



# MARES REGIONALES

PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE      DICIEMBRE 1988

*Estimación de la  
toxicidad de contaminantes  
sobre organismos del fitoplancton  
y del zooplancton marino*

*Métodos de Referencia para Estudios de  
Contaminación Marina No. 44.*

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: Estimación de la toxicidad de contaminantes sobre organismos del fitoplancton y del zooplancton marino. N<sup>o</sup>. 44, PNUMA 1986.



*Estimación de la  
toxicidad de contaminantes  
sobre organismos del fitoplancton  
y del zooplancton marino*

*Métodos de Referencia para Estudios de  
Contaminación Marina No. 44.*

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 44 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, 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	1
5. Equipo	2
6. Mantenimiento de los cultivos "stock" de fitoplancton	3
7. Procedimiento del ensayo para fitoplancton	6
8. Análisis de los datos del ensayo para fitoplancton	9
9. Mantenimiento de los cultivos de zooplancton	12
10. Procedimiento del ensayo para zooplancton	13
11. Análisis de los datos del ensayo para zooplancton	15

## 1. ALCANCE Y CAMPO DE APLICACION

Este método de referencia describe las técnicas utilizadas para determinar la toxicidad de compuestos contaminantes sobre el fitoplancton y el zooplancton marino. Se dan los procedimientos para estimar la media de la concentración efectiva del contaminante (EC50) y el "minimum algistatic concentration" (MAC-5) para el fitoplancton. Para el zooplancton se describe el procedimiento para estimar la media de la concentración letal del contaminante.

## 2. REFERENCIAS

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. (Nº. 247) 62 pp.

UNEP/FAO/IAEA (1986)

Estimation of the acute lethal toxicity of pollutants to marine fish and invertebrates : Determination of the survival time-concentration relationship (toxicity curve) and the estimation of median lethal concentrations. Reference Methods for Marine Pollution Studies Nº. 43, UNEP.

WARD, G.S. & PARRISH, P.R. (1982)

Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Part 6. Toxicity Test. FAD Fish. Tech. Pap. (Nº. 185) 23 pp., Rome, FAO.

## 3. PRINCIPIOS

Los organismos se exponen a las diferentes concentraciones del contaminante, dentro del rango seleccionado para el ensayo. Para el fitoplancton se estima la media de la concentración efectiva del contaminante (EC50) en términos del número, la biomasa o la concentración de clorofila-a de las células que sobreviven el ensayo. Para el zooplancton se estima la media de la concentración letal (LC50) a partir de los datos de mortalidad por análisis log-probit.

## 4. REACTIVOS

### 4.1 Para los ensayos con fitoplancton :

Agua de mar filtrada

Agua destilada

KNO<sub>3</sub>

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Sal de sodio de EDTA

Vitamina  $\text{B}_{12}$  (cristales)

Biotina

Clorhidrato de tiamina

Disolución "stock" del compuesto de ensayo contaminante

4.2 Para los ensayos con zooplancton :

Agua de mar filtrada

Disolución "stock" del compuesto de ensayo contaminante

NOTA : El mantenimiento de cultivos de zooplancton en el laboratorio requiere de cultivos de fitoplancton como fuente de alimento.

5. EQUIPO

5.1 Para los ensayos con fitoplancton :

Autoclave

Matraces Erlenmeyer (de varios tamaños)

Microscopio

Cuarto o recinto cerrado de temperatura constante

Sistema de luces fluorescentes

Cámara hematocitométrica

Contador automático de partículas (opcional)

Agitador orbital

Fluorímetro (opcional)

Homogeneizador de tejidos (opcional)

Papel para gráficos logaritmo-probabilidad

Salinómetro o sensor de salinidad de exactitud adecuada



5.2 Para los ensayos con zooplancton :

Recipientes para cultivo de 10-50 litros de capacidad

Microscopio

Cuarto o recinto cerrado de temperatura constante

Pipetas Pasteur

Recipientes de vidrio para los ensayos (de varios tamaños)

Papel para gráficos logaritmo-probabilidad

NOTA : El mantenimiento de zooplancton en el laboratorio requiere frecuentemente de cultivos de fitoplancton como fuente de alimento.

NOTA : Una muestra del papel para gráficos logaritmo-probabilidad se incluye en este manual, la cual podrá ser fotocopiada en caso que existan dificultades para su obtención.

6. MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS "STOCK" DE FITOPLANCTON

6.1 Los laboratorios dedicados a los ensayos de toxicidad para fitoplancton deberán establecer y mantener cultivos "stock" de las especies necesarias. Es generalmente más seguro y conveniente obtener los cultivos de laboratorios bien establecidos en lugar de tratar de preparar cultivos puros de colectas de campo.

6.2 Disoluciones necesarias

6.2.1 Disolución A - agua de mar : Utilizar agua de mar natural de fuentes no contaminadas, filtrar a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  (de preferencia) o de 0,45  $\mu\text{m}$  para eliminar algas, bacterias y materiales particulados. Si es necesario se puede también utilizar agua de mar artificial, preparada 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 1000g

Ajustar la salinidad entre 30 y 32<sup>o</sup>/oo por dilución con agua bidestilada.

6.2.2 Disolución B - disolución "stock" de nitrato : Disolver 5 g de  $\text{KNO}_3$  en 1 litro de agua destilada. Esta disolución se podrá mantener en un refrigerador por un período no mayor de cuatro meses.

6.2.3 Disolución C - disolución "stock" de fosfato : Disolver 0,68 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 1 litro de agua destilada. Esta disolución se podrá mantener en un refrigerador por un período no mayor de cuatro meses.

NOTA : Puede ser conveniente preparar también una disolución "stock" de silicato para utilizarla en la preparación del medio de cultivo.

6.2.4 Disolución D - Mezcla de elementos traza :

(a) Disolver 30 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 25 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 20 mg de  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 1 litro de agua destilada.

(b) Disolver 5g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 2 g de  $\text{MnSO}_4$  en 1 litro de agua destilada.

(c) Disolver 25 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 1 litro de agua destilada.

