



SECRETARIA DE COMERCIO

Y

FOMENTO INDUSTRIAL

NORMA MEXICANA

NMX-AA-110-1995-SCFI

**ANALISIS DE AGUA – EVALUACION DE TOXICIDAD AGUDA CON
Artemia franciscana Kellogg (CRUSTACEA – ANOSTRACA) –
METODO DE PRUEBA.**

*WATER ANALYSIS – ACUTE TOXICITY EVALUATION WITH Artemia
franciscana Kellogg (CRUSTACEA-ANOSTRACA) – TEST METHOD.*

DIRECCION GENERAL DE NORMAS

PREFACIO

En la elaboración de la presente Norma Mexicana, participaron las siguientes empresas e instituciones:

- ASESORIA Y CONSULTORIA ECOLOGICA – REMMSA
- ASOCIACION NACIONAL DE LA INDUSTRIA QUIMICA
- BACTON DICKINSON DE MEXICO.
- CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE CELULOSA Y PAPEL
- EMPRESA PARA EL CONTROL DE LA CONTAMINACION DEL AGUA EN LA ZONA DE CIVAC.
- F.J. SALCEDO Y COMPAÑÍA
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETROLEO
- INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados;
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- INSTITUTO TECNOLOGICO DE ZACATEPEC
- JUNTA MUNICIPAL DE AGUA Y SANAMIENTO DE CIUDAD JUAREZ
CHIHUAHUA.
- SECRETARIA DE MARINA
Dirección General de Oceanografía Naval
- SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA.
Comisión Nacional de Agua;
Dirección General de Acuacultura.
Instituto Mexicano de Tecnología del Agua;
Instituto Nacional de Ecología,
Instituto Nacional de la Pesca.
- UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

INDICE DEL CONTENIDO

Núm. del Capítulo

1. Objetivo
2. Campo de aplicación
3. Referencias
4. Definiciones
5. Muestreo
6. Principio
7. Reactivos y materiales
8. Aparatos y/o instrumentos
9. Preparación y acondicionamiento de las muestras.
10. Procedimiento
11. Expresión de los resultados
12. Informe de la prueba
13. Bibliografía
14. Concordancia con normas internacionales.

Apéndice (informativo)

ANALISIS DE AGUA – EVALUACION DE TOXICIDAD AGUDA CON *Artemia franciscana* Kellogg (CRUSTACEA – ANOSTRACA) – METODO DE PRUEBA.

WATER ANALYSIS – ACUTE TOXICITY EVALUATION WITH *Artemia franciscana* Kellogg (CRUSTACEA-ANOSTRACA) – TEST METHOD.

1 OBJETIVO

Esta Norma Mexicana establece el método biológico para la evaluación de la calidad del agua mediante pruebas de toxicidad aguda utilizando *Artemia franciscana*.

2 CAMPO DE APLICACION

Esta Norma Mexicana es aplicable para la evaluación de toxicidad aguda en cuerpos de agua salobres y marinos, así como aguas residuales industriales, municipales y agrícolas, lixiviados, sustancias puras o combinadas y extractos acuosos con salinidades mayores a diez.

3. REFERENCIAS.

NMX-AA-007 Aguas – Determinación de la temperatura.

NMX-AA-008 Aguas – Determinación del pH

NMX-AA-087-SCFI Análisis de agua – Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna*. Straus (Crustacea-Cladocera) – Método de prueba.

NOM-053-ECOL Que establece el procedimiento para llevar a cabo la prueba de extracción para determinar los constituyentes que hacen de un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.

4 DEFINICIONES

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

4.1. Agua de mar artificial

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

4.2. Artemia franciscana (Kellogg, 1906)

Organismo planctónico que en promedio mide de 8 mm a 12 mm de longitud en etapa adulta y 35 µm en la etapa naupliar. Con 42 cromosomas, de 1 a 3 cromocentro, diploides, furca con dos lóbulos, con varias setas y constricción basal. Presenta dimorfismo sexual: el macho tienen penes con espina; su segundo par de antenas bien desarrolladas, funciona como órgano présil para retener a la hembra; en cada antena lleva una protuberancia semiesférica; la hembra tiene un saco ovífero en la parte ventral, el cual, visto lateralmente, es puntiagudo. Generalmente habita en aguas salobres e hipersalinas, cuya concentración varía desde 5 g/L hasta 150 g/L. Es una especie originaria del continente americano, (ver figura 1).

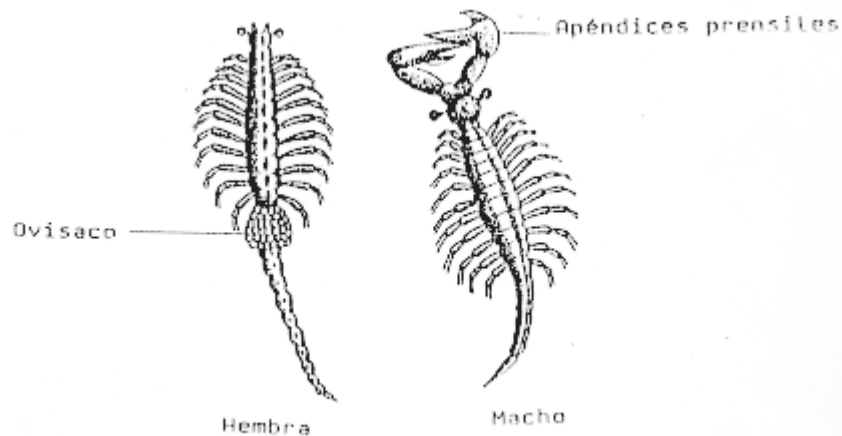


FIGURA 1.- Artemia franciscana.

