progress in Standardization of Aquatic Toxicity Tests. Chapter 4. Lewis Publishers. N.Y. p.p. 57-71.
- Breukelman, J., 1932. **Effect of Age and Sex on Resistance of *Daphnids* to Mercury Chloride.** *Science*, **76**: 302-306.
- Buikema, A. L.; B.R. Niederlehner y J. Cairns. 1982. **Biological monitoring.** Part IV-Toxicity testing. *Water. Res.***16**:239-262.
- Bulus, G.D. y Ronco, E.D., 1996. **Acute Toxicity Bioassay Using *D. obtusa* as Tests.** *Organism, Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal.* **11**: 255 – 258.
- Calow, P., 1998. **Handbook of ecotoxicology.** Edit. Blackwell Science, Ltd. USA. pp. 885.
- Cañizares-Villanueva, R.O., Martínez-Jerónimo, F.F., y Espinosa, Ch., 1999. **Acute toxicity to *Daphnia magna* of efluentes containing, Cd, Zn and mixture Cd, Zn after metal removal by *Chlorella vulgaris*.** *Environ. Toxicol.* **15**:160-164.
- Cowgill, U.M., y Milazzo, D.P., 1991a. **The sensitivity of Two Cladoceans to Water Quality Variables: Alkalinity.** *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **21**: 224-232.

- Cowgill, U.M., y Millazo D.P. 1991b. **The Sensitivity of *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna* to Seven Chemical Utilizing the Three Brood Test.** *Arch Environmental Contam. Toxicol*, **20**: 211 – 217.
- Cox, J.E., Naylor C., Bradley, M. C. y Calow P. 1992. **Effect of Differing Maternal Ration on Adult Fecundity and Offspring Size in Laboratory Cultures of *Daphnia magna* Straus for Ecotoxicological Testing.** *Aquatic Toxicology*, **24**: 63 – 74.
- Crookes, M.J., 1996. **Fenol.** *Toxic Substances Division. Environmental Hazard Assessment*.1:3-14.
- Chávez, A. M., y Márquez, J.L., 1985, **Indicadores Biológicos de Contaminación Acuática, Memorias del Ciclo de Conferencias sobre Contaminación ambiental.**, CyMA UIICSE-ENEPI. UNAM.
- Donald, E.H., y Boyd, J.E. 1967. **Use of *Daphnia magna* for the Microbioassay of Pesticides. I. Development of standard techniques for rearing *Daphnia* and preparation of dosage-mortality curves for pesticides.** *Journal of Economic Entomology*. **60**: 1-17.
- Dorn, P. B., 1987. **Hexavalent chromium as a reference toxicant in effluent toxicity tests.** *Environ. Toxicol. Chem.* **6**: 435-444.
- Eledent, B.P., y 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 *D. magna*.** *Wat. Res.* **24**: 157-167.
- Elnabarawy, M. T.; Welter, A.N. y Robideau, R.R. 1986. **Relative sensitivity of three daphnid species to selected organic and inorganic chemicals.** *Environ Toxicol. Chem.***5**: 393-398.
- Enserink, L., Luttmer W. y Dicpeveen M., 1990. **Reproductive strategy of *Daphnia magna* affects the Sensitivity of its Progeny in Acute Toxicity Tests.** *Aquatic Toxicology*. **17**: 15 – 26.
- Enserink, L., de la Haye y Maas, H., 1993. **Reproductive strategy of *Daphnia magna* affects the sensitivity of this progeny in acute toxicity test.** *Aquatic Toxicology* **17**: 15-25.
- Environmental Protection Conservation and Protection Environment. Canada. (EPS) 1990 a. **Biological test method. Reference Method for Determining Acute lethality of EFFI vents to *D. magna*.** Environment Protection Series. EPS. 1/RM/14 July.
- Environmental Protection Conservation and Protection Environment. Canada. (EPS) 1990 b. **Guidance Document for Control Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants;** Environment Protection Series, Report EPS 1/RM/15.
- Espina, S., Díaz, F., y Rosas., 1986. **Influencia del detergente sobre el balance energético de *Ctenopharyngodon idella* a través de un bioensayo crónico.** *Contaminación ambiental*. **2**: 25-37.
- Fargasová, A., 1994. **Toxicity of metals of *Daphnia magna* and *Tubifex tubifex*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*.**52**: 300-309.
- Frank, E., Gutric, y Perry., 1980. **Introduction to environmental toxicology.** Detection: Bioassay Gary M. Rand. De. Elsevier, New York. p.p. 390 – 401.

