



MARES REGIONALES

PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE

DICIEMBRE 1988

*Ensayo de toxicidad comparativa
de las fracciones de petróleo
y de los compuestos dispersantes
del mismo, para organismos marinos*

*Métodos de Referencia para Estudios de
Contaminación Marina No. 45.*

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 toxicidad comparativa de las fracciones de petróleo y de los compuestos dispersantes del mismo, para organismos marinos. Nº. 45, PNUMA 1986.



*Ensayo de toxicidad comparativa
de las fracciones de petróleo
y de los compuestos dispersantes
del mismo, para organismos marinos*

*Métodos de Referencia para Estudios de
Contaminación Marina No. 45.*

Preparado en cooperación con:

FAO

OIEA

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. N° 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 N° 45 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. 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 los ensayos	4
7. Condiciones experimentales	6
8. Procedimiento experimental	6
9. Análisis de datos	8
Apéndice A	14

1. ALCANCE Y CAMPO DE APLICACION

Este método de referencia describe un simple procedimiento para comparar la toxicidad del petróleo, de los compuestos dispersantes del mismo y de la mezcla de éstos, sobre los organismos marinos. El método permite comparar rápidamente la toxicidad de los compuestos dispersantes con la del petróleo y la mezcla de ambos. Está diseñado para el "monitoreo" de rutina y para propósitos de selección pero no es adecuado como método de investigación.

NOTA: Las propiedades físicas y químicas del petróleo y de los compuestos dispersantes del mismo crean numerosas dificultades en la determinación de su toxicidad sobre organismos marinos. En realidad, la toxicidad de estos compuestos solo puede estimarse con exactitud utilizando procedimientos y equipos complejos. Métodos más simples pueden dar la información necesaria siempre que sus limitaciones sean claramente entendidas y que se tengan en consideración en la aplicación de los resultados del ensayo. Algunas de las consideraciones especiales relacionadas con la determinación de la toxicidad del petróleo y los compuestos dispersantes del mismo se describen en el Apéndice A. En el Apéndice A también se describen los propósitos y limitaciones del presente método y deberá ser estudiado cuidadosamente antes de su utilización.

2. REFERENCIAS

REISH, D.J. and OSHIDA, P.D. (1986)
Manual of Methods for Marine Environment Research. Part 10. Short-term static bioassays. FAO Fish. Tech. Pap. (Nº.247) 62pp.

UNEP/FAO/IAEA (1986)
Estimation of the acute lethal toxicity of pollutants to marine fish and invertebrates : Determination of the survival time-concentration relation-ship (toxicity curve) and the estimation of median lethal concentrations. Reference Methods for Marine Pollution Studies Nº 43 (draft), UNEP.

WARD, G.S, and PARRISH, P.R. (1982)
Manual of Methods in Marine Environment Research. Part 6. Toxicity tests. FAO Fish. Tech. Pap. (Nº 185) 23 pp., Rome, FAO.

3. PRINCIPIOS

Se preparan extractos acuosos de petróleo, de los compuestos dispersantes del mismo y de la mezcla de ambos ; grupos de diez animales seleccionados para el ensayo se exponen a una serie de diluciones de los extractos acuosos. Se estima la concentración de los extractos que produce la muerte de la mitad de los organismos en un período de 24 horas. Una simple prueba de significación se utiliza para la determinación de la toxicidad relativa de los extractos ensayados. Si se cuenta con estándares para petróleo y los compuestos dispersantes del mismo, la toxicidad de los compuestos ensayados se puede comparar con la de los referidos estándares.

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 las 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) podrá ser usada solo si no hay otra alternativa.

4.1.1 Agua de mar natural : Es imperativo que sea obtenida de áreas no contaminadas y que 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 con base en 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 conveniente someterla a una intensa aireación, por lo menos por 48 horas, para asegurar el equilibrio de los gases disueltos con la atmósfera y estabilizar el 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 entre el agua e implementos metálicos.

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

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

<u>Compuesto químico</u>	<u>Cantidad (g)</u>
NaCl	23,926
Na ₂ SO ₄	4,008
KCl	0,677
NaHCO ₃	0,196
KBr	0,098
NaF	0,003
H ₃ BO ₃	0,026
MgCl ₂ .6H ₂ O	10,83
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,52
SrCl ₂ .2H ₂ 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 $S = 35$ ‰. Si es necesario preparar agua de mar sintética de otra salinidad, ajustar la cantidad de agua destilada de acuerdo con la misma. Por ejemplo si se necesita agua de mar con una salinidad de $S = 37$ ‰ disolver los compuestos químicos con agua destilada completando hasta 946 g.

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.

Los compuestos químicos utilizados en la preparación de este tipo de agua de mar deberán ser de grado analítico.

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

4.2 Petróleo

Si el petróleo requerido se va a utilizar para un número relativamente reducido de ensayos proceder como se indica en 4.2.1, si por el contrario va a ser usado como estándar o material de referencia para un prolongado programa de ensayos proceder como se describe en 4.2.2.

