



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

Análisis comparativo de la respuesta de toxicidad de
Daphnia magna obtenida de la prueba estandarizada
y de un método simplificado

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
SONIA RANGEL VILAFRANCO

DIRECTORA DE TESIS:
BIÓL. IVONNE JAISIBI CUESTA ZARCO



TLANEPANTLA, EDO. DE MÉXICO

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

“No existen conocimientos más elevados o más bajos, sino un conocimiento único que emana de la experimentación.”

Leonardo Da Vinci (1452-1519).

*A mí
Por no desfallecer y
alcanzar una de las meta,
fijadas en mi vida.*

*A mis padres
Por confiar en mí y brindarme
su compañía, apoyo y aliento
sin condición alguna.*

*A mis hermanos
Por acompañarme siempre.*

*A mi novio
Horacio por apoyarme y
acompañarme en el largo camino.*

AGRADECIMIENTOS

A la Biol. Ivonne Jaisibi Cuesta Zarco, por aceptarme bajo su dirección, por el tiempo invertido en la concepción del presente trabajo, apoyo en el laboratorio, así como su apoyo moral, paciencia y comprensión a lo largo de él y lo más importante... creer en mí.

Al Dr. S.S.S. Sarma, Dr. Nandin Sarma, Dr. Pedro Ramírez García y Biol. Antonio Edmundo Cisneros Cisneros, por dedicarle tiempo a la revisión de este trabajo, así como por sus comentarios y sugerencias que llevaron al mejoramiento del mismo.

Al Ing. Enrique Mejía Maravilla, Gerente de Saneamiento y Calidad del Agua por su apoyo para la realización de este trabajo así como permitirnos amablemente el uso de las instalaciones del Laboratorio Nacional de Referencia de la Comisión Nacional del Agua.

Al M. en C. Eric Daniel Gutiérrez López, Subgerente de Estudios de Calidad del Agua e Impacto Ambiental por confiar en mí y darme la oportunidad al aceptarme en el servicio social, así como su apoyo y comentarios para la realización de este trabajo.

Al Químico Juan Ignacio Ustaran Cervantes, por su ayuda en el uso del DAPHTOX KIT

Al Biol. J Jesús Núñez Morales, Subgerente de Dictaminación Técnica y Emergencias Hidroecológicas y Servicios Ambientales, por su apoyo a lo largo de mi estancia en esta institución.

A la M. en C. Mónica Rangel Villafranco, M. en C. Israel Cárdenas Camargo por su invaluable apoyo durante la carrera.

A mis amigos que encontré en el Colegio de Ciencias y Humanidades, Belem Berenice Cruz Santiago, Edgar A. Villanueva Nandayapa, Lilitiana E. mejía Muñoz, Humberto Valladares Ocampo, por su invaluable amistad, todas las experiencias compartidas y por seguir a mi lado en este largo camino.

A mis amigos de toda la carrera, por su compañía y apoyo en cada momento, por todas las experiencias que compartimos, Nadya P. Rodríguez cordero, Maribel Urban Lozano, Ramse E. Chaires Espinosa, Dante Espinosa Aguilar Omar Uribe Venegas David Mónica López Rodríguez, Alejandra Castro Mora

A mis suegros, Margarita Saavedra y Miguel Barrera por su apoyo en este largo camino.

ÍNDICE

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Situación del agua en México.	1
1.2 Calidad del agua.	2
1.3 Ensayos toxicológicos.	3
1.4 Biología de <i>Daphnia magna</i> , Straus.	9
1.5 Importancia de <i>Daphnia magna</i> y otros cladóceros en ecotoxicología	13
1.6. Cromo VI como tóxico de referencia.	17
II. ANTECEDENTES	22
III. JUSTIFICACIÓN	25
IV. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos particulares	27
V. MATERIAL	28
5.1 Cristalería	28
5.2 Equipos e instrumentos	28
5.3 Reactivos	29
VI. MÉTODO	30
6.1 Prueba tradicional (CULTIVO)	30
6.1.1 Establecimiento del cultivo	30
6.1.2 Mantenimiento y requerimientos del cultivo	31
6.1.3 Montaje de pruebas	31
6.1.3.1 Preparación del tóxico de referencia	31
6.1.3.2 Preparación de las diluciones	33
6.1.4 Lectura de las pruebas	33
6.1.5 Obtención de la CL50	33

6.2. Prueba con el DAPHTOX-KIT (KIT)	34
6.2.1 Descripción y contenido del KIT	34
6.2.2 Preparación del agua dura para el KIT.	37
6.2.3 Eclosión de los efipios del KIT.	37
6.2.4 Montaje de las pruebas.	38
6.2.4.1 Tóxico de referencia.	38
6.2.4.2 Determinación de la escala de diluciones.	38
6.2.4.3 Preparación de las diluciones y llenado de la placa de prueba.	38
6.2.5 Lectura de las pruebas.	39
6.3 Pruebas con el CULTIVO CON AGUA DEL KIT	40
6.3.1 Establecimiento y manejo del cultivo.	41
6.3.2 Montaje y análisis de las pruebas.	41
6.4. Pruebas con el KIT CON AGUA DEL CULTIVO.	41
6.4.1 Eclosión de los neonatos.	41
6.4.2 Montaje y análisis de las pruebas.	41
6.5. Diseño experimental.	42
6.6. Análisis estadístico	42
VII. RESULTADOS.	43
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	49
IX. CONCLUSIONES.	52
X. LITERATURA CITADA.	54
ANEXO 1. Cultivos puros de <i>Selenastrum capricornutum</i> .	60
ANEXO 2. Solución de micronutrientes.	62
ANEXO 3. Limpieza del material	63

RESUMEN

Los bioensayos son una herramienta rápida y eficiente que nos permite emitir un diagnóstico parcial de la calidad del agua. El bioensayo con *Daphnia magna* es usado internacionalmente, en este trabajo se comparó la respuesta al cromo VI evaluada como la Concentración Letal Media (CL_{50}) entre neonatos en cultivo, obtenidos de hembras partenogenéticas, como lo establece la Norma Mexicana NMX-AA-087-1995 SCFI Análisis de agua –Evaluación de toxicidad con *D. magna*, Straus (Crustácea – Cladóceras) – Método de prueba, y neonatos provenientes de efipios de un KIT comercial DAPHTOXKIT FTM magna.

Cada procedimiento tiene requerimientos diferentes en la dureza del agua de dilución artificial, por lo que adicionalmente se realizaron pruebas invirtiendo la concentración de la dureza en el agua de dilución para cada tipo de neonato. Así, se tuvieron cuatro tipos de prueba: CULTIVO (conforme a la NMX), KIT (conforme al procedimiento del proveedor), CULTIVO+AK (neonatos de origen partenogenético con agua de dilución de KIT), y KIT+AC (neonatos eclosionados de efipios con agua de dilución de la NMX). Se realizaron 11 ensayos de cada prueba y se midió la respuesta a las 24 y 48 horas de exposición.

Las pruebas mostraron mayor estabilidad de respuesta a las 48 horas, evidenciado por la disminución del coeficiente de variación (CV) en cada tipo de prueba. Estadísticamente, a las 24 horas se conformaron 3 grupos de pruebas: A, B y AB, donde AB representa la prueba con el CULTIVO, A son las pruebas con el KIT y KIT+AC y B es el CULTIVO+AK. A las 48 horas los grupos son: A, B y C, donde C es el CULTIVO, A el KIT y B son KIT+AC y CULTIVO+AK.

La prueba con el CULTIVO a las 48 horas fue la de menor CV (3,9 %), lo que habla de que los ensayos con neonatos partenogenéticos tienen una respuesta más estable que los organismos producto de la reproducción sexual.

La sensibilidad de los organismos se vio afectada por la dureza del agua de dilución. Sin embargo, se obtiene un punto de equilibrio entre las pruebas del CULTIVO+AK y el KIT+AC, entre las cuales no hay diferencia significativa de la CL_{50} a las 48 horas.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación del agua en México

El agua es indispensable y sin duda alguna el recurso más importante del planeta, ya que sin ella no podría existir la vida; por otra parte, el establecimiento y desarrollo de las comunidades y muchas de las actividades agrícolas e industriales dependen de un abastecimiento seguro (Tebbutt, 2002).

México tiene a lo largo de su territorio 11,600 kilómetros de litoral, 1,5 millones de hectáreas de lagunas costeras y 2,9 millones de hectáreas de cuerpos de agua interiores. Anualmente en los ríos del país escurren aproximadamente 400 km³ de agua, incluyendo las importaciones de otros países y excluyendo las exportaciones. Aproximadamente el 87% de este escurrimiento corresponde a 39 ríos principales, cuyas cuencas ocupan el 58% de la extensión territorial continental (CNA, 2001).

En el año 2004 se reportaron 65 acuíferos, distribuidos en todo el territorio nacional. El volumen estimado de agua que se extrae de los acuíferos es de 26,7 km³/año y aproximadamente el 66% se destina al riego de una tercera parte de la superficie total regada. El 70% del volumen de agua que se suministra a las ciudades proviene del subsuelo, con lo que se abastecen aproximadamente 75 millones de personas (55 millones en los mayores centros urbanos y prácticamente 20 millones del medio rural). El agua subterránea se ha convertido en un elemento indispensable en el suministro a los diferentes usuarios, siendo en las zonas áridas donde constituye la fuente de abastecimiento más importante y a menudo única, así como en las diferentes ciudades del territorio, las que han tenido que recurrir a ella para cubrir sus crecientes requerimientos de agua (CONAGUA, 2005).

Debido a que el volumen de agua que se recibe por precipitación es diferente año con año, la disponibilidad de líquido también muestra variaciones temporales y espaciales importantes, por lo que es necesario contar con información confiable acerca de la cantidad y calidad de este recurso.

1.2 Calidad del agua

La mayoría de los cuerpos de agua superficial del país reciben descargas de aguas residuales sin tratamiento, ya sean de tipo doméstico, industrial, agrícola o pecuario, esto ha ocasionado grados variables de contaminación que limitan el uso directo del agua.

Para conocer el comportamiento de la calidad de las aguas superficiales, la Comisión Nacional del Agua (CNA) lleva a cabo su monitoreo a través de la Red Nacional de Monitoreo de la Calidad del Agua (RNMCA). Las estaciones de monitoreo de la red se encuentran principalmente en los cuerpos de agua que presentan mayor contaminación, tanto en sistemas acuáticos superficiales o epicontinentales y la zona costera, como en las aguas subterráneas. Además, para la detección y control de problemas particulares, se realizan estudios que requieren estaciones de monitoreo temporales.

El análisis de los resultados de la RNMCA, deja ver que los principales contaminantes presentes en las aguas de los cuerpos receptores en nuestro país son: coliformes fecales, grasas y aceites, ortofosfatos, sólidos disueltos y detergentes (CNA, 2001). El 24% de los cuerpos de agua están contaminados o altamente contaminados, lo que impide su utilización directa en prácticamente cualquier actividad; en contados casos se presenta alguna sustancia tóxica.

A nivel mundial en los países en desarrollo se da tratamiento a menos del 10% del agua. México se encuentra en una situación mejor con una cifra cercana al 20%, considerando descargas de tipo: urbano e industrial. Pero no es suficiente, ya que sigue aumentando la contaminación de los cuerpos de agua del país y en consecuencia la reducción de la calidad del agua disponible para diversos usos (CONAGUA, 2005).

La emisión de descargas contaminantes al ambiente tiene serias consecuencias cuando no existe control y se afectan los procesos naturales por los que se puedan degradar hasta convertirse en formas inocuas, por lo que se hace necesario evaluar tanto el impacto como el carácter dañino que los desechos puedan ocasionar en la salud humana y de los ecosistemas.

1.3 Ensayos toxicológicos

La ecotoxicología se define como el estudio de los efectos tóxicos producidos por agentes físicos y químicos en los organismos vivos, especialmente en poblaciones y comunidades dentro de los ecosistemas (Coya, 1996).

En lo que corresponde a la ecotoxicología aplicada, ésta tiene como objetivo el desarrollo de protocolos de ensayo para ser utilizados como herramientas de predicción temprana de los efectos de los contaminantes tóxicos, que permitan definir umbrales permisibles de descarga de estos con niveles de incertidumbre aceptables, y sirvan de guía a las entidades reguladoras para la toma de decisiones en la vigilancia y regulación de contaminantes (Castillo, 2004).

Los bioensayos son pruebas con organismos o partes de organismos (tejidos, células, organelos, sistemas enzimáticos, etc.), que son expuestos a sustancias químicas puras o muestras de composición química compleja, bajo condiciones estándar de temperatura, iluminación, pH, salinidad y otros parámetros, durante tiempos establecidos de exposición, para observar los efectos nocivos o dañinos en dichos organismos. Los efectos nocivos de una muestra se pueden detectar y/o cuantificar mediante la comparación con un control experimental negativo, es decir, con una muestra de la cual se sabe que no es tóxica (Mayorga, 2001).

Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos. Los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades (Castillo, 2004).

Por tanto, la toxicidad será la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismo o la biocenosis y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico y su relación con el ciclo de vida del organismo; las pruebas podrán ser de tipo agudo o crónico (Castillo, 2004).

Los bioensayos pueden utilizarse, entre otras cosas para:

- Monitoreo rutinario de aguas naturales y efluentes industriales o municipales
- Evaluación de identificación de toxicidad
- Evaluación de reducción de toxicidad

- Determinar la toxicidad de sustancias químicas

A continuación se enumeran algunas de las sustancias materiales que se han evaluado usando bioensayos.

1. Productos o sustancias puras:

- Plaguicidas
- Medicamentos
- Extractos vegetales (como alcaloides)
- Reactivos de laboratorio
- Materias primas
- Productos de consumo (doméstico ó industrial).

2. Mezclas:

- Efluentes industriales (con o sin tratamiento)
- Lixiviados de vertederos de desechos
- Aguas naturales (superficiales, subterráneas, intersticiales)
- Lluvia, nieve y otras deposiciones atmosféricas
- Sedimentos (naturales, lodos de plantas de tratamiento, suelos)
- Biotoxinas (p. ej., “explosiones poblacionales” de algas).

Entre la información que podemos obtener de los bioensayos podemos mencionar:

- Determinación cuantitativa de la dosis/concentración letal/efectiva, es decir, la dosis o concentración que causa un efecto (letal o inhibitorio) a un determinado porcentaje de la población experimental.
- Concentración más baja a la cual se observa efecto (LOEC, por sus siglas en inglés).
- Concentración más alta a la cual no se observa efecto (NOEC, por sus siglas en inglés).
- Clasificar muestras (aguas naturales o efluentes) en clases ponderadas de riesgo (de contaminación) o en clases de potencial de eutrofización (Mayorga, 2001).

Actualmente se utilizan, más de un centenar de especies de organismos acuáticos (de agua dulce, salobre y marina) y organismos terrestres (de varios grupos filogenéticos) para determinar los efectos tóxicos de contaminantes vertidos o liberados a

ecosistemas acuáticos y terrestres. Entre estos grupos se pueden mencionar, de manera general, los siguientes:

- Bacterias
- Algas azul verdes
- Levaduras y hongos
- Protistas (flagelados y ciliados)
- Algas verdes unicelulares
- Plantas vasculares (o semillas)
- Celenterados
- Nemátodos
- Rotíferos
- Lombrices de tierra
- Moluscos
- Crustáceos
- Insectos
- Erizos de mar
- Peces
- Anfibios
- Mamíferos

Sin embargo, uno de los mayores obstáculos para efectuar bioensayos en el laboratorio es contar con el número óptimo de organismos para efectuar los bioensayos cuando se requieren. Es muy común que los cultivos se pierdan periódicamente por diversos problemas relacionados con la alimentación, enfermedades o fallas en la constancia de las condiciones ambientales, además de requerir espacio para el equipo y el personal que se dedique a estas actividades (Mayorga, 2001).

Por este motivo, se han desarrollado ensayos a pequeña escala, que se denominan microbioensayos. Las principales características de estos son:

- ◆ Son rentables.
- ◆ No requieren de trabajo intensivo y extensivo.
- ◆ Puede obtenerse un alto rendimiento total de procesamiento de muestras.
- ◆ La obtención de los organismos de prueba es relativamente más fácil y no necesitan un mantenimiento constante.
- ◆ Requieren de poco espacio de laboratorio e incubación.

- ◆ Tienen un bajo costo de consumibles (p. ej., recipientes para los bioensayos).
- ◆ Solo se utiliza un poco de volumen de muestra.

Existen KITS (como el DAPHTOXKIT FTM MAGNA que se uso en este trabajo (ver cuadro 1) o paquetes comerciales que reúnen las características mencionadas para efectuar bioensayos simples, rápidos, sensibles y reproducibles. Contienen todos los materiales necesarios, incluyendo los organismos de prueba en el estadio de latencia o inmovilizado, en el primer caso, por ejemplo, como los efipios, quistes, semillas; en el segundo las microalgas o las bacterias, los cuales se pueden recuperar en el momento que se quiera efectuar un bioensayo, evitándose tener que mantenerlos en cultivo constante si es que no se cuenta con los recursos humanos y de laboratorio suficientes. Otro ahorro radica en que estos ensayos pueden realizarse con equipo y en espacio mínimo de laboratorio.

Sin embargo también es conveniente tener en cuenta que existen algunas desventajas del KIT, enseguida se enlistan algunas:

- ◆ Variabilidad de la respuesta por la carga genética de los organismos de prueba, ya que los efipios son producto de la fase sexual del ciclo de vida de los dáfnidos.
- ◆ Costos de importación.
- ◆ Falta de información sobre las condiciones de los cultivos para la producción de los efipios.
- ◆ Falta de información sobre el envase de los efipios.
- ◆ Desconocimiento de la calidad y características de los ascendentes genéticos de los efipios (tamaño por ejemplo).
- ◆ Desconocimiento de agentes patógenos adheridos a los efipios.

