



# MARES REGIONALES

PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE      DICIEMBRE 1988

*Ensayo de la  
toxicidad aguda letal  
de los contaminantes sobre  
peces e invertebrados marinos*

*Métodos de Referencia para Estudios de  
Contaminación Marina No. 43.*

Preparado en cooperación con:



FAO



OIEA

---

PNUMA 1988

Nota : Este documento ha sido preparado en cooperación entre la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) bajo el proyecto FP/5102-88-03.

El texto no ha sido traducido o revisado por el Servicio de Conferencias y del Consejo de Administración del PNUMA.

Para propósitos bibliográficos este documento puede citarse como :

PNUMA/FAO/OIEA : Ensayo de la toxicidad aguda letal de los contaminantes sobre peces e invertebrados marinos. Métodos de Referencia para Estudios de Contaminación Marina N° 43, PNUMA 1986.



*Ensayo de la  
toxicidad aguda letal  
de los contaminantes sobre  
peces e invertebrados marinos*

*Métodos de Referencia para Estudios de  
Contaminación Marina No. 43.*

Preparado en cooperación con:

FAO

OIEA

---

PNUMA 1988

## PREFACIO

El programa de Mares Regionales fue iniciado por el PNUMA en 1974. Desde entonces el Consejo de Gobierno del PNUMA ha apoyado reiteradamente un tratamiento regional al control de la contaminación marina y la administración de los recursos marinos y costeros y ha fomentado el desarrollo de planes de acción regionales. El Programa de Mares Regionales incluye al momento presente diez regiones y participan en él alrededor de 120 Estados costeros. (1), (2).

Uno de los componentes básicos de los planes de acción patrocinados por el PNUMA en el ámbito del Programa de Mares Regionales es la evaluación del estado en que se encuentra el ambiente marino y de sus recursos, de las fuentes y la dispersión de la contaminación, y del impacto de ésta sobre la salud humana, los ecosistemas marinos y los sitios recreativos. Para poder apoyar a quienes están participando en esta actividad y asegurar que los datos obtenidos a través de la evaluación puedan ser comparados a nivel mundial y contribuir así al Sistema Global de Monitoreo Ambiental (GEMS) del PNUMA, se están desarrollando un conjunto de métodos de referencia y lineamientos para los estudios de contaminación marina, los cuales se recomienda sean adoptados por los Gobiernos participantes en el Programa de Mares Regionales.

Los métodos y lineamientos son preparados en cooperación con los organismos especializados del sistema de las Naciones Unidas así como con otras organizaciones y son probados por un número de expertos competentes en el campo que corresponde a los métodos descritos.

En la descripción de los métodos y lineamientos se sigue tan estrictamente como sea posible el estilo usado por la Organización Internacional para la Estandarización (ISO).

Los métodos y lineamientos publicados en las series de Métodos de Referencia para Estudios de Contaminación Marina del PNUMA, no se consideran versiones finales. Está planeada su revisión periódica tomando en cuenta el desarrollo de nuestra comprensión de los problemas, de la instrumentación analítica y de las necesidades actuales de los usuarios. Para facilitar estas revisiones se invita a los usuarios a enviar sus comentarios y sugerencias a:

Laboratorio del Medio Ambiente Marino  
Laboratorio Internacional de Radiactividad Marina  
Organismo Internacional de Energía Atómica

2. av. Prince Héritaire Albert

MC 98000 MONACO

el cual es responsable de la coordinación técnica para el desarrollo, prueba e intercalibración de los Métodos de Referencia.

- (1) UNEP: Achievements and planned development of UNEP's Regional Seas Programme and comparable programmes sponsored by other bodies. UNEP Regional Seas Report and Studies. Nº 1 UNEP, 1982.
- (2) P.HULM: A Strategy for the Seas. The Regional Seas Programme Past and Future UNEP, 1983.

Esta edición de los Métodos de Referencia para Estudios de Contaminación Marina Nº 43 fue preparada en cooperación con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA). Incluye los comentarios enviados por científicos que revisaron el método y las modificaciones propuestas que se señalan en el anexo IV del reporte de la reunión de consulta de FAO/PNUMA sobre la toxicidad de sustancias seleccionadas en organismos marinos, que fue realizada en Villefranche-sur-mer, Francia, del 10 al 24 de octubre de 1988, dentro del marco del programa MED POL - Fase II. Expresamos nuestro reconocimiento por la ayuda de todos aquellos que contribuyeron a la preparación de este método de referencia.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
1. Alcance y campo de aplicación	1
2. Referencias	1
3. Principios	1
4. Reactivos	2
5. Equipo	4
6. Animales utilizados en el ensayo	5
7. Condiciones experimentales	6
8. Procedimiento experimental	7
9. Análisis de los datos	9
10. Informe del ensayo	20

## 1. ALCANCE Y CAMPO DE APLICACION

Este método de referencia describe la determinación de la toxicidad aguda letal de los contaminantes sobre organismos marinos (peces e invertebrados) por el método estacionario (sin flujo continuo). Se incluyen además los procedimientos para la determinación de la curva de toxicidad (relación entre el tiempo de supervivencia y la concentración del compuesto contaminante) y la estimación de la concentración media letal (LC50). Este método es apropiado para su uso con peces y macroinvertebrados, pero no lo es para organismos marinos fitoplanctónicos y zooplanctónicos ni para la determinación de la toxicidad del petróleo y sus compuestos derivados, ni tampoco para los agentes dispersantes del mismo. Los métodos adecuados para estos casos se describen en los Métodos de Referencia N° 44 y 45, respectivamente.

## 2. REFERENCIAS

- FAO (1977) Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Part 4. Bases for selecting biological tests to evaluate marine pollution. FAO Fish. Tech. Pap. (N° 164) 31pp.
- REISH, D.J. and OSHIDA, P.S. (1986)  
Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Part 10. Short-term static bioassays. FAO Fish. Tech. Pap. (N° 247) 62pp., Rome, FAO.
- WARD, G.S. and PARRISH, P.R. (1982)  
Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Part 6. Toxicity tests. FAO Fish. Tech. Pap. (N° 185) 23pp., Rome, FAO.

## 3. PRINCIPIOS

Los animales utilizados en el ensayo, en grupos de diez especímenes, son expuestos separadamente a varias concentraciones del compuesto contaminante y observados durante varios días a intervalos regulares; es importante señalar que las disoluciones empleadas deberán renovarse con frecuencia durante el ensayo. Al mismo tiempo es necesario mantener un registro de la supervivencia de cada uno de los animales expuestos a cada una de las concentraciones del compuesto contaminante. La media del tiempo de supervivencia de cada grupo de animales se determina gráficamente utilizando una transformación log-probit de los datos obtenidos. Para obtener la curva de toxicidad se representa gráficamente la media de los tiempos de supervivencia, con sus límites de confianza, en función de la concentración del compuesto ensayado. Los datos experimentales se podrán utilizar para estimar la concentración media letal (LC50) del compuesto de ensayo, para animales sometidos a diferentes períodos de exposición.

NOTA : En algunos países los experimentos con animales vivos están sujetos a ciertas restricciones legales. Los investigadores deberán cerciorarse de que cuentan con las licencias o permisos necesarios antes de empezar con los experimentos.

#### 4. REACTIVOS

##### 4.1 Agua de mar

El agua necesaria para los ensayos podrá ser agua de mar natural, agua de mar artificial preparada a partir de sales de agua de mar (producto comercial) o agua de mar sintética preparada por disolución de los compuestos químicos apropiados en agua destilada.

NOTA : Es ampliamente recomendado utilizar agua de mar natural siempre que sea posible. Las sales comerciales de agua de mar (p.ej. "Instant Ocean") son aceptables como segunda opción. El agua de mar sintética (ver sección 4.1.3) podría ser usada solo si no hay otra alternativa. Los investigadores deberán tomar en cuenta que esta agua de mar sintética puede estar contaminada con metales traza, aun cuando se utilicen reactivos de grado analítico.

4.1.1 Agua de mar natural : Es imperativo que sea obtenida de áreas no contaminadas y no haya estado en contacto con tuberías o equipos metálicos. Dependiendo de su origen es muy probable que el agua de mar natural requiera ser decantada y/o filtrada antes de su utilización.