4.3. Clase crustácea

Categoría taxonómica que agrupa a los organismos mandibulados, los cuales presentan exoesqueleto quitinoso con sales calcáreas, por lo que el caparazón a veces es muy duro. Tiene dos pares de apéndices prebucles que constituyen el primero y segundo par de antenas; al primer par también se le conoce como aténulas. El segundo par, aunque se encuentra antes de la boca, en su origen es postoral. Después de la boca, los crustáceos poseen numerosos pares de apéndices. Con excepción del primer par de antenas, todos los apéndices derivan de apéndices birramios. Durante su desarrollo, en general, presentan metamorfosis y un estado larval llamado “nauplio” (ver inciso 4.12) de tipo muy primitivo.

4.4. Concentración letal media (Cl_{50})

Es la concentración de una sustancia (pura o combinada) o efluente, que en una prueba de toxicidad aguda, provoca un efecto letal en 50% de los organismos expuestos durante un tiempo determinado.

4.5. Cuerpos de agua.

Son los mares, lagos, lagunas costeras, estuarios, acuíferos, ríos y sus efluentes directos o indirectos, permanentes o intermitentes, presas, cuencas, cauces, canales, embalses, cenotes, manantiales, y demás depósitos o corrientes de agua y redes colectoras, con excepción de los sistemas de drenajes y alcantarillado urbano y municipal.

4.6. Cuerpos receptores.

Son todos los mencionados en el inciso 4.5. que reciban directa o indirectamente descargas.

4.7. Descarga.

Aguas residuales que se vierten directa o indirectamente en algún cuerpo de agua o sistema de drenaje y alcantarillado urbano o municipal, incluyéndose los procesos de infiltración e inyección.

4.8. Efluente.

Es el agua u otro líquido que procede de un embalse, cuenca, proceso o planta de tratamiento.

4.9. Inmovilidad.

Es la incapacidad de los nauplios (ver inciso 4.12) para presentar algún movimiento apendicular, después de 10s de observación mediante la utilización de un microscopio estereoscópico. Este criterio se emplea en esta norma como un indicador de mortalidad de los organismos.

4.10. Lixiviado.

Es el líquido proveniente de los residuos, el cual se forma por reacción, arrastre o perculación y que contiene, disueltos o en suspensión, componentes que se encuentran en los mismos residuos.

4.11. Muestra simple o instantánea.

Es la que se toma ininterrumpidamente durante el período necesario para completar un volumen proporcional al caudal, de manera que éste resulte representativo de la descarga de aguas residuales, medido en el sitio y en el momento del muestreo.

4.12. Nauplio.

Es la primera etapa de desarrollo de un crustáceo y abarca desde que emerge del huevo hasta la primera muda. El nauplio recién nacido tiene forma ovoide, mide en promedio 350 μm de longitud; su cuerpo muestra tres segmentos cefálicos y una región post mandibular no segmentada, un ojo naupliar y labrum amplio, debajo del cual se encuentra la boca. En el primer segmento cefálico lleva un par de antenas llamadas anténulas, colocadas una a cada lado del ojo naupliar; en el segundo segmento cefálico se ubica el segundo par de antenas que son apéndices birramios y funcionan como las primeras estructuras de locomoción; el tercer segmento, lleva las mandíbulas que también son birramiadas, (ver figura 2)

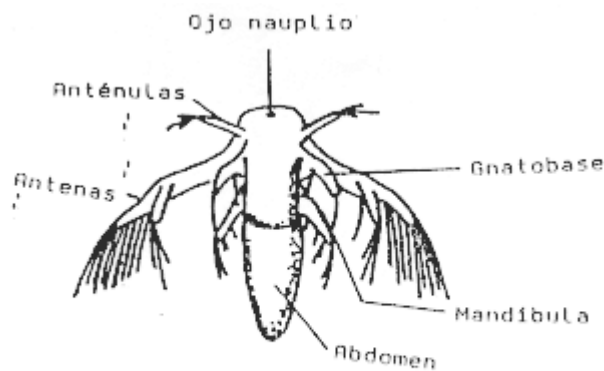


FIGURA 2.- Nauplio

FIGURA 2. Nauplio

4.13. Orden anostraca.

Categoría taxonómica que agrupa a organismos sin caparazón, ojos compuestos pedunculados, antenas prensiles bien desarrolladas en los machos y reducidas en las hembras, poseen de 11 a 19 pares de apéndices en el tronco. Sin apéndices postgeneitales. Rama furcal unisegmentada. Con metamorfosis en su desarrollo. Tienen la capacidad de tomar huevos resistentes llamados quistes. Las aberturas genitales de hembras y machos se localizan en un segmento que resulta de la fusión de los segmentos 12 y 13 del tronco. En la etapa de la reproducción, la hembra muestra una bolsa de la reproducción, la hembra muestra una bolsa de huevecillos (ovisaco), en la cara ventral de los primeros segmentos postgenitales.

4.14. Prueba de toxicidad (bioensayos de toxicidad)

Es la exposición controlada de organismos a sustancias puras o combinadas, lixiviados, extractos acuosos, aguas residuales industriales, municipales, agrícolas y aguas provenientes de cuerpos de agua, para evaluar su efecto tóxico.

4.15. Quiste.

Es un estado de desarrollo embrionario en etapa de gástrula, protegido por una cubierta constituida por tres estructuras; corión, membrana cuticular externa y cutícula embrionaria. Los quistes tienen una masa de 2,8µg a 4µg. Miden 200µm a 300µm y son de color marrón claro. Cuando están deshidratados tienen la apariencia de balones desinflados y al hidratarse se tornan esféricos.

4.16. Salinidad

Es la cantidad total de materia sólida, en gramos, disuelta en 1 kg. de solución acuosa después de que todos los carbonatos se han convertido en óxidos, todos los bromuros y yoduros reemplazados por cloruros y toda la materia orgánica se ha oxidado.

4.17. Sedimento

Material particulado o granular que se deposita en el fondo de un cuerpo de agua, sistema de drenaje y alcantarillado urbano o municipal.

4.18. Sustancia combinada.

Es aquella que se forma por la integración de dos o más compuestos en una proporción no mayor al 98% de cualquiera de ellos. Para fines de esta norma las sustancias combinadas pueden ser de aguas; residuales industriales, municipales y agrícolas, lixiviados y extractos acuosos con salinidades mayores a diez.