Cuadro 1 Características que se describen en el DAPHTOXKIT FTM MAGNA que se uso en este trabajo.

Origen	A partir de las pruebas biológicas con las especies <i>Daphnia magna</i> , <i>Daphnia pulex</i> y <i>Ceriodaphnia dubia</i> desarrolladas por los equipos de investigación del Dr. G. Persoone en el Laboratorio para la Investigación Biológica en la Contaminación Acuática (LABRAP, por sus siglas en inglés) en la Universidad de Gante en Bélgica. Recientemente se ha renombrado como: laboratorio para la toxicología del medio ambiente y la ecología acuática (LETAE).
Alcance	Los KITS son microensayos que contienen todos los materiales incluyendo los organismos de prueba, necesarios para realizar los ensayos de toxicidad de manera más simple que manteniendo cultivos. Las pruebas con estos KIT satisfacen particularmente las pruebas rutinarias para la determinación de toxicidad de productos químicos y contaminación en ambientes acuáticos, así como en terrestres.
Ventajas de las pruebas con KITS	La ventaja principal de los microensayos con respecto a pruebas biológicas convencionales, es que los organismos están incorporados en “una forma inactiva” o “inmovilizada”, a partir de la cual pueden ser reactivados en un tiempo relativamente corto para montar las pruebas. Esto elimina la necesidad del reclutamiento continuo y/o la manutención continua de cultivos. Todas las pruebas con KITS “se han miniaturizado”, son prácticos y de uso fácil que se pueden realizar con los materiales y el equipo convencionales del laboratorio, en poco espacio.
Principio del KIT	Son pruebas de 24 y 48 horas para determinar la CL ₅₀ . Se realizan en las placas (de policarbonato, de 22x20cm y volumen para 300mL), incluidas en el paquete y un lote de efiopios de edad uniforme, que proporciona, mediante su eclosión previa, los neonatos necesarios para realizar las pruebas. Ver foto 1

Cuadro 1. Continuación

1.4 Biología de *Daphnia magna*, Straus.

Características biológicas del KIT	Los organismos de prueba provienen de efipios (Fig.1), que representa la fase sexual de los daphnidos. Los efipios se pueden almacenar por períodos de tiempo largos sin perder su viabilidad. Cuando el efipio se coloca en condiciones ambientales y disparadores específicos, eclosionan aproximadamente en 3 días. Los recién nacidos pueden ser utilizados para las pruebas de la toxicidad dentro de las primeras 24 horas.
Metodología de la prueba	Las pruebas con el KIT se realizan de acuerdo con los métodos de prueba prescritos por las organizaciones nacionales e internacionales como Organization for Cooperation for Development Economic (OCDE), International Organization for Standardization (ISO), EEC, United States of America Environmental Protection Agency (USEPA), American Society for Testing Materials (ASTM).
Características	Cada KIT contiene todos los materiales para realizar 6 pruebas completas. El único equipo necesario es una incubadora o un cuarto de temperatura controlada en 20-25 °C, un microscopio de disección, así como cristalería convencional de laboratorio.
Sensibilidad	La investigación comparativa en varios laboratorios en diversos países ha demostrado que la sensibilidad de las pruebas realizadas con el KIT es similar a la de las pruebas convencionales realizadas con neonatos de cultivos stock.
Precisión	El nivel de repetibilidad de estos microensayos ha probado ser muy alto.
Vida útil	Los efipios se almacenan en oscuridad, a 5 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$) para mantener su viabilidad. La eclosión de los mismos, está garantizada si se mantuvieron en las condiciones anteriores por varios meses, según lo indicado en la etiqueta de la fecha de vencimiento en cada KIT.
Representatividad	Como los rotíferos y los copépodos, los cladóceros son miembros muy importantes en las comunidades de agua dulce. Los Daphnidos son las especies de crustáceos de uso más generalizado en pruebas para la determinación de los efectos tóxicos en consumidores primarios de ecosistemas de agua dulce.

Daphnia magna es una especie que pertenece al Género *Daphnia*, Suborden Cladocera, Orden Diplostraca, Familia Daphnidae, Subclase Brachiopoda, Clase Crustacea.

Se distribuye en localidades situadas a baja y media altura sobre el nivel del mar, generalmente sometidas a régimen climático árido. Toleran un amplio rango de condiciones ambientales, prefiriendo volúmenes de agua pequeños (charcas, zanjas inundadas, etc.) de escasa turbidez y expuestas a radiación solar, aunque también pueden habitar en la zona litoral o formar parte del zooplancton de embalses pequeños y mineralizados. En ambientes ricos en vegetación se concentran en las aguas libres formando enjambres (Alonso, 1996: en Villarroel, 2004)

Daphnia magna es un pequeño crustáceo cuya longitud máxima es de 6 mm (sin contar la espina caudal), su coloración es variable ya que el déficit de oxígeno disuelto y la salinidad, de forma conjunta o aislada, provocan una coloración naranja o parda (Alonso, 1996: en Villarroel, 2004). Están comprimidas lateralmente, poseen un caparazón bivalvo que encierra al tronco pero no a la cabeza; tiene cinco pares de apéndices llamados periópodos y suele terminar posteriormente en una espina apical posterior. La cabeza tiene una saliente ventral, algo dirigida hacia atrás.

La parte final del tronco, normalmente llamada postabdomen, está girado ventralmente y lleva una especie de garras y espinas para limpiar el caparazón. Nadan por medio de segundas antenas poderosas, el movimiento es en gran parte vertical y normalmente a trompicones, el batido hacia abajo de la antena lanza al individuo hacia arriba, luego se va hundiendo lentamente, utilizando las antenas a modo de paracaídas.

Los ojos son compuestos y sésiles, los cuales en la mayoría de los cladóceros, funcionan orientando al animal mientras nada (Ruppert y Barnes, 1996) (Figura 1).

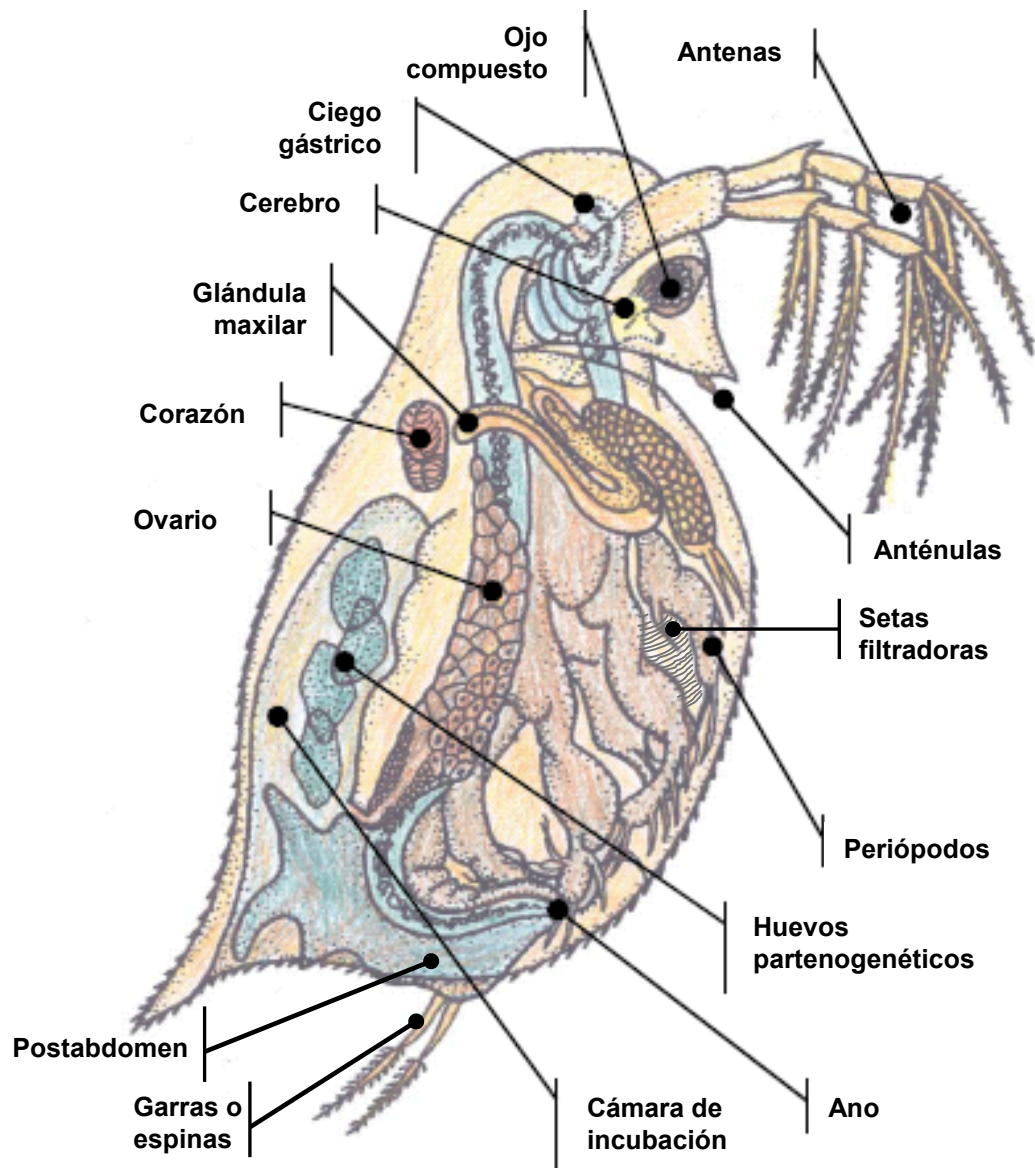


Figura 1. Anatomía de *Daphnia magna* (Tomado de: Villarroel 2004)

Se alimentan filtrando las microalgas presentes en el agua. Producen una corriente de agua del lado anterior al posterior y las partículas alimenticias son recolectadas y transferidas al ciego gástrico por medio de setas especiales situadas en la parte basal de los apéndices (Figura1).

Las daphnias son hembras partenogenéticas; producen huevos diploides que eclosionan dando hembras partenogenéticas durante muchas generaciones. El desarrollo es directo y cuando los juveniles abandonan la cámara de incubación, situada bajo el caparazón, el exoesqueleto se desprende, se produce la muda de la hembra adulta y una nueva puesta es expulsada dentro de la cámara incubadora.

Ciertos factores como la temperatura del agua o un descenso en la disponibilidad de alimento (generalmente debida a un aumento de la población), inducen la aparición de machos en la población, lo que conduce a la reproducción sexual y se producen huevos fecundados, esto genera cambios en la condición genética de la población. Las paredes de la cámara de incubación ahora, se transforman en una cápsula protectora en forma de estribo llamada efipio. (Figura 2).

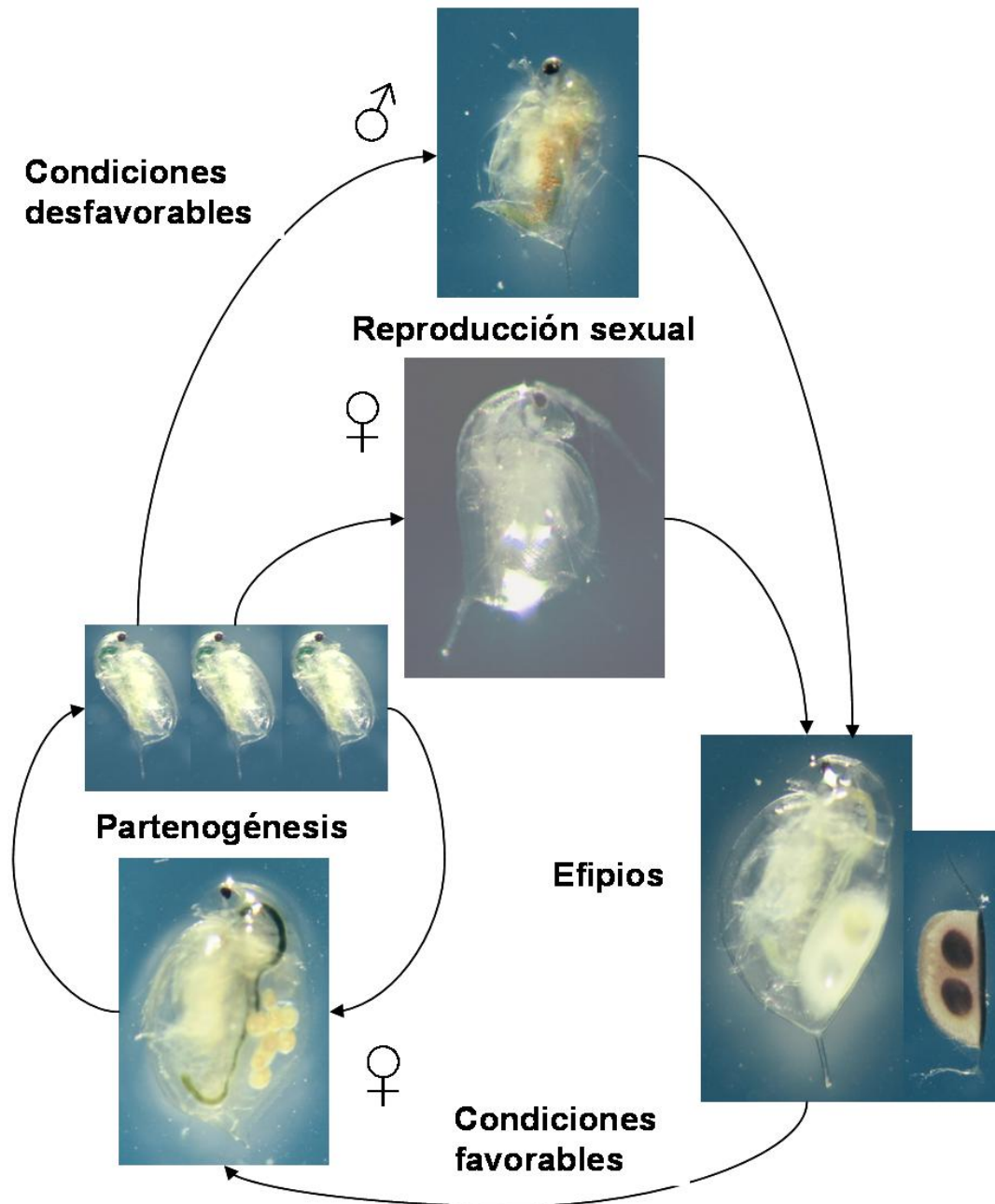


Figura 2. Ciclo de vida de *Daphnia magna*.

Los efipios son liberados cuando la hembra muda, estos flotan, se hunden totalmente o se adhieren a objetos que pueden soportar la desecación y la congelación e incluso resistir el paso por el tubo digestivo de peces, aves y mamíferos. Por medio del viento o de animales, estos huevos pueden ser dispersados a grandes distancias. Así,

pueden pasar el invierno y sobrevivir a las sequías estivales. Cuando reaparecen las condiciones favorables, los efipios eclosionan dando lugar a hembras partenogénicas que inician de nuevo el ciclo asexual (Ruppert y Barnes, 1996).

Boersma en el 2000 menciona que en *D. magna* existe de manera natural una diferencia en las tallas de las hembras y que esta diferencia influye en la producción de huevos partenogénicos y el tamaño de los efipios que producen al presentarse la reproducción sexual. Observaron que tanto en el laboratorio como en el campo, las hembras de mayor tamaño producen efipios de mayor tamaño, que al eclosionar liberan neonatos más grandes y estos a su vez, al madurar alcanzaran una talla mayor, desencadenando la misma relación en las siguientes descendencias.

En condiciones de cultivo, los rangos para una óptima reproducción se han determinado como sigue:

- Temperatura: Entre los 4 y 25 °C el rango térmico de tolerancia varía con la edad. En un gradiente, los adultos seleccionan una temperatura de 19 a 21°C, mientras los jóvenes prefieren un rango de 24 a 25 °C, no obstante es preferible mantener los cultivos a 20 ± 2 °C.
- pH: Es adecuado un rango entre 6.5 y 8.5.
- Oxígeno disuelto: Es tolerante a cambios en el régimen de este parámetro, su supervivencia en medios poco oxigenados depende de su capacidad de sintetizar hemoglobina. En un medio de cultivo se recomienda más del 40% de saturación.
- Dureza del agua: Entre 160 y 260 mg/L expresada como CaCO_3 .
- Alcalinidad: Puede variar entre 65 y 415 mg/L expresada como CaCO_3 .

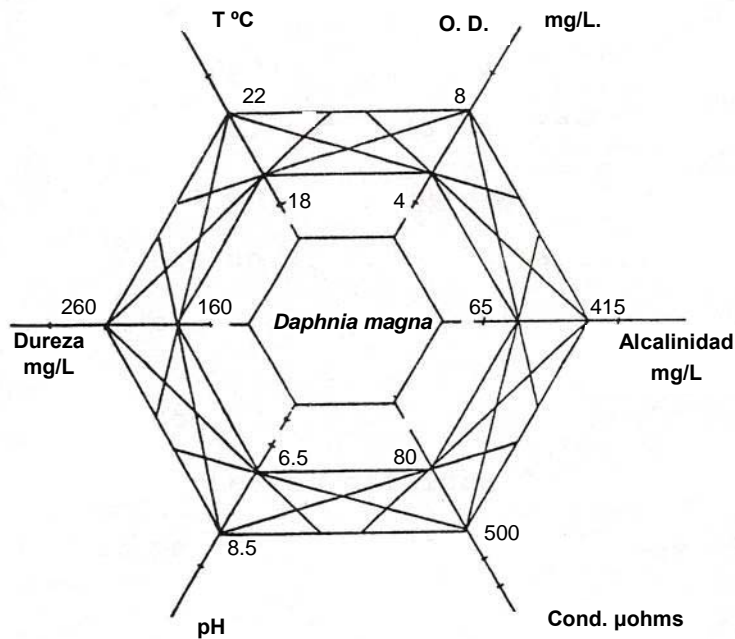


Figura 3. Rangos de tolerancia para *D. magna* en cultivo (Tomado de: SEDUE, s/año).