4.1.2 Agua de mar artificial preparada a partir de sales de agua de mar (del tipo que se usa para acuarios) : El agua de mar artificial deberá prepararse de acuerdo con las recomendaciones del productor de la mezcla de sales de agua de mar (es posible que sea necesario ajustar la salinidad en base a los requerimientos del ensayo). Es importante preparar una cantidad suficiente para cubrir las necesidades de los experimentos. Antes de la utilización del agua de mar artificial será necesario someterla a una intensa aireación, por lo menos 48 horas, para asegurar el equilibrio de los gases disueltos con la atmósfera y estabilizar el valor del pH entre 8.1 y 8.2. Si después de la aireación aparecen precipitados, éstos deberán ser eliminados por decantación o filtración. Como en 4.1.1, evitar el contacto con tuberías e implementos metálicos.

4.1.3 El agua de mar sintética podrá prepararse de acuerdo con la siguiente formulación :

Compuesto químico	Cantidad (g)
NaCl	23,926
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,008
KCl	0,677
NaHCO <sub>3</sub>	0,196
KBr	0,098
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,026
NaF	0,003
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10,83
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,52
SrCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02
Agua destilada	completar a 1000 g

Disolver los compuestos químicos en agua destilada y en el orden indicado y completar a 1000 g. Tener en cuenta que esta formulación produce agua de mar sintética con una salinidad de S = 35<sup>0</sup>/oo. Si es necesario preparar agua de mar sintética de otra salinidad, ajustar la cantidad de agua destilada de acuerdo con la misma. Los compuestos químicos utilizados en la preparación de este tipo de agua de mar deberán ser de grado analítico.

Es importante preparar una cantidad suficiente de agua de mar sintética de manera tal de cubrir las necesidades de los experimentos ; como se describe en 4.1.2 el agua deberá someterse a una intensa aireación. Si durante la misma se producen precipitados, éstos deberán ser eliminados por decantación o filtración. Evitar todo contacto entre el agua de mar sintética e implementos metálicos.

NOTA : El agua de mar preparada por el método anterior es muy costosa.

NOTA : Muchas especies de organismos no prosperan en agua de mar sintética recientemente preparada. Lo ideal es mantener el agua por un lapso prolongado en un acuario con sistema de recirculación, antes de utilizarla con propósitos experimentales.

#### 4.2 Compuesto contaminante de ensayo

Los compuestos de ensayo que serán utilizados en los experimentos deberán obtenerse en su forma más pura, de preferencia como reactivos de grado analítico.

4.2.1 Si el compuesto de ensayo se disuelve fácilmente en agua, la disolución "stock" deberá prepararse en agua destilada, desionizada. Si la disolución es estable, se puede preparar una sola disolución al empezar el experimento ; si por el contrario el compuesto no es estable en disolución (p.ej. sujeto a oxidación u otras transformaciones químicas) es conveniente preparar la disolución "stock" inmediatamente antes de su uso.

4.2.2 Si el compuesto de ensayo es una sustancia orgánica que no se disuelve fácilmente en agua (p.ej. ciertos plaguicidas), la disolución acuosa del compuesto tóxico puede hacerse empezando con su disolución en un pequeño volumen de un disolvente apropiado. Debido a su bajo nivel de toxicidad con organismos marinos se recomiendan acetona, etanol o propilen-glicol.

En estos casos proceder como a continuación se detalla. Pesar la cantidad necesaria del compuesto de ensayo y disolverlo en una cantidad conocida del disolvente seleccionado, agregar esta disolución lentamente sobre agua destilada utilizando un agitador magnético para favorecer su mezcla. Verificar si hay algún signo de precipitación y descartar toda disolución que produce precipitados. Si por el contrario no hay precipitación durante la mezcla, completar la disolución con el volumen de agua adecuado.

NOTA : Cuando se utiliza un disolvente orgánico para la preparación de la disolución "stock" acuosa, será necesario tener dos controles para el ensayo. El primero no deberá contener ni el compuesto de ensayo ni el disolvente orgánico, el segundo en cambio deberá contener la cantidad de disolvente equivalente a la concentración más alta del compuesto de ensayo.

4.2.3 La concentración de la disolución "stock" variará de acuerdo con las condiciones de los ensayos. En general una concentración de 1000 mg l<sup>-1</sup> (moléculas activas o iones) parece adecuada para los compuestos de ensayo solubles en agua, y una concentración de 1 a 10 mg l<sup>-1</sup> lo es para plaguicidas.

NOTA : Cuando el rango de concentraciones a ser ensayadas incluye valores relativamente altos del compuesto de ensayo, el agregado de la disolución "stock" puede aumentar el volumen del líquido en los recipientes de ensayo y como consecuencia disminuir de manera significativa la salinidad de las disoluciones de ensayo ; en estos casos será necesario preparar disoluciones "stock" más concentradas.

#### 4.3 Reactivos analíticos

Es de gran importancia (ver secciones 7.6 y 7.7) que la concentración del compuesto de ensayo en el líquido de los recipientes de ensayo sea determinada periódicamente durante el curso del experimento. Si este es el caso será necesario contar con los reactivos analíticos adecuados.

### 5. EQUIPO

#### 5.1 Recipientes para los ensayos

Los recipientes usados en los ensayos deberán ser de tamaño adecuado (ver sección 7.1) y preferiblemente de vidrio, los cuales han sido cuidadosamente lavados con ácidos y enjuagados con agua de mar antes de su utilización. Si no se cuenta con recipientes de vidrio se pueden emplear recipientes de polietileno, PVC o fibra de vidrio. Sin embargo, debe prestarse especial atención cuando estos recipientes son nuevos ya que pueden liberar sustancias tóxicas en el agua de ensayo. Por lo tanto éstos deberán remojar con agua de mar por varias semanas antes de su primera utilización. Otro problema que presenta el uso de recipientes de plástico es que las paredes pueden absorber el compuesto de ensayo durante el experimento y de esta manera disminuir su concentración. La forma de los recipientes no es de importancia siempre que permitan una profundidad de agua suficiente con relación al tamaño de los animales y que tengan el volumen necesario para acomodar el agua requerida y dejar un espacio libre en la parte superior para impedir que los animales puedan saltar por encima de los mismos.

#### 5.2 Equipo de aireación

Cada recipiente de ensayo debe estar aireado moderadamente con una simple "air stone" conectada a una fuente de aire libre de contaminantes.

5.3 Un cuarto o recinto cerrado con temperatura constante

5.4 Papel para gráficos logaritmo-probabilidad.

5.5 Papel para gráficos log-log (recomendable pero no esencial)

5.6 Tabla o generador de números aleatorios.

5.7 Un medidor de pH.

5.8 Un salinómetro.

5.9 Si se requiere, un instrumento para la determinación de la concentración del compuesto de ensayo en las disoluciones de ensayo.

## 6. ANIMALES UTILIZADOS EN EL ENSAYO

6.1 Dependiendo del propósito del experimento se podrá usar cualquier especie de pez o macroinvertebrado disponible que pueda ser mantenido en el laboratorio por el período requerido. Los animales deberán obtenerse de áreas no contaminadas, o de acuicultivos, y si es posible ser de tallas similares. Más aun, en aquellos casos en que se pueda determinar la edad y el sexo, los organismos escogidos deberán ser del mismo sexo y edad.

NOTA : Instrucciones detalladas sobre el cuidado y el mantenimiento de los organismos más comúnmente utilizados en los ensayos se presentan en las referencias de la sección 2.

### 6.2 Aclimatación a las condiciones de laboratorio

6.2.1 Después de su captura los animales deben transferirse lo más pronto posible a los tanques "stock" del laboratorio y mantenerse bajo observación por un período mínimo de 14 días.

6.2.2 Durante este período los animales pueden ser gradualmente aclimatados a la temperatura del ensayo, siempre que los cambios de temperatura no excedan 1° C por día.

NOTA : Algunas especies son particularmente sensibles a los cambios de temperatura y por lo tanto requieren un período de aclimatación más prolongado.

6.2.3 La mayoría de los animales podrán ser mantenidos en forma satisfactoria bajo condiciones de iluminación continua de baja intensidad. Por consiguiente será conveniente evitar alteraciones en las condiciones de iluminación p.ej. rápidos cambios de intensidad. Si es posible es preferible emplear un régimen de fotoperíodo, p.ej. 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad (el fotoperíodo deberá corresponder al del ambiente natural de donde provienen los animales). Durante el período que corresponde a oscuridad, será más útil mantener un bajo nivel de iluminación en lugar de oscuridad total ; de esta manera se facilitarán las observaciones.