NOTA: Para los programas de ensayo de toxicidad de petróleo y compuestos dispersantes del mismo, puede que exista la necesidad de establecer un estándar de referencia cuya toxicidad pueda ser comparada con los compuestos ensayados. Esto es de gran importancia ya que no existen estándares o materiales de referencia de uso internacional para determinar la toxicidad de petróleo y compuestos dispersantes del mismo. Más aun, petróleos del mismo origen y con las mismas especificaciones varían en su composición química. Por lo tanto es aconsejable que cada laboratorio cuente con un petróleo utilizado como material de referencia y en suficiente cantidad para poder completar el programa de ensayos anticipados. En la práctica cantidades de hasta 1000 litros de material de referencia parecen razonables. Entre los materiales a seleccionar el petróleo crudo ligero y el "fuel oil" medio o pesado son aceptables como materiales de referencia, la elección dependerá del propósito del programa experimental.

4.2.1. Generalmente una muestra de petróleo de 1 litro se considera suficiente, éste debe mantenerse en un recipiente adecuado debiendo evitarse recipientes de plástico, fibra de vidrio o cualquier otro material sintético, siendo preferible que sean opacos. Llenar el recipiente adecuado completamente y taparlo ajustadamente de manera tal que no quede aire en su interior, el recipiente no debe ser destapado a menos que se utilice el petróleo inmediatamente. Estos recipientes deben ser almacenados en un lugar fresco y oscuro.

4.2.2 Mezclar el petróleo "stock" utilizando un procedimiento que no lo exponga al aire, dividir el "stock" en alícuotas de 0,5 o 1 litro en los recipientes descritos en 4.2.1. Tapar los recipientes y mantenerlos en un lugar fresco y oscuro. Durante el proceso evitar la exposición del petróleo al aire.

NOTA: la manipulación y almacenaje de grandes cantidades de petróleo deberá realizarse observando precauciones de seguridad. En algunos países existen regulaciones específicas que deben ser observadas, los investigadores deben asegurarse de cumplir con las mismas.

4.3 Compuestos dispersantes de petróleo.

Si los compuestos dispersantes de petróleo solo se requieren para un limitado número de ensayos, proceder como se indica en 4.3.1. Si por el contrario se les utiliza como material de referencia para un prolongado programa de ensayos proceder como se describe en 4.3.2.

NOTA: Aunque los compuestos dispersantes de petróleo son especialmente formulados, su composición química puede variar ya que algunos fabricantes alteran las especificaciones de estos compuestos periódicamente. En otros casos no definen o controlan sus productos y con frecuencia el dispersante puede ser retirado del mercado por razones comerciales. Es por lo tanto conveniente mantener un "stock" de estos compuestos como material de referencia.

4.3.1 Obtener una muestra del compuesto dispersante de petróleo y tratarla como se describe en 4.2.1.

4.3.2. Tratar el "stock" de referencia como se describe en 4.2.2.

5. EQUIPO

5.1 Equipo para la preparación de los extractos acuosos de petróleo y de sus compuestos dispersantes.

5.1.1 Agitadores magnéticos.

5.1.2 Recipientes cónicos de 1 a 5 litros de capacidad.

5.1.3 Tubos de vidrio.

5.1.4 Salinómetro o sensor de salinidad.

5.2 Recipientes para los ensayos.

Los recipientes deben ser de vidrio y del tamaño adecuado (ver 7.1). No se deben utilizar recipientes de plástico, fibra de vidrio o de cualquier otro material sintético.

5.3 Papel para gráficos logaritmo-probabilidad.

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

5.4 Cuarto o recinto cerrado de tamaño adecuado con temperatura constante.

6. ANIMALES UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS

6.1 Se puede utilizar cualquier especie de pez o macroinvertebrado que pueda mantenerse en el laboratorio por el período requerido. Deben ser obtenidos de áreas no contaminadas, o de acuicultivos, y si es posible ser del mismo tamaño, para este ensayo en particular se prefiere utilizar organismos de tamaño pequeño. Especies de reconocida resistencia a los contaminantes o que reaccionan lentamente con éstos deben evitarse.

NOTA: los detalles e instrucciones para el cuidado y mantenimiento de los animales más comúnmente utilizados en los ensayos se presentan en la lista de referencias de la sección 2.

6.2 Aclimatación a las condiciones del laboratorio

NOTA: los laboratorios que se dedican a los ensayos de toxicidad o donde se llevarán a cabo una serie de experimentos de toxicidad deberán establecer y mantener "stocks" de animales aclimatados para los ensayos. En algunos casos puede que sea necesario conducir experimentos de toxicidad imprevistamente y se requiera la utilización de animales no aclimatados ; en estos casos debe tenerse especialmente cuidado de que las condiciones del ensayo sean similares a las del área de donde se obtuvieron los animales. Se debe prestar una atención particular a la mortalidad de los animales en el recipiente de control. El hecho de que se hayan utilizado animales no aclimatados debe ser registrado y tenido en cuenta cuando se considere la significación del ensayo.

6.2.1 Los animales deberán ser transferidos a los tanques "stock" tan pronto como sea posible después de su captura y mantenerse en estas condiciones por un período mínimo de 14 días.