4.19. Sustancia pura.

Elemento o conjunto de dos o más elementos combinados químicamente, que dan lugar a un compuesto con pureza no menor al 98%, por ejemplo: dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), fenol (CH_6-OH), sulfato de zinc ($ZnSO_4$).

4.20. Tiempo de exposición.

Es el período en el que se someten los organismos a las soluciones de prueba, en un bioensayo de toxicidad.

4.21. Toxicidad aguda.

Es el efecto letal que se produce después de exponer a los organismos prueba, a sustancias puras o combinadas una sola vez, durante un período corto.

4.22. Tóxico.

Es cualquier sustancia pura o combinada que al entrar en contacto con un organismo, produce daños estructurales, alteraciones bioquímicas o fisiológicas o incluso la muerte, dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición.

4.23. Tóxico de referencia.

Es una sustancia química utilizada en bioensayos de toxicidad, cuyo efecto en los organismos, a determinadas concentraciones, es conocido y por lo tanto permite establecer el estado de respuesta de los organismos de prueba empleados, así como comparar los resultados intra e inter laboratorios. El uso de estos tóxico, proporciona también una evaluación general de la precisión (estabilidad y reproducibilidad del método a través del tiempo).

5 MUESTREO.

El muestreo tanto de cuerpos de agua como de efluentes industriales, municipales y agrícolas, constituyen una parte integral y fundamental de cualquier programa de monitoreo de la calidad del agua, pues proporciona bases para la evaluación de propiedades y efectos potenciales del agua, sobre los organismos de ecosistema.

5.1. Muestreo en efluentes industriales, municipales y agrícolas, extractos acuosos y lixiviados.

Se toman muestras compuestas de dos litros (volumen total), en recipientes de plástico inerte o de vidrio borosilicato, los cuales deben ser llenados completamente y sellados.

El número de muestras instantáneas o simples, necesarias para formar una muestra compuesta depende de las horas en que se opere el proceso generador de la descarga, como se especifica en la tabla 1.

TABLA 1 Muestras instantáneas requeridas para formar una muestra compuesta.

Horas por día en que se opera el proceso generador de la descarga.	Número de muestras	Intervalo para la obtención de muestras simples.	
		Mínimo	Máximo
Hasta 8 h	4	1,0	2,0
Más de 8 h y hasta 12h	4	2,0	3,0
Más de 12 y hasta 18h	6	2,0	4,0
Más de 18h y hasta 24h	6	3,0	3,0

Para determinar el volumen de las muestras instantáneas o simples para la preparación de una muestra compuesta, se debe seguir el ejemplo del apéndice n de la Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI, (ver 3 Referencias).

5.2. Muestreo en cuerpos de agua.

Se debe establecer una red de muestreo que represente las condiciones del cuerpo receptor, las muestras deben ser simples y las muestras compuestas de 2L, colectadas en la misma forma que en el inciso 5.1.

Deben registrarse los parámetros fisicoquímicos básicos (salinidad, pH, oxígeno disuelto y temperatura), anotando las siguientes características aparentes:

- Olor
- Color
- Turbiedad
- Presencia o ausencia de burbujas y espuma.

5.3. Muestreo de lixiviados

el muestreo de lixiviados se debe efectuar en los pozos de monitoreo de los sistemas de captación de los mismos, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-053-ECOL, (ver 3 Referencias). Toda muestra debe colectarse en recipientes de plástico inerte o de vidrio borosilicato; éstos deben ser llenados completamente y sellados. Se deben tomar las medidas precautorias necesarias utilizando el equipo de seguridad adecuado (guantes de Látex, mascarillas, lentes protectores y cualquier otro)

5.4. Muestreo de sedimentos.

El muestreo de sedimentos se lleva a cabo utilizando una draga Ekman o similar, o bien un nucleador, siempre que se realice en cuerpos de agua cuya profundidad sea igual o mayor a 50 cm. Si el muestreo se efectúa a profundidades menores a la anterior, se utiliza una pala pequeña de acero inoxidable o de plástico inerte.

En cualquiera de los dos casos mencionados, la muestra que se considera para el análisis corresponde a la lámina superior de sedimento con un espesor de 3 cm y masa húmeda aproximada de 2 Kg.

Al efectuar el muestreo, se recomienda considerar lo siguiente:

- Cuando se realiza el muestreo en sedimentos limosos, se sugiere introducir lentamente la draga o el nucleador, para evitar remolinos y corrientes que suspendan el sedimento.
- Si el muestreo se realiza en un sedimento rocoso – arenoso, pueden quedar atrapadas rocas pequeñas entre la mandíbulas de la draga, impidiendo el cierre adecuado de ésta, lo cual conduce a pérdidas de sedimento.

La draga o el nucleador deben lanzarse tantas veces como sea necesario hasta obtener la cantidad suficiente de sedimento.

- Cuando se utilice la pala pequeña de acero inoxidable o de plástico inerte, se debe procurar sumergirla en dirección del flujo y, al llegar al fondo, introducirla lentamente inclinando la pala en un ángulo aproximado de 45°.

Posteriormente, arrastrar ésta paralelamente al fondo hasta obtener una cantidad suficiente. En seguida, se debe elevar la pala en forma casi horizontal (paralela al fondo) muy lentamente, para evitar pérdida de sedimento.

Para todos los casos anteriores, la muestra colectada para el análisis se coloca en bolsas de polietileno incoloras, las cuales deben quedar perfectamente cerradas, con objeto de proteger la acción de la luz solar.

Este método se basa en la exposición controlada del crustáceo Artemia franciscana, a cuerpos de agua salobre o marino, sustancias puras o combinadas, cuya salinidad sea mayor a diez, para evaluar su efecto tóxico.