NOTA : Algunas especies son sensibles a los niveles de iluminación y a la variación de los mismos. A veces el fracaso en el mantenimiento de organismos bajo condiciones de laboratorio se debe a que el régimen de iluminación no es el adecuado.

6.2.4 Durante el período de aclimatación de los organismos, éstos deben ser observados cuidadosamente y ser alimentados con una dieta adecuada.

6.2.5 Si al final del período de observación más del 20 % de los organismos han muerto, muestran signos de enfermedad o parecen moribundos, todos los organismos colectados deberán descartarse y ser reemplazados con un nuevo grupo.

### 6.3 Selección de los animales para los experimentos

Si se juzga que los animales colectados son aceptables para el ensayo, descartar todos aquellos que están moribundos, que no se alimentan normalmente o que muestran signos de enfermedad o cualquier otra anomalía.

#### 6.4 Supresión de la alimentación

Los animales seleccionados para el ensayo no deberán ser alimentados por un período de 48 horas antes de la iniciación del ensayo.

#### 6.5 Determinación del peso y talla de los animales

A una muestra representativa (mínimo 30) de los animales seleccionados para el ensayo se les determina el peso y la talla, presentando los resultados como los valores medios  $\pm$  la desviación estándar, indicando el número (n) de animales medidos.

### 7. CONDICIONES EXPERIMENTALES

#### 7.1 Volumen de la disolución de ensayo

Cada recipiente utilizado en los experimentos deberá contener como mínimo 1 litro de disolución de ensayo por gramo de tejido animal. Es preferible que el volumen de la disolución de ensayo corresponda a 2 o 3 litros por gramo de tejido animal. Deberán evitarse volúmenes menores de 1 litro por gramo de tejido.

#### 7.2 Temperatura

La temperatura elegida para el ensayo depende del propósito del experimento entre otros factores. En todo caso ésta no deberá variar más de  $\pm 1^{\circ}$  C durante el ensayo ; sin embargo variaciones de hasta  $\pm 2^{\circ}$  C son aceptables a temperaturas de  $15^{\circ}$  C y aun mayores.

#### 7.3 Salinidad

La salinidad de las disoluciones de ensayo deberán ser ajustadas a las condiciones locales simuladas en el ensayo y/o a los propósitos del experimento. Normalmente la fluctuación de la salinidad en el ensayo no deberá variar más de  $\pm 1$  ‰ de los niveles seleccionados.

#### 7.4 pH

El agua de mar es normalmente un buen sistema tampón y su pH no deberá variar durante el ensayo. El pH de las disoluciones de ensayo debe estar entre 8.1 y 8.2 con variaciones no mayores de  $\pm 0,05$  durante el ensayo.

#### 7.5 Duración del ensayo

Los experimentos deberán durar como mínimo 96 horas, experimentos de menor duración carecen de valor.

NOTA : Los experimentos deberán extenderse tanto como sea posible, hasta que haya cesado la mortalidad de los organismos o hasta establecer el umbral letal de toxicidad (p.ej. hasta que la curva de toxicidad se hace asintótica a la ordenada del tiempo).

#### 7.6 Renovación de las disoluciones de ensayo

La renovación de las disoluciones de ensayo deberá llevarse a cabo por lo menos una vez cada 24 horas. Para los compuestos de ensayo de conocida inestabilidad química o biológica se recomienda hacer la renovación de las disoluciones dos veces cada 24 horas. La no renovación de las disoluciones invalida el experimento.

La mejor forma de hacer la renovación de las disoluciones es tener preparado un duplicado del número de recipientes usados en el ensayo a los cuales se pueden transferir los animales. De esta manera los recipientes originales podrán ser vaciados, lavados y llenados nuevamente. El compuesto de ensayo deberá ser agregado inmediatamente antes de la transferencia de los animales a los nuevos recipientes.

Si no se cuenta con duplicados de los recipientes de ensayo, se sifonea lentamente la disolución a renovar y se reemplaza con la disolución recién preparada. Durante este proceso tratar de perturbar lo menos posible a los animales y evitar cambios bruscos de temperatura.

#### 7.7 Determinación de la concentración del compuesto de ensayo

La concentración del compuesto de ensayo deberá determinarse en el líquido de cada uno de los recipientes de ensayo mediante la utilización de un método analítico adecuado. Hacer determinaciones de la concentración del compuesto de ensayo en el líquido de cada recipiente al empezar el experimento e inmediatamente antes y después de la renovación de las disoluciones de ensayo.

### 8. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

#### 8.1 Inicio del experimento

8.1.1 Colocar los recipientes de ensayo en un cuarto o recinto con temperatura constante. Llenar cada recipiente con la cantidad requerida de agua de mar (ver sección 7.1) y numerar cada recipiente.

8.1.2 Instalar el sistema de aireación de manera tal que cada recipiente reciba una aireación constante y moderada.

8.1.3 Verificar que la salinidad, el pH y la temperatura se encuentren dentro de los límites establecidos. (ver secciones 7.2, 7.3, 7.4).

8.1.4 Aleatoriamente asignar los animales a cada uno de los recipientes de ensayo hasta que cada uno de ellos contenga el número requerido de animales (generalmente 10). Esto se puede hacer como se describe a continuación :

Supongamos que hay 8 recipientes preparados para el ensayo numerados del 1 al 8. Usando una tabla o un generador de números aleatorios, seleccionar un número entre 1 y 8 inclusive y colocar un animal del tanque "stock" en el recipiente que corresponde al número seleccionado. Repetir esta operación hasta que cada recipiente contenga 10 animales. Cuando un recipiente contiene ya los 10 animales, obviamente no se agregan más animales aun si el número del citado recipiente es seleccionado.

8.1.5 Asignar la concentración del compuesto de ensayo que tendrá cada recipiente y rotularlos.

8.1.6 Agregar la cantidad requerida de la disolución "stock" del compuesto de ensayo a cada uno de los recipientes de manera tal de obtener la concentración final deseada.

NOTA : La disolución "stock" del compuesto de ensayo deberá ser agregada lentamente y mezclando cuidadosamente de manera tal de evitar todo contacto directo entre el compuesto de ensayo y los animales. Empezar esta operación con la concentración más baja del compuesto de ensayo.

8.1.7 Anotar la fecha y hora de inicio del ensayo.

8.1.8 Verificar nuevamente la salinidad y el pH del agua de mar en cada uno de los recipientes para asegurarse que el agregado de la disolución del compuesto de ensayo no ha alterado los valores iniciales.

8.1.9 Tomar muestras de agua de cada recipiente (incluyendo el control) para el análisis de la concentración del compuesto de ensayo.

## 8.2 Seguimiento del experimento

NOTA IMPORTANTE : Todas las operaciones de la sección 8.2 deberán repetirse todos los días mientras dure el ensayo, inclusive los fines de semana y los días feriados. El no hacerlo invalida el experimento.

8.2.1 Por lo menos una vez por día verificar que la temperatura, la salinidad y el pH del agua de cada recipiente se encuentran dentro de los límites establecidos.

8.2.2 Si se requiere, tomar muestras de agua de cada recipiente para el análisis de la concentración del compuesto de ensayo antes y después de cada renovación de las disoluciones de ensayo.

8.2.3 Si se requiere, alimentar a los animales con una ración mínima de alimento una hora antes de la renovación de las disoluciones de ensayo.

8.2.4 Renovar las disoluciones de ensayo por lo menos una vez por día como se describe en la sección 7.6.

NOTA : En algunos casos (ver secciones 7.6 y 7.7) las disoluciones de ensayo se deberán renovar con más frecuencia.

8.2.5 Asegurarse que los animales muertos y todo exceso de alimentos, materia fecal y otros detritos son eliminados de los recipientes.

8.2.6 Verificar que el suministro de aire en cada recipiente es el adecuado y funciona correctamente.

## 8.3 Observaciones y registro de los datos

8.3.1 Registrar todos los valores medidos de temperatura, salinidad y pH para cada recipiente en cada ocasión que se hace su medición.

8.3.2 Registrar todas las ocasiones en las cuales se ofrece alimento a los animales.

8.3.3 Registrar los valores de la concentración del compuesto de ensayo en cada recipiente cada vez que se hace su análisis.