- Frear, D.E., y Boyd, E. J., 1967. **Use of *Daphnia magna* for the Microbioassay of Pesticides. I. Development of Standardized Techniques for Rearing *Daphnia* and Preparation of Dosage-Mortality Curves for Pesticides.** *Journal of Economic Entomology*. **60**: 1228-1236.
- Freeman, L., 1953. **Toxicity Thresholds of Certain Sodium Sulfonates for *Daphnia magna* Straus.** *Sewage and Industrial Wastes*. November, **25**: 1331-1335.
- Gama, J., Sarma, S., y Fernández M., 1999. **Combined Effects of Chlorella Density and Methyl Parathion Concentration on the Population Growth of *Brachionus calyciflorus* (rotifera).** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **62**: 769 – 775.
- Gendusa, T.C., Beitinger, T.L., y Rodgers, J.H., 1993. **Toxicity of hexavalent chromium from aqueous and sediment sources to *Pimephales promelas* and *Ictalurus punctatus*.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **50**: 144-151.
- Gersich, F.M. 1984. **Evaluation of a Static Renewal Chronic Toxicity Test Method for *Daphnia magna* Straus Using Boric Acid.** *Environmental Toxicology and Chemistry*. **3**: 89 – 94.
- Gersich, F.M., Blanchard, S. L., Aplegath, y Park C.N., 1986. **The Precision of Daphnid (*Daphnia magna* Straus, 1820) Static Acute Toxicity Test.** *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **15**: 741-749.
- Gorbi, G., Corradi G., Torrelli y Boss., 1996. **Comparison between a normal and Cr tolerant strain of *Scenedesmus acutos* as a food source to *Daphnia magna*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **35**: 109 – 111.
- Goulden, C. E., y Comotto, R. H., 1982. **Procedures and recommendations for the culture and use of *Daphnia* in bioassay studies in aquatic.** Toxicology and hazard assessment fifth conference. ASTM STP 766. J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop. Eds. American Society for Testing and Materials. pp. 139 – 160.
- Harte, J., 1991. **Guía de las sustancias contaminantes**, México, D.F. Ed. Grijalbo, p.p. 91-100.
- Hodgson, E., y Dauteman, W.C., 1980. **Metabolism of toxicants. Phase I reactions.** In: Introduction to Biochemical Toxicology. Eds E. Hodgson y F.E. Guthric. New York: Elsevier. p.p. 113-118.
- ISO 6341-1982 Water quality. **Determination of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera-Crustacea).** First edition, International Organization for Standardization, Report No. ISO 6341-1982 (E), Geneva Switzerland.
- Jansen, C.R. y Persoone G., 1993. **Rapid Toxicity Screening Test for Aquatic Biota. 1 Methodology and Experiments with *D. magna*.** *Environmental, Toxicology and Chemistry*. **12**: 711 – 717.
- Krassoí, F.R. y M. Julli., 1994. **Chemical batch as a factor affecting the acute toxicity of the reference toxicant potassium dichromate to the cladoceran *Moina australiensis* (Sars).** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **53**: 153-157.
- Kopplin, M., 2001. **Toxicología Ambiental. Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental.** Universidad de Arizona.

- Knops, M., Altenburger R. y Segner H., 2001. **Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress.** *Aquatic Toxicology*. **53**: 79-90.
- Kungolos, A., y Aoyama, I., 1993. **Interaction Effect, Food Effect, and Bioaccumulation of Cadmium for the System *Daphnia magna*-*Chlorella ellipsoidea*.** *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*. **8**:351-369.
- Lacouture, F.G., 1984. **Relación entre los Seres Vivos y su Medio Ambiente.** Ed. Trillas, México, p.p. 13-15.
- LeBlanc, G.A., 1980. **Acute Toxicity of Priority Pollutant to Water flea (*Daphnia magna*).** *Bull. Environmental Contamination Toxicity*. p.p. 24- 30.
- Leeuwangh, P., 1978. **Toxicity tests with daphnids: Its application in the management of water quality.** *Hydrobiologia* **225**: 281-290.
- Lewis, P.A., y Weber C. I. 1985. **In A study of the reliability of *Daphnia* Acute toxicity Tests; Cardwell, R. D.; Purdy R., Bahner, R. C., Eds; *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium; American Society for testing and Materials*: Philadelphia; pp 73-86; ASTM STP 854.**
- Lozano, 1997. **Determinación de la toxicidad aguda de los residuales mediante bioensayos con el Crustáceo *Daphnia magna* y semillas de rábanos *Raphanus sativus*.** Tesis Profesional. UNAM FES Iztacala. 1-25.
- Lu, C.F., 1985. **Toxicología Básica. Riesgo por exposición a sustancias tóxicas.** Ed. Harla, Madrid España. p.p. 100-105.
- Maciorowski, H.D. y Clarke R., 1980 **Advantages and disadvantages of using invertebrates in toxicity Testing.** *Aquatic Invertebrate Bioassays*. (Eds A.L. Buikema y Jhon Cairns) ASTM STP 715 p.p. 36-47
- Manson, 1997. **Biology of freshwater pollution.** Edit. Addison Wesley Longman Limited, England. p.p. 356.
- Martínez F., Villaseñor R., G., y Espinoza F., 1994. **Effect of food type and concentration on the survival longevity, and reproduction of *Daphnia magna*.** *Hidrobiología*, **282**: 207-214.
- Martínez-Jerónimo y García-González., 1994. **Effect of Food Concentration on the Chronic Toxicity of Sodium Dodesyl Sulphate to *Daphnia magna*.** *Journal of Aquatic Ecosystem Health* **3**: 247 – 263.
- Martínez-Jerónimo, F.F. 1995. **Autoecología experimental de *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) y su aplicación en estudios de toxicología acuática.** Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. p.p. 157.
- Montpellier, Fevrier, 1987. Método de Unidades Probabilísticas. Análisis Estadístico Probit.
- Moreno S., y Devars, S., 1999. **Abundancia de los metales pesados en la Biosfera.** En: *Contaminación ambiental por metales pesados. Impacto en los seres vivos.* Editores: Cervantes C. y Moreno S.R. Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Cardiología. México D.F. p.p. 1-6.