(d) Disolver 50 mg de la sal de sodio de EDTA en 1 litro de agua destilada

NOTA : Estas disoluciones deberán prepararse separadamente.

6.2.5 Disolución E - Vitamina B 12 : Disolver 10 mg de cristales de Vitamina B 12 en 100 ml de agua destilada. Mantener en un congelador hasta su uso.

6.2.6 Disolución F - Biotina : Disolver 10 mg de Biotina en 100 ml de agua destilada. Mantener en un congelador hasta su uso.

6.2.7 Disolución G - Clorhidrato de tiamina : Disolver 100 mg de Clorhidrato de tiamina en 100 ml de agua destilada. Mantener en un congelador hasta su utilización.

### 6.3 Preparación de las disoluciones "stock"

La preparación de las disoluciones "stock" para el medio se lleva a cabo de la siguiente manera.

6.3.1 Obtener una cantidad adecuada de agua de mar (Disolución A)

6.3.2 Tomar 1 ml de la disolución B y diluirlo con 999 ml de agua destilada.

6.3.3 Tomar 1 ml de la disolución C y diluirlo con 999 ml de agua destilada.

6.3.4 Tomar 100 ml de la disolución de EDTA (sección 6.2.4) y 10 ml de cada una de las disoluciones descritas en 6.2.4 y diluirlos con 800 ml de agua destilada.

6.3.5 Descongelar la disolución E, tomar 1 ml y diluirlo con 99 ml de agua destilada. Congelar nuevamente la disolución E.

6.3.6 Descongelar la disolución F, tomar 1 ml y diluirlo con 99 ml de agua destilada. Congelar nuevamente la disolución F.

6.3.7 Descongelar la disolución G, tomar 1 ml y diluirlo con 99 ml de agua destilada. Congelar nuevamente la disolución G.

NOTA : Estas disoluciones "stock" deberán prepararse inmediatamente antes de su utilización ya que no se conservan bien. Cuando se ha preparado la cantidad apropiada de medio de cultivo será necesario descartar el resto de las disoluciones "stock". Sin embargo, y en el caso particular de la disolución "stock" de metales traza, ésta podrá mantenerse en un refrigerador por un período no mayor de cuatro meses.

#### 6.4 Preparación del medio de cultivo

NOTA : Las disoluciones que se indican en esta sección son aquellas descritas en 6.3 a partir de las originales descritas en 6.2.

6.4.1 Por cada litro de agua de mar agregar :

10 ml de disolución de nitrato (B)

1 ml de la disolución mezcla de metales traza (D)

1 ml de la disolución de Biotina (F), y

1 ml de la disolución de Clorhidrato de tiamina (G)

6.4.2 Esterilizar esta mezcla en un autoclave.

6.4.3 Agregar 1 ml de la disolución de Vitamina B 12 (E) a la mezcla esterilizada (6.4.2).

NOTA : El medio de cultivo no deberá ser esterilizado después de la adición de vitaminas. Las vitaminas deberán ser añadidas asépticamente una vez que el medio ha sido esterilizado.

6.4.4 Esterilizar separadamente la cantidad necesaria de la disolución de fosfato (C).

6.4.5 Agregar 10 ml de la disolución de fosfato por cada litro del medio de cultivo esterilizado.

6.4.6 Si se producen precipitados será necesario filtrar el medio de cultivo a través de filtros estériles de 0,45  $\mu\text{m}$  antes de su utilización.

6.4.7 De esta manera el medio de cultivo está listo para ser utilizado. Para evitar contaminación es necesario que todo el material de vidrio haya sido esterilizado y que el medio de cultivo sea transferido en forma aséptica.

6.5 Distribuir el medio de cultivo en matraces Erlenmeyer de 500 ml e inocular asépticamente entre 5 y 15 ml del cultivo de fitoplancton. Cubrir la boca de los matraces con tapones de algodón e incubar a 20° C bajo luz fluorescente (p.ej. "Grow Lux") con una intensidad de aproximadamente 2000 lux, colocando los matraces sobre un agitador orbital regulado a 100 rpm.

NOTA : Se recomienda una intensidad de 2000 lux como condición inicial, pero puede aumentarse según se requiera de acuerdo a las especies usadas y las condiciones físicas del cuarto.

6.6 Para mantener un suministro de células saludables, una vez por semana deberá transferirse, bajo condiciones asépticas, una alícuota del cultivo "stock" a un medio de cultivo recientemente preparado. Cada cultivo deberá ser inspeccionado bajo el microscopio para asegurarse que no ha sido contaminado con otras especies. Los cultivos contaminados deberán descartarse.

## 7. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO PARA FITOPLANCTON

7.1 En cada caso deben realizarse dos ensayos, uno preliminar para determinar el rango del ensayo y el otro para el ensayo propiamente dicho.

7.2 Los ensayos deberán conducirse utilizando el mismo medio de cultivo empleado para mantener los cultivos "stock". Sin embargo, algunos investigadores prefieren utilizar agua de mar como medio de cultivo y otros utilizan agua de mar suplementada. Puesto que especies diferentes tienen características y requerimientos ambientales específicos, no se dan recomendaciones especiales. Cualquiera que sea el medio de cultivo elegido éste debe ser claramente indicado en el informe. Ward and Parrish (ver Referencias, sección 2) describen un medio de cultivo adecuado para el ensayo.

7.3 Las condiciones físicas del ensayo (iluminación y temperatura) deberán ser las mismas que las condiciones de los cultivos "stock", a menos que el ensayo requiera condiciones diferentes.

7.4 Cuando las condiciones experimentales (medio de cultivo o condiciones físicas) difieren de las del cultivo "stock" (sin contar la presencia del compuesto de ensayo) los cultivos para el ensayo deben aclimatarse a las condiciones del mismo por lo menos 7 días antes de su iniciación. Esto se efectúa inoculando los matraces de cultivo como se indica en la sección 6, incubándolos bajo las condiciones del ensayo. La inoculación de los cultivos experimentales solo se debe llevar a cabo a partir de cultivos "stock" aclimatados.