6.2.2 Durante el citado período pueden ser aclimatados gradualmente a la temperatura de los experimentos, teniendo la precaución de que los cambios de temperatura no excedan de 1^o C por día.

NOTA: Algunas especies son particularmente sensibles a los cambios de temperatura y puede que requieran un período prolongado de aclimatación.

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 de 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 obscuridad (el fotoperíodo deberá corresponder al del ambiente natural de donde provienen los animales). Durante el período que corresponde a obscuridad, será más útil mantener un bajo nivel de iluminación en lugar de obscuridad 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 animales 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 aclimatación más del 20 % de los organismos han muerto, muestran signos de enfermedad o parecen moribundos, todos los organismos colectados deberán descartarse y ser reemplazados por 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.

7. CONDICIONES EXPERIMENTALES

NOTA : En este método de referencia las condiciones experimentales requeridas han sido simplificadas tanto como fue posible. Sin embargo, los investigadores deberán estar conscientes de la gran influencia que las condiciones experimentales tienen sobre los resultados de los ensayos. Consultar las referencias de la sección 2.

7.1 Volumen de la disolución para el ensayo.

Cada recipiente utilizado en los experimentos deberá contener como mínimo 1 litro de disolución por gramo de tejido animal y de preferencia un volumen de disolución mayor.

NOTA : Como las disoluciones del ensayo se preparan como se indica en la sección 8, las ventajas de elegir animales pequeños es obvia. Ver también 7.2.

7.2 Aireación.

Debido a que la aireación promueve la evaporación de sustancias volátiles es preferible no airear los recipientes durante el ensayo.

NOTA : Como el experimento solo dura 24 horas, los animales pequeños pueden ser mantenidos en forma satisfactoria si el volumen de las disoluciones es suficiente.

7.3 Temperatura.

La temperatura del ensayo deberá ser la misma que la temperatura de aclimatación (ver 6.2).

7.4 Salinidad.

Verificar que la salinidad de las disoluciones del ensayo no difiera más de 1^o/oo de la del agua de mar normal.

7.5 pH.

Verificar que el pH de las disoluciones del ensayo no difiera más de ± 0.05 del pH del agua de mar normal.

7.6 Iluminación.

Las condiciones de iluminación deberán ser las mismas que las utilizadas durante el proceso de aclimatación.

8. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

8.1 Estimar el volumen total de la disolución de ensayo requerida.

NOTA : El volumen de la disolución del ensayo necesaria dependerá del tamaño de los recipientes del ensayo y de la toxicidad del compuesto a ensayar (p.ej. la magnitud a la cual la disolución a ensayar va a ser diluida). A veces se requiere realizar pruebas preliminares para establecer el volumen de disolución necesaria.

8.2 Preparar el volumen necesario de la disolución de ensayo y los extractos de petróleo y de los compuestos dispersantes del mismo como se describe en 8.2.2. Para preparar una mezcla de los extractos de petróleo y compuesto dispersante proceder como se indica en 8.2.3.

8.2.1. Transferir 900 ml de agua de mar, 100 ml de petróleo y 10 ml del compuesto dispersante a un recipiente de 1 litro de capacidad y sin tapanlo proceder como se describe en 8.2.3.

8.2.2. Transferir 900 ml de agua de mar y 100 ml de petróleo o del compuesto dispersante a un recipiente de 1 litro de capacidad sin tapanlo.

8.2.3. Agregar a los recipientes anteriores barras magnéticas cubiertas con "Teflon" y colocarlos sobre agitadores magnéticos. Ajustar la velocidad del agitador de manera tal que el vortex en el recipiente no exceda más del 25 % de la distancia entre el nivel del líquido y el fondo del recipiente, mezclar por 20 horas.

8.2.4 Después de las 20 horas detener la agitación y permitir que la mezcla repose por 30 minutos. Se pueden observar dos capas de líquido, la inferior contiene las fracciones solubles en agua de los compuestos tratados.

8.2.5 Con la ayuda de un sifón de vidrio separar la capa inferior de líquido y transferirla a un matraz Erlenmeyer de 1 litro de capacidad y tapanlo hasta que se requiera para el bioensayo.

NOTA : Con este proceso se obtienen 900 ml del extracto de petróleo necesario para el ensayo. Si se requiere un volumen mayor p.ej. si el material no es muy tóxico o si el volumen de los recipientes se incrementa, preparar volúmenes mayores en una serie de recipientes similares y agitarlos al mismo tiempo. En estos casos las fracciones solubles en agua deberán ser mezcladas antes de ser utilizadas para asegurar su homogeneidad.

NOTA : Si el petróleo o el compuesto dispersante provienen de un "stock" de material de referencia como se describe en 4.2 descartar el resto de la alícuota después de su uso pues no debe ser utilizada para otros experimentos una vez que ha estado expuesta al aire.

8.3 Preparar una serie de diluciones en agua de mar de las fracciones solubles en agua de los compuestos a ensayar. Es conveniente preparar de cinco a seis diluciones más el control, siguiendo una serie logarítmica, p.ej. 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 %, y 50 %. También es útil preparar diluciones con concentraciones de los compuestos a ensayar más cercanas, p. ej. 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % y 30 %.