- Müller, H.G., 1980. **Experiences with tests systems using *Daphnia magna***. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **4**:21-25.
- Münzinger, A., y Monicelli, F., 1991. **A comparison of the sensitivity of three *Daphnia magna* populations under chronic heavy metal stress**. *Ecotoxicol Environ. Safety*. **22**: 24-31.
- Münzinger, A. y Monicelli, F. 1992. **Heavy metal co-tolerance in a chromium tolerant strain of *Daphnia magna***. *Aquat. Toxicol.* **23**: 203-216.
- Muñoz, M. G. y Ramírez S., 1990. **Método de toxicidad utilizando *D. magna* y su inclusión dentro de la normatividad ambiental**. Simposium de Calidad Ambiental para el Desarrollo Sustentable. Secretaria de Desarrollo Social. Instituto Nacional de Ecología. Dirección General de Normatividad Ambiental. 21-23.
- Naylor, C., Cox, J., Bradley, M.C. y Callow, P., 1993. **Effect of differing maternal food ration on susceptibility of *D. magna* Straus neonates to toxic substances**. *Aquatic toxicology*. **24**: 75 – 82.
- Naylor, M.C. 1993. **Freeze-Dried *Chlorella vulgaris* as food for *Daphnia magna* Straus in toxicity testing**. *Ecotoxicol. Environ, Saf.* **25**: 166-172.
- Nikunen, E y Miettinen V. 1985. ***Daphnia magna* as an Indicator of the Acute Toxicity of wastewater**. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **35**: 368 – 374.
- Nriagu, J.O., y Pacyna J.M., 1988. **Quantitative assesment of worldwide contamination of air, water and solids by trace metals**. *Nature* 333, 134-139.
- Norma CETEEBLS-018. 1986. **Test de Toxicidae Aguda *Daphnia magna* Straus. Cladocera – Crustácea**. Portugal.
- Norma Oficial Mexicana NOM- AA-087-1995-SCFI. **Análisis de Agua Evaluación de Toxicidad Aguda con *Daphnia magna* Straus (Crustácea Cladocera) – Método de prueba**. Dirección General de Normas. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial.
- Núñez, G., 2002. **Efecto letal y subletal de un fluido de perforación polímero en post larvas y juveniles de *Litopenaus cetiferos* (Crustácea-Decápoda)**. Tesis de Maestría. Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Pág. 78.
- Organization for Economic Cooperation and Development, (OECD) 1984. ***Daphnia sp.* Acute immobilization test and reproduction test**. Guidelines for Testing of Chemicals. 1984.. No. 202, Paris, France 16 pp
- Oikari A., Kukkonen J., y Virtanen V. 1992. **Acute Toxicity of Chemicals to *Daphnia magna* in Humic Waters**. *The Science of the Total Environment*. **117 / 118**: 367 – 377.
- Paggi, J.C., 2002. ***Daphnia magna*: El “canario de las aguas”** Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Instituto Nacional de Limnología (INALI) Santa Fe.
- Parker, 1983. **Result of an Interlaboratory Study on the Toxicity of Potassium Dichromate to *Daphnia***. Environmental Protection Service Environment Canada.

- Parker, 1985. **Results of an interlaboratory study to determine the acute toxicity of potassium dichromate to *Daphnia magna***. Part 2. Env. Prot. Service Canada.
- Péqueux, A. 1995. **Osmotic regulation in crustaceans**. *J. Crust. Biol.* **15**: 1-60.
- Peter, C., 1993. **Handbook of Ecotoxicology**. Vol. 1. 4° Freshwater Invertebrate Toxicity Test. G. Persoone y C.R. Janssen Editorial Anvisory Soar. p. 51 – 64.
- Pica–Granados, Y., Trujillo, G.D., y Hernández H.S., 2000. **Bioassay standardization for water quality monitoring in Mexico**. *Environ. Toxicol.* **15**: 322-330.
- Rainbow, P.S., 1997. **Ecofisiology of trace metal uptake in crustaceans**. *Est. Coast. Shelf Sci.* **44**: 169-175.
- Ramírez, R. C., 1997. **Estudio Preeliminar del Efecto Toxicológico de Inhibidores de Corrosión en Poblaciones de Bacterias y Crustáceos**. Tesis Biología, UNAM FES Zaragoza, México, D.F. 60 p.
- Rand, G.M., y Petrocelli. S.R., 1985. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Copyright. U.S.A. 666 pp.
- Reeves, A. L. 1981. **The metabolism of foreign compounds**. In: Toxicology: Principles and practices. Vol. 1. Ed. Reeves. New York. John Wiley.
- Resource Conservation and Recovery Act (RCRA). 1976. Pub. L. No. 94-580; 90 Stat. 2795, et seq.; 42 U.S. C. 6901, et seq.
- Ribelles, A., M. Carrasco, M. Rosety y M. Aldana. 1995. **A histochemical study of the biological effects of sodium dodecyl sulfate on the intestine of the gilthead seabream *Sparus aurata* L.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **32**: 131-38.
- Sarma, S.S.S. y Nandini S. 1999. **Methods and experimental design In: International Workshop on Zooplankton Ecotoxicology involving Rotifera, Cladocera and Copepoda**. ENEP Iztacala. UNAM, p.p. 101-127.
- Seoanez, C.M., 1995. **Ingeniería Medioambiental Aplicada a la Industria y Empresas. Manual para Responsables Medioambientales**. Colección Ecología Industrial. Grupo Mundi-Presa. Madrid, España. p.p. 163-165, 397-401.
- Stephenson, R., y Watts, S. A., 1984. **Chronic Toxicity Test whit *Daphnia magna*: The Effects of Different Food and Temperature Regimes on Survival, Reproduction and Growth**. *Environmental Pollution*. **36**: 95 – 107.
- Taylor, B.E., 1985. **Effects of food limitation on growth and reproduction of *Daphnia***. *Arch. Hydrobiol. Beih.* **21**: 285-296.
- Toxic Substances Controls Act (TSCA), 1976. Pub. L. No. 94-496; 90 Stat. 2003, et seq.; 15 U.S. C. 2601, et seq.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 1982. **Daphnid Acute Toxicity Test**. Office of Toxic Substances, Document EG-1ES-1, Washington, D.C.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 1985 **Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms**. W.H. Peltier y C.I. Weber (eds). Report EPA/6000/4-85/013, Cincinnati, OH (1985a) US Environmental Protection Agency (EPA). 1982

Van Leeuwen, C.J., G. Niebek y M. Rijkeboer, 1987. **Effects of chemical stress on the population dynamics of *Daphnia magna*: A. comparison of two test procedures**. *Ecotoxicol Environ. Safety* **14**: 1 – 11.