7.5 Todo el material de vidrio a utilizar deberá ser lavado con una mezcla ácido-agua, enjuagado con agua destilada y de preferencia esterilizado antes de su uso.

7.6 El ensayo preliminar se lleva a cabo de la misma manera que el ensayo definitivo, solo que las concentraciones del compuesto de ensayo contaminante son diferentes.

7.7 Seleccionar el rango de concentraciones del compuesto de ensayo ; se requieren por lo menos cinco concentraciones más el control.

Para el ensayo preliminar las concentraciones del compuesto de ensayo son más cercanas las unas a las otras y deben seguir aproximadamente una serie logarítmica. Por ejemplo si el ensayo preliminar indica que la concentración efectiva del compuesto de ensayo es de 1 mg/l, el rango seleccionado para el ensayo definitivo será 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 mg/l.

7.8 Preparar los ensayos por triplicado, para el ensayo definitivo es preferible hacer los ensayos por quintuplicado.

7.8.1 Los recipientes para el ensayo son matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad conteniendo 100 ml del medio de ensayo.

7.8.2 Transferir el volumen de inóculo requerido a cada uno de los matraces de ensayo. El volumen de inóculo necesario se determina por el procedimiento descrito en 7.9 y no debe exceder los 10 ml.

7.8.3 Agregar la cantidad requerida del compuesto de ensayo y agitar los matraces.

NOTA : El compuesto de ensayo deberá agregarse a partir de una disolución "stock" concentrada. El volumen a utilizar deberá ser pequeño (<1 ml). Si la cantidad requerida es mayor de 1 ml será necesario preparar una disolución "stock" de contaminante más concentrada.

### 7.9 Determinación del volumen de inóculo

7.9.1 Determinar la concentración de las células de fitoplancton en el cultivo "stock", esto se puede llevar a cabo mediante el uso de una cámara hematocitométrica o un contador automático de partículas. En cualquiera de los dos casos es conveniente seguir estrictamente las instrucciones para el uso de estos equipos.

NOTA : No todos los contadores automáticos de partículas son adecuados para su uso con microalgas. El equipo deberá ser adaptado con accesorios específicos para el conteo de microalgas, de otra manera los resultados serán erráticos y erróneos. En caso de dudas consultar con el fabricante del equipo.

7.9.2 Calcular el volumen de inóculo necesario para cada recipiente de ensayo, si este excede los 10 ml el cultivo "stock" deberá ser concentrado.

Ejemplo : Supongamos que el cultivo "stock" contiene 34000 células/ml, que el recipiente de ensayo contiene 100 ml de medio y que la densidad inicial de las células deberá ser por ejemplo, 10000 células/ml. El número total de células requerido para cada ensayo será  $100 \times 10000 = 10^6$ . Por consiguiente el volumen de inóculo para cada ensayo será :

$$\frac{10^6}{34000} = 24,9 \text{ (ml)}$$

Este volumen es demasiado elevado (pues gran proporción del medio utilizado en el ensayo estará compuesto de medio agotado por el cultivo "stock"). En estos casos el cultivo "stock" deberá ser concentrado.

7.9.3 El cultivo "stock" se concentra por centrifugación descartando el medio sobrenadante y suspendiendo nuevamente las células en un volumen menor de medio de cultivo.

7.9.4 Estimar nuevamente la densidad de las células del cultivo "stock" como se describe en 7.9.1 y repetir 7.9.2 hasta que el volumen del inóculo necesario sea menor que 10 ml.

7.10 Tapar los recipientes de ensayo con tapones de algodón y registrar la hora de inicio del experimento. Colocar los recipientes sobre un agitador orbital a 100 rpm bajo las condiciones de iluminación y temperatura seleccionadas para el ensayo.

7.11 Mantener los recipientes de ensayo bajo las mismas condiciones por 96 horas.

7.12 Después de transcurridas las 96 horas determinar la densidad de las células en cada uno de los recipientes de ensayo siguiendo el mismo método utilizado para determinar la densidad de los cultivos "stock".

7.13 Si se ha decidido determinar la biomasa del fitoplancton al final del ensayo utilizar uno de los siguientes procedimientos :

7.13.1 Filtrar el contenido de cada recipiente a través de un filtro de  $0,45 \mu\text{m}$  que ha sido previamente pesado y secar por varias horas a  $60^{\circ}\text{C}$ . Pesarse nuevamente el filtro con el fitoplancton seco y sustraer el peso inicial del filtro, por diferencia obtener la biomasa de las microalgas.

7.13.2 Centrifugar el contenido de cada recipiente y desechar el medio sobrenadante, lavar las células tres veces con agua destilada. Repetir la centrifugación después de cada lavado y transferir cuantitativamente la biomasa a un crisol previamente pesado, secar a  $60^{\circ}\text{C}$  por varias horas. Sustraer el peso del crisol del peso del crisol más la biomasa seca.

7.14 Si se quiere estimar el contenido de clorofila-a en el fitoplancton proceder como sigue :

7.14.1 Preparar el fluorímetro para la determinación de clorofila-a de acuerdo con las instrucciones del instrumento.

7.14.2 Homogeneizar las disoluciones de ensayo.

7.14.3 Llenar la celda de medición con la disolución de ensayo homogeneizada. Utilizar una celda conteniendo el medio de cultivo para determinar el cero del instrumento.

7.14.4 Estimar el contenido de clorofila-a de las disoluciones de ensayo.

7.15 Si se quiere determinar el "minimum algistic concentration" (MAC-5) proceder de la forma siguiente :

7.15.1 Incubar los recipientes de ensayo conteniendo los cultivos un día adicional.

7.15.2 Centrifugar el contenido de cada recipiente y descartar el medio sobrenadante. Suspender nuevamente las células en medio de cultivo recién preparado y sin el compuesto de ensayo. Repetir este procedimiento dos veces más para eliminar el resto del compuesto contaminante.

7.15.3 Inocular una serie de recipientes de ensayo conteniendo 100 ml de medio de cultivo con cada una de las suspensiones de células preparadas de acuerdo con 7.15.2 de manera tal de obtener una densidad final de 10000 células por ml usando para este fin el método descrito en 7.9.