8.3.4 Las observaciones de la mortalidad de los animales deberán realizarse por lo menos a los siguientes intervalos (en horas) : 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 8,  $14 \pm 2$ ,  $24, 33 \pm 3$ , 48. Después de las 48 horas las observaciones se podrán hacer por lo menos cada 24 horas y cuando sea posible con más frecuencia.

NOTA : Para los propósitos de este ensayo, la muerte de un animal se define como la cesación permanente de todo movimiento espontáneo y la falta de respuesta a un suave estímulo mecánico, p.ej. tocar al animal con una varilla de vidrio. Se requiere tener un cuidado particular con ciertas especies, p.ej. algunos moluscos, en los cuales la muerte es difícil de determinar. En todos los casos el criterio para definir la muerte de los organismos deberá ser claramente establecido.

NOTA : En algunos casos es posible que los animales muertos sirvan de alimento a los que sobreviven. Por lo tanto para determinar la mortalidad será necesario contar los organismos vivos y sustraerlos del número inicial.

8.3.5 Registrar la formación de precipitados cuando ésta se produce en los recipientes de ensayo.

NOTA : Muchas sustancias solubles en agua tienden a precipitar en agua de mar a las concentraciones utilizadas en los experimentos de toxicidad. La formación de precipitados no necesariamente invalida el ensayo, pero deben registrarse pues pueden tener un valor significativo en la interpretación de los resultados del ensayo.

8.3.6 Si en cualquier momento la mortalidad de los animales en el recipiente de control excede el 10 %, el experimento deberá darse por terminado.

## 9. ANALISIS DE LOS DATOS

### 9.1 Tabulación de los datos de mortalidad

Construir una tabla con los datos del porcentaje aditivo de mortalidad para cada ensayo a los distintos tiempos de observación, como en el ejemplo de la Tabla 1.

## 9.2 Cálculo de la media del tiempo de supervivencia (LT50)

NOTA : El valor de LT50 solo puede ser calculado si más de la mitad de los animales expuestos a una determinada concentración del compuesto de ensayo han muerto. Si la mitad o menos de la mitad de los animales, en un determinado recipiente, han muerto, los datos del citado ensayo deberán ser descartados.

9.2.1 Para cada recipiente de ensayo, en el cual más de la mitad de los animales han muerto, trazar un gráfico del porcentaje aditivo de mortalidad (escala de probabilidad) en función del tiempo transcurrido (escala logarítmica) como se muestra en la Fig. 1, usando papel para gráficos logaritmo-probabilidad.

El ejemplo de la figura 1 incluye algunos rasgos que comúnmente causan confusión entre los investigadores con poca experiencia. Notar en el citado ejemplo que del número de animales expuestos a  $20 \text{ mg l}^{-1}$  del compuesto de ensayo, el 10 % (uno de una muestra de 10) ha muerto después de 4 horas y el 30 % (tres de una muestra de 10) después de 8 horas (ver Tabla 1). Estos son los datos que se llevan al gráfico, sin embargo, si el número de animales que mueren entre dos observaciones excede el 20 % de la muestra el ensayo deberá invalidarse y repetirse con observaciones más frecuentes.

Notar en la Tabla 1 que después de 36 horas el 60 % de los animales expuestos a  $20 \text{ mg l}^{-1}$  del compuesto de ensayo han muerto y que a las 48 horas no se registra mortalidad adicional. En estos casos se lleva al gráfico el dato de 60 % de mortalidad (corregido a 55 % como se describe más adelante) para 36 horas, omitiendo el dato correspondiente a la observación de las 48 horas. Lo ideal es contar con puntos para cada animal de la muestra.

Finalmente, advertir que en el ajuste de la línea deberá prestarse especial atención a los puntos comprendidos entre 20 % y 80 % de mortalidad. Los puntos que representan valores de mortalidad <20 % y >80 % frecuentemente se desvían de la línea.

Los valores para LT16, LT50 y LT84 (ver 9.2.3) se muestran en la Fig. 1.

NOTA : Una muestra del papel para gráficos logaritmo-probabilidad se incluye en este manual.

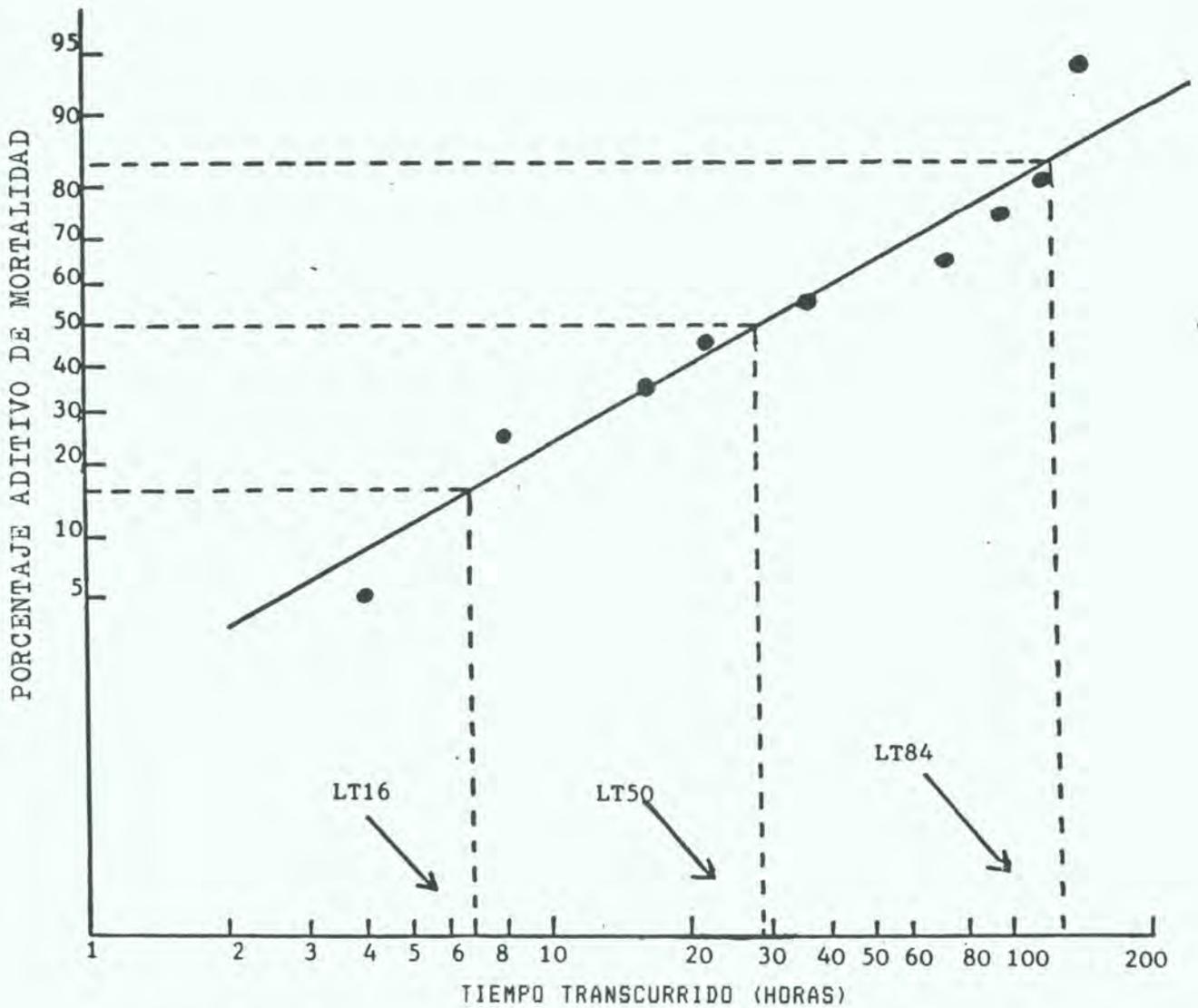
Cuando se marcan los puntos de los datos obtenidos sobre la escala de probabilidad en el gráfico, los valores correspondientes a cero y 100 % de mortalidad deberán omitirse. En este proceso emplear uno de los siguientes métodos :

(a) Marcar en el gráfico los puntos correspondiente a los valores de los porcentajes aditivos de mortalidad observados durante el ensayo omitiendo el valor de 100 %.

Tabla 1: Un ejemplo de los datos de un ensayo de toxicidad. En la tabla se muestran los porcentajes aditivos de mortalidad para cada una de las concentraciones del compuesto de ensayo durante el desarrollo del experimento.