1.5 Importancia de *Daphnia magna* y otros cladóceros en ecotoxicología.

Este organismo ha sido utilizado desde hace tiempo como una especie estándar en ensayos de ecotoxicidad por organizaciones como la CE, OECD e ISO. Este hecho se debe a los siguientes factores (Mark y Solbé, 1998: en Villarroel, 2004):

- Su reproducción es partenogenética, con lo que se pueden obtener muchas generaciones que son clónicas entre sí, evitando las diferencias genéticas. Esto hace que se dé una respuesta uniforme frente a las condiciones ambientales. Además, su corto ciclo de vida permite la realización de ensayos de toxicidad crónicos en un espacio breve de tiempo.
- Se cultiva fácilmente en condiciones de laboratorio, su mantenimiento es más económico que el de otros animales como los peces, los moluscos o macrocrustáceos.
- Es un elemento importante en las cadenas alimenticias de las aguas dulces. Dentro del zooplancton, constituye una pieza clave en los estudios de toxicología acuática moderna, ya que es uno de los principales consumidores de los productores primarios y lo más importante, es el alimento de invertebrados y

vertebrados predadores (Hebert, 1978; Larsson y Dodson, 1993: en Villarroel, 2004).

- Es una especie muy utilizada, por lo que la relevancia de los ensayos está reconocida. Hay mucha información sobre su biología y ecología en múltiples estudios (Hutchinson, 1967; Gulati, 1978: en Villarroel, 2004).

- En general, se ha encontrado que los cladóceros son más sensibles que los peces a las sustancias tóxicas (Henry, 1988). Presentan sistema nervioso, lo cual sugiere la presencia de la acetilcolina (ACh). Este neurotransmisor normalmente es hidrolizado por la acetilcolinesterasa (AChE) la cual es muy sensible a diferentes contaminantes, entre los que se pueden mencionar los metales pesados, detergentes e hidrocarburos policíclicos (Martínez-Tabche *et al*, 1997: en Martínez-Tabche, 1999). Son capaces de detectar la presencia hasta de 0,005 mg de mercurio en el agua y aún menores concentraciones de numerosos plaguicidas y residuos industriales (Paggi y de Paggi, 2000).

- Se ha demostrado que el género *Daphnia* es muy sensible y grupos de investigación e industriales la utilizan para probar calidad del agua. Por ejemplo, es muy sensible al cloro y al flúor en agua potable. Es también sensible al sodio, potasio, magnesio y calcio, que en concentraciones crecientes puede causar inmovilidad y muerte. Es extremadamente sensible al cobre y al zinc (Clare, 2002)

La enorme cantidad de información biológica y toxicológica que existe de *D. magna* la convierte indiscutiblemente en el organismo zooplanctónico mejor conocido y más empleado como organismo de prueba en toxicología acuática (Martínez-Jerónimo *et al*. 2000: en Martínez-Jerónimo, 2008), la existencia de la norma mexicana 087 con este cladóceros, da un punto de partida para incluir esta herramienta de manera rutinaria en los laboratorios del país, sin embargo esta especie se encuentra en ambientes templados; al tener en cuenta las diferencias ambientales en las regiones del país se considera necesaria la integración de pruebas con especies nativas.

En la evaluación de riesgos ecológicos, la información toxicológica para especies tropicales y subtropicales es prácticamente nula, por lo que los países de estas regiones emplean criterios de calidad del agua que han sido desarrollados para

especies de ambientes templados, lo que conlleva un fuerte grado de incertidumbre sobre su alcance real (Kwok et al. 2007: en Martínez-Jerónimo, 2008)

El número de especies estandarizadas para realizar la evaluación de efectos tóxicos en el agua es bastante limitado, si se considera la riqueza específica que es común encontrar en muchos de los ecosistemas naturales y principalmente en los tropicales, que en su conjunto representan alrededor del 75% de la biodiversidad mundial (Lacher y Goldstein 1997: en Martínez-Jerónimo, 2008). Sin embargo, la propuesta de otras opciones como organismos de prueba, normalmente se enfrenta a obstáculos como la falta de información biológica para entender los mecanismos de reacción e interpretar adecuadamente las respuestas de intoxicación observadas, dificultades para obtener lotes confiables de organismos de ensayo (Arenzon et al. 2003: en Martínez-Jerónimo 2008), falta de consistencia en los resultados, y desconocimiento de los intervalos “normales” de respuesta a fin de determinar cuando un resultado denota realmente un efecto significativo. No obstante, es necesario buscar y proponer especies alternativas debidamente sustentadas, que proporcionen información más adecuada y fácil de entender y extrapolar, de acuerdo a las condiciones ambientales de la biota acuática que prevalece en áreas geográficas que no están incluidas en las zonas templadas del mundo (Martínez-Jerónimo, 2008).

En México se tienen 110 especies de cladóceros pero no todas pueden ser usadas como organismos de prueba para los bioensayos, a continuación se mencionan algunos estudios con especies nativas:

Martínez-Jerónimo 2008, realizó un estudio en el que determinó la CL_{50} de *Daphnia exilis* para Cromo IV, además de variar la temperatura (20 y 25 °C) de la incubación de la prueba. Obteniendo para la prueba realizada a 20°C un coeficiente de variación (CV), de 16,54 %, y una CL_{50} de 0,1182 mg/L, con un intervalo de confianza ($P = 0,95$ %) de ± 0.0064 mg/L y para la prueba realizada a 25°C el valor de CL_{50} promedio fue de 0.0802 mg/L, con intervalo de confianza ($P = 0,95$) de $\pm 0,0057$ mg/L y un CV de 19,72 %.

Martínez-Jerónimo en 2007, reporta valores de CL_{50} y coeficiente de variación para Cromo IV con tres especies de cladóceros distribuidas en México *Daphnia pulex*, con una $CL_{50}=0,284$ mg L⁻¹ y un CV= 40,6%, *Ceriodaphnia dubia* $CL_{50}= 0,227$ mg L⁻¹ y un CV= 31.1% y *Simocephalus mixtus*, $CL_{50}=0,127$ mg L⁻¹ y un CV= 47,2%, estas

especies mostraron alta sensibilidad y los autores la proponen como organismos de prueba para complementar los resultados de interpretación a nivel regional.

Silva en el 2003 reporta para el cladóceros *Daphnia pulex* un CL₅₀ a las 24 horas de 0,051 mg/L de Cromo IV, con una desviación estándar de 0,026 y un coeficiente de variación de 17,6% y con estos resultados menciona que es una prueba con un alto nivel de precisión y exactitud.

El cladóceros *Simocephalus vetulus* posee un tamaño apropiado (3 a 4 mm en especímenes adultos) que permite visualizarlo y manipularlo con mayor facilidad. Además permiten disponer de abundantes especímenes idénticos en un tiempo relativamente reducido ya que las hembras se reproducen partenogenéticamente y poseen un corto tiempo generacional (8–12 días en condiciones óptimas) (Díaz Báez et al., 2004: en Juárez. 2007),

Se han realizado estudios comparativos entre especies nativas y especies de referencia internacional, como es el caso del realizado por Muñoz-Mejía en el 2007 en el que compara 2 cladóceros nativos de México *Scapholeberis armata* y *Macrothrix elegans* contra *D. magna* y *C. dubia* en pruebas con Cromo IV y productos de uso de la industria del petróleo. En este estudio concluyeron que *M. elegans* es significativamente menos sensible que las otras especies al Cromo IV y a los productos sometidos a prueba, sin embargo reporta un coeficiente de correlación >90% entre *M. elegans* y las dos especies de referencia, por lo que los autores consideran a las especies nativas como candidatas factibles para ser usadas en pruebas de toxicidad en la región sureste del país.

Metodológicamente, hay diferencias entre el uso de neonatos como organismos de prueba provenientes de efipios y de neonatos provenientes de una hembra partenogenética en cultivo. En el cuadro 2 se presentan algunas de estas diferencias.

Cuadro 2. Diferencias metodológicas, utilizando neonatos provenientes de hembras partenogenéticas en cultivo y de efipios de un Kit comercial.

Característica	Neonatos de hembras partenogenéticas	Neonatos de efipios del
----------------	--------------------------------------	-------------------------

		DAPHTOXKIT F TM MAGNA
Tiempo para la obtención de los neonatos para pruebas	Por lo menos 7 días para que las hembras alcancen la madurez sexual y obtener en los 2 días siguientes la primera progenie útil para las pruebas.	72 - 96 horas para la eclosión de los efipios y obtener neonatos.
Condiciones ambientales para la obtención de neonatos para pruebas	Hembras partenogenéticas en cultivo: <ul style="list-style-type: none"> • 20° C ± 2° • 600-1000 lux de iluminación. • Fotoperiodo: 16 hrs. de luz/ 8 de oscuridad 	Incubación de efipios: <ul style="list-style-type: none"> • 20° C ± 2° • 6000 lux de iluminación continúa.
Número de neonatos que se utilizan en una prueba definitiva	180 organismos	120 organismos
Condiciones de incubación de la prueba	20° C ± 2° 600-1000 lux 16 hrs. de luz/ 8 de oscuridad.	A 20°C en oscuridad, alimentar a los organismos 2hrs antes de la prueba.

1.6 Cromo VI como tóxico de referencia

El cromo es un elemento natural que se encuentra en las rocas, los animales, las plantas, el suelo y en el polvo y gases volcánicos. El cromo está presente en el ambiente en varias formas, las más comunes son el cromo metálico (0), el cromo trivalente (III) y el cromo hexavalente (VI). El cromo III ocurre naturalmente en el ambiente y es un elemento nutritivo, esencial que el cuerpo requiere para promover la acción de la insulina de manera que los azúcares, las proteínas y las grasas puedan ser utilizados por el organismo. El cromo (VI) y el cromo (0) son producidos generalmente por procesos industriales. No se ha asociado ningún sabor u olor con los compuestos de cromo. El cromo metálico, es un sólido de color acero-grisáceo que se derrite a temperatura muy alta. Se usa principalmente para producir acero y otras aleaciones (mezclas de metales). El mineral cromita, que contiene la forma de cromo (III) y que ocurre naturalmente, se usa como ladrillo de revestimiento en hornos

industriales, en la manufactura de metales y aleaciones y de sustancias químicas. Los compuestos de cromo, principalmente las formas de cromo III y VI, producidas por la industria se usan para cromado de metales, manufactura de colorantes y pigmentos, curtido de cuero y preservación de madera. Cantidades menores se usan en barrenas usadas en la extracción de petróleo, inhibidores de corrosión, en la industria textil y en tóner para copadoras (ATSDR, 2000), de esta manera los desechos de estas industrias son responsables de la contaminación por Cr en el ambiente. En el cuadro 3 se muestran algunos productos que usan o poseen algún compuesto de cromo y como es que se tiene contacto con estos.

Cuadro 3. Materiales de uso común que poseen cromo.

Materiales u objetos que contienen cromo	Oficios o lugar de contacto	Compuestos de cromo
Mineral de cromo Baños de cromo Aleaciones para soldadura	Refinado de cromo Artes gráficas Industria del metal	Cromato Ácido crómico – dicromato de sodio Cromato
Pinturas y tintes de cromo	Pintores, decoradores, artes gráficas, textiles, vidrio, porcelana	Oxido verde de cromo, hidróxido de cromo, verde cromato de zinc, cromato de plomo
Aceites, lubricantes y grasas	Industria del metal	Oxido crómico y cromatos
Agentes anticorrosivos en sistemas de refrigeración	Motores diesel, calderas y sistemas de aire acondicionado	Dicromatos alcalinos
Tejidos, pieles	Industria textil	Cromatos
Cemento, productos de cemento, agentes para fraguado rápido	Producción del cemento, industria de construcción	Cromatos
Materiales de limpieza, de lavado y lejías	Amas de casa, lavanderías, limpiadores	Cromatos
Cueros teñidos al cromo	Industria del cuero y calzado	Sulfato de cromo, aluminato de cromo
Conservadores de madera	Tintes para madera, carpintería, minería	Dicromatos alcalinos

Efectos nocivos en la salud por exposición al cromo

El cromo tiene una doble relación con el organismo humano en su forma trivalente, es esencial e indispensable para la vida, ya que participa en diversos procesos bioquímicos y fisiológicos del ser humano, dentro de los que se destacan su participación en el metabolismo de la glucosa, los ácidos grasos y el colesterol. Y en su forma hexavalente se comporta como un elemento tóxico que produce efectos nocivos reversibles e irreversibles tanto agudos como crónicos en diferentes sistemas

del cuerpo humano (Flaherty, 1993: en Téllez 2004). La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC), clasifica el cromo hexavalente como un elemento comprobadamente cancerígeno en el humano.

Las principales vías de absorción del cromo y sus compuestos en el organismo, son la ingestión, el contacto dérmico y la inhalación, siendo estas dos últimas las principales vías en la exposición ocupacional. En general los compuestos solubles hexavalentes se absorben rápidamente por cualquier vía.

Los efectos adversos del cromo en la salud se pueden dividir en efectos no cancerígenos y efectos cancerígenos.

Efectos no cancerígenos

- En la piel y mucosas: Ejerce una acción corrosiva sobre la piel, produciendo úlceras cutáneas, dermatitis alérgica y perforación del tabique nasal.
- En el sistema respiratorio: Este riesgo se deriva de la inhalación, llegando a ocasionar irritación de la nariz, estornudos, comezón, hemorragias nasales, úlceras, y perforaciones en el tabique nasal, rinitis crónica, bronquitis crónica y asma de origen ocupacional (Montanaro. 1992: en Téllez, 2004).
- Sistema renal: Aparición de necrosis tubular renal.
- En el sistema inmunológico: En exposición continua a dosis bajas causan efectos inmunosupresores, mientras que a dosis altas produce inmunoestimulación tanto en animales de experimentación como en el hombre (Lafuente Gimenez, 2001: en Téllez, 2004).
- Efectos genotóxicos: La mayoría de compuestos hexavalentes han demostrado ser mutagénicos en las células eucariotas y procariontas.

Efectos cancerígenos

Los riesgos potenciales del cromo VI en la actividad industrial han sido ampliamente documentados. De acuerdo a las investigaciones de la Agencia Internacional Para la Investigación sobre el cáncer (IARC), el cromo VI y sus compuestos se clasifican

dentro del grupo I (carcinógenos confirmados en humanos). Hasta el momento, la evidencia científica indica que el cromo VI es probablemente mucho más tóxico por inhalación que por ingestión. Se han confirmado como cancerígenos pulmonares el cromato de calcio y el cromato de estroncio y como muy sospechosos el cromato de plomo, los dicromatos alcalinos y el ácido crómico (Boffetta, 1993: en Téllez, 2004).

En Francia, Alemania, Italia, Japón, Noruega, EE.UU y el Reino Unido, se ha descrito un aumento de la incidencia de Cáncer de pulmón en trabajadores expuestos a los compuestos de Cr VI. Sobre el contenido de cromo en pulmones se han informado niveles de 0,26 a 0,85mg/100gr de tejido. Se ha encontrado mayor riesgo de cáncer en trabajadores con más de tres años de estar en contacto con el metal y mayor tasa de mortalidad, principalmente por cáncer, que en la población no expuesta (Langard, 1993: en Téllez, 2004).

Teniendo en cuenta todos los efectos que el Cromo produce en los seres humanos es importante resaltar que una de las formas de exposición al metal es por ingestión, por lo que tenemos que tener en cuenta lo que mencionó Gagneten en el 2002: "... una proporción muy alta del cromo liberado al medio acuático es absorbida por las partículas de materia orgánica y las microalgas, por lo que al ser consumidas por el zooplancton esta fracción no se deposita en los sedimentos sino que se incorpora a las tramas tróficas, acelerando el pasaje a organismos de niveles tróficos superiores. El zooplancton es el principal alimento de larvas y juveniles de peces, que a su vez son ingeridos por otros peces y algunas aves teniendo una acumulación de cromo en su sistema, lo que los hace potencialmente peligrosos para la salud de los humanos que los ingieren".

La necesidad de evaluar los niveles de contaminación por cromo en los cuerpos de agua antes de que se presenten daños en las poblaciones humanas, nos hace inevitable tratar de dominar las técnicas de detección de este metal pesado y otros contaminantes que ponen en riesgo el equilibrio de los ecosistemas y la salud humana. El ensayo de toxicidad aguda con el cladóceros *Daphnia magna* es una de las técnicas para detectar la presencia de este metal en los cuerpos de agua y es un método estandarizado en el mundo.

El dicromato de potasio es altamente sugerido como tóxico de referencia para evaluar la salud y sensibilidad de los organismos de prueba para las pruebas de toxicidad aguda con cladóceros (Martínez-Jerónimo, 2006). El dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

es la sal del hipotético ácido dicrómico (este ácido en sustancia no es estable) $H_2Cr_2O_7$. Se trata de una sustancia de color intenso anaranjado. Es un oxidante fuerte. En contacto con sustancias orgánicas puede provocar incendios. Se utiliza en la galvanotecnia para cromar otros metales, en la transformación del cuero, en la fabricación de pigmentos, como reactivo en la industria química, para recubrimientos anticorrosivos del zinc y del magnesio y en algunos preparados de protección de madera. En química analítica se utiliza para determinar la demanda química de oxígeno (DQO) en muestras de agua.