7.15.4 Tapar los recipientes recién inoculados con tapones de algodón e incubar los cultivos por un período de 9 días, bajo las mismas condiciones del ensayo original.

7.15.5 Después de transcurridos los 9 días estimar la densidad de los cultivos en cada recipiente usando el procedimiento descrito en 7.9.

NOTA : El MAC-5 no puede estimarse si los cultivos de ensayo han sido usados para determinar la biomasa y/o la clorofila-a de los mismos.

## 8. ANALISIS DE LOS DATOS DEL ENSAYO PARA FITOPLANCTON

Se presentan tres métodos para el análisis de los datos.

8.1 Tabular los datos como se muestra en la Tabla 1.

NOTA : En este ejemplo se utilizan los datos del número de células por ml de medio de cultivo. Este procedimiento también puede ser usado con los datos de la biomasa del fitoplancton o la concentración de clorofila-a en el mismo.

8.2 Para determinar la concentración del compuesto de ensayo que ejerce un efecto significativo sobre el fitoplancton, comparar los valores medios del ensayo con los valores medios del control usando la prueba Student Newman-Keuls. Esta prueba se describe con detalles en Reish y Oshida (ver referencias, sección 2).

8.3 Para determinar el EC50 para 96 horas calcular el porcentaje de la reducción del número de células de fitoplancton de cada uno de los ensayos bajo las diferentes concentraciones del compuesto de ensayo y compararlo con el valor del ensayo control. Usando papel de gráficos logaritmo-probabilidad representar gráficamente el porcentaje de la reducción de células en los ensayos (escala de probabilidad) en función de la concentración del compuesto de ensayo (escala logarítmica) y proceder como se describe en la sección 11.

Tabla 1. Tabulación de los datos del ensayo de toxicidad con fitoplánton, mostrando el número de células por ml de medio de ensayo después de 96 horas.

Contaminante mg l <sup>-1</sup>	Número de ensayos por concentración					Media	Desviación estándar	% Media reducción v/control
	1	2	3	4	5			
Control	115000	122000	114000	126000	119000	119200	4970	-
0,1	114000	116000	108000	119000	116000	114600	4090	3,85
0,32	98000	101000	99000	110000	96000	100800	5450	19,3
0,56	28000	47000	33000	41000	39000	37600	7335	68,5
1,0	16000	21000	18000	19000	17000	18200	1924	84,7
1,3	4000	7000	6000	8000	6000	6200	1483	94,8



NOTA : El método de análisis de datos descritos en la sección 11 para zooplancton es el mismo que se utiliza para fitoplancton, con la diferencia que se usan los datos de reducción del número de células, biomasa o clorofila-a en lugar de datos de mortalidad. El resultado final se expresa como EC50 (concentración media efectiva) para 96 horas en lugar de LC50 (concentración media letal) para 96 horas.

NOTA : En algunos casos la presencia de contaminantes en los cultivos puede causar un aumento en la densidad de las células, biomasa o la concentración de clorofila-a. Esto no debería suceder en un ensayo definitivo, si el ensayo preliminar se llevó a cabo en forma apropiada y si se interpretó correctamente. Sin embargo, si ocurre un aumento, los investigadores deberán considerar la posibilidad de realizar ensayos de bio-estimulación diseñados apropiadamente.

#### 8.4 Determinación del "minimum algistatic concentration" MAC-5.

NOTA : Esto solo es posible si se ha llevado a cabo el procedimiento adicional descrito en 7.5.

8.4.1 Para cada uno de los duplicados de los ensayos realizados con las distintas concentraciones del compuesto de ensayo, calcular :

$$K = \frac{\log_2 \frac{N_1}{N_2}}{t},$$

Donde K = Constante de crecimiento

$N_1$  = Número de células al final del período de recuperación.

$N_2$  = Número de células al inicio del período de recuperación.

t = Período de recuperación en días (en general 9 días).

NOTA : Recordar que las células estuvieron expuestas al compuesto de ensayo durante 5 días, por lo tanto el resultado final es el "minimum algistatic concentration" para 5 días (MAC-5).

8.4.2 Calcular la media de los valores de K y la desviación estándar para cada una de las concentraciones del compuesto ensayado.

8.4.3 Comparar la media de los valores de K de los ensayos con la media del valor de K del control, usando la prueba de Student Newman-Keuls (ver Reish y Oshida, referencias sección 2) o la prueba t de Student.

8.4.4 El valor de MAC-5 se encuentra entre la concentración más baja del compuesto de ensayo que produce valores de K que son significativamente diferentes (al nivel de 95 % de confianza) del valor de K del control y la concentración más alta del compuesto de ensayo que produce valores de K que no son significativamente diferentes del valor de K del control.

NOTA : Es obvio que el valor de MAC-5 no se puede determinar con exactitud, pues siempre se le encuentra entre dos concentraciones del compuesto ensayado. Por lo tanto en los ensayos para determinar el valor de MAC-5 será necesario utilizar concentraciones del compuesto de ensayo muy próximas y de esta manera el valor de MAC-5 se podrá expresar como : MAC-5 es menor que x mg/l o el MAC-5 se encuentra entre x e y mg/l.

## 9. MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE ZOOPLANCTON

9.1 Como existe un número limitado de especies de zooplancton disponibles en el comercio es conveniente obtenerlo de colectas de poblaciones naturales. Es muy frecuente encontrar en ellas una especie que predomina.

9.2 El transporte del zooplancton al laboratorio, luego de su colecta deberá hacerse en recipientes con aireación continua teniendo cuidado de proteger a los animales de cambios bruscos de temperatura e iluminación.

9.3 En el laboratorio examinar los organismos colectados bajo un microscopio y seleccionar a los individuos de las especies a utilizar en los ensayos y transferirlos con una pipeta a recipientes separados.