NOTA : Es a menudo necesario hacer algunas pruebas preliminares para determinar el rango apropiado de las concentraciones de los compuestos a ensayar, con el propósito de que a la concentración más alta todos los animales mueran dentro de las 24 horas del ensayo y que a la concentración más baja la mayoría de los animales sobrevivan.

8.4 Transferir la cantidad necesaria de cada dilución de ensayo a cada uno de los recipientes experimentales.

8.5 Colocar 10 animales en cada uno de los recipientes y anotar la hora de iniciación del ensayo.

8.6 Dejar que el ensayo proceda sin perturbación alguna por 24 horas y al final de este período contar y registrar la mortalidad de los animales en cada recipiente.

NOTA : Para los propósitos de este ensayo, la muerte de un animal se define como la cesación permanente de todo movimiento espontáneo o la falta de respuesta a un suave estímulo mecánico, p.ej. tocando 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 establecida.

NOTA : En algunos ensayos es posible observar el desarrollo de una alta turbidez, en tales casos debe tenerse especial cuidado cuando se cuentan los animales.

9. ANALISIS DE LOS DATOS

9.1 Preparar una tabla donde se muestre el porcentaje de mortalidad después de 24 horas para cada una de las diluciones ensayadas, un ejemplo se presenta en la Tabla 1.

NOTA : No deberá registrarse mortalidad alguna en el control pues esto invalida el experimento y como consecuencia deberá repetirse.

9.2 Usando papel para gráficos logaritmo-probabilidad trazar un gráfico del porcentaje de mortalidad después de 24 horas (escala de probabilidad) en función de la dilución del compuesto ensayado (escala logarítmica) como se muestra en la Fig. 1 ; no llevar al gráfico los valores de cero y 100 % de mortalidad.

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

9.3 Examinar los puntos marcados en la línea del gráfico, debe haber por lo menos tres puntos sobre la línea, uno de ellos debe corresponder a una mortalidad mayor del 50 % y otro a una mortalidad menor que el citado valor, excluyendo los valores de cero y 100 % de mortalidad. Si este no es el caso se debe considerar la repetición del experimento usando rangos diferentes de las diluciones de ensayo.

9.4 Ajustar, a ojo, una línea entre los puntos marcados en el gráfico.

9.5 Probar la bondad de ajuste de la línea de acuerdo con el siguiente procedimiento.

9.5.1 Tabular los valores de la mortalidad observada y aquellos de los valores previstos para cada punto en el gráfico.

NOTA : La mortalidad observada es aquella registrada durante el experimento, la mortalidad prevista se determina de la línea del gráfico como se muestra en la Fig. 1.

9.5.2 Usando el nomograma de la Fig. 2 determinar la contribución de los valores de J_i^2 para cada punto de la línea (ver Tabla 2).

9.5.3 Determinar el valor total de J_i^2 y multiplicarlo por el número de animales utilizados en cada recipiente (normalmente 10).

9.5.4 Determinar el número de grados de libertad, esto está dado por $N-2$ donde N es el número de diluciones ensayadas. No incluir al control en este cálculo.

9.5.5 Si el valor de J_i^2 calculado como se indica en 9.5.4 es menor que el valor correspondiente en la Tabla 2 la línea tiene buen ajuste y el análisis se puede continuar como se describe en 9.4.

Tabla 1 : Ejemplo, usando datos hipotéticos, del análisis de los datos descritos en la sección 9 (el gráfico correspondiente se muestra en la Fig. 1).

Dilución de la Fracción Soluble en agua %	Nº de animales ensayados	Mortalidad Observada %	Mortalidad Prevista %	Contribución a J_i^2
Control	10	0	-	-
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 $J_i^2 =$		0,042

Como el número de animales ensayados a cada dilución es igual a 10, el valor de J_i^2 de la línea de la Fig. 1 es $0,042 \times 10 = 0,42$. El número de diluciones ensayadas 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 2 se puede constatar que el valor crítico para J_i^2 con cuatro 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.