7 REACTIVOS Y MATERIALES.

7.1. Reactivos (grado analítico)

- Acetona (C_3H_6O)
- Acido bórico (H_3BO_3)
- Acido nítrico (HNO_3)
- Agua destilada
- Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$)
- Bromuro de potasio (KBr)
- Cloruro de calcio anhidro ($CaCl_2$)
- Cloruro de estroncio ($SrCl_2 \cdot 6H_2O$)
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Fluoruro de sodio (NaF)
- Lauril sulfato de sodio (Dodecil sulfato de sodio) ($(CH_3)(CH_2)_{10}CH_2OSO_3Na^*$)
- Sulfato de sodio ($NaSO_4 \cdot 10H_2O$)

NOTA 1.-*Reactivo empleado como tóxico de referencia.

7.2. Materiales.

7.2.1. De vidrio.

- Caja de petri de 60 mm de diámetro y 12 mm de alto.
- Embudo de separación de 125 ml.
- Matraces aforados (diferentes capacidades)
- Matraces Erlenmeyer (diferentes capacidades)
- Pipetas Pasteur con bulbo.
- Pipetas volumétricas (diferentes capacidades)
- Vaso de precipitado tipo Griffin de 30ml.

7.2.2. Material biológico.

7.2.2.1. Quistes de artemia franciscana.

Se debe utilizar quistes como un máximo de 10% de humedad y garantizados por el proveedor. La condición de humedad debe mantenerse aún después de abierto el recipiente.

7.2.3. Otros materiales.

- Bolsas de polietileno incoloras
- Cubrebocas.
- Detergente para uso en laboratorio.
- Filtro de membrana de 0,45 μm .
- Guantes de látex
- Lentes protectores
- Mascarillas
- Pala pequeña de acero inoxidable o de plástico inerte.
- Propipetas
- Recipientes de plástico inerte o de vidrio borosilicato
- Soporte universal
- Tamiz de luz de malla de nylon de 100 μm
- Tubo o manguera de plástico.

8 APARATOS Y/O INSTRUMENTOS.

- Balanza analítica
- Bomba de aire
- Centrífuga refrigerada
- Congelador
- Droga tipo Ekman
- Luxómetro
- Microscopio estereoscópico.
- Medidor de pH
- Nucleador
- Oxímetro
- Parrilla magnética
- Salinómetro, refractómetro o Densímetro.
- Sistema de control de temperatura.
- Termómetro.

9 PREPARACION Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Las muestras de agua (simples o instantáneas y compuestas), de lixiviados y de sedimentos, deben ser almacenadas, cuando se requiera, en el mismo recipiente donde fueron colectadas.

Las muestras deben mantenerse a una temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ desde su colecta, y hasta 36 h y hasta 60 días posteriores a la fecha de colecta, se deben congelar a no más de -10°C para evitar cambios debidos a la actividad microbiana, transformación química y/o pérdida de sustancias volátiles. Las pruebas de toxicidad realizadas fuera de estas condiciones, no son válidas.

Las muestras deben ser preservadas sin producto químico alguno.

El tiempo cero, en una muestra compuesta, es el tiempo de la toma de la última colecta simple o instantánea.

10 PROCEDIMIENTO

El área para pruebas de toxicidad debe ser exclusiva, con dimensiones mínimas de 6m² y control de fotoperíodo (16 h Luz/8 h oscuridad).

10.1. Actividades previas en el laboratorio.

Una vez que se conoce la fecha exacta en la que se debe llevar a cabo el bioensayo, se deben realizar las siguientes actividades:

10.1.1. Técnicas de eclosión de quistes de Artemia franciscana y obtención de nauplios.

A un embudo de separación de 125 ml de capacidad, agregar 100ml de agua de mar artificial diluida. Establecer las condiciones que se mencionan en la tabla 2. Posteriormente, adicionar 100mg de quistes.

TABLA 2.- Condiciones para llevar a cabo la eclosión de los quistes.

Parámetro	Condiciones
Temperatura	27°C ± 3°C
Luminosidad	1 000 Luxes *
Salinidad	10 a 12
Oxígeno disuelto	No menor al 80% de saturación
Ph **	8,5 ± 0,5

NOTA 2. * Luxes se abrevia Lx

NOTA 3 ** En caso necesario ajustar con bicarbonato de sodio.

Aplicar aireación continua, mediante el uso de una manguera conectada a una bomba de aire la que, se introduce por la boca del embudo hasta el fondo para que los quistes se mantengan en movimiento y su distribución en el agua sea homogénea (ver figura 3). Procurar que la aireación sea moderada para no dañar los quistes.

Exponer el embudo de separación a una fuente luminosa (luxómetro) colocada a una distancia tal que asegure que la iluminación incidente sea la requerida. Mantener la iluminación por lo menos durante 7h.

Si los quistes se mantienen durante 24h en las condiciones descritas, se obtiene la eficiencia de eclosión máxima. Posteriormente, suspender la aireación para que los nauplios se concentren en el fondo del embudo de separación; colectarlos en un tamiz de malla de nylon de 100 μm de abertura, abriendo la llave del embudo. Transferirlo a cajas de petri de 60 mm de diámetro y 12 mm de alto, donde deben permanecer hasta el inicio de la prueba.

Con la ayuda de una pipeta Pasteur con bulbo, seleccionar los nauplios que presenten mayor movimiento. Para facilitar esta operación colocar una fuente luminosa por un lado de la caja de petri; aquellos nauplios que respondan más rápidamente al estímulo, son los indicados para utilizares en las pruebas de toxicidad.