Venegas-Pérez, R. C., 1996. **Efectos subletales del cadmio y zinc en el camarón blanco *Penaeus setiferus***. Tesis de doctorado en ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM, México. p.p. 118.

Walker, J.D., 1990. **Effects of chemical on microorganisms**. *Research Journal WPCCK*. **62**: 1-11.

Weber, C.I., 1991. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwaters and marine organisms**. Ath ed. USEPA, Cincinnati, Ohio, EPA 600 4-90 027. p.p. 197.

Wells, Peter G.; Kenneth Lee y Blassie Christian, 1998. **microscale testing in aquatic toxicology**. CRC Press, USA. p.p. 679.

Zar, J. H., 1999. **Biostatistical Analysis**. Ed. Prentice – Hall. New York. 4ta Edición. 663 p.

Zúñiga, L.S., 2002. **Efecto del cadmio en la osmorregulación de juveniles de *Litopenaeus setiferus* (Crustácea: Decapoda)**. Tesis de Maestría, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. 104 p.

ANEXOS

ANEXO 1

CONDICIONES DE CULTIVO Y MANTENIMIENTO PARA *Daphnia magna*

Preparación de materiales.

El material que se utilizó en las pruebas, se lavó con acetona y se trató con ácido nítrico al 30%. Antes de iniciar las pruebas, todos los recipientes se enjuagaron con agua reconstituida.

Preparación del agua reconstituida.

Se preparó el agua reconstituida libre de contaminantes y con características deseables de pH, dureza, conductividad y oxígeno disuelto. Se agregaron los siguientes reactivos: 2.4 g de sulfato de magnesio ($MgSO_4$), 3.48 g de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$), y 0.16 g de cloruro de potasio (KCl). Por separado, se disolvió 2.4 g de sulfato de calcio dihidratado ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$), en un litro de agua bidestilada, se agitó hasta que se disolvió completamente y se adicionaron a los 18 litros restantes preparados con anterioridad, se mezcló perfectamente y se aireó toda la noche.

Mantenimiento de los organismos.

Se adquirió una incubadora, marca REVCO con un intervalo de: 15 a 40°C. En la cual, se lograron mantener los parámetros fisicoquímicos dentro de los rangos establecidos (Tabla 22).

Tabla 25. Parámetros que se observaron en el cultivo de *D. magna*.

Parámetro	Intervalo
Temperatura	20°C a 22°C
pH	7.5 a 8.5
Dureza	160 mg/l a 180 mg/l
Oxígeno disuelto	Por arriba de 3 mg/l
Conductividad	250 mhoms/cm a 600 mhoms/cm
Fotoperíodo	16 h luz
Iluminación	600 a 1 000 luxes

Fuente: (NOM-AA-087-1995-SCFI).

Alimentación.

El alimento estuvo constituido por una especie de algas verdes conocida como: *Chlorella vulgaris*. La preparación se hizo a partir de una cepa inicial del alga. Se procedió a su inoculación en medio Bold (Tabla 26) previamente esterilizado. Una vez que se contó con un medio limpio y confiable, se realizó el filtrado del medio, las membranas utilizadas (0.45 micras) a un volumen de 100 ml de agua reconstituida. De cada medio filtrado se realizó un conteo en la cámara de New Bawer. La cantidad que se suministró fue de 2.5×10^6 células/ml/organismo, aproximadamente 1 ml de alimento por organismo. Ésta se realizó tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes). El conteo de las células de *Chlorella* se efectuó con la ayuda de una cámara de New-Bawer en un microscopio óptico.

Los frascos con el alimento preparado, se mantuvieron en refrigeración únicamente por dos semanas, al término de las cuales, el alimento fue desechado.

Tabla 26. Preparación del medio Bold para cultivo de *Chlorella vulgaris*

STOCK	COMPUESTO	CANTIDAD (g)	CANTIDAD DE AGUA DESTILADA (ml)
1	NITRATO	10	400
2	CLORURO DE CALCIO	1	400
3	SULFATO DE MAGNESIO	3	400
4	FOSFATO ÁCIDO DE POTASIO	3	400
5	FOSFATO BI-ÁCIDO DE POTASIO	7	400
6	CLORURO DE SODIO	1	400
7	EDTA	50	1000
	HIDRÓXIDO DE POTASIO	31	
8	SULFATO DE FIERRO	4.98	1000
	ÁCIDO SULFÚRICO	1 ml	
9	ÁCIDO BÓRICO	11.42	1000
	ZULFATO DE ZINC	8.82	
	CLORURO DE MANGANESO	1.44	
10	ÓXIDO DE MOLIBDENO	0.71	1000
	SULFATO DE COBRE	0.57	
	NITRATO DE COBALTO	0.49	

Fuente: (NOM-AA-087-1995-SCFI)

ANEXO 2

PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA DUREZA TOTAL

Fuente: (NOM-AA-087-1995-SCFI)

1. Este se determinó por medio el método de titulación con E.D.T.A.
2. Se tomaron 50 ml de la muestra, de tal manera que se gastaron menos de 15 ml, del E.D.T.A. en la titulación.
3. Se adicionó 1 ó 2 ml de solución amortiguadora y se obtuvo un pH de 10 a 10.1.
4. Se agregó una cantidad apropiada de indicador eriocromo negro T. (0.1 a 0.2 gr)
5. Se tituló con E.D.T.A., el vire fue de rojizo a azul.
6. Cálculos:

mg/l de Dureza como CaCO_3 =

$$\frac{\text{ml de E.D.T.A.} \times F \times 1000}{\text{ml de muestra}}$$

donde:

F= Factor que se obtiene al valorar la solución. de E.D.T.A..

$$F = \frac{\text{mg de CaCO}_3}{\text{ml de EDTA}}$$

ANEXO 3 PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

1. DICROMATO DE POTASIO

Tabla 27. Parámetros fisicoquímicos de las pruebas definitivas sin alimento de toxicidad aguda con DP en *D. magna*. Se incluyen valores máximos, mínimos, promedio y la desviación estándar.