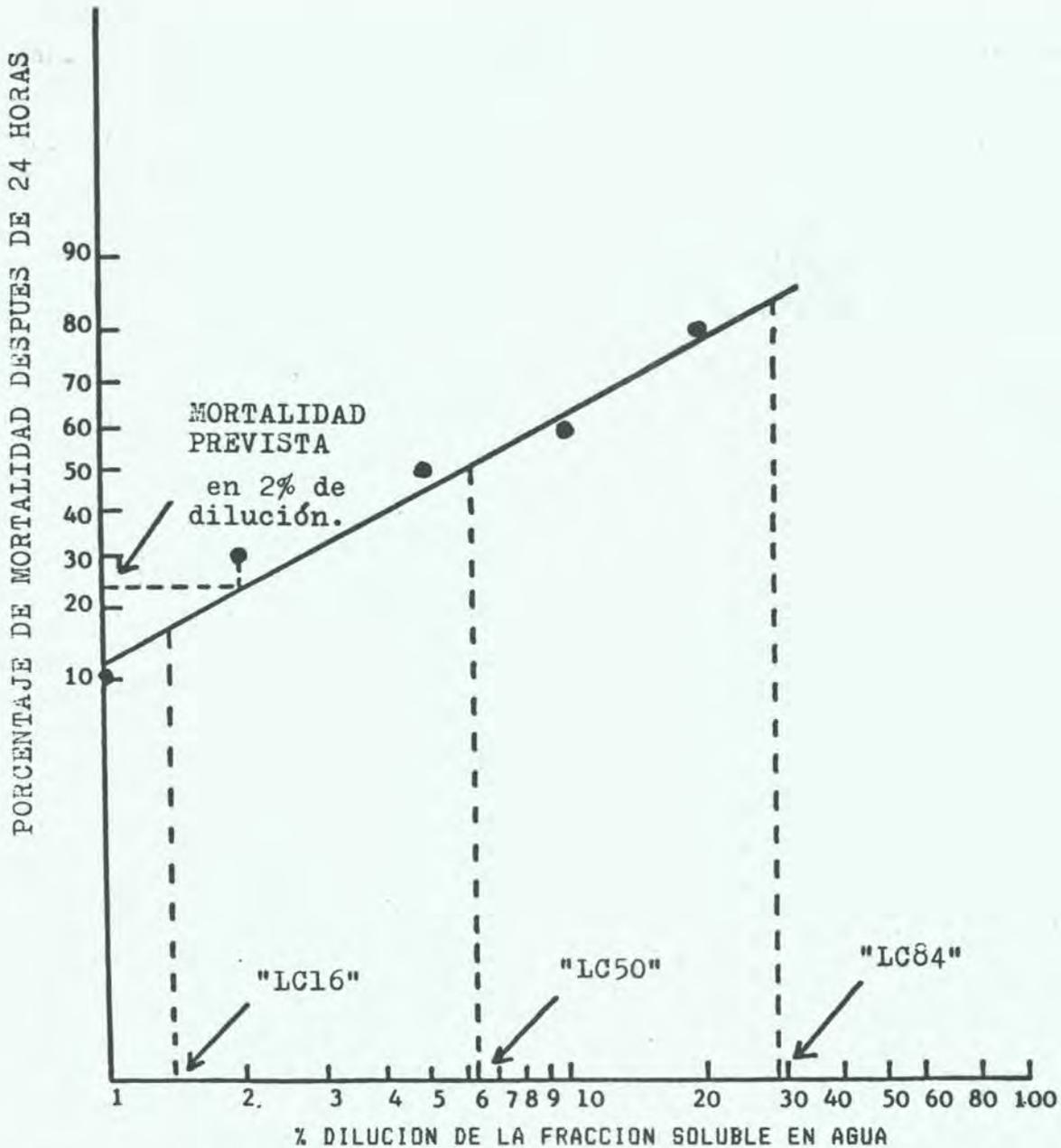


FIGURA 1 : Estimación de los valores de "LC50" para 24 horas como se describe en la Sección 9. En este ejemplo los datos de la Tabla 1 han sido llevados al gráfico por el método indicado. Note que los valores para cero y 100 % de mortalidad no han sido incluidos. Los valores para "LC16", "LC50", y "LC84" 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 diluciones del compuesto ensayado. La mortalidad prevista se determina de la línea del gráfico como se indica en el mismo.