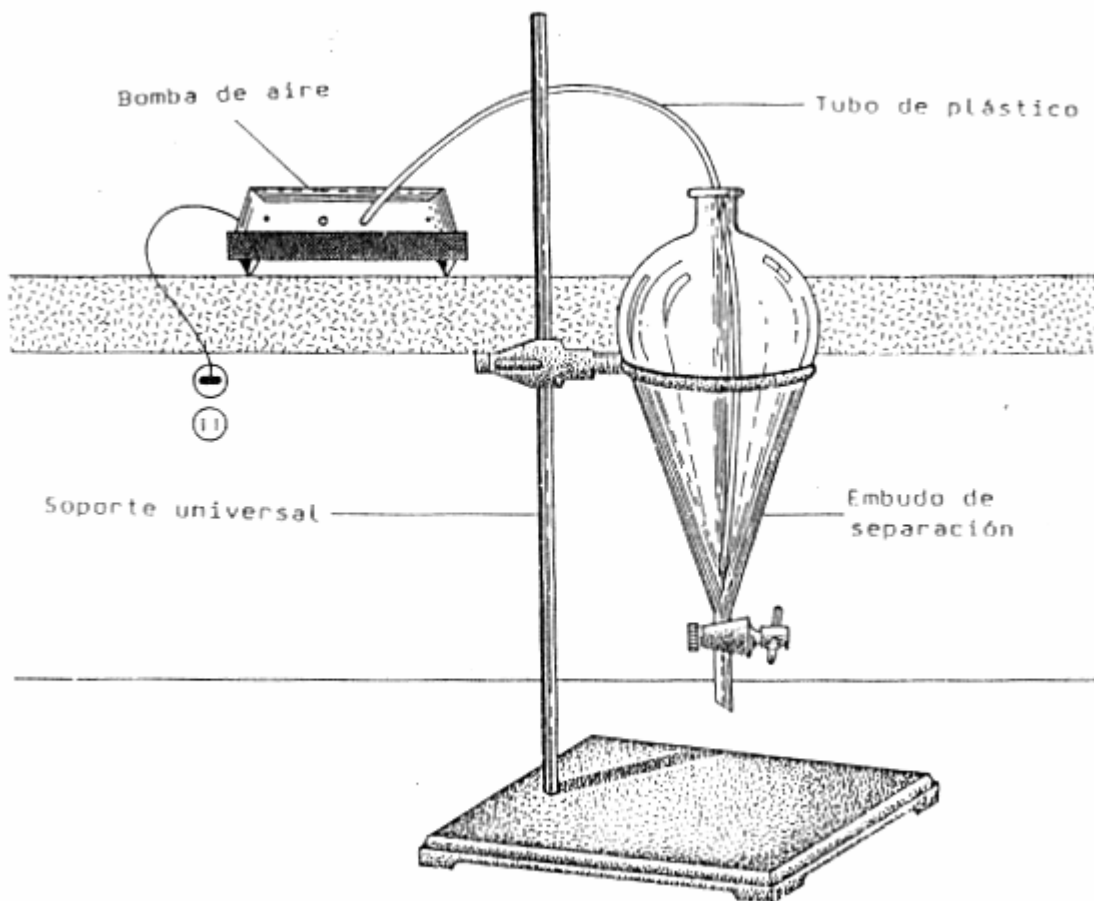


FIGURA 3.-Equipo para eclosionar los quistes de Artemia franciscana.

10.2. Lavado de material.

Todos los recipientes que entren en contacto con las muestras, deben lavarse perfectamente para eliminar residuos potencialmente tóxicos a los organismos de prueba, utilizando el método siguiente:

10.2.1. Lavar el material con detergente para uso en laboratorio y enjuagar dos veces con agua de llave.

10.2.2. Enjuagar el material con ácido nítrico (HNO_3) al 30% para eliminar residuos metálicos. Enjuagar con agua desionizada y escurrir.

10.2.3. Enjuagar con acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) para eliminar residuos orgánicos. Enjuagar con agua desionizada y dejar secar completamente.

Esta serie de lavados tienen que llevarse a cabo de 24h a 48h antes del bioensayo, protegiendo el material del polvo y otros factores.

10.2.4. Minutos antes de iniciar el bioensayo, enjuagar con agua de mar artificial los recipientes que van a contener a los organismos.

10.2.4.1. Preparación de agua de mar artificial

El uso del agua de mar artificial es necesario para la prueba, ya que, tienen una composición química conocida y permite resultados reproducibles, su preparación debe efectuarse al menos con 72h de anticipación, cuidando que se efectúe tal y como se indica en la tabla 3, ya que de ello depende en gran parte la culminación exitosa de la prueba, (ver Capítulo 13 Bibliografía inciso 13.13).

TABLA 3.- Preparación de agua de mar artificial a una salinidad de 35

Solución A		Solución B	
Sales	Cantidad (g)	Sales	Cantidad (g)
NaCl	23,90	$\text{NaSO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	9,06
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10,83	NaHCO_3	0,20
CaCl_2 anhidro	1,15	NaF	0,000 3
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,004	H_3BO_3	0,002 7
KCl	0,682	Agua destilada	100ml
KBr	0,099		
Agua destilada	856 ml		

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

Para comprobar la calidad óptima del agua de mar artificial, se deben colocar 10 nauplios en una muestra de 20ml, durante 24h; si al término del plazo no se registra mortalidad, el agua puede ser utilizada en la prueba.

10.3. Calibración de aparatos.

Antes de cada prueba, se debe efectuar una calibración de aparatos (medidores de pH, oxígeno disuelto y de salinidad).

10.4. Preparación de extractos acuosos de sedimentos provenientes de ambientes salobres y marinos.

Homogeneizar la muestra de sedimento colectada, mezclar con agua marina artificial en una relación 1:4 (masa/volumen) utilizando un matraz Erlenmeyer. Agitar vigorosamente durante 30 min utilizando una parrilla magnética. Centrifugar la mezcla a 10 000 r/min utilizando una centrífuga refrigerada hasta obtener una separación completa de las dos fases. Utilizar el sobrenadante para análisis.

Repetir el procedimiento las veces necesarias hasta obtener el volumen de muestra suficiente para el análisis.

10.5. Período de prueba.

Cuando la muestra llegue al laboratorio, se deben medir y anotar la salinidad, temperatura y el pH. Si el análisis no va a ser efectuado inmediatamente, mantener la muestra como se indica en el inciso 9 de esta norma, hasta que sea procesada. En caso de que la muestra llegue congelada al laboratorio, estos parámetros se determinan al inicio del bioensayo. La muestra debe descongelarse a temperatura ambiente.