Intervalo de tiempo desde el inicio del ensayo (horas)	Concentración del compuesto de ensayo mg l <sup>-1</sup>						
	1	2	5	10	20	50	Control
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	10	0
4	0	0	0	0	10	20	0
8	0	0	0	0	30	40	0
16	0	0	0	10	40	60	0
24	0	0	10	20	50	70	0
36	0	0	20	30	60	80	0
48	0	10	30	40	60	90	0
72	0	20	40	50	70	100	0
96	10	30	50	60	80	100	0
120	20	40	60	80	90	100	0
144	40	60	80	100	100	100	0
168	50	70	100	100	100	100	0

FIGURA 1 : Representación gráfica hipotética del porcentaje aditivo de mortalidad (escala de probabilidad) en función del tiempo transcurrido (escala logarítmica). En este ejemplo se utilizan los datos de la Tabla 1 para la concentración de  $20 \text{ mg l}^{-1}$  del compuesto de ensayo y de acuerdo con el método descrito en el párrafo 9.2.1 (b).



(b) Reducir de cada porcentaje aditivo de mortalidad la mitad del valor que corresponde a cada animal y marcar en el gráfico el valor corregido. De esta manera si hay 10 animales en cada recipiente de ensayo, cada animal representa el 10 % de la muestra. El valor corregido se obtiene sustrayendo el 5 % de cada valor observado. De esta forma se registran en el gráfico los valores de 5 %, 15 %, 25 % en lugar de 10 %, 20 % y 30 %. El valor de 100 % de esta manera se reduce a 95 %.

NOTA : Aunque la diferencia entre los dos métodos es en la práctica pequeña, el método (b) es estadísticamente correcto y provee una estimación más exacta del valor verdadero de la media. Si se incrementa el tamaño de la muestra la magnitud de la corrección decrece. Por ejemplo, si el tamaño de la muestra es de 20 animales la corrección es solo del 2.5 % en lugar del 5 %. Este método permite además registrar en el gráfico todos los puntos producto del ensayo.

9.2.2 Ajustar, a ojo, la línea entre los puntos marcados en el gráfico poniendo particular atención en aquellos de la sección media del gráfico.

NOTA : Los puntos que representan valores muy bajos (<20 %) o muy altos (>80 %) de mortalidad frecuentemente muestran las mayores desviaciones de la línea ajustada.

9.2.3 Determinar a partir de la línea ajustada los valores correspondientes para LT16, LT50 y LT84 (ver Fig.1).

NOTA : En los casos donde no todos los animales han muerto durante el ensayo la línea del gráfico puede extrapolarse para obtener el valor de LT84.

9.2.4 Calcular el valor de S, pendiente de la función, de acuerdo con la siguiente expresión :

$$S = \frac{\frac{LT50 + LT84}{LT16} - \frac{LT50}{LT50}}{2}$$

9.2.5 Cuando no todos los animales de un ensayo han muerto omitir este paso y proceder como se indica en 9.2.8.

Si todos los animales en el recipiente de ensayo han muerto, calcular f :

$$f = S \cdot 1,96 / \sqrt{N}$$

Una fórmula equivalente es,

$$f = \text{antilog} \left( \frac{1,96 \cdot \log S}{\sqrt{N}} \right)$$

NOTA : Estas fórmulas son matemáticamente equivalentes.

9.2.6 Calcular el 95 % de los límites de confianza superior e inferior.

Límite de confianza superior =  $LT50 \times f$

Límite de confianza inferior =  $LT50 / f$

9.2.7 Repetir este proceso para cada uno de los ensayos donde han muerto más de la mitad de los animales.

9.2.8 Cuando no todos los animales han muerto es necesario calcular el valor de "N"; el valor de "N" se encuentra entre el número de animales usados en el ensayo (N) y el número de animales que han muerto durante el ensayo. El valor de "N" se determina usando el nomograma de la Fig. 2.

Trazar una línea recta entre el número N de animales empleados en el ensayo y el porcentaje (x) de animales que han muerto en el mismo. Determinar el valor de "N" donde la recta intercepta la escala "N".

Calcular f usando la fórmula de la sección 9.2.5 sustituyendo N por "N" y proceder como se indica en 9.2.6 y 9.2.7.

NOTA : No tiene importancia que "N" no sea un número entero

### 9.3 Trazado de la curva de toxicidad

9.3.1 Tabular los valores de LT50 con sus límites de confianza.

9.3.2 Representar gráficamente los valores de LT50 con sus límites de confianza en función de la concentración del compuesto de ensayo, en un papel para gráficos log-log como se muestra en la Fig. 3.

NOTA : Esto se puede hacer fácilmente empleando papel para gráficos log-log. Si no se cuenta con este tipo de papel se puede usar papel para gráficos con escalas aritméticas, determinando previamente los logaritmos de los datos obtenidos. Notar que la transformación a logaritmos de ambas series de datos no altera la forma de la curva de toxicidad. Si el rango de concentraciones del compuesto de ensayo ensayado no es amplio, es a veces posible trazar la curva de toxicidad en papel para gráficos con escalas aritméticas.

9.3.3 Ajustar, a ojo, la línea sobre los puntos marcados en el gráfico (Fig. 3).

En este ejemplo la concentración crítica (umbral) letal del compuesto de ensayo es evidente, p.ej. la curva se hace asintótica a la ordenada del tiempo. Sin embargo, esto no ocurre en todos los casos, particularmente cuando el ensayo es de corta duración. Es conveniente también indicar que si bien las curvas de toxicidad tienen la forma que se muestra en la Fig. 3 en muchos casos los datos pueden ajustarse a una línea recta, especialmente cuando el rango de concentraciones del compuesto de ensayo no es amplio.