EFFECTO PREVISTO

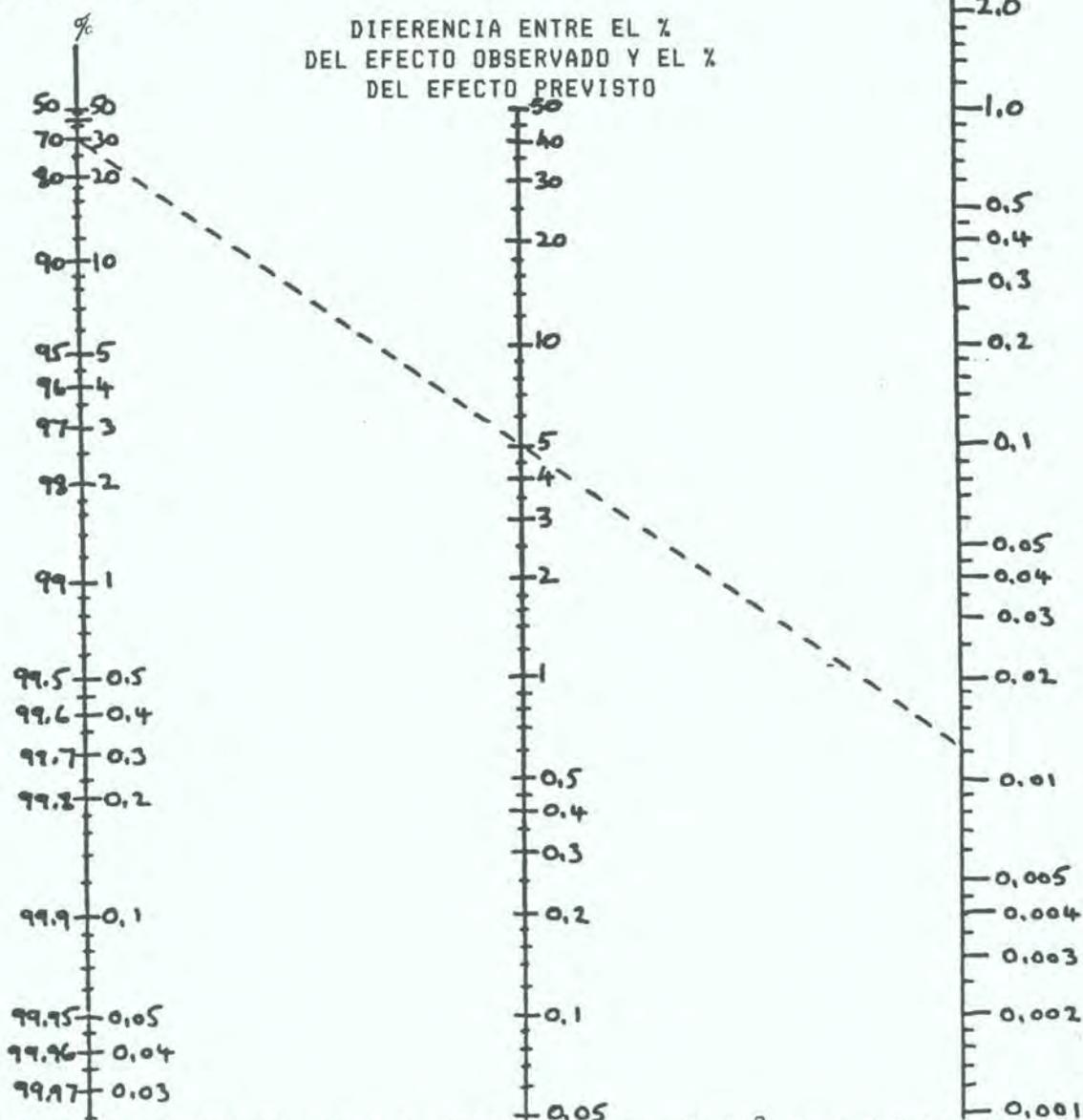


FIGURA 2 : Nomograma para la determinación de J_i^2 (ver 9.5.2). Para el uso de este nomograma trazar una línea recta (o utilizar una regla) que conecte el % del efecto previsto (sobre el eje de la izquierda) con el valor de la diferencia entre los porcentajes observados y previstos (eje central). Continuar 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 dilución (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 (ver 9.5.3).

Tabla 2 : Valores de J_i^2 para $p = 0,05$. Si los valores calculados para J_i^2 (p.ej. Fig. 1) por el método descrito en la sección 9.5 es menor que el indicado en esta tabla, para el número apropiado de grados de libertad (ver 9.5.4), 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 describe en la sección 9.

<u>Grados de Libertad</u>	<u>J_i^2</u>
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

Si el valor de J_i^2 de la línea es igual o mayor que el valor correspondiente indicado en la Tabla 2 la línea no tiene buen ajuste. En estos casos será necesario trazar una nueva línea y probar su bondad de ajuste, continuar con este procedimiento hasta lograr una línea con buen ajuste.

NOTA : En algunos casos no es posible obtener una línea con buen ajuste y por lo tanto el análisis no puede continuar. Se recomienda repetir el experimento usando si es necesario un rango diferente de diluciones.

NOTA : Cuando la línea obtenida tiene buen ajuste es conveniente trazar y probar otras líneas hasta lograr una línea que produce el menor valor de J_i^2 .

9.6 De la representación gráfica determinar los valores de "LC16", "LC50", y "LC84" como se muestra en la Fig. 1.

9.7 Calcular S pendiente de la línea, donde

$$S = \frac{\begin{array}{cc} \text{"LC84"} & \text{"LC50"} \\ \text{-----} & \text{-----} \\ & + \\ \text{"LC50"} & \text{"LC16"} \\ \text{-----} & \text{-----} \end{array}}{2}$$

9.8 Determinar el valor de N que se define como el número de animales ensayados donde las mortalidades previstas se encuentran entre 16 % y 84 %.

NOTA : En la Fig. 1 y en la Tabla 1 hay cuatro puntos que representan recipientes de ensayo donde la mortalidad prevista se encuentra entre 16 % y 84 %. Por lo tanto $N = 4 \times 10 = 40$, considerando que 10 animales fueron ensayados en cada recipiente.

9.9 Calcular f, donde

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

9.10 Calcular los límites de confianza superior e inferior de "LC50" para 24 horas.

Límite de confianza superior = "LC50" x f

Límite de confianza inferior = "LC50" / f

9.11 Para determinar si una sustancia es más tóxica que otra (p.ej. si un compuesto dispersante de petróleo es más tóxico que el material de referencia, o si el citado dispersante es más o menos tóxico que el petróleo a ensayar), examinar los datos obtenidos en los ensayos con las dos sustancias. Si los límites de confianza se solapan las sustancias no difieren de manera significativa en su toxicidad, si por el contrario los límites de confianza no se solapan una de las sustancias es más tóxica que la otra.