CONCENTRACIÓN mg/l	TEMPERATURA °C		PH		DUREZA mg CaCO ₃		OXIGENO DISUELTO mg/l		CONDUCTIVIDAD microhoms/cm	
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
0.50	22.7	22.8	7.58	7.6	118.20	120.17	7.9	7.1	540	543
0.45	22.7	22.8	7.58	7.6	118.20	120.17	7.9	7	538	540
0.40	22.7	22.8	7.60	7.6	119.00	122.17	7.9	7	536	539
0.35	22.7	22.8	7.62	7.6	122.00	124.17	7.8	7.1	530	535
0.30	22.7	22.8	7.62	7.6	120.00	122.17	7.8	7.1	517	520
0.25	22.7	22.8	7.67	7.6	124.1	126	7.8	7.1	508	511
Testigo	22.7	22.8	7.63	7.7	120.17	123.06	8	7.3	500	501
S =	0.0519		0.0334		2.3723		54.8722		15.5796	
Promedio =	22.80		7.61		121.40		7.48		525.57	
Rango =	22.7 - 22.8		7.58 - 7.67		118.20 - 124.17		7.0 - 8.0		500 - 543	

Tabla 28. Parámetros fisicoquímicos de la prueba definitiva con alimento de toxicidad aguda con DP en *D. magna*. Se incluyen valores máximos, mínimos, promedio y la desviación estándar.

CONCENTRACIÓN mg/l	TEMPERATURA °C		PH		DUREZA mg CaCO ₃		OXIGENO DISUELTO mg/l		CONDUCTIVIDAD microhoms/cm	
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
0.50	22.7	22.8	7.58	7.6	118.20	120.17	7.9	7.1	539	541
0.45	22.7	22.8	7.58	7.6	118.20	120.17	7.9	7	496	503
0.40	22.7	22.8	7.60	7.6	119.00	122.17	7.9	7	496	503
0.35	22.7	22.8	7.62	7.6	122.00	124.17	7.8	7.1	496	503
0.30	22.7	22.8	7.62	7.6	120.00	122.17	7.8	7.1	496	505
0.25	22.7	22.8	7.67	7.6	124.1	126	7.8	7.1	490	500
Testigo	22.7	22.8	7.63	7.7	120.17	123.06	8	7.3	500	501
S =	0.0519		0.0334		2.3723		54.8722		15.3896	
Promedio =	22.80		7.61		121.40		7.48		504.92	
Rango =	22.7 - 22.8		7.58 - 7.67		118.20 - 124.17		7.0 - 8.0		496 - 541	

2. SULFATO DE ZINC

Tabla 29. Parámetros fisicoquímicos de las pruebas definitivas sin alimento de toxicidad aguda con SZ en *D. magna*. Se incluyen valores máximos, mínimos, promedio y la desviación estándar.

CONCENTRACIÓN mg/l	TEMPERATURA °C		PH		DUREZA mg CaCO ₃		OXIGENO DISUELTO mg/l		CONDUCTIVIDAD microhoms/cm	
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
5.0	22.2	22.8	7.9	8.1	140	145	8.3	7.9	440	453
4.0	22.1	22.8	7.8	8.1	138	138	8.3	7.9	428	417
3.0	22.1	22.7	7.8	8.1	126	128	8.3	7.4	420	415
2.0	22.0	22.6	7.7	7.9	120	126	8.3	7.4	419	423
1.0	21.9	22.5	7.6	7.9	118	119	8.2	7.3	419	435
0.5	21.9	22.4	7.5	7.8	114	115	8.1	7.1	420	540
Testigo	22.4	22.5	7.5	7.6	160	165	7.9	7.5	500	510
S =	0.3180		0.2093		16.1409		0.4292		222.8031	
Promedio =	22.4		7.80		132.28		7.85		446	
Rango =	21.9 - 22.8		7.5 - 8.1		114-165		7.1 - 8.3		415 - 540	

Tabla 30. Parámetros fisicoquímicos de la prueba definitiva con alimento de toxicidad aguda con SZ en *D. magna*. Se incluyen valores máximos, mínimos, promedio y la desviación estándar.

CONCENTRACIÓN mg/l	TEMPERATURA °C		PH		DUREZA mg CaCO ₃		OXIGENO DISUELTO mg/l		CONDUCTIVIDAD microhoms/cm	
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
5.0	22.1	22.8	8.1	8.4	110.32	112.12	7.1	6.8	443	450
4.0	22.1	22.8	8.1	8.4	110.32	114.12	7.1	6.8	442	447
3.0	22.1	22.7	8.1	8.3	100.24	110.32	7.1	6.8	440	439
2.0	22.0	22.7	7.9	8.2	100.24	110.32	6.9	6.8	440	439
1.0	22.0	22.6	7.8	8.1	100.24	108.10	6.9	6.7	437	430
0.5	22.0	22.6	7.7	8.1	100.24	106.14	6.9	6.5	430	428
Testigo	22.2	22.7	7.5	7.7	100.24	100.24	7.3	5.4	500	516
S =	0.3348		0.2730		5.4171		0.4480		26.0874	
Promedio =	22.4		8.02		105.94		6.79		448.64	
Rango =	22.0 - 22.8		7.5 - 8.4		100.24 - 114.12		5.4 - 7.3		428 - 516	

3. FENOL

Tabla 31. Parámetros fisicoquímicos de las pruebas definitivas sin alimento de toxicidad aguda con fenol en *D. magna*. Se incluyen valores máximos, mínimos, promedio y la desviación estándar.