En este trabajo se utilizó el Cr VI como tóxico de referencia a partir del dicromato de potasio. Todos los valores de la CL_{50} se expresaron como Cr VI. Los datos tomados de otros trabajos (Cuadro 4) expresados como dicromato se convirtieron a cromo VI, dividiendo el valor de la CL_{50} dado por el(los) autor(es) entre 2,83.

II. ANTECEDENTES

Existen diferentes procedimientos para realizar el bioensayo con *Daphnia magna* con base en los métodos descritos por distintas organizaciones:

Organización	Método
ISO	Norma ISO 6341:1996./cor.1:1998 (E)
OCDE	Guideline for testing of chemicals. 202: <i>Daphnia sp.</i> Acute Immobilization Test , 2004
USEPA	Método estandarizado OPPTS 850.1010 aquatic invertebrate. Acute toxicity test freshwater Daphnids. 1996
EC	Método estandarizado EPS 1/RM/11 julio 1990

El bioensayo con *D. magna* es utilizado para detectar la toxicidad de compuestos puros o mezclas de ellos. Martínez en el 2006 realizó un estudio en el que determinó que la diferencia en la temperatura y fotoperiodo en las condiciones del cultivo no influyen en la CL_{50} para Cr VI. De la misma manera, las diferencias en el CL_{50} no son significativas al variar la temperatura y el fotoperiodo al momento de realizar las pruebas con este metal. En el caso de algunos plaguicidas se reporta una CL_{50} de 0.0015 mg/L para diazinon, 0.168 mg/L para endosulfan y 0.312 mg/L para trifluralin (George, 2007). En 2005, Lin reportó una CL_{50} de 1.66 para Talio. En el 2000, García la reporta como una especie sensible a los alcaloides de las semillas de *Erythrina americana*. En el caso de muestras complejas como es el caso de los lodos de plantas potabilizadoras, Castañeda (<http://www.cepis.org.pe/bvsaidis/tratagua/mexicon/R-0106.pdf>), ha reportado que *D. magna* no es una especie muy sensible a este tipo de muestras.

Con respecto al KIT de *D. magna*, también existen trabajos con diferentes tipos de muestras o compuestos como es el caso de Fernández-Alba en el 2002 que realizó un estudio con plaguicidas y comparó la sensibilidad de *D. magna* con *Vibrio fischeri* (Bio Tox

TM) y MitoScanTM, reportando a *D. magna* como más sensible a los plaguicidas y a las interacciones de las mezclas.

Para asegurar la estabilidad de la sensibilidad de los organismos de prueba en los bioensayos, es necesario realizar pruebas con una sustancia de referencia. Para *D. magna*, el Cr VI es el metal usado como toxico de referencia por algunos laboratorios. En el cuadro 4 se concentran algunos datos de CL₅₀ reportados para este bioensayo, tanto con organismos cultivados como con efipios

Se han llevado a cabo diferentes estudios comparativos para el bioensayo con *D. magna*, entre organismos mantenidos en cultivo como los utilizados en el KIT.

- Daniel en 2004 realizó un estudio comparativo con 21 muestras de efluentes, utilizando el KIT y obtuvo un valor de $r = 0.86$, por lo que concluyó que es una buena alternativa como método de prueba.
- Galassi en el 2000, realizó un estudio comparativo entre el cultivo y el KIT en el que menciona que la sensibilidad del KIT es, si no avanzada, sí es comparable con el cultivo tradicional que se utiliza para la prueba aguda. Menciona además, que se esperaría una mayor resistencia de los neonatos provenientes de los efipios por ser resultado de la reproducción sexual, que de los clones en la prueba tradicional, ya que la reproducción sexual en ecosistemas naturales es una estrategia que aumenta la variabilidad genética y por lo tanto la capacidad de sobrevivir en condiciones adversas. Sin embargo, también puede generar individuos más sensibles.
- Lucivjanská en el 2000 reportó ser más sensibles a los neonatos provenientes de los efipios del KIT para el dicromato de potasio que los neonatos provenientes de un cultivo y a estos últimos mas sensibles que los del KIT en la prueba que realizó con lixiviados.
- Ulm en 1999 reportó una buena correlación ($r = 0.97$) entre el cultivo y el KIT en la prueba con 30 productos de uso doméstico.
- Fotchman en 1999 reportó una correlación de 0.98 para el dicromato de potasio y 9 plaguicidas entre el KIT y el cultivo.

Cuadro 4. Valores de CL₅₀ a las 24 y 48 horas para Cromo VI con el cultivo y el KIT y los valores de dureza del agua de dilución usada en la prueba.

REFERENCIA	CULTIVO CL ₅₀ (mg/L)		Dureza CaCO ₃ (mg/L)	DAPHTOX-KIT CL ₅₀ (mg/L)		Dureza CaCO ₃ (mg/L)
	24 hrs.	48 hrs.		24 hrs.	48 hrs.	
Seco (1998)	0,22-0,77	-	-	-	-	-
Persoone (1993) ¹	0,35	-	-	-	-	-
Persoone (1989) ³	0,048-0,116	-	80	-	-	-
Persoone (1989) ³	0,68-1,73	-	320	-	-	-
Persoone (1989) ³	1,5-2,7	-	560	-	-	-
Khangarot (1987) ¹	2,20	-	-	-	-	-
Fargasova (1994) ¹	1,00	-	-	-	-	-
Kühn (1989) ¹	0,35	-	-	-	-	-
Fochtman (1999)	-	0,26	150-160	-	0,27	250±25
Lucivjanská ⁵	0,19	0,11	250±25	0,09	0,03	-
Ulm (1999)	-	0,42	250±25	-	0,32	250±25
Canna ⁵	-	-	-	-	0,22-0,29	250±25
Ronco (Argentina) ⁵	-	0,02-0,35	-	-	-	-
Ronco (Colombia) ⁵	-	0,25	-	-	-	-
Martinez (2006)	-	0,19-0,23	170±10	-	-	-
Kungolos (2004)	-	-	-	0,24-0,41	-	250±25
Galassi (2000)	-	-	-	0,35	0,23	250±25
Marchetti (1991) ²	0,4-0,51	-	-	-	-	-
Guilhermino (1997) ²	0,26-0,263	0,22-0,23	-	-	-	-
Lab. ABC (2006-2007) ⁴	-	-	-	0,36-0,60	-	160-180
Lab. ABC (2007) ⁴	-	-	-	0,51-0,69	-	250±25
PROVEEDOR (1996) ²	-	-	-	0,42-0,64	0,21-0,35	250±25
PROVEEDOR (1998) ²	-	-	-	0,25-0,46	-	250±25
DAPHTOX-KIT Valor de referencia en el producto	-	-	-	0,42	0,27	250±25
CIPEL (1997)	0,38-0,61	0,24-0,47	250±25	-	-	-
ISO 6341:1996 (E)	0,2 - 0,74	-	250±25	-	-	-
OCDE (202, 2004)	0,2 - 0,74	-	250±25	-	-	-

¹ Referencias tomadas de Seco (1998)

² Referencias tomadas de Galassi (2000)

³ Referencias tomadas de Martínez-Fernández (2006)

⁴ Comunicación personal

⁵ Referencias en Persoone (2000)

III. JUSTIFICACIÓN

El acelerado decrecimiento de la calidad del agua ha llevado a buscar formas en las que podamos tener de manera rápida y eficiente la información necesaria sobre los niveles de toxicidad de los cuerpos de agua para conjuntarla con factores fisicoquímicos y poder emitir un diagnóstico de calidad. Con base en lo anterior la información obtenida es relevante para el análisis y la toma de decisiones, sobre cómo abordar y solucionar el problema de este tipo de contaminación en los cuerpos de agua.

En México se trabaja para incluir a los bioensayos como herramienta para la evaluación de la calidad del agua. En 1994 con el fin de detectar el nivel de toxicidad y preservar la calidad de los cuerpos de agua se adoptó en la legislación ambiental el establecimiento de niveles máximos de contaminación en las fuentes puntuales, estipulando para los 28 giros industriales, entonces clasificados, valores guía para compuestos orgánicos e inorgánicos tóxicos, determinados mediante el uso de métodos analíticos para determinar su concentración, incluyendo bioensayos con *D. magna*, *Vibrio fischeri* y *Artemia franciscana*, como una alternativa para evaluar la calidad del agua (Mendoza-Cantú, 2007).

En 2005 el Instituto Nacional de Ecología (INE), coordinó el desarrollo de una batería de bioensayos para ser usada en nuestro país, participaron 34 expertos en la materia que determinaron los criterios de selección de los bioensayos y llegaron a 16 bioensayos para la formación de la batería. En 2007 el INE publicó los protocolos de las 16 pruebas. Cabe mencionar que en el 2006, 6 laboratorios realizaron un ejercicio de inter-calibración para bioensayos con *D. magna* y *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*), además de un ejercicio con 4 especies nativas de cladóceros, de las que tres especies (*D. exilis*, *Ceriodaphnia dubia* y *Simocephalus mixtus*) son más sensibles al Cromo IV que *D. magna* (*Idem*).

A pesar de lo anterior, actualmente las pruebas de toxicidad aún no son exigidas por la ley en nuestro país. Sin embargo, es importante su desarrollo e implementación como una herramienta eficaz, rápida y de relativo bajo costo para ser implementadas e incluidas en

la legislación correspondiente, con el fin de mejorar la lucha por la preservación y la protección del ambiente. La adopción de normas ecotoxicológicas, como las emitidas por ejemplo en Francia, en las que las pruebas de toxicidad, utilizando *D. magna*, determinan el impuesto promedio que cobran las agencias del agua, facilitaría y complementaría considerablemente las auditorias y evaluaciones ambientales (Isnard, 1998 en Blinova).

El uso del DAPHTOXKIT FTM MAGNA es una posibilidad más para realizar análisis de toxicidad aguda de manera eficaz y eficiente, sustituyendo la falta de recursos humanos y de infraestructura en un laboratorio.

Por lo anterior se han establecido los siguientes objetivos de trabajo.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Comparar la CL₅₀ para Cromo VI en pruebas con *Daphnia magna* de Daphtoxkit FTM magna y la prueba tradicional establecida en la Norma Mexicana NMX-AA-087-1995-SCFI Análisis de agua - Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, Straus (Crustacea – Cladocera) - Método de prueba.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar la CL₅₀ de cada prueba al variar la dureza del agua dura artificial.
- Proponer el uso del KIT de pruebas comercial, como una metodología alternativa y válida para realizar pruebas de toxicidad aguda con *D. magna*.

HIPOTESIS

- 1: No habrá una diferencia significativa entre la CL₅₀ de la prueba tradicional y la del KIT comercial.
- 2: La dureza del agua no influye en el efecto del tóxico de referencia. Entonces no habrá variación significativa en la CL₅₀ de la prueba tradicional y la del KIT comercial.

V. MATERIAL

5.1. Cristalería

- Bureta de 50 mL
- Bulbos de succión
- Cajas Petri de 10 cm de diámetro.
- Manguera para acuario
- Micropipeta de 1 mL
- Micropipeta de 100 μ L
- Matraz aforado de 50 y 100 mL
- Matraz aforado de 1 y 2 Lts.
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Pinzas para bureta
- Pipetas Pasteur
- Pipetas serológicas desechables de 25 mL
- Pipetas volumétricas de 10, 50 y 100 mL
- Puntas desechables para micropipetas de 1 mL
- Puntas desechables para micropipetas de 100 μ L
- Soporte universal
- Vasos pastilleros desechables de 30 mL
- Vasos de precipitado de 50, 500 y 1000 mL

5.2. Equipo e instrumentos

- Balanza analítica; precisión de 0.0001g
- Bombas de acuario
- Controlador de fotoperíodo (Timer)
- Luxómetro con rango de medición entre 1000 y 20,000 luxes
- Microscopio de disección resolución 2x y 4x
- Medidor de oxígeno disuelto
- Potenciómetro
- Refrigerador (de 0°C a 4°C)

- Termómetro
- Parilla con agitador
- Incubadora

5.3. Reactivos

- Sulfato de magnesio (MgSO_4)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Sulfato de calcio dihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)
- Acido nítrico (HNO_3)
- Selenito
- Vitamina B12
- Tiamina
- Negro de eriocromo

VI. MÉTODO

6.1. Prueba tradicional (a la que llamaremos CULTIVO)

Se realizó conforme a lo establecido en la NMX-AA-087-1995-SCFI. Análisis de agua.- Determinación de dureza total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.

Debe hacerse la aclaración de que en el área de Toxicología de la Gerencia de Calidad del Agua de la Comisión Nacional del Agua, el mantenimiento del cultivo y la prueba han sido estandarizados variando 3 aspectos:

1. La alimentación del cultivo se realizó con cultivos puros de *Selenastrum capricornutum*. Teniendo una densidad algal de 500,000 cels/mL, en el medio de cultivo de las daphnias con 24 horas de nacidas y hasta su madurez sexual y 800,000 cels/ mL para las daphnias en etapa reproductiva.
2. El volumen de prueba de cada réplica es de 20 mL para cada réplica y no de 100 mL, como lo señala la NMX.
3. Las pruebas se incuban en oscuridad.

Tomando en cuenta lo anterior, lo señalado en el Cuadro 2, es con base en estas consideraciones.

6.1.1 Establecimiento del cultivo.

Preparación de agua dura.

Para preparar 20 L de agua dura, se colocaron 15 L de agua desonizada en un garrafón de plástico con capacidad de 20 L, la cual se obtuvo del equipo MILLIPORE; sus características fueron: pH 5, conductividad < 10 μ S/cm.

Por separado, en un matraz aforado de 1L se adicionaron en el siguiente orden: 2,4 g de Sulfato de magnesio, 3,84g de Bicarbonato de sodio y 0,16 g de Cloruro de potasio,

agitando al adicionar cada uno, hasta que se disolviera completamente; ya disueltos se adicionó la solución al garrafón con agua destilada.

Al final, se adicionó al garrafón la disolución de sulfato de calcio dihidratado. Por la dificultad de este compuesto para disolverse, es necesario que los 2.4 g que se requieren, se coloquen en un litro de agua desionizada en un vaso de precipitado de 2L de capacidad y sobre una parrilla de agitación, para favorecer su disolución, procurando ir deshaciendo los grumos que se forman. Una vez disuelto totalmente se adiciona al garrafón y se completan los 20 L con agua destilada. El agua preparada permaneció en aireación, utilizando una bomba de acuario y una pipeta serológica con filtro de algodón.

La valoración del agua dura se realizó 24 ó 48 horas después, los parámetros promedio obtenidos de las veces que se preparó fueron: pH entre 7,6 y 8,0; concentración de oxígeno por encima de 6 mg/L y la dureza dentro del intervalo de 160-180 mg CaCO₃/L, determinada de acuerdo a la NMX-AA072-SCFI-2001.- Análisis de agua.- Determinación de dureza total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas

6.1.2 Mantenimiento y requerimientos del cultivo

Se colocaron hembras partenogénicas de *D. magna* bajo las condiciones descritas en el cuadro 3.

6.1.3 Montaje de pruebas

El presente trabajo sólo consideró el uso del dicromato de potasio como tóxico de referencia estandarizado para esta prueba.

6.1.3.1 Preparación del tóxico de referencia

Se preparó una solución madre de 160 ppm agregando 0,045 g de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) en 50 mL de agua desionizada y se aforó a 100 mL.

Cuadro 3.- Condiciones de mantenimiento del cultivo de *D. magna*

PARÁMETRO	CONDICIÓN
Temperatura	20± 2 °C
Calidad e intensidad de luz	Fluorescente, blanco-frío, 600-1000 lux sobre la superficie del líquido
Fotoperíodo	16 horas luz/8 oscuridad
Recipientes de mantenimiento	Vasos de precipitado de 1 L de vidrio transparentes
Alimentación	Cultivos puros de <i>Selenastrum capricornutum</i> , Chlorophyta (Anexo 1)
	La cantidad de alimento suministrada se calculó utilizando la fórmula:
	$V_1 = C_2 * V_2 / C_1$
	donde:
	V_1 = volumen de la suspensión algal que se adicionará C_2 = la densidad algal que se desea tenga el recipiente del cultivo de daphnias, considerando 10 a 12 organismos por litro. V_2 = el volumen de medio de cultivo en el que se encuentra las daphnias C_1 = la densidad de la suspensión algal o cultivo puro.
Suplemento alimenticio	Para los lotes en reproducción se utilizó agua dura vitaminada; por cada litro de agua dura preparada se adicionaron las siguientes cantidades de solución stock de nutrientes: 0,2 mL de vitamina B12, 1 mL de tiamina y 0.2 mL de Selenito de sodio (Anexo 2).
Densidad poblacional	No mayor de 10 a 12 individuos/L
Limpieza	Diariamente se retiraron las mudas de los cultivos. Cada 8 días se cambió completamente el medio de cultivo.
Recolección de neonatos	Diariamente se retiraron los neonatos con una pipeta de abertura lo suficientemente ancha como para no ocasionarles daño, sobre todo si se iban a utilizar para pruebas.

6.1.3.2 Preparación de las diluciones

Las diluciones que se manejaron fueron 0,08; 0,12; 0,16; 0,20; 0,24 mg/L, preparadas en matraces aforados de 100 mL.