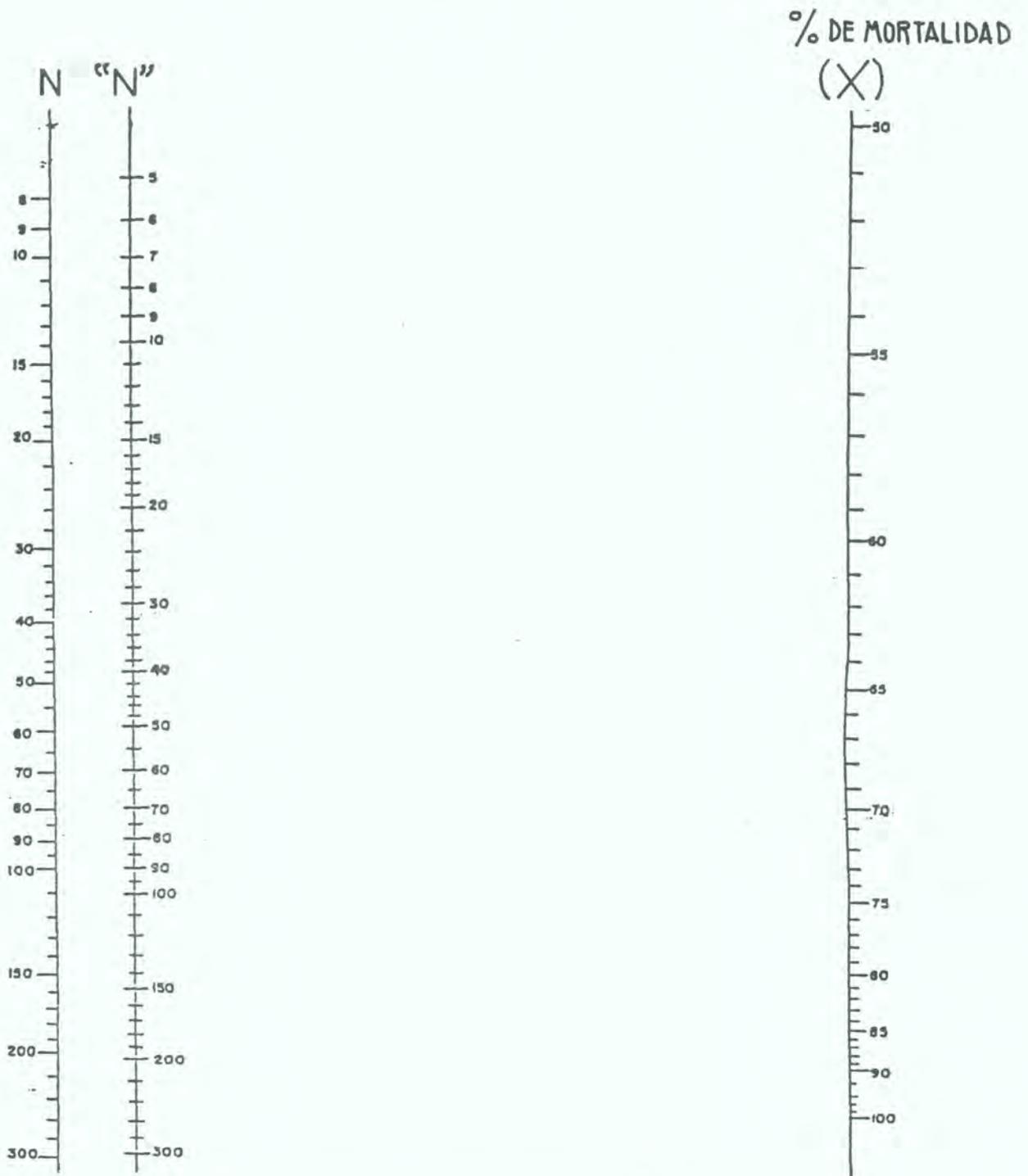


FIGURA 2 : Nomograma para la determinación de "N" cuando no todos los animales expuestos a la concentración del compuesto de ensayo han muerto antes de la terminación del experimento. El uso de este nomograma se describe en 9.2.8.

#### 9.4 Estimación de los valores para LC50 (concentración media letal)

NOTA : Los valores de la concentración media letal (LC50) no tienen significado alguno a menos que se indique el tiempo de exposición (p.ej. LC50 para 96 horas).

9.4.1 Seleccionar el tiempo de exposición para el cual se desea obtener el valor de LC50. En el presente ejemplo se supone que el tiempo escogido es 96 horas.

9.4.2 Obtener los datos necesarios de la tabla de resultados (ver Tabla 1). En este caso será preciso conocer los porcentajes de mortalidad después de las 96 horas en cada uno de los recipientes de ensayo.

9.4.3 Empleando papel para gráficos logaritmo-probabilidad representar gráficamente el porcentaje de mortalidad (escala de probabilidad) en función de la concentración del compuesto de ensayo (escala logarítmica) como se muestra en la Fig. 4. Omitir los datos correspondientes a cero y 100 % de mortalidad.

NOTA : Los valores de LC50 no podrán ser calculados por este método a menos que se incluya en el mismo por lo menos un punto que exceda el 50 % de mortalidad y otro por debajo de este valor.

9.4.4 Ajustar, a ojo, la línea sobre los puntos marcados en el gráfico y determinar la bondad de ajuste de la misma de acuerdo con el procedimiento descrito en 9.5.

NOTA : En muchos casos solo se llevan al gráfico un reducido número de puntos. Si son menos de cuatro el valor para LC50 no podrá ser calculado con exactitud y el investigador deberá considerar la repetición del ensayo utilizando concentraciones del compuesto de ensayo más cercanas. Teniendo en cuenta que en general el número de puntos llevados al gráfico no es el más adecuado es imperativo que la bondad de ajuste de la curva (línea) se determine por el procedimiento descrito en 9.5. Si la línea no presenta un buen ajuste será necesario probar otras hasta obtener una con buen ajuste.

9.4.5 Si la línea presenta un buen ajuste, determinar los valores para LC16, LC50 y LC84 del gráfico (Fig. 4). Calcular el valor de S, pendiente de la función, de acuerdo con la siguiente fórmula :

$$S = \frac{\frac{LC84 + LC50}{LC50} - \frac{LC50}{LC16}}{2}$$

9.4.6 Determinar el valor de N, que se define como el número de animales ensayados a las concentraciones del compuesto de ensayo cuyos efectos previstos se encuentran entre el 16 % y el 84 % de mortalidad.

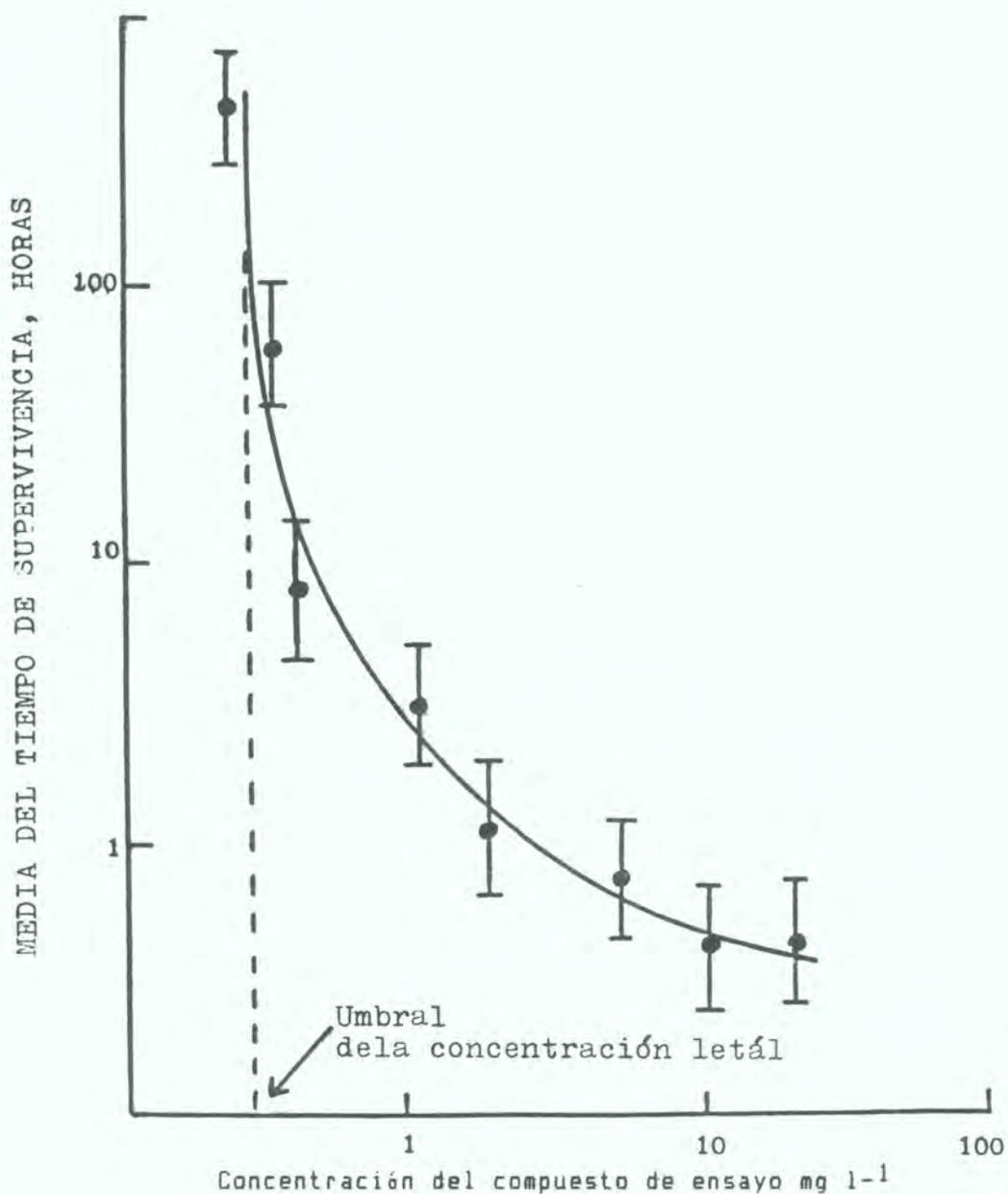


FIGURA 3 : Ejemplo de una curva de toxicidad. Representación gráfica de la media del tiempo de supervivencia, con el 95 % de sus límites de confianza, en función de la concentración del compuesto de ensayo. Notar que el gráfico ha sido trazado sobre coordenadas con escalas logarítmicas.