CONCENTRACIÓN mg/l	TEMPERATURA °C		PH		DUREZA mg CaCO ₃		OXIGENO DISUELTO mg/l		CONDUCTIVIDAD microhoms/cm	
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
17.5	22.4	23.0	8.11	8.2	128	132	7.4	5.6	552	560
15.0	22.4	23.0	8.31	8.4	128	132	7.4	5.8	483	490
12.5	22.4	23.0	8.44	8.5	128	134	7.4	5.8	483	490
10.0	22.4	23.1	8.44	8.5	147.75	150	7.4	5.8	488	500
7.5	22.5	23.2	8.45	8.6	135.93	146	7.5	5.6	490	510
5.0	22.0	23.1	8.45	8.6	120.17	144	7.5	5.6	490	510
2.5	22.7	23.2	8.46	8.5	114.26	146	7.5	5.8	491	510
Testigo	22.8	23.4	8.46	8.5	114.26	140	7.5	7.5	435	440
S =	0.3964		0.1293		11.4268		0.8955		31.8870	
Promedio =	22.8		8.43		133.77		6.69		495.12	
Rango =	22.0 - 23.4		8.11 - 8.6		114.26 - 150		7.4 - 7.5		435 - 560	

Tabla 32. Parámetros fisicoquímicos de la prueba definitiva con alimento de toxicidad aguda con fenol en *D. magna*. Se incluyen valores máximos, mínimos, promedio y la desviación estándar.

CONCENTRACIÓN mg/l	TEMPERATURA °C		PH		DUREZA mg CaCO ₃		OXIGENO DISUELTO mg/l		CONDUCTIVIDAD microhoms/cm	
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
17.5										
15.0	24.0	24.1	7.85	8.20	110.32	126.08	7.6	6.1	486	580
12.5	24.0	24.2	7.85	8.20	116.23	133.96	7.6	6.2	498	577
10.0	23.8	24.7	8.32	8.39	116.23	133.96	7.6	6.1	496	577
7.5	24.0	24.2	8.31	8.42	116.23	124.11	7.6	6.0	488	557
5.0	24.0	24.3	8.42	8.48	114.26	124.11	7.6	6.0	490	546
2.5	24.1	24.4	8.40	8.43	120.17	137.90	7.7	6.2	491	540
Testigo	24.1	24.3	8.42	8.43	116.22	133.99	7.7	6.1	491	538
S =	0.2243		0.1946		9.8360		0.7941		36.7786	
Promedio	24.1		8.30		124.85		6.95		527.56	
Rango =	23.8 - 24.7		7.85 - 8.48		110.32 - 143.81		6.0 - 8.0		486 - 580	

4. DODESIL SULFATO DE SODIO

Tabla 33. Parámetros fisicoquímicos de las pruebas definitivas sin alimento de toxicidad aguda DSS en *D. magna*. Se incluyen valores máximos, mínimos, promedio y la desviación estándar.

CONCENTRACIÓN mg/l	TEMPERATURA °C		pH		DUREZA mg CaCO ₃		OXIGENO DISUELTO mg/l		CONDUCTIVIDAD microhoms/cm	
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
17.5	23.3	23.4	8.38	8.4	128.05	130.10	6.5	5.0	547	551
15.0	23.1	23.4	8.36	8.4	124.11	128	6.5	5.0	515	533
12.5	23.1	23.4	8.27	8.4	118.20	126	6.5	4.9	508	521
10.0	23.1	23.4	8.25	8.4	104.41	124	6.5	4.9	504	518
7.5	23.1	23.4	8.20	8.5	104.41	122	6.5	4.8	504	515
5.0	23.1	23.4	8.20	8.5	102.44	122	6.5	4.8	503	510
Testigo	23.1	23.4	8.4	8.5	102.44	120	6.5	4.6	500	506
S =	0.1500		0.0964		9.6798		0.8706		16.7407	
Prom =	23.3		8.37		118.83		5.67		514.125	
Rango =	23.1 - 23.4		8.20 - 8.5		102.44 - 130.10		4.6 - 6.5		495 - 551	

Tabla 34. Parámetros fisicoquímicos de la prueba definitiva con alimento de toxicidad aguda con DSS en *D. magna*. Se incluyen valores máximos, mínimos, promedio y la desviación estándar.

CONCENTRACIÓN mg/l	TEMPERATURA °C		PH		DUREZA mg CaCO ₃		OXIGENO DISUELTO mg/l		CONDUCTIVIDAD microhoms/cm	
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
17.5	24.0	24.4	8.2	8.6	130.69	126.85	4.8	4.1	491	505
15.0	24.0	24.4	8.3	8.8	115.32	115.32	4.8	4.1	494	502
12.5	24.0	24.4	8.2	8.8	107.63	113.39	4.8	4.1	496	500
10.0	24.0	24.4	8.2	8.9	115.32	109.55	4.8	4.1	497	500
7.5	24.0	24.4	8.4	8.9	121.08	105.71	4.8	4.1	497	501
5.0	24.0	24.4	8.3	8.9	121.08	105.71	4.8	4.0	497	501
Testigo	24.0	24.4	8.4	8.9	130.69	109.55	4.8	4.0	498	503
S =	0.2066		0.2849		8.0619		0.4004		3.5302	
Prom =	24.2		8.50		116.27		4.4		498.9	
Rango =	24.0 - 24.4		8.2 - 8.9		105.71 - 130.69		3.8 - 4.8		491 - 505	

ANEXO 4

MÉTODO PROBIT

La obtención de la CL_{50} se realizó mediante el “Método de Unidades Probabilísticas”, cuya secuencia se explica a continuación.