Cada dilución se montó por triplicado, colocando en vasos pastilleros desechables 20 mL y adicionando 10 neonatos de menos de 24 horas de nacidos en cada uno. Los controles negativos se montaron únicamente con agua dura artificial también por triplicado. Los vasos se cubrieron con parafilm y se incubaron a $20 \pm 1^\circ \text{C}$ en una incubadora marca Fisher, modelo 307C, con temperatura controlada y monitoreada con termómetro (-20 a 50°C) en total oscuridad por un periodo de 48 horas.

6.1.4 Lectura de las pruebas

La lectura de las pruebas se realizó a las 24 y 48 horas, registrando el número de organismos inmóviles en cada vaso. La verificación de la ausencia total de movimiento de los organismos se realizó con la ayuda de un microscopio de disección (marca Labomed, modelo Digi zoom a 4x de aumento).

6.1.5 Obtención de la CL50

El cálculo de la CL50 se realizó con el método PROBIT, utilizando el software USEPA: Probit Analysis Program, versión 1.5, homólogo al cálculo manual descrito en la NMX.

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

6.2. Prueba con el DAPHTOX-KIT (KIT).

6.2.1 Descripción y contenido del KIT

El KIT contiene todos los elementos necesarios para llevar a cabo 6 pruebas (Foto 1).

- Viales de efipios.- Tubos de plástico de 1 mL cada uno contiene la cantidad de efipios necesarios, que al eclosionar proporcionan la cantidad requerida de neonatos utilizados en una prueba (Foto 2).
- Frascos con soluciones stock.- Son 2 grupos de 4 frascos, cada uno, está etiquetado con la fórmula de la sal concentrada que contiene y un número que indica el orden en que tiene que ser adicionado para preparar el medio de dilución o agua dura, cada grupo sirve para preparar 2 litros de agua dura (Foto 3).
- Microtamiz.- Un tamiz con una malla de 100 μ , para enjuagar los efipios (Foto 4).
- Frascos con polvo de *Spirulina* sp.- Tubos de plástico de 1 mL que contienen una cantidad pequeña de polvo de *Spirulina* sp. para “pre-alimentar” a los neonatos antes de la prueba (Foto 5).
- Placas para montaje de pruebas.- Son de policarbonato. Tienen 6 pozos de enjuague y 24 pozos para las diluciones de prueba (Foto 6).
- Cajas Petri.- De poliestireno, 5 centímetros de diámetro, para poner a eclosionar los efipios (Foto 1).
- Tiras de Parafilm.- Tiras de 24x22 cm. para sellar las placas de prueba y reducir al mínimo la evaporación durante el período de la incubación.
- Micropipetas.- De polietileno de 1mL de capacidad para la transferencia de los organismos de prueba (Foto 1).
- Manual de procedimiento.- Un folleto detallado con todas las instrucciones para el uso del Daphtoxkit para análisis de búsqueda y/o definitivos con productos químicos puros o aguas residuales (Foto 7).
- Resumen del procedimiento.- Una versión abreviada del manual de procedimiento
- Hojas para el registro de resultados.- Seis hojas para anotar los resultados y el cálculo de los porcentajes de efecto (Foto 8).
- Hojas de interpolación gráfica.- Seis hojas para el cálculo manual de la CL_{50} (Foto 9).
- Hoja de especificaciones.- Una hoja que indica el número de lote y la vida útil de los efipios, el número de lote de las soluciones stock, la fecha de vencimiento del Daphtoxkit y los valores de la CL_{50} a las 24y 48horas para el dicromato de potasio como tóxico de referencia (Foto 10). Para este trabajo se utilizaron 4 paquetes, cuyo lote de efipios fue el mismo (DM41006)

Cuadro 5. Fotos de los componentes del KIT

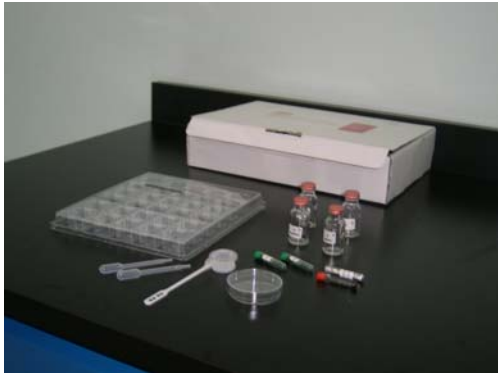


Foto 1. Componentes del KIT



Foto 2. Viales de efiptos



Foto 3. Frascos con soluciones stock



Foto 4. Microtamiz



Foto 5. Viales con *Spirulina* sp

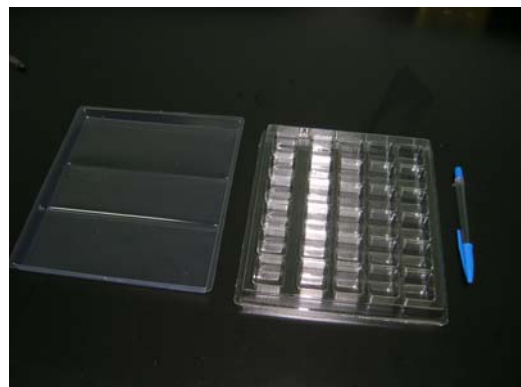


Foto 6. Placa de prueba

Cuadro 5. Continuación



Foto 7. Manual de procedimiento

DAPHTOXKIT F
RESULTS SHEET

Name of operator :
 Date of performance of test :
 Toxicant tested :
 Type of test :
 range finding test
 definitive test
 Test species :
 Daphnia magna
 Daphnia pulex
 Dilution series tested :
 Concentration 1 :
 Concentration 2 :
 Concentration 3 :
 Concentration 4 :
 Concentration 5 :

	Control	Conc. 5 < F		Conc. 4		Conc. 3		Conc. 2		Conc. 1 > F		
Exposure (h)	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
A												
B												
C												
D												
Total	/20	/20	/20	/20	/20	/20	/20	/20	/20	/20	/20	/20
% Effect												

Effect scores

24h EC₅₀ :
 48h EC₅₀ :

Foto 8. Hoja de registro de resultados

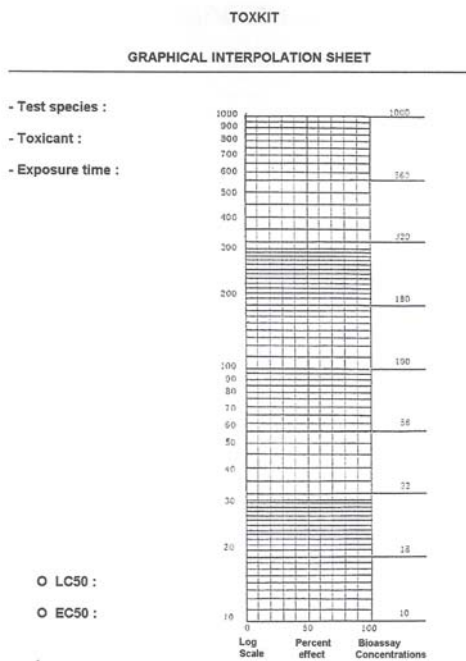


Foto 9. Hoja de interpolación gráfica

Industriezone "De Pijpbeek" - Vosschevlei 19
 9810 Nazareth, Belgium
 Tel : 32(0)9 380 8345
 Fax : 32(0)9 380 8346
 email : microbio@microbio.be
 www.microbio.be

MICROBIOTESTS Inc.

DAPHTOXKIT F™ MAGNA
Specification Sheet

The materials used in this Toxkit have the following guaranteed characteristics :

Kit number : **DM449**
 Number of tests : **6**
 To be used preferably before : **31/05/07**
 Test species : ***Daphnia magna***
 Dormant stage of test species : ***Ephippia***
 Storage conditions of ephippia : **in darkness, at 5 °C (+/- 2 °C)**
 Batch number of ephippia : **DM041006**
 Time to hatching : **72-84 h at 20-22 °C and 6.000 lux**
 Batch number of concentrated salt solutions : **ISOD101006**
 Batch number of Spirulina food : **SP250105**

Mean EC₅₀ for the reference toxicant potassium dichromate (K₂Cr₂O₇) :

- 24h EC₅₀ : **1.19 mg/l (*)**
- 48h EC₅₀ : **0.76 mg/l**
- (*) 24h EC₅₀ acceptability range according to ISO 6341 : 0,6 - 2,1 mg/l

LIABILITY : In case of problems, the user is requested to return this specification sheet to the distributor, with a detailed description of the problem(s) encountered. The claim will be analyzed and the outcome communicated to the claimer. The liability is restricted to the replacement of the materials.

Kris Perdaen
 Kris Perdaen
 Production Manager

Philippe Persoone
 Philippe Persoone
 Sales Manager

B1W
 TVA BE 473.205.392
 VAT

H.R. - R.C. Geel 197533

KBC 442-7695141-64
 Bankrekening
 Compte en banque
 Bank account

Foto 10 Hoja de especificaciones

6.2.2 Preparación del agua dura para el KIT

De acuerdo a las recomendaciones del proveedor, para preparar 2 litros se colocó 1 litro de agua desionizada en un matraz aforado de 2 litros y se adicionó en estricto orden, el contenido de cada una de las siguientes soluciones stock incluidas en el KIT (Foto 3): frasco 1 bicarbonato de sodio (NaHCO_3), frasco 2 cloruro de calcio (CaCl_2), frasco 3 sulfato de magnesio (MgSO_4) y frasco 4 cloruro de potasio (KCl), se aforó a 2 litros, y homogenizó el agua dura artificial y se colocó en aireación por 24 horas con una pipeta con filtro de algodón.

El promedio de dureza del agua fue de 266 mg/L (como CaCO_3), determinada de acuerdo a la NMX-AA072-SCFI-2001.- Análisis de agua.- Determinación de dureza total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas; y el pH fue de $8 \pm 0,2$.

6.2.3 Eclosión de los efipios del KIT

Se vertió el contenido de un vial con los efipios en el microtamiz y se enjuagó con agua desionizada para eliminar los rastros del medio de almacenaje. Se transfirieron los efipios a una caja de Petri con 30 mL de agua dura, se cubrió la caja y se incubó entre 72 y 80 horas, bajo iluminación continua a 6000 lux y temperatura de 20-22 °C. Debe señalarse que la eclosión comienza a las 72 horas y alrededor de las 80 horas se obtuvo la mayor parte de los neonatos que eclosionan. Estos se colectaron como máximo a las 90 horas contadas a partir de la incubación para asegurar que la edad de los neonatos era menor a las 24 horas.

Se tiene como referencia que los neonatos usados en pruebas convencionales nacen en medios de cultivo en los que disponen de alimento hasta el momento del análisis, obteniendo de esta manera la reserva de energía necesaria para resistir durante el periodo de prueba, una vez colectados los neonatos fueron alimentados 2 horas antes de montar las pruebas, utilizando el alga *Spirulina* sp incluida en el KIT (Foto 5).

6.2.4 Montaje de la prueba

6.2.4.1 Tóxico de referencia

Se utilizó la solución madre de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) preparada conforme al inciso 1.3.1

6.2.4.2 Determinación de la escala de diluciones

Se realizaron 2 pruebas exploratorias para determinar la escala de diluciones que más convenía para obtener la CL₅₀.

- ◆ La primera se realizó utilizando las concentraciones sugeridas por el proveedor (0,1; 0,3; 1,0; 3,0 y 10 mg/L). En la que la CL₅₀ se rebasó desde la concentración de 1 mg/L a las 24 horas.
- ◆ La segunda se realizó con las concentraciones de la prueba tradicional (0,08; 0,12; 0,16; 0,20 y 0,24 mg/L). Sin embargo no se logró alcanzar la CL₅₀.

Con base en los resultados de las pruebas anteriores se decidió utilizar el intervalo de diluciones de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0 mg/L tomando en cuenta que la concentración de 0,24 mg/L produjo un 20% de efecto y la de 1,0 mg/L el 95 % de efecto.

6.2.4.3 Preparación de las diluciones y llenado de la placa de prueba

Dado el volumen que se utiliza para la prueba con este método, las diluciones se prepararon en matraces aforados de 100 mL y a partir de ellos se realizó el llenado de la placa de prueba, el cual inicia por la parte superior y de acuerdo a la siguiente descripción (Figura 4).

El control y cada dilución cuentan con 4 réplicas. Los pozos de prueba corresponden a las columnas etiquetadas como A, B, C, D. Las filas 1, 2, 3, 4, y 5 corresponden a cada una de las concentraciones de prueba, en este caso del tóxico de referencia, por lo que la fila 1 es para la concentración de 0,2; la fila 2 para la concentración de 0,4; etcétera. La fila "X", o sea la superior, es para las 4 réplicas del control. Los pozos de la columna de la

extrema izquierda son llamados pozos de enjuague; cada uno se llenó con 10 mL de agua dura o con la concentración de prueba correspondiente y se transfirieron a cada uno por lo menos 20 neonatos desde la caja Petri, tratando de tomar la menor cantidad de líquido de la caja, de esta manera se previene la dilución de la concentración del tóxico en los pozos de prueba.

Desde los pozos de enjuague, comenzando por la fila del control se transfirieron 5 organismos a cada pozo de prueba, evitando que los neonatos quedaran atrapados en la tensión superficial. La transferencia continuó en orden ascendente de las filas.

Cuando se verificó que cada pozo de prueba contenía 5 organismos, la placa se cubrió con las tiras de parafilm y las tapas de plástico.

Las pruebas se incubaron a $20 \pm 1^\circ \text{C}$ en una incubadora marca Fisher, modelo 307C con temperatura controlada y monitoreada con termómetro (-20 a 50°C) en total oscuridad por un periodo de 48 horas.

6.2.5 Lectura de las pruebas

La lectura de las pruebas se realizó a las 24 y 48 horas, registrando el número de organismos inmóviles en cada pozo de prueba con ayuda de un microscopio de disección con el que se verificó la ausencia de movimiento de cada organismo y se tomó el total de las 4 repeticiones para cada concentración.

Para la obtención de la CL₅₀ se utilizó también el software USEPA: Probit análisis Program, versión 1.5, conforme a lo descrito en el inciso 1.5.

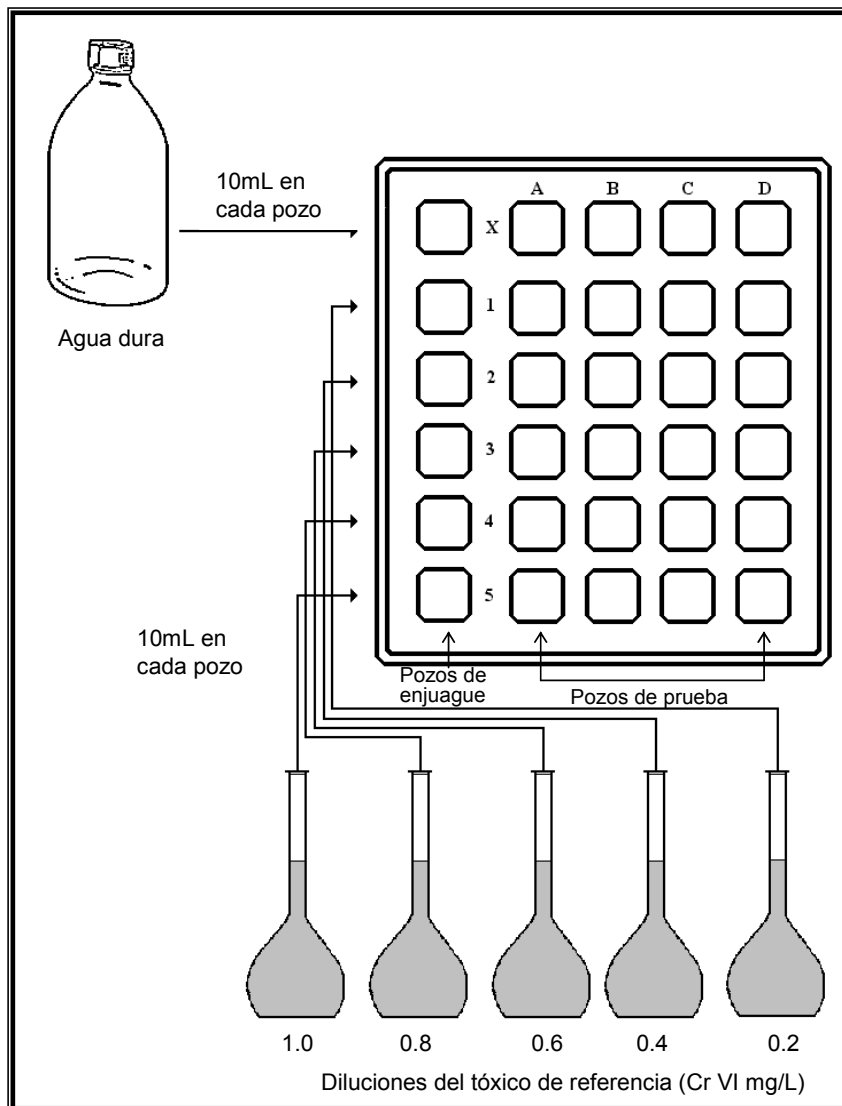


Figura 4. Llenado de la placa de prueba del KIT (tomado del manual del proveedor)

6.3 Pruebas con el CULTIVO CON AGUA DEL KIT

De acuerdo al proveedor, el agua de dilución que utiliza está elaborada conforme a la norma ISO 6341:1996 (E), que establece una dureza de 250 ± 25 mg/L de CaCO_3 . Con base en ello se elaboró agua dura suficiente, cumpliendo con las especificaciones de dicha norma, ya que el agua del KIT era insuficiente para el mantenimiento de un cultivo. La finalidad fue establecer cultivos de *D. magna* con un medio de dureza mayor a la establecida en la norma mexicana para evitar que los neonatos al ser puestos en un medio con mayor dureza durante la prueba pudieran verse afectados y comprometieran

los resultados de las pruebas. La valoración de la dureza del agua se determinó de acuerdo a la NMX-AA072-SCFI-2001.- Análisis de agua.- Determinación de dureza total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas, obteniendo un valor promedio de 234 mg/L (como CaCO₃).