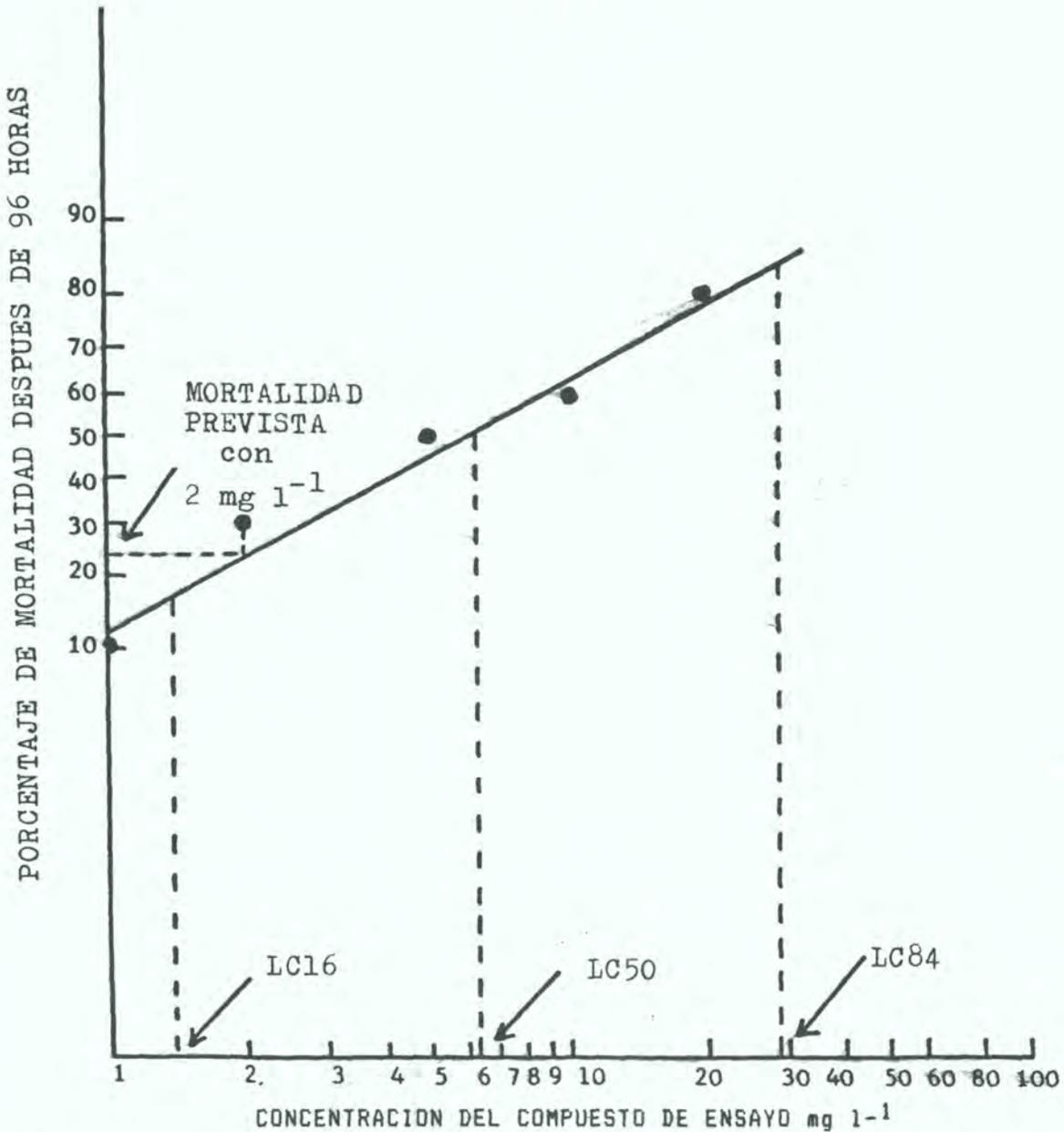


FIGURA 4 : Estimación de los valores de LC50 para 96 horas como se describe en 9.4 y 9.5. En este ejemplo los datos de la Tabla 1 han sido llevados al gráfico por el método indicado. Note que los valores para cero y 100 % de mortalidad no han sido incluidos. Los valores para LC16, LC50 y LC84 se obtienen de la línea como lo muestra el diagrama. Para probar la bondad de ajuste de la línea (ver 9.5) es necesario conocer los valores de la mortalidad observada y los de la mortalidad prevista para cada una de las concentraciones del compuesto de ensayo consideradas en el gráfico. La mortalidad observada son los puntos que se marcan en el gráfico mientras que la mortalidad prevista se determina de la línea del gráfico como se indica en el mismo.

NOTA : En la Fig. 4 hay cinco puntos marcados en el gráfico. De ellos la mortalidad prevista para la concentración de 1 mg l<sup>-1</sup> del compuesto de ensayo es menor del 16 %. Por lo tanto las mortalidades previstas para las otras cuatro concentraciones del compuesto de ensayo se encuentran entre el 16 % y el 84 %. Como se utilizaron 10 animales en cada ensayo a cada una de las concentraciones ensayadas, N = 10 x 4 = 40.

9.4.7 Calcular f, donde

$$f = \text{antilog} \left( \frac{2,77 \log S}{\sqrt{N}} \right) = S^{2,77/\sqrt{N}}$$

9.4.8 Calcular el 95 % de los límites de confianza superior e inferior para LC50. El valor de LC50 se obtiene de la curva (ver Fig. 4) considerando que ésta tiene buen ajuste (ver 9.5).

$$\begin{aligned} \text{Límite de confianza superior} &= \text{LC50} \times f \\ \text{Límite de confianza inferior} &= \text{LC50} / f \end{aligned}$$

#### 9.5 Prueba de la bondad de ajuste de la línea de probabilidad

NOTA : En algunos casos la línea de probabilidad no puede obtenerse con buen ajuste. Si después de haber seguido el procedimiento descrito anteriormente no se obtiene una línea con un buen ajuste, el valor de LC50 no podrá determinarse por éste método. En tales casos es conveniente utilizar otros métodos de análisis o considerar la modificación del proceso experimental.

9.5.1 Tabular los valores de mortalidad observados y previstos para cada punto de la representación gráfica (ver Tabla 2).

9.5.2 Usando el nomograma de la Fig. 5 determinar la contribución a Ji<sup>2</sup> de cada uno de los puntos marcados en el gráfico (ver Tabla 2).

9.5.3 Determinar la suma total de las contribuciones a Ji<sup>2</sup> y multiplicar éste valor por el número de animales ensayados a cada una de las concentraciones del compuesto de ensayo, p.ej. si se utilizaron 10 animales para cada concentración ensayada multiplicar el valor total de Ji<sup>2</sup> por 10 (ver Tabla 2).

NOTA : Aunque el número de animales usados a cada concentración es en general el mismo, a veces este no es el caso. Por lo tanto en tales circunstancias será necesario calcular la siguiente relación :

$$\frac{\text{Número total de animales ensayados}}{\text{Número total de concentraciones ensayadas}}$$

y multiplicar el valor de Ji<sup>2</sup> por el resultado obtenido. En estos cálculos no deben incluirse los animales del ensayo de control.

9.5.4 Determinar el número de grados de libertad : éste valor se obtiene de  $N-2$ , siendo  $N$  el número de concentraciones ensayadas. No se deben incluir en este cálculo los controles, o aquellas concentraciones a las cuales no ocurrió mortalidad.

9.5.5 Utilizando la Tabla 3 determinar el valor de  $Ji^2$  para el número apropiado de grados de libertad.

9.5.6 Si el valor de  $Ji^2$  de la línea es igual o mayor que el valor apropiado de la Tabla 3, la línea no tiene buen ajuste. Si por el contrario el valor es menor, la línea presenta un buen ajuste. No obstante esto deberá repetirse todo el procedimiento y probar otras líneas trazadas sobre el mismo gráfico hasta obtener la línea que tiene el valor mínimo de  $Ji^2$ .

NOTA : En algunos casos no se podrá lograr una línea con buen ajuste, por lo tanto no será posible calcular el valor de LC50 por este método.

## 10. INFORME DEL ENSAYO

### 10.1 Condiciones físicas

Informar sobre los siguientes datos :

10.1.1 Tamaño y material de los recipientes usados en el ensayo.

10.1.2 Sitio y condiciones de iluminación donde se llevó a cabo el experimento.

10.1.3 Origen, temperatura, salinidad y pH del agua de mar usada para hacer las disoluciones. Informar sobre los valores medios, rango, desviación estándar y el número de determinaciones realizadas.