### 9.4 Condiciones de cultivo.

Numerosas especies de zooplancton han sido cultivadas exitosamente en el laboratorio, sin embargo los requerimientos para muchas otras especies no son bien conocidos. Los investigadores interesados deberán realizar una búsqueda bibliográfica para determinar los requerimientos de las especies que desean cultivar. Será necesario además realizar algunos experimentos preliminares para establecer las condiciones óptimas de los cultivos. Los laboratorios que planean realizar ensayos de toxicidad utilizando zooplancton deberán en primer término establecer cultivos "stock" de las especies a utilizar en los ensayos. Las siguientes recomendaciones pueden ser de gran utilidad. Información adicional se puede encontrar en las referencias de la sección 2.

9.4.1 Los recipientes para los cultivos de zooplancton deberán tener entre 10 y 50 litros de capacidad.

9.4.2 El medio preferido es agua de mar filtrada que proviene de una fuente no contaminada. Se puede también usar agua de mar sintética pero algunas especies no prosperan en agua de mar sintética recientemente preparada, por lo tanto se aconseja acondicionarla por una semana antes de su utilización.

9.4.3 Se debe utilizar un sistema de aireación continua.

9.4.4 Los requerimientos para la alimentación de los organismos varía con las especies y se recomienda hacer ensayos para determinar la calidad óptima y la cantidad de alimento necesaria. Los requisitos para la alimentación de las especies más comúnmente usadas son :

Acartia tonsa: Se alimenta de una mezcla de cuatro especies de fitoplancton - Skeletonema costatum, Thalassiosira pseudonana, Isochrysis galbana y Rhodomonas baltica (ver sección 6 para los detalles de los métodos de cultivo para fitoplancton).

Igriopus sp : Se alimenta de una suspensión de harina de pescado finamente pulverizada.

Iisbe sp : Se alimenta de Duniallela sp.

Mysidaceae sp: Se alimenta de nauplios de Artemia.

9.4.5 Durante los ensayos la temperatura debe mantenerse constante y ser apropiada para las especies utilizadas teniendo en cuenta las condiciones de su habitat natural.

9.4.6 Los cultivos de zooplancton necesitan un cuidado regular y deben ser examinados diariamente. No debe permitirse la acumulación de exceso de alimento y otros materiales detriticos, los cultivos deberán ser transferidos en su totalidad a recipientes con agua de mar limpia periódicamente.

9.4.7 Muestras del cultivo de zooplancton deben ser examinadas periódicamente bajo el microscopio para verificar que no han sido contaminados con otras especies de zooplancton. Los cultivos contaminados deberán descartarse.

9.4.8 Con muchas especies los cultivos de laboratorio pierden vitalidad después de varias generaciones por consiguiente será necesario establecer nuevos cultivos periódicamente.

## 10. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO PARA ZOOPLANCTON

10.1 Los recipientes de ensayo deben ser de vidrio y lo suficientemente grandes para contener 100 ml de la disolución de ensayo. Es conveniente que estos recipientes sean del mismo tamaño y forma para que puedan colocarse fácilmente bajo un microscopio binocular para poder examinar a los animales durante el ensayo.

10.2 Seleccionar el rango de concentración del compuesto de ensayo tóxico, por lo menos 5 concentraciones además del control. Las concentraciones elegidas deberán seguir aproximadamente una serie logarítmica, p.ej. 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 mg/l.

10.3 Preparar los recipientes de ensayo agregando la cantidad adecuada del compuesto de ensayo al agua de mar filtrada de manera tal que cada recipiente contenga un volumen final de 100 ml de la disolución de ensayo de la concentración requerida.

#### 10.4 Selección de los animales para el ensayo

10.4.1 Como mínimo utilizar 10 o de preferencia 20 animales para cada recipiente de ensayo. Un número igual de animales deberá usarse en cada recipiente.

10.4.2 Examinar cada animal individualmente bajo el microscopio y excluir aquellos que parecen enfermos, dañados, moribundos o que presentan alguna anomalía. También excluir a las hembras portadoras de huevos.

NOTA : Debido al corto tiempo de generación de las especies de zooplankton es posible terminar con más organismos al final del ensayo. Por lo tanto es importante excluir de los ensayos de toxicidad a las hembras grávidas.

NOTA : Si más del 20 % de los animales son rechazados debido a enfermedades u otras anomalías es muy probable que el cultivo no es saludable y por lo tanto los organismos no podrán ser usados en los ensayos.

10.4.3 Colocar el número requerido de organismos en cada uno de los recipientes de ensayo empezando con aquel que contiene la concentración más baja del compuesto de ensayo y registrar la hora de inicio del experimento.

10.4.4 Colocar los recipientes de ensayo en un cuarto o recinto cerrado donde la temperatura y las otras variables físicas están controladas a los niveles seleccionados para el ensayo.

10.4.5 Decidir sobre el período de duración del experimento. Se considera que éste debe ser de 96 horas.

NOTA : Los ensayos de toxicidad con una duración menor de 96 horas tienen muy poca validez pues tienden a producir conclusiones falsas. Lo ideal es que los ensayos de toxicidad puedan continuarse por un período lo más extenso posible. Sin embargo, como los organismos del zooplankton tienen tiempos de generación breves, existe la posibilidad de que los organismos se reproduzcan durante el ensayo invalidando así los resultados. Es por lo tanto recomendable que se adopten las 96 horas como el tiempo estándar para la duración del ensayo.

10.4.6 Después de transcurridas las 96 horas contar y registrar el número de animales en cada uno de los recipientes de ensayo.

NOTA : Se debe poner cuidado especial en determinar si un organismo está muerto o no lo está. Los organismos vivos tienen normalmente movilidad, sin embargo aquellos animales que parecen inmóviles deben ser examinados detenidamente bajo el microscopio. Si se observa alguna movilidad en los apéndices, tracto intestinal o en los órganos internos el animal debe considerarse como que ha sobrevivido el ensayo.

10.4.7 Se pueden hacer estimaciones de los valores de LC50 para 24, 48, y 72 horas si se registra el número de animales que sobreviven en cada recipiente de ensayo a los tiempos antes señalados. El procedimiento para el análisis de los datos es exactamente el mismo que se describe en la sección 11 para el LC50 de 96 horas, excepto que los datos de mortalidad corresponden a tiempos de observación más cortos.