6.3.1 Establecimiento y manejo del cultivo

El cultivo se estableció colocando neonatos de menos de 24 horas de nacidos en el agua dura preparada en el laboratorio conforme a lo descrito en la ISO 6341:1996 (E) bajo las mismas condiciones descritas en el cuadro 3 del inciso 1.2. A los 8 días alcanzaron la madurez sexual y los neonatos de la primera y la segunda puesta fueron descartados. Los neonatos de la tercera puesta fueron utilizados para iniciar lotes reproductores y ya con estos, fueron los organismos de la tercera puesta los que se utilizaron para las pruebas.

6.3.2 Montaje y análisis de las pruebas

Para la realización de estas pruebas se utilizó como agua de dilución el agua dura utilizada para el establecimiento del cultivo. El montaje de las pruebas, la lectura de las mismas y la obtención de la CL₅₀ se realizó con base en lo señalado en los incisos 1.3, 1.4 y 1.5.

6.4. Pruebas con el KIT CON AGUA DEL CULTIVO

6.4.1 Eclosión de los efipios

Debido a que se tenía un número limitado de efipios para asegurar la eclosión de estos, los neonatos se pusieron a eclosionar con agua preparada conforme al inciso 2.2 y se colocaron bajo las mismas condiciones descritas en el inciso 2.3

6.4.2 Montaje y análisis de las pruebas

Para la realización de estas pruebas se utilizó como agua de dilución el agua dura preparada en el laboratorio conforme al inciso 1.1. Con base en las pruebas con el KIT se decidió utilizar la misma escala de concentraciones 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/L de Cr VI

las diluciones se prepararon en matraces aforados de 100mL. El llenado de la placa de prueba y el traslado de los organismos, la incubación de las pruebas se realizaron conforme a lo descrito en el inciso 2.4.3, la lectura y el cálculo de la CL₅₀ se realizó como se describe en el inciso 2.5.

6.5. Diseño experimental

Consistió en obtener la CL₅₀ a las 24 y 48 horas para Cromo VI con *Daphnia magna* en las distintas pruebas.

- CULTIVO (inciso 6.1), se realizaron 11 ensayos, cada ensayo tuvo 5 concentraciones por triplicado con 10 organismos por cada réplica sumando 30 organismos por concentración.
- KIT (inciso 6.2), se realizaron 11 ensayos cada ensayo consistió en 5 concentraciones con 4 réplicas con 5 organismos cada una sumando 20 organismos por concentración.
- CULTIVO CON AGUA DEL KIT (inciso 6.3), se realizaron 11 ensayos, cada ensayo tuvo 5 concentraciones por triplicado con 10 organismos por cada réplica sumando 30 organismos por concentración.
- KIT CON AGUA DEL CULTIVO (inciso 6.4), se realizaron 11 ensayos cada ensayo consistió en 5 concentraciones con 4 réplicas con 5 organismos cada una sumando 20 organismos por concentración.

Todos los ensayos se incubaron a $20 \pm 1^\circ$ C en oscuridad y se revisaron al cumplir 24 y 48 horas para cuantificar el número de organismos inmóviles por concentración. Con estos datos se alimentó el programa del probit para obtener el valor de la CL₅₀.

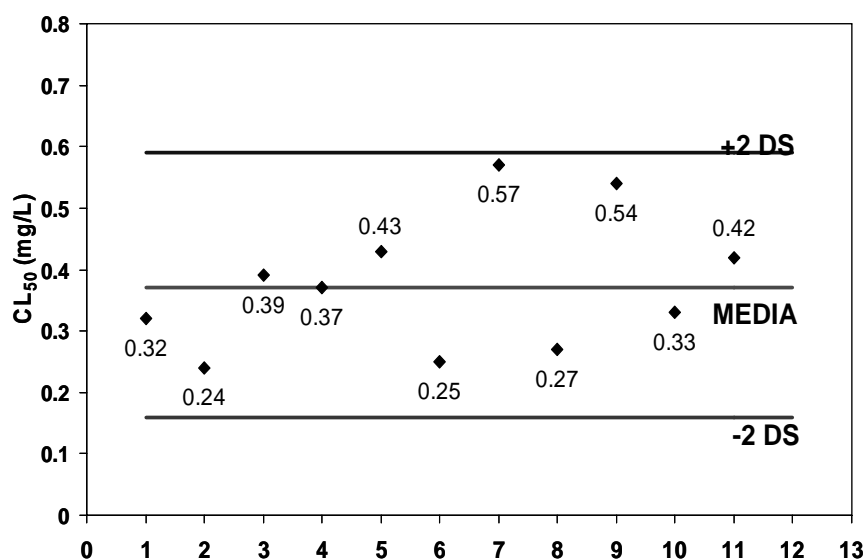
6.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con los valores de CL₅₀ obtenidos con el programa Probit para cada prueba. Con el fin de detectar diferencias debidas al origen de los organismos de prueba o a la dureza del agua de dilución, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) entre las 4 pruebas a las 24 y 48 horas. Posteriormente se realizó una prueba de Tukey para determinar entre que pruebas se encontraban las diferencias. El análisis estadístico se realizó con el software Statistica 6.0.

VII. RESULTADOS

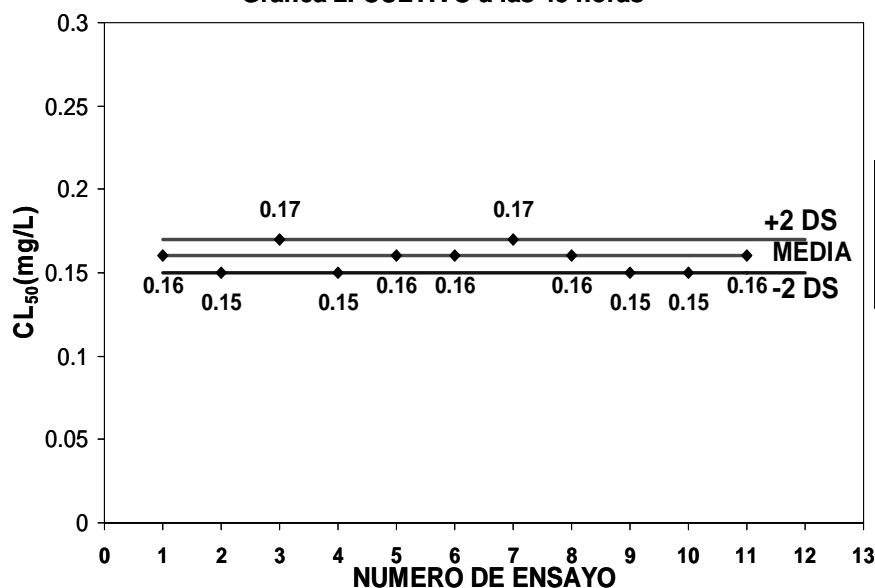
Se realizaron 44 pruebas, 11 de cada variante, de las que se obtuvieron los valores de CL_{50} a las 24 y 48 horas. En las gráficas 1 y 2 se muestra la media de la CL_{50} para Cromo VI en la prueba con organismos en cultivo a las 24 y 48 horas respectivamente. También se puede observar una estabilidad mayor de la prueba a las 48 horas y un coeficiente de variación menor que a las 24 horas (3,9%).

Gráfica 1. CULTIVO a la 24 horas



\bar{x}	0.37
C.V %	29.2
DS	0.1

Gráfica 2. CULTIVO a las 48 horas

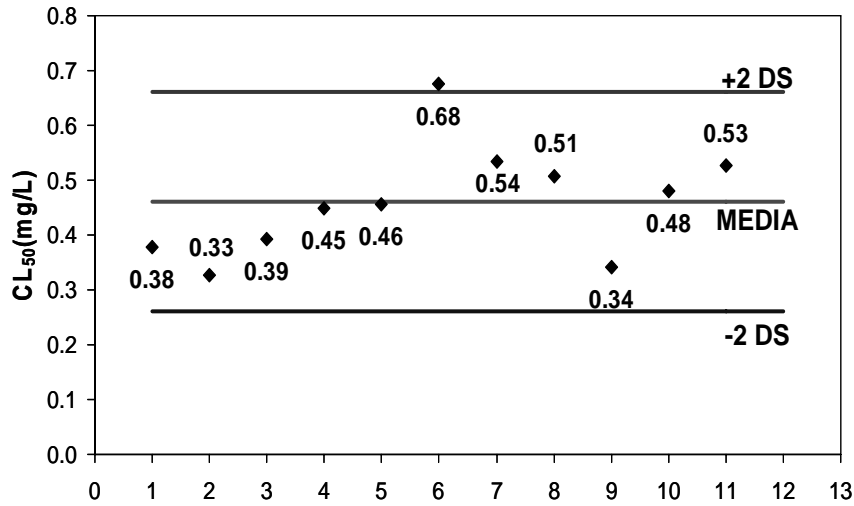


\bar{x}	0.16
C.V %	3.9
DS	0.006

Gráficas 1 y 2.- CL_{50} con Cr VI a las 24 y 48 horas en pruebas con *Daphnia magna*, utilizando la prueba tradicional con organismos en cultivo.

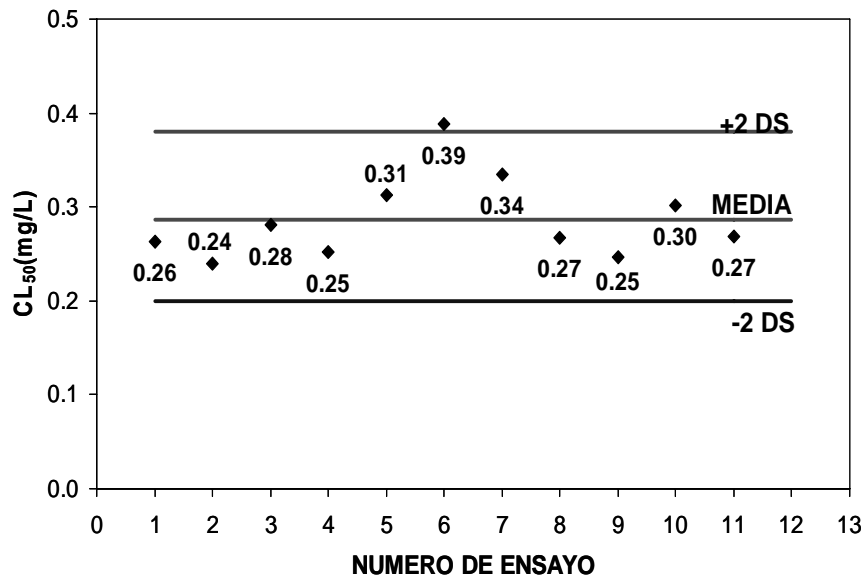
En las gráficas 3 y 4 se presentan los resultados de las pruebas realizadas con el KIT. A las 24 se obtuvo una CL50 media de $0,46 \pm 0,1$ mg/L, mientras que a las 48 horas el valor medio de la CL50 fue de $0,28 \pm 0,04$ mg/L. En este caso, también se observó una estabilidad mayor de la prueba con un C.V de 15,6 % a las 48 horas.

Gráfica 3. KIT a las 24 horas



\bar{x}	0.46
C.V %	21.9
DS	0.10

Gráfica 4. KIT a las 48 horas

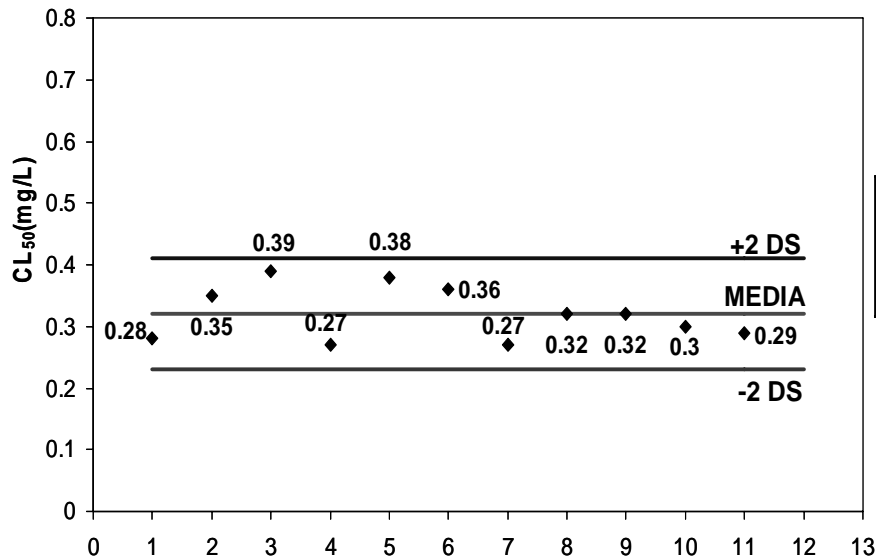


\bar{x}	0.29
C.V %	15.6
DS	0.04

Gráficas 3 y 4.- CL50 con Cr VI a las 24 y 48 horas en pruebas con *D. magna*, utilizando el KIT comercial.

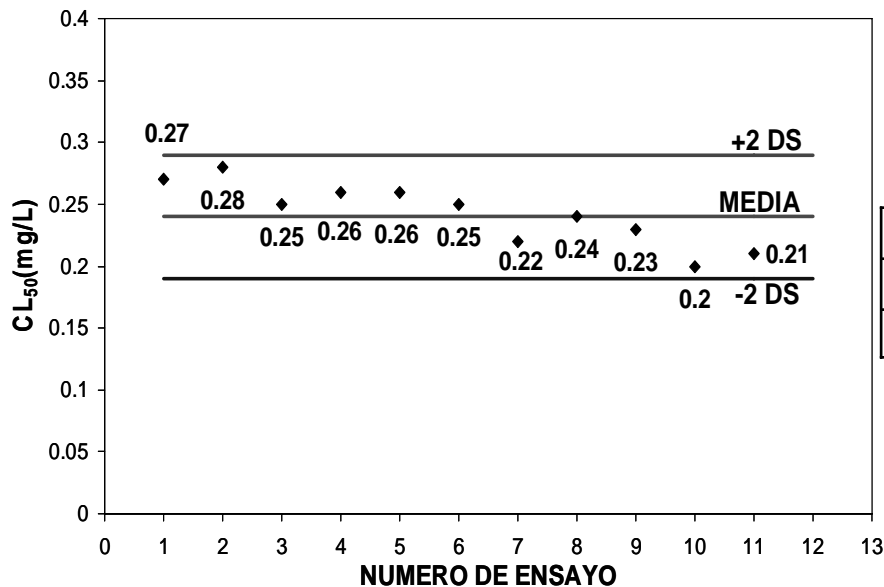
Para la prueba con organismos en cultivo, utilizando agua dura del KIT (dureza de 250 ± 25 mg/L de CaCO_3) se obtuvo una CL_{50} de $0,32 \pm 0,04$ mg/L de Cr VI a las 24 horas con un C.V de 13,6%. Cabe mencionar, que es el valor más bajo para el grupo de pruebas a las 24 horas, en el caso de las 48 horas para esta prueba la CL_{50} fue de $0,24 \pm 0,2$ mg/L de Cr VI, y un C.V de 10,2%. Gráficas 5 y 6.