10.1.4 Frecuencia de la renovación de las disoluciones durante el ensayo.

10.1.5 Si se realizan determinaciones de la concentración del compuesto de ensayo en los distintos recipientes, informar sobre valores medios, rango, desviación estándar y número de determinaciones realizadas para cada recipiente utilizado en el ensayo.

### 10.2 Organismos utilizados en el ensayo.

Informar los siguientes datos :

10.2.1 Origen de los organismos seleccionados.

10.2.2 Nombre científico completo.

10.2.3 Talla y peso (media, desviación estándar y número de especímenes medidos), si es posible edad y sexo de los organismos.

10.2.4 Procedimiento de aclimatación.

Tabla 2 : Datos requeridos para determinar la bondad de ajuste de la línea de la Fig.4.

Contaminante mg l-1	Nº de animales ensayados	Mortalidad observada %	Mortalidad prevista %	Contribución a Ji <sup>2</sup>
1	10	10	12	0,004
2	10	30	24	0,02
5	10	50	45	0,01
10	10	60	64	0,007
20	10	80	79	0,001
50	10	100	-	-

Valor total de Ji<sup>2</sup> = 0,042

Como el número de animales ensayados a cada concentración del compuesto de ensayo es igual a 10 el valor de Ji<sup>2</sup> es 0,042 x 10 = 0,42. El número de concentraciones ensayadas (ver Tabla 1) es igual a 6 excluyendo el control, por lo tanto el número de grados de libertad es (6-2) = 4 (ver 9.5.4). Usando la Tabla 3 se puede constatar que el valor crítico para Ji<sup>2</sup> con cuatro grados de libertad es 9,49. Dado que 0,42 < 9,49, se considera que la línea de la Fig. 4 tiene un buen ajuste.

EFFECTO PREVISTO

DIFERENCIA ENTRE EL %  
DEL EFECTO OBSERVADO Y EL %  
DEL EFECTO PREVISTO

$J_i^2$

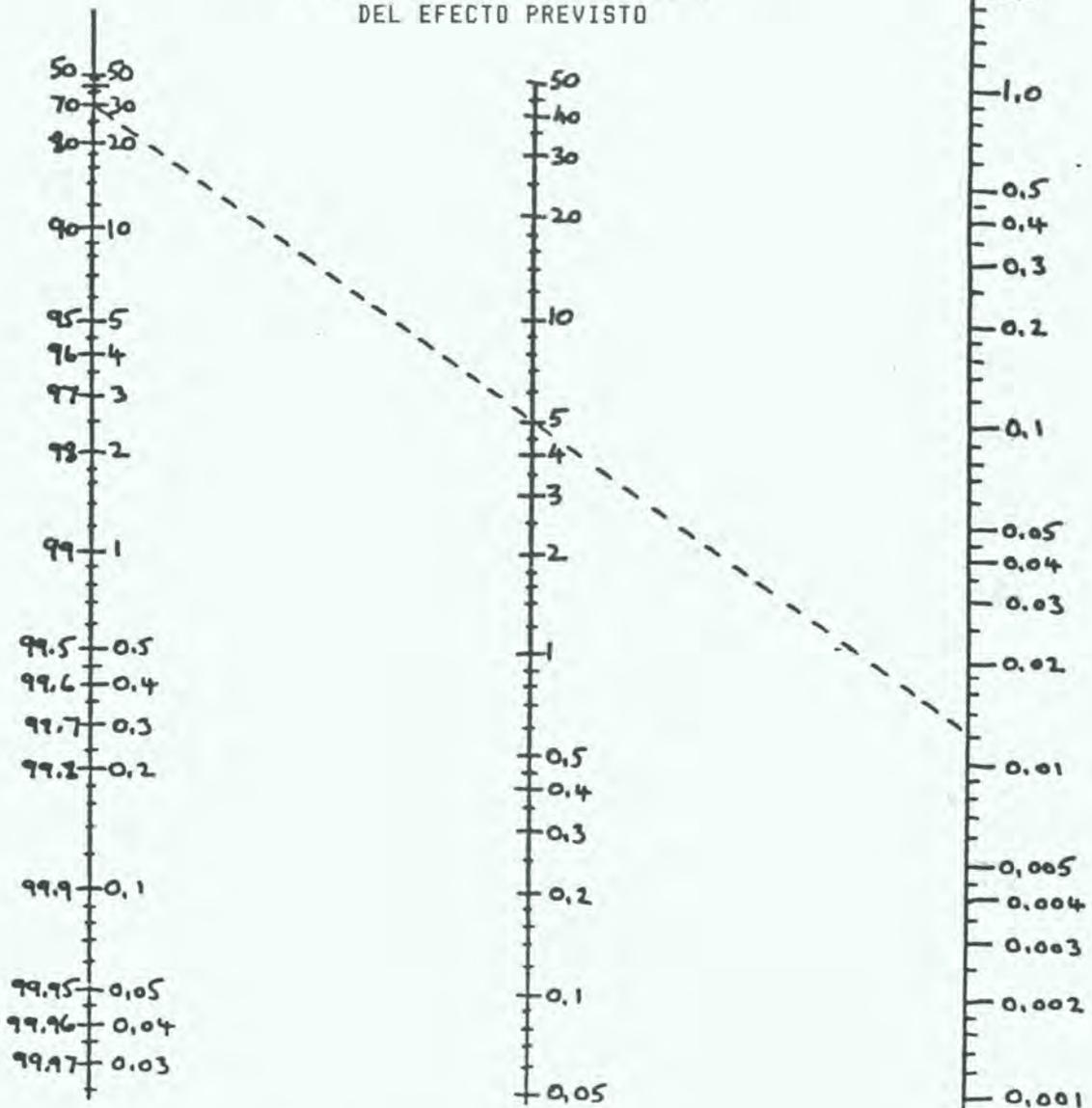


FIGURA 5 : nomograma para la determinación de  $J_i^2$  (ver 9.5.2). Para el uso de este nomograma trazar una línea recta (o utilizar una regla) que conecta el % del efecto previsto (sobre el eje de la izquierda) y el valor de la diferencia entre los porcentajes observados y previstos (eje central). Continuar con el trazado de la línea hasta intersectar el eje de  $J_i^2$  a la derecha del diagrama. El valor de  $J_i^2$  se determina en la intersección.

En el ejemplo del diagrama la mortalidad prevista es del 30 % y la mortalidad observada es 25 %, por consiguiente el valor de  $J_i^2$  es 0.012. Recordar que el valor de  $J_i^2$  deberá multiplicarse por el número de animales ensayados a cada concentración (ver 9.5.3) y que deberá ser sumado a los otros valores de  $J_i^2$  calculados de manera similar para los otros puntos de la representación gráfica.

Tabla 3: Valores de  $J_i^2$  para  $p = 0.05$ . Si los valores calculados para  $J_i^2$  por el método descrito en la sección 9.5, son menores que los indicados en esta tabla, para el número apropiado de grados de libertad, el ajuste de la línea es bueno y por lo tanto el valor de LC50 y el 95 % de sus límites de confianza puede calcularse como se indica en la sección 9.4.

Grados de libertad	$J_i^2$
1	3,84
2	5,99
3	7,82
4	9,49
5	11,1
6	12,6
7	14,1
8	15,5
9	16,9
10	18,3

10.2.5 Régimen de alimentación empleado antes y durante el experimento.

### 10.3 Resultados

Informar sobre los siguientes datos :

10.3.1 Media de los tiempos de supervivencia, límites de confianza y función de la pendiente para cada grupo de animales (ver 9.2).

10.3.2 Curvas de toxicidad (ver 9.3).

10.3.3 Valores de LC50, función de las pendientes y 95 % de los límites de confianza (ver 9.4).

10.3.4 Cualquier otra información pertinente.

NOTA : En la mayoría de los experimentos, se determina el tiempo medio de supervivencia o la concentración letal media. De todas maneras ambos valores se pueden estimar de los mismos datos experimentales y es aceptable utilizar ambos métodos de análisis.

Editado por:

Programa del Centro de Actividad para los Océanos y las Areas Costeras  
Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente

Copias adicionales de esta publicación  
se pueden obtener de:

Programa del Centro de Actividad para los Océanos y las Areas Costeras  
Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente  
P.O. Box 30552  
NAIROBI  
Kenya

o de:

Laboratorio Internacional de Radiactividad Marina  
Organismo Internacional de Energía Atómica  
2, Av. Prince Hérodote Albert  
Monaco Ville  
98000 MONACO