NOTA : Tal vez algunos investigadores estén interesados en la determinación de la media del tiempo de supervivencia (LT50) para cada concentración del compuesto ensayado y construir una curva de toxicidad. En estos casos se utiliza el mismo procedimiento experimental, salvo que las observaciones de mortalidad se hacen con más frecuencia.

### 11. ANALISIS DE LOS DATOS DEL ENSAYO PARA ZOOPLANCTON

Se estima el valor de LC50 para 96 horas y sus límites de confianza como sigue :

11.1 Tabular los datos como se muestra en la Tabla 2. El porcentaje de mortalidad en cada uno de los ensayos se calcula de la siguiente manera :

$$\frac{N-X}{N} \times 100$$

donde N = al número inicial de animales en cada recipiente de ensayo y X = al número de animales que sobreviven después de 96 horas en cada ensayo.

Tabla 2 : Un ejemplo de los datos necesarios para estimar el valor de LC50 para 96 horas del compuesto de ensayo y para probar la bondad de ajuste de la línea que se muestra en la Fig.1.

Contaminante mg l <sup>-1</sup>	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 tóxico es igual a 10 el valor de Ji<sup>2</sup> es 0,042 x 10 = 0,42. Siendo el número total de concentraciones ensayadas igual a 6, excluyendo el control, el número de grados de libertad es por lo tanto (6-2) = 4 (ver 9.5.4). Usando la Tabla 3 se puede constatar que el valor inicial de Ji<sup>2</sup> para 4 grados de libertad es 9,49. Dado que 0,42 < 9,49, se considera que la línea de la Fig. 1 tiene un buen ajuste, por lo tanto el valor de LC50 para 96 horas y sus límites de confianza pueden ser estimados de la misma.

11.2 Usando 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. 1. Ignorar los valores correspondientes a cero y 100 % de mortalidad.

NOTA : Los valores para LC50 no pueden ser calculados por este procedimiento a menos que el gráfico incluya por lo menos un punto que corresponda a una mortalidad mayor que el 50 % y otro punto que indique un valor de mortalidad menor que el 50 %.

11.3 Ajustar, a ojo, una línea con los puntos marcados en el gráfico y probar la bondad de ajuste por el procedimiento descrito en 11.8.

NOTA : En la mayoría de los casos el número de puntos en el gráfico es reducido, si son menos de cuatro puntos los valores para LC50 no podrán ser calculados con la exactitud requerida y el investigador debe considerar la repetición del experimento utilizando concentraciones del compuesto de ensayo menos espaciadas. Debido a que en todo caso el número de puntos en el gráfico será bajo, es esencial que se pruebe la bondad de ajuste de la línea usando el método descrito en 11.8. Si la línea no presenta un buen ajuste será necesario trazar y ensayar otras líneas hasta que se obtenga un buen ajuste.

11.4 Si la línea presenta un buen ajuste determinar los valores correspondientes para LC16, LC50 y LC84 del gráfico como se muestra en la Figura 1. Calcular la pendiente S de la línea de acuerdo con la siguiente fórmula :