Gráfica 5. CULTIVO CON AGUA DEL KIT a las 24 horas



\bar{x}	0.32
C.V %	13.6
DS	0.04

Gráfica 6. CULTIVO CON AGUA DEL KIT a las 48 horas

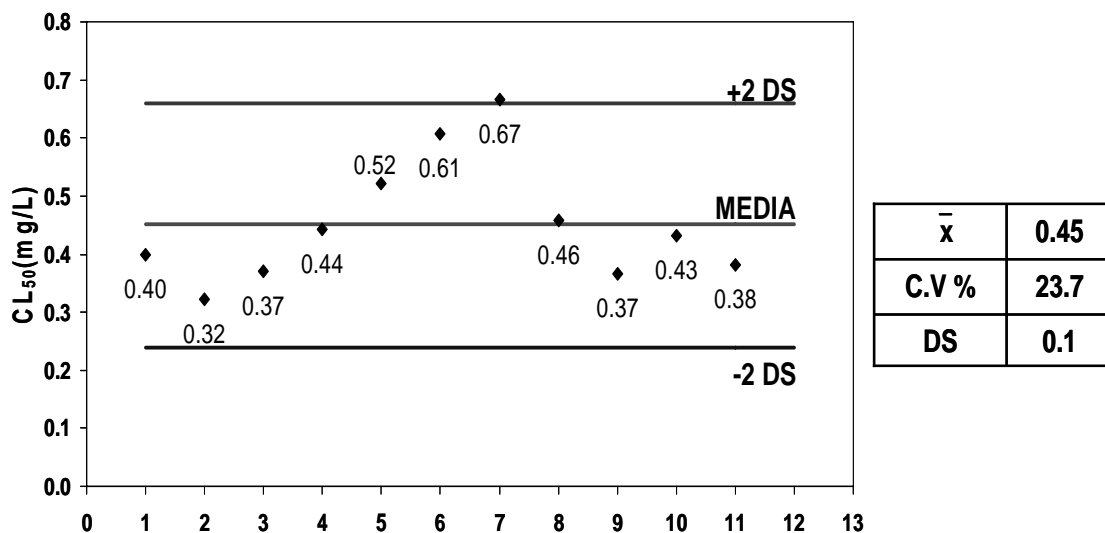


\bar{x}	0.24
C.V %	10.2
DS	0.02

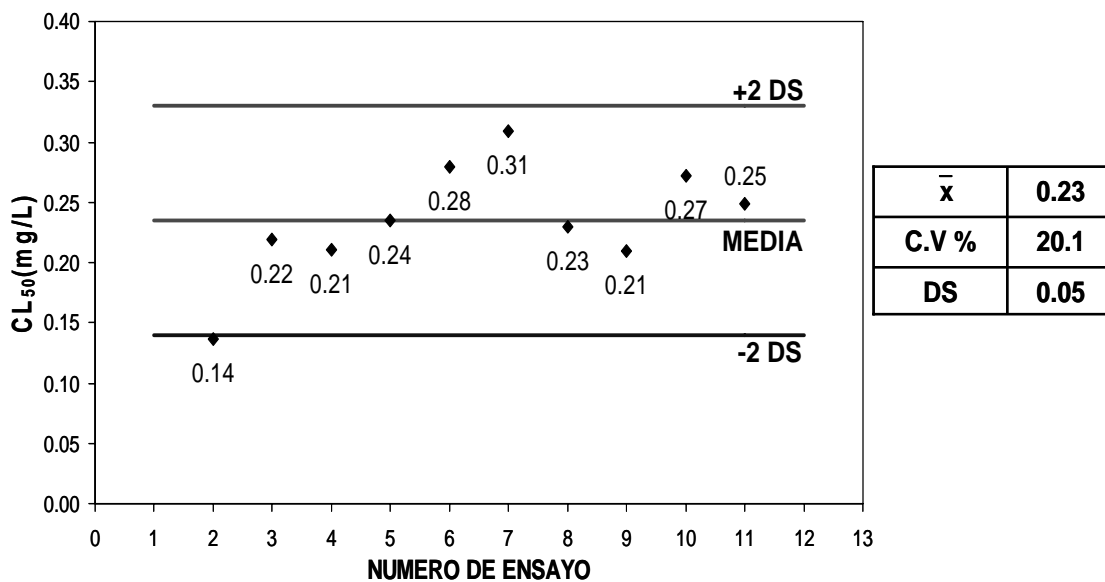
Gráficas 5 y 6.- CL_{50} con Cr VI a las 24 y 48 horas en pruebas con *D. magna*, utilizando organismos en cultivo y el agua dura artificial del KIT.

En otro grupo de pruebas, utilizando los epipios del KIT y agua dura artificial del cultivo tradicional (dureza de 170 ± 10 mg/L), se obtuvieron las CL₅₀ de $0,45 \pm 0,1$ y $0,23 \pm 0,05$ mg/L de Cr VI a las 24 y 48 horas respectivamente con un C.V de 23,7% similar al del KIT a las 24 horas y mayor a este a las 48 horas, con un valor de 20,1%.

Gráfica 7. KIT CON AGUA DEL CULTIVO a las 24 horas



Gráfica 8. KIT CON AGUA DEL CULTIVO a la 48 horas

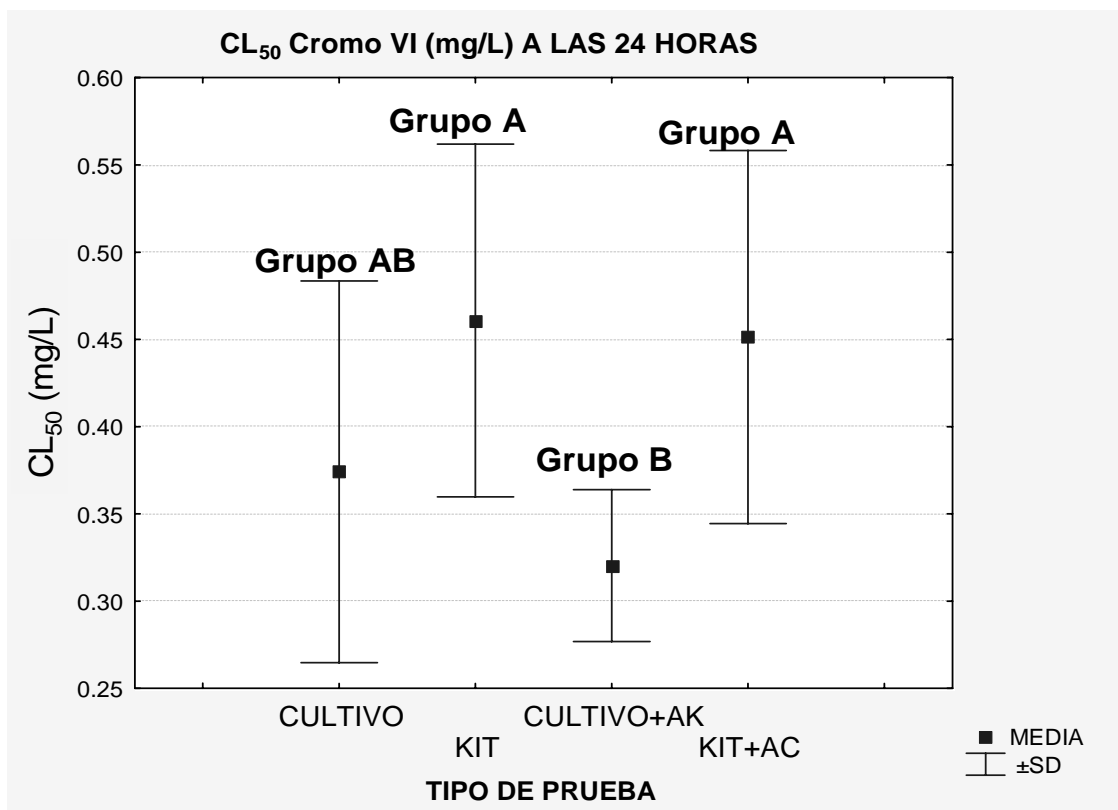


Gráficas 7 y 8.- CL₅₀ con Cr VI a las 24 y 48 horas en pruebas con epipios de *D. magna*, provenientes del KIT, utilizando agua dura del cultivo.

Al aplicar el análisis de varianza (ANOVA), la CL₅₀ a las 24 horas, presentó diferencias significativas entre los cuatro tipos de ensayo realizados ($P = 0,003$), (ver cuadro 5). Las diferencias y semejanzas que reveló la prueba de Tukey ($p < 0.05$) entre los 4 ensayos, se muestran representadas con la formación de los grupos expresados en la gráfica 9. En general las pruebas del KIT y el KIT con agua del cultivo (KIT+AC), no presentaron diferencias entre sí (con una media de 0,46 y 0,45 mg/L de Cr VI, respectivamente), por lo que conforman ambas pruebas el grupo A. La prueba con organismos cultivados, utilizando agua de dilución con la dureza del KIT (CULTIVO+AK), constituye el grupo B, diferente a las pruebas que formaron el grupo A. En cuanto a la prueba tradicional con organismos cultivados (CULTIVO), ésta mostró semejanzas tanto con el grupo A como con el B, por lo que se nombró grupo AB (gráfica 9).

Cuadro 5. Análisis de varianza (ANOVA) para la CL₅₀ con Cr VI con *D. magna* a las 24 horas para las 4 distintas pruebas

	<i>gl</i>	CM	<i>F</i>	<i>P</i>
Ensayo	3	0,048892	5,5140	0,002891

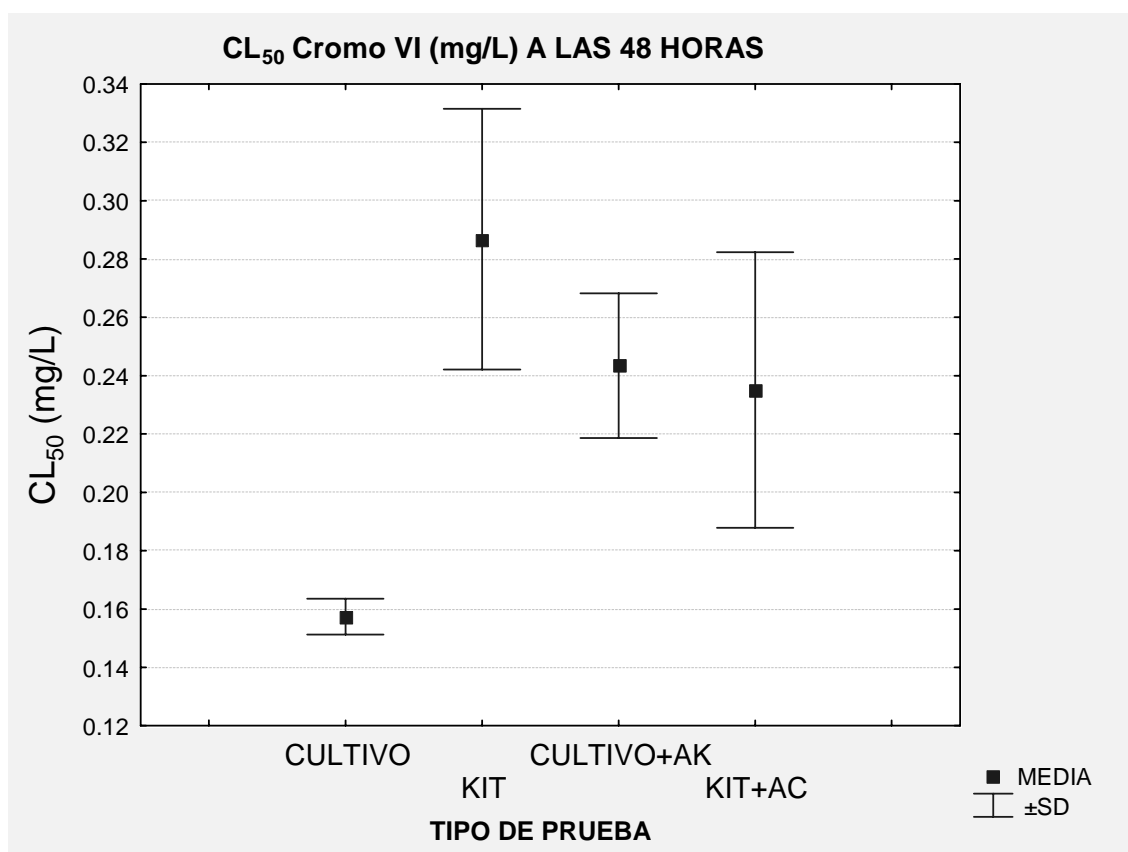


Gráfica 9. Semejanzas y diferencias para la CL₅₀ a las 24 horas para Cr VI en los ensayos con el CULTIVO y el KIT de *D. magna*.

Como se muestra en el cuadro 6 la ANOVA mostró diferencias significativas entre los 4 tipos de ensayo ($P < 0,001$) para la CL_{50} a las 48 horas. Posteriormente al realizar la prueba de Tukey para los 4 ensayos se observaron las siguientes diferencias y semejanzas (Gráfica 10). La prueba del KIT (con una media de 0,29 mg/L de Cr VI) es el grupo A. Las pruebas del CULTIVO+AK y el KIT+AC que era del grupo A no presentaron diferencias entre sí (con una media de 0,24, 0,23 mg/L de Cr VI, respectivamente), por lo que pasaron a conformar un grupo, el grupo B. En el caso de la prueba con el CULTIVO que a las 24 horas era el grupo AB, la uniformidad de la respuesta de esta prueba a las 48 horas (ver gráfica 2) la hace separarse de los otros tipos de ensayos formando el grupo C.

Cuadro 6. Análisis de varianza (ANOVA) para la CL_{50} con Cr VI con *D. magna* a las 48 horas para las 4 distintas pruebas

	<i>gl</i>	CM	<i>F</i>	<i>P</i>
Ensayo	3	0,031928	26,728	< 0,001



Gráfica 10. Semejanzas y diferencias para la CL_{50} a las 48 horas para Cr VI en los ensayos con el CULTIVO y el KIT de *D. magna*.

VIII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El desarrollo de los bioensayos como herramientas para evaluar la calidad del agua nos lleva a mejorar los procedimientos para obtener mejores resultados de una forma rápida y con menos costos.

El valor de la CL_{50} del CULTIVO a las 24 horas es similar con los valores que reportan diversos los autores excepto con Lucivjanská. En el caso de organismos cultivados con agua de dilución con la dureza del KIT (CULTIVO+AK) a las 24 podemos mencionar que la CL_{50} no concuerda con Lucivjanská, CIPEL Guilhermino y Marchetti. Sin embargo el KIT y KIT con agua del cultivo (KIT+AC) a las 24 horas la CL_{50} es similar a lo estipulado en el producto y con lo reportado por otros autores, a excepción de lo que reporta Lucivjanská ($CL_{50}= 0.09$) aunque el autor explica que esto se pudo deber a un error al preparar el agua del Daphtox-kit con una menor dureza (cuadro 4).

En el caso de las pruebas a las 48 horas, la CL_{50} (0.15-0.17 mg/L de Cr VI) de la prueba del CULTIVO es diferente a lo reportado por otros autores incluyendo el trabajo de Martínez en 2006 que realizó en México, en el cual reportó un intervalo de 0.19-0.23 para el cultivo en las mismas condiciones. El CULTIVO+AK concuerda con los resultados obtenidos en otros trabajos excepto con el de Lucivjanská y con Ulm. En lo que respecta al KIT y el KIT+AC los resultados para estas pruebas solo varían con lo reportado por Lucivjanská como se observa en el cuadro 4.

Se observó en los cuatro tipos de pruebas que la toxicidad del cromo hexavalente aumenta conforme aumenta el tiempo de exposición, de la misma manera podemos observar una respuesta menos variable en las pruebas cuando aumenta el tiempo de la prueba lo que es confirmado con la disminución en los coeficientes de variación de cada una de las pruebas al pasar de 24 a 48, horas (graficas 1-8). La prueba más estable es la tradicional (CULTIVO) que sigue los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NMX-AA-087-1995-SCFI, teniendo un C.V de 3.9 % a las 48 horas.

Como se puede observar en el cuadro 4 los valores de CL_{50} reportados por Khangarot en 1987 y Fargasova en 1994, están por encima a lo reportado en este trabajo, así como por otros autores. Cabe mencionar que al no tener la referencia de las condiciones en las que se realizaron las pruebas nos hace imposible explicar la discrepancia entre los valores.

La prueba del CULTIVO a las 24 horas como se puede ver en la gráfica 9 con la formación del grupo AB no muestra diferencias con las otras pruebas ni con los valores reportados por otros autores, (cuadro 4), incluso concuerda con lo que establecen la ISO y la OCDE, a pesar de no cumplir con la condición de la dureza del agua de dilución que establecen estas normas, lo que nos lleva a pensar, de acuerdo a los intervalos de confianza, que las pruebas son tan variables en su respuesta a las 24 horas que no importa el origen de los organismos o las condiciones de la prueba.

Esta condición cambia al transcurrir las 48 horas de prueba. La dureza del agua produce un decremento en el efecto del tóxico, lo que explica la diferencia de la CL_{50} en pruebas con el mismo tipo de organismos, es decir, en las pruebas del CULTIVO y el CULTIVO+AK, ambas tienen como organismo de prueba a neonatos de origen partenogenético, cuya carga genética es la misma. Sin embargo, la respuesta es diferente al cambiar la dureza del agua de dilución. Esto también se observa en los valores reportados por Persoone en 1989 en los que la toxicidad del cromo disminuye conforme aumenta la dureza (cuadro 4). De la misma forma esto pasa con la prueba del KIT y el KIT+AC; ambas pruebas son realizadas con neonatos provenientes de efipios, con variabilidad genética, sin embargo, cambia su respuesta al variar la dureza del agua de dilución.

Aunque la respuesta de los organismos varió al modificarse la condición de la dureza en el agua de dilución, los resultados de este trabajo muestran que las pruebas con organismos provenientes de hembras partenogenéticas tienen una respuesta más estable que las pruebas con neonatos provenientes de los efipios del KIT. Como se mencionó al inicio, la variabilidad de la respuesta en las pruebas puede estar dada por la carga genética de los neonatos que eclosionan de efipios, por lo que el uso de este tipo de organismos, pudiera estar reflejando esa respuesta menos uniforme que la que dan los de origen partenogenético.

Pudiera pensarse, que el tamaño de los neonatos es un aspecto en la variación de su respuesta. Sin embargo, Martínez-Jerónimo en el 2006 observó que la temperatura de los cultivos afecta significativamente la talla de los neonatos, notó que los neonatos provenientes de hembras mantenidas a 25° C son significativamente más pequeños que los neonatos de hembras mantenidas a 20° C, la talla también es afectada por el número de puesta; las dos primeras puestas son más pequeñas que las consecutivas. Pese a ello, el autor menciona que esta diferencia en talla no afecta significativamente

la sensibilidad de los neonatos siempre y cuando se utilicen los neonatos a partir de la tercera puesta, lo que nos podría servir como referencia al evaluar la respuesta de los neonatos provenientes de efiptos con diferencias de tamaño.

Existe gran cantidad de información a nivel nacional e internacional sobre el uso de *D. magna* para evaluar la calidad de cuerpos de agua y fuentes puntuales de contaminación. Pero existe la necesidad de contar con información que refleje las condiciones ambientales propias de una región para una mayor objetividad en los diagnósticos, lo cual lleva a la búsqueda de trabajar con especies nativas. Si bien México tiene registradas 110 especies de cladóceros, la sola existencia de la NMX-AA-087-1996-SCFI, representa un punto de partida para trabajar con un organismo de prueba internacionalmente reconocido, con el cual pueden trazarse comparaciones entre su respuesta y las que proporcionen los organismos de especies nativas.