NOTA : Si un estándar de petróleo o del compuesto dispersante se compara con un nuevo material ambos deben ser ensayados simultáneamente. Los resultados de ensayos previos con el material estándar no podrán ser comparados con validez con resultados de ensayos más recientes.

NOTA : Esta simple prueba de significación no es suficiente cuando se hacen un gran número de comparaciones. Como el ensayo está basado en el 95 % de los límites de confianza, como promedio una comparación de cada veinte resulta en conclusiones falsas. Por ejemplo en el caso donde es necesario comparar la toxicidad de 6 compuestos dispersantes de petróleo, el número de comparaciones que se deben realizar es 15, aun así existe la posibilidad de que se obtengan falsas conclusiones. En estos casos es necesario recurrir a otras pruebas de significación como la prueba Student Newman-Keuls. Esta prueba es descrita en detalle por Reish y Oshida (ver Referencias, sección 2).

APENDICE A

Comentarios sobre la determinación de la toxicidad de petróleos y de compuestos dispersantes de petróleo para animales marinos.

Las propiedades físicas y químicas del petróleo y de los compuestos dispersantes del mismo crean dificultades especiales para la determinación de su toxicidad sobre animales acuáticos.

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos cuya composición precisa es a menudo desconocida. Los compuestos dispersantes de petróleo, por otra parte, contienen detergentes disolventes de hidrocarburos y otros compuestos químicos tales como compuestos emulsionantes y de estabilización. El petróleo y los compuestos dispersantes tienen muy baja solubilidad en agua, pero cuando son agitados en ella forman emulsiones que generalmente no son estables, p.ej. las propiedades físicas variarán con el tiempo. En efecto el propósito de los compuestos dispersantes es el de promover la formación y estabilización de emulsiones petróleo-agua. Determinar la toxicidad de estas emulsiones no es tarea simple por varias razones, especialmente si se desea expresar la toxicidad de estos compuestos en términos convencionales tal como la concentración media letal (LC50) en unidades de peso por volumen.

En primer término debemos considerar que la toxicidad de estas emulsiones depende fundamentalmente del tamaño de las gotitas formadas en la emulsión, esto a su vez depende del tipo y la clase de energía aplicada en la agitación de la mezcla para formar la emulsión. En segundo término estas emulsiones son inestables y su toxicidad varía con el tiempo. Finalmente el petróleo y los compuestos dispersantes del mismo contienen fracciones de hidrocarburos ligeros (volátiles) que tienden a evaporarse en un corto plazo. Estos componentes volátiles son generalmente de alta toxicidad y como consecuencia la toxicidad de las emulsiones cambiará rápidamente.

Estos tres factores indican que la determinación precisa de la toxicidad de petróleos y de los compuestos dispersantes del mismo requiere de equipos y procedimientos complejos. Por ejemplo es necesario que la emulsión sea agitada por procesos estándar bien definidos y cuidadosamente controlados ; la agitación se deberá mantener durante el ensayo de toxicidad en forma controlada y sin dañar a los animales usados en el ensayo. Lo ideal es renovar las disoluciones de ensayo frecuentemente y de preferencia por medios automáticos durante el curso del ensayo. El equipo necesario que reúne estas características es difícil de mantener y costoso para instalar.

Es posible a veces obtener resultados con procesos más simples, sin embargo y a menos que se tomen precauciones específicas para superar las dificultades descritas anteriormente y considerando las propiedades físicas y químicas de los petróleos y de los compuestos dispersantes los resultados son de poco valor. Es muy probable que difieran grandemente de los valores verdaderos y por lo tanto son de poco valor práctico.