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

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

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

11.6 Calcular f, donde :

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

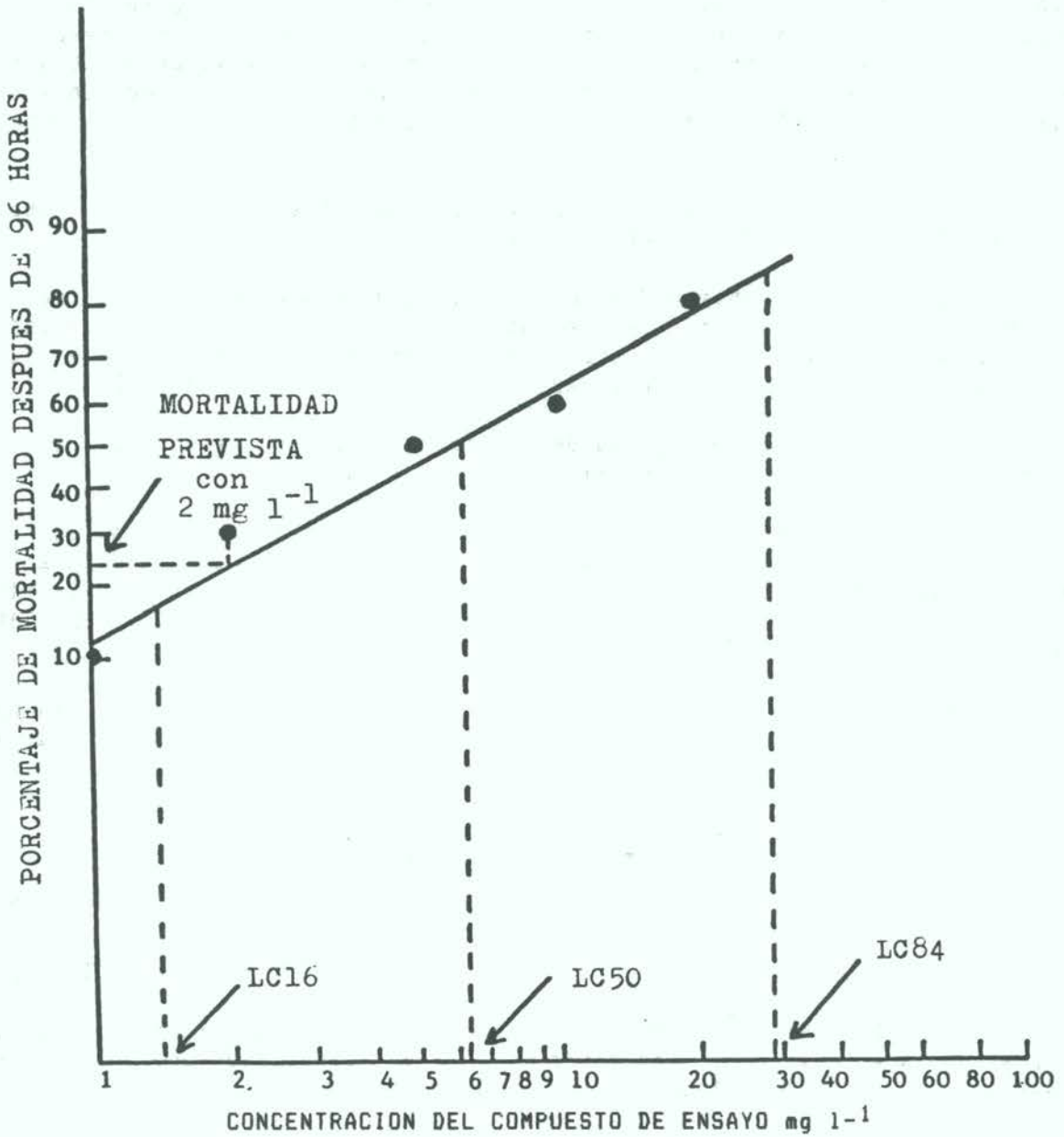


FIGURA 1 : Estimación del valor de LC50 para 96 horas usando los datos presentados en la Tabla 2. El diagrama muestra como se determinan los valores de LC16, LC84 a partir de la curva (línea) y como se puede hallar la mortalidad prevista para cada concentración del compuesto de ensayo.

11.7 Calcular el 95 % de los límites de confianza superior e inferior de LC50. El valor de LC50 se obtiene de la curva (ver Fig. 1). Esto condicionado a que la línea tenga buen ajuste (ver 11.8).

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

11.8 Prueba de la bondad de ajuste de la línea de probabilidad

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

11.8.1 Tabular los valores de mortalidad observados y previstos para cada punto del gráfico (ver Tabla 2).

NOTA : Los valores observados de mortalidad son aquellos registrados durante el experimento, mientras que los valores previstos de mortalidad se obtienen de la línea ajustada del gráfico, a cada una de las concentraciones del compuesto ensayado, tal como se muestra en la Fig.1.

11.8.2 Usando el nomograma de la Fig.2 determinar la contribución a  $J_i^2$  de cada uno de los puntos en el gráfico (ver Tabla 2).

11.8.3 Determinar la suma total de las contribuciones a  $J_i^2$  y multiplicar éste valor por el número de animales usados para cada una de las concentraciones del compuesto ensayadas, p.ej. si se usaron 10 animales para cada concentración multiplicar el valor total de  $J_i^2$  por 10 (ver Tabla 2).

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

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

y multiplicar el valor total de  $J_i^2$  por el valor de esta relación.

En estos cálculos no debe incluirse a los animales del ensayo control.

11.8.4 Determinar el número de grados de libertad : Este es igual a  $N-2$ , siendo  $N$  el número de concentraciones del compuesto que han sido ensayadas. No se debe incluir al control en este cálculo.

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

11.8.6 Si el valor de  $J_i^2$  calculado de la línea según 11.8.3 es menor que el valor apropiado de la Tabla 3, se considera que la línea tiene buen ajuste y el análisis se puede continuar como se describe en 11.4.