Finalmente, el uso de efiptos extiende la posibilidad comercial de reproducirlos masivamente y de esta manera tener más control y manipular las condiciones del cultivo y su producción y conocer y controlar la calidad de los efiptos. El uso al que se les destine deberá establecerse claramente, ya que los neonatos obtenidos de su eclosión pueden usarse como organismos de prueba directamente como en el KIT, o bien, como iniciadores de nuevos cultivos clónales, conociendo así su origen y descendencia en las pruebas.

IX. CONCLUSIONES

Los neonatos de prueba que provienen de una reproducción sexual fueron como se esperaba más resistentes, ya que naturalmente están preparados para sobrevivir en situaciones adversas teniendo una CL_{50} mayor, comparada con organismos de origen partenogenético.

La variación en las respuestas de las pruebas a las 24 horas nos da como resultado un intervalo tan amplio que no nos permite reconocer las diferencias que puede ocasionar la variación de parámetros importantes como es el caso del origen del organismo de prueba o la dureza del agua de dilución. En cambio, si se toma en cuenta la respuesta de las pruebas a las 48 horas son evidentes las diferencias entre aplicar la prueba conforme a la Norma Oficial Mexicana NMX-AA-087-1995-SCFI y utilizar el Daphtoxkit de acuerdo a su procedimiento. En este caso, la dureza y el origen de los organismos de prueba (partenogenético o por efipios) influyen en la CL_{50} de las pruebas; ambos aspectos determinan la respuesta al efecto tóxico del cromo, evidenciado por la formación de los grupos A, B y C (gráfica 10).

Tras ver las diferencias de la CL_{50} a las 24 y 48 horas de los ensayos se sugiere que se realice la lectura de las pruebas a las 48 horas y se tome en cuenta como un resultado determinante de la sensibilidad de los organismos de prueba ya sean cultivados o provenientes de efipios.

La necesidad de evitar o controlar la contaminación de los cuerpos de agua nos ha llevado a modificar los bioensayos de modo que sean más prácticos, eficientes y poco costosos. Es así que podemos proponer el uso del KIT como alternativa a la prueba tradicional, al considerar la formación del grupo B a las 48 horas (gráfica 10) y en la que se observa un equilibrio entre el CULTIVO y el KIT. También hay que considerar que el aumento de la dureza del agua de dilución en la prueba tradicional aminora el efecto del tóxico, equiparándolo a la resistencia de los neonatos provenientes de efipios que se observan más sensibles al disminuir la dureza del agua de dilución, lo que hace más disponible el tóxico.

La variación en las condiciones del cultivo de *Daphnia* sp o de las condiciones de las pruebas hace difícil comparar los resultados con otros laboratorios nacionales o internacionales. Las formas de trabajar requieren estandarizar condiciones o criterios metodológicos con el fin de reducir la variabilidad en los resultados y poder hacerlos comparables.

Es necesario tomar como referencia los estudios realizados con las diversas especies, así como ejercicios de inter-calibración para desarrollar la futura legislación en el tema del uso de bioensayos como herramientas de rutina para la regulación en estudios de riesgo y monitoreo ambiental para la protección de los recursos.

LITERATURA CITADA

1. ATSDR. 2000. Resumen de salud pública cromo CAS#: 7440-47-3
www.atsdr.cdc.gov/es
2. Blinova, I. Sin año. Use of bioassays for toxicity assessment of polluted water. Proceedings of the Symposium dedicated to the 40th Anniversary of Institute of Environmental Engineering at Tallinn Technical University. 24-26 September, Tallinn. Tallinn, 149 -154pp.
3. Canna-Michaelidou, S., A. S. Nicolaou, E. Neopfyto y M. Christodoulidou. The use of microbiotests as a tool for integrated pollution control: evaluation and perspectives in Cyprus 39-48pp. (In: Persoone, G., C. Janssen y W. De Coen. eds 2000. New Microbiotests for routine screening and biomonitoring, ed. Kluwer Academic/Plenum, Publishers. NY, USA.).
4. Castañeda, O. S. sin año. Determinación de la toxicidad de los lodos generados por una planta potabilizadora, utilizando bioensayos, Centro Nacional de Prevención de Desastres (CENAPRED). 15p.
<http://www.cepis.org.pe/bvsaidis/tratagua/mexicon/R-0106.pdf>
5. Castillo, G. M., A. Ronco., C. B. Díaz. y Y. G. Pica. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de agua estandarización, ínter calibración, resultados y aplicaciones. Editorial Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. México. 200 p.
6. CIPEL 1997. En Guide pour l'utilisation des tests ecotoxicologiques avec les daphnies, les bactéries luminescentes et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l'environnement 2002.
7. Clare, J. 2002. Daphnia: An Aquarist's Guide. Version 3.2.
www.caudata.org/daphnia/
8. CNA. 2001. Programa Nacional hidráulico 2001-2006

9. CONAGUA-IMTA. 1996. Estudio de clasificación de la cuenca del Río Cazones. 350 p.
10. CONAGUA, 2005. Estadísticas de agua en México. 141 p.
11. Coya Fernandez, B. Marañon Maison, E. Arribas Rojo, P. Sastre Andrés, H., 1996. Ensayos analíticos de ecotoxicología. Artículos técnicos # 518-96 41-55pp.
12. Daniel, M., A. Sharpe, J. Driver, A. W. Knight, P. O. Keenan, R. M. Walmsley, A. Robinson, T. Zhange y D. Rawson. 2004. Results of a technology demonstration project to compare rapid aquatic toxicity screening tests in the analysis of industrial effluents. J. Environ. Monit. 6, 855–865pp.
13. Daphtoxkit F magna. 2000. Crustacean toxicity screening test for freshwater. Standard Operational Procedure. Creasel, Deinze, Bélgica. 16 pp.
14. Fernández-Alba, A. R., M.D. Hernando Guil, G. Díaz-López y Y. Chisti. 2002. Comparative evaluation of the effects of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays. Analytica Chimica Acta 451. 195–202pp.
15. Fochtman, P. 1999 Acute toxicity of nine pesticides as determined with conventional assays and alternative microbiotests. 233-241pp. (In: Persoone, G., C. Janssen y W. De Coen. eds 2000. New Microbiotests for routine screening and biomonitoring, ed. Kluwer Academic/Plenum, Publishers. NY, USA.).
16. Gagneten, A. M. 2002. Respuesta de una comunidad zooplanctónica de agua dulce a la aplicación de cromo en clausuras experimentales Interciencia. V.27. n.10. 563-570
17. Galassi, S. V. 2000. Test acuto con Daphtoxkit Fâ magna per la valutazione della tossicità di un effluente industriale e l'individuazione dei composti tossici. Biologia Ambientale, 14 (2): 21-28pp.
18. Garcia, R. M., M. H. Soto. y M. V. Martínez. 2000. Toxicidad de los extractos de las semillas de *Erythrina americana*. Ciencia Ergo Sum 7 (2) 166-170pp.

19. George, K. T. y K. Liber. 2007. Laboratory Investigation of the Toxicity and Interaction of Pesticide Mixture in *Daphnia magna*. Environmental Contamination and Toxicology 52. 64-72pp.
20. Henry, L. 1988. Recomendaciones concernientes a la selección de organismos para bioensayos acuáticos.
<http://www.cepis.opsoms.org/eswww/fulltext/publica/orimuest/omnax51html>.
21. I.S.O. 1996. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). I.S.O., 6341:1996/cor.1:1998 (E)
22. Juárez, J. y A. Villagra de Gamundi. 2007. Bioensayos preliminares para evaluar la toxicidad del lindano sobre *Simocephalus vetulus* (O.F.Muller, 1776) (Crustacea: Cladocera). Rev. Perú. biol. 14(1): 065- 067pp.
23. Kungolos, A., S. Hadjispyrou, M. Petala, V. Tsiridis, P. Samaras y G. P. Sakellaropoulos. 2004. Toxic properties of metals and organotin compounds and their interactions on *daphnia magna* and *vibrio fischeri*. Water, Air, and Soil Pollution: Focus 4: 101–110pp.
24. Lin, T.S. P. Meier y J. Nriagu 2005. Acute Toxicity of Thallium to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. Environmental Contamination and Toxicology. 75:350–355pp.
25. Lucivjanská, V., M. Lucivjanská y V. Cízek. 2000. Sensitivity comparison of the ISO *Daphnia* and algal procedures with Toxkit microbiotests. 243-246pp. (In: Persoone, G., C. Janssen y W. De Coen. eds 2000. New Microbiotests for routine screening and biomonitoring, ed. Kluwer Academic/Plenum, Publishers. NY, USA.).
26. Martínez-Jerónimo, F., L. Martínez-Jerónimo y F. Espinosa-Chávez. 2006 Effect of culture conditions and mother's age on the sensitivity of *Daphnia magna* Straus 1820 (Cladocera) neonates to hexavalent chromium Ecotoxicology 15: 259–266pp.

27. Martínez-Jerónimo, F. y G. Muñoz-Mejía. 2007. Evaluation of the sensitivity of three cladoceran species widely distributed in México to three reference toxicants. *Journal of Environmental Science and Health. Part A.* Vol. 42. 1417-1424.
28. Martínez-Jerónimo, F. J. Rodríguez-Estrada y L. Martínez-Jerónimo. 2008. *Daphnia exilis* Herrick, 1895 (Crustácea: Cladocera). Una especie zooplanctónica potencialmente utilizable como organismo de prueba en bioensayos de toxicidad aguda en ambientes tropicales y subtropicales. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 24 (4) 153-159pp.
29. Martínez-Tabche, L., M. Romero Solís, E. López, y M. Galar, M. 1999. Efecto tóxico del DDT, clordano y agua de la presa Ignacio Ramírez (México) sobre *Daphnia magna* (Crustacea: Daphnidae) *Revista de Biología Tropical* 47(4):681-690pp.
30. Mayorga, P. S. 2001. Microbioensayos ecotoxicológicos: su utilidad en el manejo de evidencia de contaminación hídrica. En *Manual para el manejo de la evidencia en casos de contaminación hídrica.* 28-35pp.
31. Mendoza-Cantú, A., P. Ramírez-Romero y Y. Pica-Granados. 2007. Environmental legislation and aquatic ecotoxicology in México: Past, present and future scenarios. *Journal of Environmental Science and Health. Part A.* Vol. 42. 1344-1348pp.
32. Norma Oficial Mexicana NMX-AA-087-1995-SCFI, *Análisis de agua – Evaluación de toxicidad aguda con Daphnia magna status (crustacea – cladocera) – Método de prueba.*
33. Muñoz-Mejía, G., G. Zavala-Olivarez y F. Martínez-Jerónimo. 2007. Comparative analysis between native and reference cladocerans to assess the toxic of products used by oil industry in México. *Journal of Environmental Science and Health. Part A.* Vol. 42. 1453-1460pp.
34. OCDE 2004 *Daphnia* sp. Acute immobilisation test. OECD Guideline for testing of chemicals No. 202, 12 pp

35. Paggi, J. y de Paggi, S. 2000 *Daphnia magna*: el "canario" de las aguas. www.ceride.gov.ar/servicios/comunica/canario.htm
36. Ronco, A. E., G. Castillo y M. C. Díaz-Baez. Development and application of microbioassays for routine testing and biomonitoring in Argentina, Chile and Colombia. 49-61. 241 (In: Persoone, G., C. Janssen y W. De Coen. 2000).
37. Ruppert E.E., Y Barnes, R.D. 1996. "Zoología de los invertebrados." 6ª Edición. Eds. Mc Graw-Hill interamericana. S.A. México. 1114p.
38. Seco Gordillo, J.I.; C. Fernández Pereira y J. F. Vale Parapar. 1998. Evaluación de la ecotoxicidad aguda de metales pesados con *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental Restoration* 1 (1). 3-12pp.
39. SEDUE, 1976. Control de la contaminación del agua en México. Secretaria de recursos hidráulicos. 196 p.
40. SEDUE, (sin año). Manual de bioensayos de toxicidad aguda con microorganismos cladóceros *Daphnia magna* Straus. Secretaria de Ecología. Dirección General de Prevención y Control de la Contaminación Ambiental.
41. Silva. J., G. Torrejón, E. Bay-Schmith, y A. Larrain. 2003. Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* (Crustácea: Cladocera) usando un toxico de referencia *Gayana* 67(1): 87-96pp.
42. Tebbutt, T. H. Y., (2002). Fundamentos de control de la calidad del agua. Ed. Limusa. 233 pp.
43. Téllez, J. M. M. R. Carvajal y A M Gaitán. 2004. Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización del cromo en el proceso productivo de curtiembres. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb* Vol. 52 No. 1. 50-61pp

44. Ulm, L., J. Vrzina, V. Schiesi, D. Puntaric y Z. Smit. 1999. Sensitivity comparison of the conventional acute *Daphnia magna* immobilization test with the Daphtoxkit FTM microbiotest for household products. 247-252pp. (In: Persoone, G., C. Janssen y W. De Coen. eds 2000. New Microbiotests for routine screening and biomonitoring, ed. Kluwer Academic/Plenum, Publishers. NY, USA.).
45. Villarroel, M.J.U. 2004. Alteraciones fisiológicas en el crustáceo *Daphnia magna* por exposición a plaguicidas. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia. España. 223p.

ANEXO 1

CULTIVOS PUROS DE *Selenastrum capricornutum*

1.1 Preparación del cultivo algal

Se utilizó el medio Basal de Bold para el cultivo de algas verdes, el cual se preparó de la siguiente manera

Previamente se hicieron 100 ml de cada una de las soluciones stock, conforme a la siguiente tabla.

Solución stock	Reactivo(s)	Peso (g)
1	Nitrato de sodio (NaNO_3)	25
2	Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2,5
3	Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	7,5
4	Fosfato dibásico (KH_2PO_4)	7,5
5	Fosfato monobásico (K_2PO_4)	17,5
6	Cloruro de sodio (NaCl)	2,5
7	Sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) + $1\mu\text{L H}_2\text{SO}_4$	0,498
8	Acido bórico (H_3BO_3)	1,4201
9	EDTA	5,0
	Hidróxido de potasio (KOH)	3,1
10 *	Sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,882
	Cloruro de manganeso tetrahidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,144
	Oxido de molibdeno (MoO_3)	0,071
	Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,157
	Nitrato de cobalto hexahidratado [$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]	0,049

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

- 1.2 Cada una de las soluciones stock se colocaron en envases debidamente rotulados y se conservaron en refrigeración ($4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$).
- 1.3 Para preparar 1 litro del medio Basal de Bold se agregó 1 mL de cada una de las soluciones stock a 500 mL de agua desionizada o destilada en orden del 1 al 10 y se aforó a 1 L.
- 1.4 Se esterilizó en un matraz Erlenmeyer en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.
- 1.5 El medio de cultivo se dejó enfriar a temperatura ambiente e inoculo con un cultivo precedente de densidad conocida para alcanzar una concentración inicial aproximada de $1 (10^6)$ células /mL.

- 1.6 El cultivo fue colocado junto a una fuente de luz continua y aireación constante, permaneció así hasta por 10 días, tiempo en el cual alcanza una densidad entre 15 y 20 millones de células/mL, para suministro de alimento.
- 1.7 El cultivo se retiró y colocó a una temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para que se sedimentara, durante 2 días; posteriormente, se decantó el sobrenadante y se homogenizó el sobrante. Se realizó la estimación de la densidad celular, utilizando una cámara de Neubauer. Este concentrado algal, que se utiliza como alimento, no debe conservarse más allá de una semana.

ANEXO 2

SOLUCIÓN DE MICRONUTRIENTES

El suministro de nutrientes a los cultivos de *Daphnia magna* se realizó sólo en los cultivos stock y los lotes de reproducción.

La solución de nutrientes se preparó elaborando 100 mL de solución stock de cada una de las siguientes sustancias:

Solución stock	Sustancia	Peso (g)
1	Vitamina B ₁₂	0,001
2	Selenito de sodio (Na ₂ SeO ₄)	0,001
3	Tiamina	0,0075

Cada disolución se guardó en envases de vidrio bien rotulados y en refrigeración (4°C ± 2°C).

Por cada litro de agua dura a la que se le adicionó vitaminas se agregaron: 0,2 mL de la solución stock 1 (vitamina B₁₂); 0,2 mL de la stock 2 (selenito de sodio) y 1 mL de la stock 3 (tiamina).

ANEXO 3

LIMPIEZA DEL MATERIAL

Todo el material que no sea desechable, utilizado en el área de toxicología debe ser lavado como sigue:

- 3.1 Lavar con jabón libre de fosfatos y agua caliente.
- 3.2 Enjuagar abundantemente con agua corriente y dejar secar, preferentemente a temperatura ambiente.
- 3.3 Añadir un poco de acetona, escurriendo por las paredes del recipiente y quitar el exceso. Dejar secar.
- 3.4 Sumergir el (los) recipientes en una solución de ácido nítrico al 10% durante 24 horas. Sacar el material al concluir el tiempo y enjuagar con agua destilada y dejar secar.
- 3.5 Guardar el material en estantes limpios y cerrados. Previo a su uso el material se enjuaga con agua destilada o bien con agua dura, según sea su uso.

Los vasos y/o recipientes utilizados para los cultivos stock y lotes de reproducción de los dáfidos, se lavan preferentemente por separado retirando previamente con una fibra exclusiva para esa tarea, los restos de comida que se acumulan en el fondo; enjuagar perfectamente con agua corriente caliente y dar un último enjuague con agua dura. Dejar secar y volver a enjuagar con agua dura previo a su uso.