Las aguas provenientes de efluentes industriales, municipales y agrícolas, extractos acuosos y lixiviados, deben ser evaluadas a partir de una prueba exploratoria y una definitiva siempre que la salinidad sea igual o mayor que diez; en el análisis de sustancias puras solubles en agua se debe utilizar el mismo criterio. Para cuerpos de agua con salinidades mayores o iguales a diez, se realiza únicamente una prueba definitiva.

10.5.1. Prueba exploratoria en efluentes industriales, municipales y agrícolas, extractos acuosos, lixiviados y sustancias puras.

Esta prueba sirve para determinar si una muestra es tóxica o no, y en su caso, permite definir el intervalo de concentraciones que se deben aplicar en una prueba definitiva. En este bioensayo se prueban cinco concentraciones de la muestra: 100%, 50%, 25%, 12% y 6%, más un testigo, siguiendo los lineamientos de la tabla 4 de esta norma.

TABLA 4.-Condiciones de la prueba exploratoria con Artemia franciscana Kellogg

Tipo de prueba	Estática, sin renovación de la solución de prueba
Duración	24 h
Luminosidad	600 Luxes a 1 000 Luxes*
Fotoperíodo	16 h luz/8 h oscuridad
Volumen de los recipientes de prueba (vasos de precipitados)	30 mL
Volumen total de cada concentración (agua de mar artificial más muestra)	20 mL
Edad de los organismos	24 h
Número de réplicas	2
Número de organismos por réplicas	10
Aireación en los recipientes prueba	No
Agua de dilución	Agua de mar artificial
Temperatura	25°C ± 2°C
Alimentación	No
Volumen total de muestra por prueba	77,5 mL
Volumen total de agua de mar artificial por prueba (incluyendo testigos)	182,5 mL
Respuesta evaluada	Inmovilidad y/o mortalidad
Criterio de aceptación de la prueba	Sobrevivencia mayor o igual de la prueba a 90 % en testigos

NOTA 4.- * Luxes se abrevia Lx.

10.5.2. Prueba definitiva en efluentes industriales, municipales y agrícolas, extractos acuosos lixiviados y sustancias puras.

El tiempo de exposición en la prueba definitiva es mayor que en la exploratorio; por lo tanto, la mortalidad puede incrementarse al final de la prueba y entonces la CI_{50} no necesariamente cae dentro del intervalo seleccionado. Debido a esto, al finalizar la prueba exploratoria se debe observar a los organismos que continúan vivos para determinar, de acuerdo al estado de afectación, el intervalo de concentraciones que va a ser usado en la prueba definitiva.

Para la determinación del intervalo que debe ser usado en la prueba definitiva de estas muestras, se recomienda revisar los ejemplos de apéndice B de la Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI, (ver 3 Referencias). Para la preparación de las diferentes diluciones, se debe contar con medidas de seguridad para evitar entrar en contacto directo con las muestras de agua residuales. Se recomienda utilizar propipetas, guantes de látex desechables y cubrebocas.

10.5.2.1. Condiciones para la prueba definitiva.

En la tabla 5 de esta norma se agrupan las condiciones que deben observarse durante una prueba definitiva en muestras provenientes de efluentes industriales, municipales y agrícolas, extractos acuosos y lixiviados, así como en cuerpos de agua.

10.5.3. Prueba definitiva en cuerpos de agua.

En esta prueba se deben preparar al menos, cinco concentraciones: 100%, 50%, 25%, 12,5% y 6,25%, más el testigo, utilizando para ello pipetas volumétricas y matraces aforados de diferentes capacidades.

NOTA 5.- Es las pruebas definitivas para efluentes y cuerpos de agua, se deben preparar al menos tres réplicas.

TABLA 5.- Condiciones de la prueba definitiva con Artemia franciscana Kellogg

Tipo de prueba	Estático, sin renovación de la solución de prueba.
Duración	48 h
Luminosidad	1 000 luxes *
Fotoperíodo	16 h luz/8 h oscuridad
Volumen de los recipientes de prueba (vasos de precipitados)	30 mL
Volumen total (agua de mar artificial más muestra)	20 mL
Edad de los organismos	24 h
Número de réplicas por concentración	3
Número de organismos por réplica	10
Aireación en los recipientes prueba	No
Agua de dilución	Agua de mar artificial
Temperatura	25°C ± 2°C
Alimentación	No
Respuesta evaluada	Inmovilidad a 24 h y 48 h
Criterio de aceptabilidad de la prueba	Sobrevivencia mayor o igual al 90% en los testigos

NOTA 6.- * Luxes se abrevia Lx.

10.5.4. Evaluación de sensibilidad

El laboratorio que realice pruebas de toxicidad debe validar la sensibilidad de la cepa de Artemia franciscana, realizando para ello, pruebas periódicas (se recomienda cada 2 meses), con el tóxico de referencia que se establece en el inciso 10.5.5.1. de esta norma.

La sensibilidad del Artemia franciscana se evalúa mediante la determinación de la CL₅₀ en un bioensayo de 48h, aplicando concentraciones establecidas de tóxico de referencia. El método y las condiciones de prueba, deben ser los descritos en la presente norma.

10.5.5. Tóxicos de referencia.

Los tóxicos de referencia deben cumplir con las siguientes características:

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

10.5.5.1. El tóxico de referencia que se sugiere emplear en esta prueba es el lauril sulfato de sodio (dodecil sulfato de sodio) $[(CH_3)(CH_2)_{10}CH_2OSO_3Na]$, en las siguientes concentraciones: 2 mg/L, 4mg/L, 8mg/L, 16mg/L y 32mg/L. La CL_{50} de referencia para este tóxico es de $16,6 \text{ mg/L} \pm 3,3 \text{ mg/L}$; el valor obtenido experimentalmente debe quedar dentro de este intervalo de confianza.