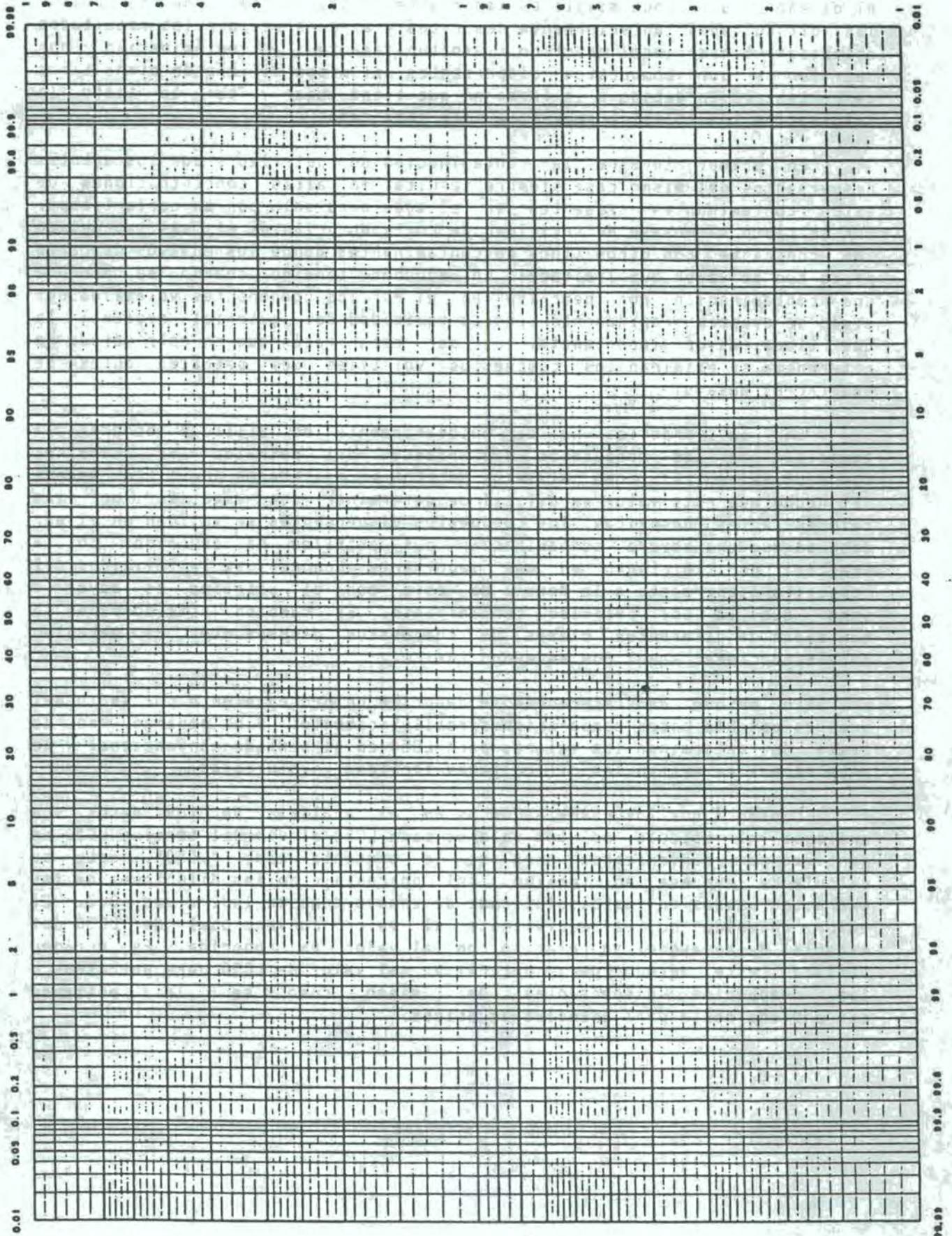
No obstante es necesario contar con algunos métodos para determinar la toxicidad de petróleos y de los compuestos dispersantes del mismo. En el diseño de un método simple es importante considerar la forma de evitar las dificultades anteriormente descritas y asegurarse que los resultados obtenidos tienen uso práctico. Afortunadamente la contaminación por petróleo y por compuestos dispersantes del mismo difiere de otros tipos de contaminación debido a la forma en que tiene lugar y por lo tanto la información toxicológica necesaria para cada caso.

En primer término la contaminación por petróleo y por los agentes dispersantes del mismo casi siempre resulta en altas concentraciones de estos contaminantes presentes en el agua pero solo por un corto tiempo. Por lo tanto el ensayo de toxicidad de corta duración es el más apropiado (en contraste con otros tipos de contaminantes donde los ensayos de corto plazo son de valor muy limitado). En segundo término cuando se produce una contaminación por petróleo en el mar los componentes volátiles del mismo se evaporan rápidamente y es la toxicidad del material residual la que tiene mayor importancia. Es por esta razón que en este método de referencia se eliminan los compuestos volátiles del petróleo antes de empezar el ensayo.

En la práctica no es necesariamente de utilidad conocer la toxicidad de los compuestos dispersantes del petróleo en términos convencionales tal como el valor de LC50 en miligramos por litro. Aparte del hecho que este valor es difícil de determinar con exactitud por las razones antes descritas, los compuestos dispersantes se aplican en el mar después que una severa contaminación por petróleo ha ocurrido. En la práctica por lo tanto es más importante conocer si la toxicidad del compuesto dispersante o la mezcla de éste con el petróleo es mayor o menor que la del petróleo contaminante. Es también útil comparar la toxicidad de diferentes clases de compuestos dispersantes de petróleo para seleccionar aquel que es menos tóxico.

En este método de referencia se describe un procedimiento por medio del cual es posible hacer comparaciones realísticamente. Sin embargo, no se trata de determinar los valores para LC50 en el sentido convencional y de esta manera se evitan las dificultades técnicas involucradas.

Debido a que los pasos seguidos en el análisis de los datos son análogos al cálculo de los valores para LC50 el uso del término LC50 se mantiene por conveniencia pero se le presenta como "LC50". Este se calcula y expresa en términos del porcentaje de las diluciones de los extractos usados en las disoluciones de ensayo como se indica en 8.2. El valor obtenido no es equivalente al valor convencional de LC50 del material de ensayo ni su relación con tal valor es conocida. Es erróneo utilizar este método para determinar el valor de LC50 para petróleos y los compuestos dispersantes del mismo como se le entiende convencionalmente para animales acuáticos.



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