1. Se preparó una tabla con los siguientes datos:

- Concentración (es) usadas en la prueba (%)
- Log_{10} de las concentraciones (x)
- Número de organismos por concentración (N)
- Mortalidad observada por concentración (r)
- Porcentaje de mortalidad por concentración (P)
- Probit empírico (EP)
- Probit calculado

2. El valor del probit empírico se obtuvo en la siguiente tabla (35) a partir del % de mortalidad por concentración:

Tabla 35. Relación % de mortalidad/ Probit empírico

	Mortalidad %					Probits Empíricos				
--	--------------	--	--	--	--	-------------------	--	--	--	--

%	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
99 a	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

3. Se graficó en papel el Log_{10} de las concentraciones en el eje de las X y los probits empíricos en el eje “Y”.

4. Se efectuó el ajuste de la recta por el “método de mínimos cuadrados” utilizando la ecuación de la recta que se describe a continuación:

$$Y = mX + b$$

5. Finalizado esto, se trazó una recta perpendicular al eje “Y” exactamente en el valor de Probit igual a 5. En el punto de intersección con la recta ajustada, se proyectó hacia el eje “X” para obtener el Log_{10} de la CL_{50} .

6. Después de esto se determinó la CL_{50} mediante la siguiente relación:

$$\text{CL}_{50} = \text{Antilog}_{10} X \text{ (en } Y = 5 \text{)}$$

7. Para la determinación del error patrón, se calculó “S” que está definido como el intervalo de incremento de Log_{10} de la concentración (X) por unidad de incremento en el Probit empírico (EP) y tiene la siguiente relación:

$$S = \frac{X_2 - X_1}{CP_2 - CP_1}$$

Donde:

X_2 y X_1 Son los valores más bajos y más altos respectivamente obtenidos a partir de la concentración en Log_{10}

CP_1 y CP_2 Son los valores más bajos y más altos respectivamente obtenidos a partir del Probit calculado (CP)

8. Se determinó el error patrón del $\text{Log}_{10} \text{CL}_{50}$, preparando una tabla con los siguientes datos:

- Logaritmo de la concentración (X)
- Número de organismos en cada concentración (N)
- Probit calculado (CP)
- Factor ponderado (w), obtenido a partir de la tabla 36, considerando los valores de probit calculado (CP).
- Productos: Nw , NwX y NwX^2
- Sumatorias: Nw , NwX y NwX^2

FACTOR PONDERADO

Tabla 36 Factor ponderado (w), para el calculo de Probit (Y)

(w)	(y)									
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
1	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002	0.003	0.05	0.006	0.008	0.01
2	0.015	0.019	0.025	0.031	0.040	0.050	0.062	0.076	0.092	0.11
3	0.131	0.154	0.180	0.208	0.238	0.269	0.302	0.336	0.370	0.40
4	0.439	0.471	0.503	0.532	0.558	0.581	0.601	0.616	0.627	0.63
5	0.637	0.634	0.627	0.616	0.60	0.581	0.558	0.532	0.503	0.47
6	0.439	0.405	0.370	0.336	0.302	0.269	0.238	0.208	0.180	0.15
7	0.131	0.110	0.092	0.076	0.062	0.050	0.040	0.031	0.025	0.01
8	0.015	0.011	0.008	0.006	0.005	0.003	0.002	0.002	0.001	0.00

9. Una vez obtenidos el factor ponderado (w) y calculado los productos Nw, NwX2 y sumatorias, se obtuvo el error patrón (Eslog₁₀) de la CL₅₀ utilizando la siguiente relación.

$$Eslog_{10}CL_{50} = S^2 [\frac{1}{\sum Nw} + \frac{\sum Nw(m-z)^2}{\sum Nw (\sum NwX^2) - (\sum NwX)^2}]^{0.5}$$

Donde:

ES= error estándar

X= logaritmo de la concentración

s= intervalo de incremento

m= pendiente obtenida por mínimos cuadrados

w= factor ponderado obtenido de tablas

Nw= número de organismos por factor ponderado

NwX= producto con el logaritmo de la concentración

NwX2= producto por el cuadrado del logaritmo de la concentración

$$Z = NwX/Nw$$

10. El intervalo de confianza de la CL₅₀ está dado por la siguiente relación:

$$IC CL_{50} = (CL_{50})ESLogCL_{50}(In_{10})$$

ANEXO 5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de ANOVA fue realizado mediante el programa de computo STATISTICA 5.1, '98 Edición.

Tabla 37. Análisis de Varianza (DP). Efectos significativos $p < .05$

SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	Df Error	MS Error	F	p
0.0037	4	0.0009	0.0046	8	0.0006	1.6187	0.2602

Tabla 38. Análisis de Varianza (SZ). Efectos significativos $p < .05$

SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
6.4143	5	1.2829	6.5397	9	0.7266	1.7655	0.2161

Tabla 39. Análisis de Varianza. (DSS). Efectos significativos $p < .05$

SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
32.8822	5	6.5764	42.1737	8	5.2717	1.2475	0.3711

Tabla 40. Análisis de Varianza (Fenol) Efectos significativos $p < .05$

SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
11.5736	4	2.8934	8.2352	8	1.0294	2.8108	0.0997

El análisis de ANCOVA para cada tóxico fue realizado mediante el programa de computo STATISTICA 5.1, '98 Edición.