En caso contrario, se recomienda no realizar más bioensayos con dicha cepa y sustituirla con una nueva para la prueba, la cual, también debe ser evaluada.

10.5.5.2. El tóxico de referencia descrito en esta norma puede ser sustituido por cualquier otro, siempre y cuando, cumpla con las características señaladas en el inciso 10.5.5. de esta norma, debiendo registrar el valor de CL_{50} y el intervalo de confianza correspondiente.

10.6. Factores de variabilidad.

Algunos de los factores de variabilidad pueden ser:

- Manejo de los nauplios
- Manejo del tóxico de referencia
- Lavado de material
- Pureza de los reactivos
- Pericia y consistencia en las realización de las pruebas por parte de los analistas.

11 EXPRESION DE RESULTADOS.

Para la obtención de la CL_{50} se recomienda utilizar el Método de Unidades Probabilísticas “Probit” (ver Capítulo 13 Bibliografía inciso 13.12), el cual evalúa la relación concentración – respuesta de un contaminante sobre un organismo, medido en términos de su CL_{50} y su precisión o intervalo de confianza de acuerdo a los lineamientos que se establecen en la Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI, (ver 3 Referencias).

11.1. Conteo de nauplios

El conteo de nauplios inmóviles debe efectuarse a las 24h y 48h para el cálculo de CL_{50} . Si se tiene duda sobre la inmovilidad de los organismos, auxiliares de un microscopio estereoscópico.

11.2. Parámetros a evaluar.

Durante la prueba, los parámetros físicoquímicos (pH, temperatura, oxígeno disuelto y salinidad), se determinan al inicio y al término de la misma.

Para fines de esta norma, el oxígeno disuelto y la salinidad se determinan mediante el empleo de un oxímetro y un salinómetro, densímetro o refractómetro respectivamente.

La temperatura y el pH se determinan de acuerdo a la Normas Mexicanas NMX-AA-007 y NMZ-AA-008, (ver 3 Referencias).

12 INFORME DE LA PRUEBA.

El informe de la prueba incluye especificar los siguientes puntos:

12.1. Cuenca hidrológica.

12.2. Nombre del cuerpo de agua receptor.

12.3. Si se trata de pruebas en efluentes, indicar

12.3.1. Responsable legal del efluente o descarga.

12.3.2. Si es efluente industrial:

- Razón social de la empresa; dirección, teléfono, que produce; que materias primas utiliza; horario de operación.

12.3.3. Si es efluente agrícola:

- localización, tipo(s) de cultivo(s) y, en su caso, que fertilizante(s) y/o plaguicida(s) se utiliza(n).

12.3.4. Si es efluente urbano o municipal

- Localización, nombre de la ciudad o municipio.

Para los casos descritos en los incisos 12.3.2, 12.3.3. y 12.3.4, especificar además:

- Caudal promedio ($\text{m}^3/\text{día}$); caudal promedio durante el muestreo (m^3/s); en caso de contar con sistema de tratamiento, breve descripción del mismo, localización de punto(s) de muestreo seleccionado(s); método de colecta usado; fecha período y horario de colecta; tiempo transcurrido entre la última toma de muestra(s) y el inicio del análisis; temperatura de la(s) muestra(s) al recibirse en el laboratorio; datos fisicoquímicos y observaciones en campo; responsable(s) del muestreo.

12.4. Si se trata de pruebas en cuerpos receptores, indicar:

- Localización de punto(s) de muestreo; método de colecta usado; fecha, período y horario de colecta; tiempo transcurrido entre la última toma de muestra(s) al recibirse en el laboratorio; datos fisicoquímicos y observaciones en campo; responsables (s) del muestreo.

12.5 Datos a registrar durante la prueba de toxicidad;

- Condiciones de almacenamiento y preservación de la(s) muestra(s); fecha de inicio y término del análisis; tipo de prueba realizada (exploratoria y/o definitiva); datos fisicoquímicos al inicio del análisis (pH, oxígeno disuelto, salinidad, temperatura del agua) y características aparentes (color, olor, turbiedad, presencia o ausencia de burbujas y espuma); datos fisicoquímicos en las muestras al 100%, diluciones y testigo a las 24h y 48h de exposición (pH, oxígeno disuelto, salinidad, temperatura del agua) concentración(es) y/o definitiva(s) y la mortalidad o inmovilidad de los organismos prueba; responsable(s) de la realización de la(s) prueba(s) de toxicidad.

12.6. Análisis de resultados.

- Tablas y gráfica(s) derivadas de la prueba de toxicidad, así como, anotaciones de las observaciones diarias efectuadas en los organismos en cada concentración, incluyendo los testigos; indicar los valores de toxicidad obtenidos expresados en CL_{50} (con su respectivos límites de confianza al 95%) y en unidades de toxicidad, método estadístico utilizado y discusión de resultados.

12.7. Datos adicionales:

- Tóxico de referencia utilizado en la prueba de sensibilidad, CL_{50} obtenida y fecha de realización; responsable(s) de la realización de la prueba.

12.8. Conclusiones y recomendaciones.

- 12.9. Si se contrata a una empresa consultora, laboratorio, etc., para llevar a cabo los análisis, indicar razón social, representante legal, dirección y teléfono.