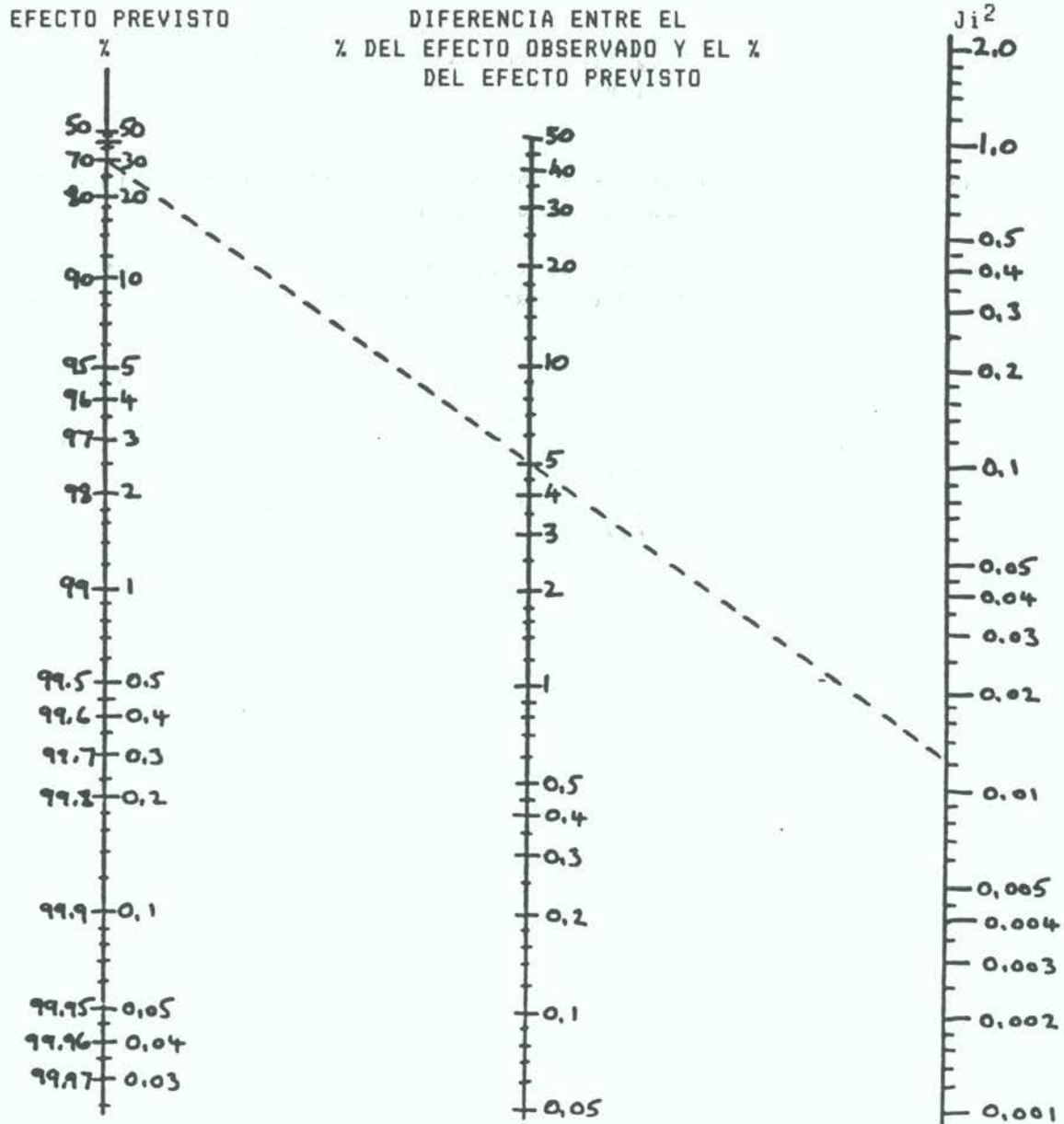


FIGURA 2 : Nomograma para la determinación del valor de  $J_i^2$  (ver 11.8). Para el uso de este nomograma trazar un línea recta (o utilizar una regla) que conecta el % del efecto previsto (sobre el eje a la izquierda) y el valor de la diferencia entre los porcentajes observados y previstos (eje central). 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 del 25 % en consecuencia el valor de  $J_i^2$  es 0.012. Recordar que el valor de  $J_i^2$  deberá ser multiplicado por el número de animales ensayados por concentración 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.

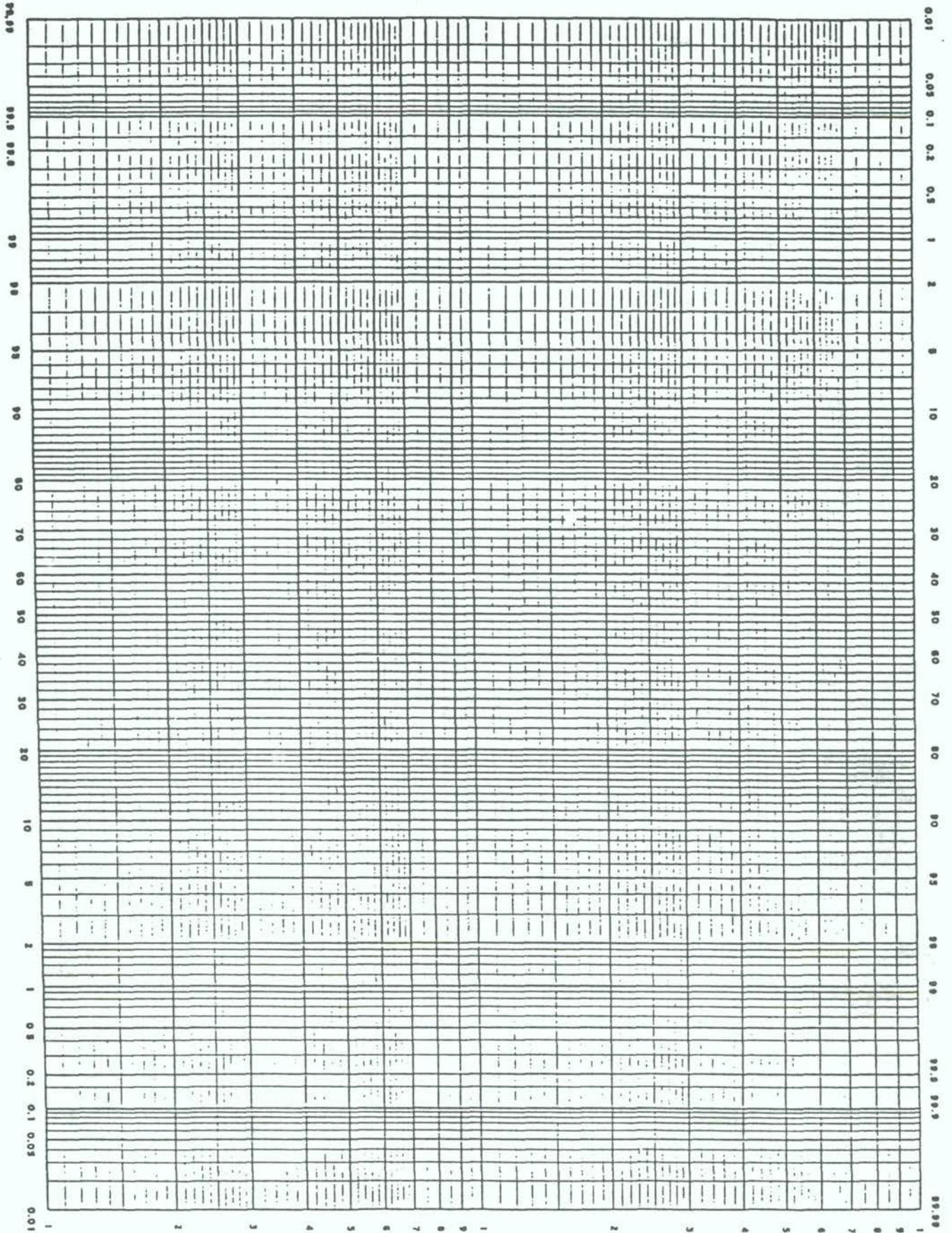
Si el valor de  $Ji^2$  de la línea es igual o mayor que el valor apropiado de la Tabla 3, la línea no tiene buen ajuste. En estos casos trazar otras líneas y repetir el procedimiento para probar la bondad de ajuste.

NOTA : En algunos casos no se puede obtener una línea con buen ajuste por lo tanto el valor de LC50 no podrá calcularse por este método.

NOTA : Cuando la curva (línea) trazada tiene buen ajuste es recomendable trazar y probar otras para determinar la línea que produce el valor más bajo de  $Ji^2$ .

Tabla 3 : Valores críticos de  $Ji^2$  para la prueba de bondad de ajuste de la línea de probabilidad por el procedimiento descrito en 11.8 (si el valor de  $Ji^2$  de la línea es igual o mayor que el valor de la tabla para el número apropiado de grados de libertad, la línea no tiene buen ajuste y por lo tanto deberá ser rechazada)

Grados de libertad	$Ji^2$
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



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 Héreditaire Albert  
Monaco Ville  
98000 MONACO