Tabla 41. Análisis de Varianza (Dicromato), 1 Covarianzas. Intensidad del tóxico.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Efecto	317.628	1	317.628	2.249	0.208
Error	564.894	4	141.224		

Tabla 42. Análisis de Varianza (Dicromato), 1 Covarianzas. Sensibilidad del tóxico.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Efecto	27.508	1	27.508	3.289	0.144
Error	33.457	4	8.364		

Tabla 43. Análisis de Varianza (Zinc), 1 Covarianzas Intensidad del tóxico.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Efecto	3.017	1	3.017	4.295	0.107
Error	2.810	4	0.702		

Tabla 44. Análisis de Varianza (Zinc), 1 Covarianzas. Sensibilidad del tóxico.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Efecto	19.574	1	40.204	13.128	0.022
Error	12.250	4	3.062		

Tabla 45. Análisis de Varianza (fenol), 1 Covarianzas. Intensidad del tóxico.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Efecto	1.381	1	1.381	8.201	0.046
Error	0.674	4	0.168		

Tabla 46. Análisis de Varianza (fenol), 1 Covarianzas. Sensibilidad del tóxico.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Efecto	372.993	1	372.993	16.532	0.015
Error	90.246	4	22.562		

Tabla 47. Análisis de Varianza (DSS), 1 Covarianzas. Intensidad del tóxico.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Efecto	0.082	1	1.292	32.661	0.005
Error	0.158	4	0.040		

Tabla 48. Análisis de Varianza (DSS), 1 Covarianzas. Sensibilidad del tóxico.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Efecto	10.809	1	61.146	2.462	0.008
Error	10.425	4	2.606		

COMPARACIÓN DEL EFECTO DE CUATRO TÓXICOS

Tabla 49. Comparación múltiple por Newman-Keuls; INTENSIDAD (S/alimento vs C/alimento). Efectos con significancia $p < .05$

	Cr s/a	fenol s/a	DSS s/a	Zn s/a	DP c/a	fenol c/a	DSS c/a	SZ c/a
promedio	154.93	4.2095	4.6473	13.750	175.840	5.6070	6.0165	13.9250
Cr s/a	1	0.0001	0.0001	0.0001	0.0014	0.0001	0.0002	0.0001
fenol s/a			0.9183	0.2881	0.0001	0.9524	0.9797	0.2268
DSS s/a				0.2673	0.0001	0.8476	0.9564	0.1945
Zn s/a					0.0001	0.2670	0.1977	0.9967
DP c/a						0.0001	0.0001	0.0002
fenol c/a							0.9287	0.1703
DSS c/a								0.0885
SZ c/a								1

s/a : sin alimento; c/a : con alimento

Tabla 50. Comparación múltiple por Newman-Keuls; SENSIBILIDAD (S/alimento vs C/alimento). Efectos con significancia $p < .05$

	Cr s/a	fenol s/a	DSS s/a	Zn s/a	DP c/a	Fenol c/a	DSS c/a	SZ c/a
Promedio	-9.0424	3.6976	-3.8855	11.8070	-8.0855	-6.5418	-12.846	6.4804
Cr s/a	1	0.0009	0.1716	0.0001	0.4560	0.4242	0.4241	0.0002
fenol s/a			0.0185	0.0388	0.0035	0.0066	0.0003	0.3634
DSS s/a				0.0003	0.3705	0.3991	0.0495	0.0056
Zn s/a					0.0001	0.0002	0.0001	0.1047
DP c/a						0.6120	0.2768	0.0006
Fenol c/a							0.1859	0.0013
DSS c/a								0.0002
SZ c/a								1

s/a: sin alimento; c/a: con alimento



ANEXO 6
FORMATOS DE REGISTRO
LABORATORIO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE AGUA

TIPO DE AGUA	FECHA	T°C	pH	CONDUCTIVIDAD (microhoms/cm)	DUREZA (mgCaCO3)	OXÍGENO DISUELTO (mg/l)	OBSERVACIONES	ANALIZÓ

Registro de análisis fisicoquímicos del agua bidestilada y reconstituida para *Daphnia magna*.

REGISTRO DE CULTIVO DE *Daphnia magna*

No. Frasco: _____

No. De Frasco: _____

FECHA	No. ORGANISMOS	MORTALIDAD	CAMADA	EDAD DE LOS ORGANISMOS	No. DE NEONATOS	OBSERVACIONES	ANALIZÓ

Registro de cultivo de *Daphnia magna*, bajo condiciones de laboratorio.

REGISTRO ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DEL AGUA DE PRUEBA

Tipo de prueba: _____

Identificación de la muestra: _____

Fecha análisis inicial: _____ Fecha de análisis final: _____

CONCENTRACIÓN	T°C		pH		DUREZA (mgCaCo ₃)		OXÍGENO DISUELTTO (mg/l)		CONDUCTIVIDAD (microhoms/cm)		OBSERVACIONES
	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	

Registro fisicoquímicos del agua de prueba, para el período de prueba con tóxico.

REGISTRO DE RESULTADOS DE PRUEBA

Fecha: _____ Hora inicio: _____ Hora término: _____

Clave de la muestra: _____ Tipo de prueba: _____

No. Organismos por concentración: _____ Edad de los organismos: _____

PRUEBA 1							PRUEBA 2										
CONCENTRACIÓN (mg/l)	LECTURAS NO. MUERTOS EN INTERVALOS DE TIEMPO						TOTAL	MORTALIDAD %	CONCENTRACIÓN (mg/l)	LECTURAS NO. MUERTOS EN INTERVALOS DE TIEMPO						TOTAL	MORTALIDAD %
	24 horas			48 horas						24	48	24 horas			48 horas		
	Replicas			Replicas			Horas	Horas		Replicas			Replicas			Horas	Horas
	1	2	3	1	2	3				1	2	3	1	2	3		
Testigo									Testigo								
CL₅₀:							CL₅₀:										

Registro de organismos muertos a 24 y 48 horas, aplicando el tóxico en *D. magna*