13. BIBLIOGRAFIA

- 13.1. ABREU-GROBOIS, F.A. 1987. A review of the genetics of Artemia. (Una revisión de la genética de Artemia) En: Artemia research and its Applications. Vol. 1. Morphology, Genetics, Strain Characterization, Toxicology. P. Sorgeloos; D.A. Bengston; W. Decleir and E. Jaspers (Eds.) Universal Press. Wetteren, Bélgica. Pp. 61-99
- 13.2. APHA, AEEA, WPCF, 1989. Standard Methods For the examination of water and Wastewater. (Métodos estándar para el análisis del agua y de aguas residuales) American Public Health Association, Port City press, Baltimore, Maryland, E.U.A. 10-200p. + láminas.
- 13.3. BLISS, D.E. 1982. The biology of crustacean. (Biología de los Crustáceos). Vol. 1 Lawrence G. (Editor) Academic press, USA. Pp. 67-261.
- 13.4. BURTON Jr. G.A. Sediment Toxicity Assessment. (Evaluación de Toxicidad de sedimentos). Ed. Lewis Publishers INC. EUA. 957.p.
- 13.5. CASTRO, B.T. Gallardo, R.C. 1983. Artemia s.p. Cuadernos No. 31. CBS. UAM . México, d.f. pp. 14-15
- 13.6. CASTRO, M.J., De Lara A.R. 1991. Manual de Técnicas para el manejo de Quistes de Artemia sp. UNAM. México. 47 pp.
- 13.7. CETESB, 1991 a Métodos de Avaliaçáo de Toxicidade de Poluenes a Organismos Aquaticos. (Métodos de evaluación de toxicidad de contaminantes en organismos acuáticos) Sao Paulo, SP. Brasil. S.p.
- 13.8. CETESB, 1991 b. Procedimientos para utilizacáo de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. (Procedimiento para la utilización de pruebas, de toxicidad en el control de efluentes líquidos) Serie Manuais. Sao Paulo, SP. Brasil, 17p.
- 13.9. CETESB, 1991 c. Implementacáo de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. (Implementación de pruebas de toxicidad en el control de efluentes líquidos) Serie Manuais. Sao Paulo, SP. Brasil, 7p.
- 13.10. EPA, 1991 Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Métodos para medir la toxicidad aguda de efluentes y aguas receptoras con organismos marinos y dulceacuicolas) EPA/600-4-90/OZ7.
- 13.11. EPS, 1990.Guidance Document on Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants. (Guía para el control de precisión en la prueba de toxicidad utilizando tóxicos de referencia) Report EPS 1/RM/12 Canadá.

- 13.12. FINNEY, D.J., 1971. Probit analysis. (Análisis probit) 3ª. Ed. Cambridge University Press, Londres. 333 pp.
- 13.13. KINNE, O. 1971. Marine Ecology. (Ecología Marina) volume 1 Environmental Factors Part. 2. Wiley – Interscience. New York.
- 13.14. Ley de Aguas Nacionales. Publicada en el Diario Oficial de la Federación del 1 de diciembre de 1992.
- 13.15. Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. Publicada en el Diario Oficial de la Federación del 28 de enero de 1988.
- 13.16. LITCHFIELD, J.T.Jr. y F. Wilcoxon, 1949. A simplified method of evaluating dose effect experiments. (Método simplificado para evaluar los efectos de las dosis en los experimentos) J. Pharm. Exp. Ther. 96:99-113.
- 13.17. NEEDHAM, J.G., P.S. Galtsoff, F. E. Lutz y P.S. Welch, 1937. Culture Methods for Invertbrate Animals. (Métodos de cultivo en invertebrados) Comstock Publ. Co. Reprinted by Dover Publ., Inc., Nueva York.
- 13.18. PEREZ, Ch. A. 1986. Eficiencia de eclosión de quistes de Artemia salina procedentes de dos salinas de México. Tesis de Licenciatura, UNAM Iztacala. México.
- 13.19. PERSOONE, G. SORGELOOS, P. 1980. The structure of the shell and outer membranes in encysted Artemia salina embryos during cryptobiosis and development. (Estructura del caparazón y membranas externas en el enquistamiento de los embriones de Artemia salina durante la criptobiosis y desarrollo). J. Ultrastruct. Res. 20:244-259.
- 13.20. PIELOU, E.C. 1969. An Introduction to Mathematical Ecology. (introducción a la Ecología Matemática) Wiley Intersciences John Wiley and Sons, Nueva York.
- 13.21. SAMOILOFF, M. 1984. Toxicity Testing of Sediments: Problems Trends, and Solutions. (Pruebas de Toxicidad en Sedimentos: Problemas, Guías y Soluciones). Bioquest International, Inc., Winnipeg, Manitoba, Canadá. Pp. 143-159.
- 13.22. SORGELOOS, P. 1980. Life history of the brine shrimp Artemia (Ciclo de vida del camarón de salmuera de Artemia). p. XXI-XXIII. En : the brine shrimp Artemia. Vol. 1. Morphology, Genetics, Strain Characterization, Toxicology. P. Sorgeloos; D.A. Bengston; W. Decler and E. Jaspers (Eds.) Universa Press. Wetteren, Bélgica.
- 13.23. STEPHAN, C.E. 1977. Methods for calculation an Lc_{50} . (Métodos para el cálculo de la CL_{50}) In: Mayer y J.L. Hamelink, (Eds.), Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation, ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania: 65-84.

- 13.24. VANHAECKE,P., PERSOONE, G., CLAUS, C. AND P. SORGELOOS. 1980. Researcha on the development of a short term standard toxicity test with Artemia nauplii. (Investigación sobre el desarrollo de una prueba de toxicidad estándar de corta duración con nauplios de Artemia). Pp. 263-285. En: G. Persoone; p. Sorgeloos; o. Roels y E. Jaspers. (Eds.) The Brine Shrimp. Artemia. Vol. 1. Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. Universa Press. Wetteren, Bélgica. 318 p.
- 13.25. VAZQUEZ, G. L. 1987. Zoología del phylum Arthropoda. Bravo, A. (Editor) Editorial Interamericana. México, D.F. 174 pp.

14 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES.

Esta norma no concuerda con ninguna norma internacional por no existir referencia alguna al momento e su elaboración.

APENDICE INFORMATIVO.

La elaboración de la presente Norma Mexicana se efectuó, tomando como base investigación realizada a nivel nacional y la información consultada de normas extranjeras.

MÉXICO, D.F. A 6 marzo.1996
LA DIRECTORA GENERAL DE NORMAS.



LIC. MA. EUGENIA BRACHO GONZALEZ.