



Guías de laboratorio de toxicología ambiental

Stefany Cobos Joya
Nestor Alejandro Miranda Sambony

Universidad Santo Tomás
Facultad de Ingeniería Ambiental
Bogotá, Colombia
2016

Guías de laboratorio de toxicología ambiental

Stefany Cobos Joya
Nestor Alejandro Miranda Sambony

Proyecto de apoyo a docencia presentado como requisito parcial para optar al título de:
Ingeniero(a) Ambiental

Director:
Ingeniero Ambiental y Sanitario Johan Alexander Álvarez Berrio

Línea de Investigación:
Toxicología Ambiental

Universidad Santo Tomás
Facultad de Ingeniería Ambiental
Bogotá, Colombia
2016

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 1 de 129

Resumen.

Se presentan una serie de guías de laboratorio de toxicología ambiental, a partir de una revisión bibliográfica de las normas expuestas en la EPA (Environmental Protection Agency) por sus siglas en inglés, en la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), y de artículos científicos encontrados en bases de datos como Scopus y Science Direct. Los ensayos de toxicidad se llevan a cabo con las siguientes especies: *Daphnia magna*, *Artemia salina*, *Vibrio fischeri*, Guppy (*Poecilia reticulata*), lombriz de tierra y lenteja de agua (*Lemna minor* y *Lemna valdiviana*). Igualmente se elaboró una guía referente al uso estadístico de la prueba PROBIT para interpretar los resultados de las anteriores guías toxicológicas.

Además, se exponen las medidas de seguridad básicas en el laboratorio. El formato de las guías se basa principalmente en una introducción, materiales y equipos, procedimiento, análisis de resultados, actividades monitor, actividades estudiantes y bibliografía, así como una serie de imágenes que faciliten la comprensión de las diferentes metodologías.

Se planteó la necesidad de contar con guías de laboratorio de toxicología ambiental en la Universidad Santo Tomás con la finalidad de afianzar los conocimientos en la electiva del mismo nombre, y de esta manera, no sólo adquirir bases teóricas sino también prácticas, formando profesionales completos e íntegros para afrontar la vida laboral.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 2 de 129

Contenido

Resumen	1
Introducción	4
Objetivos	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
1. Marco contextual	6
2. Marco teórico	7
2.1. Fuentes del conocimiento toxicológico	7
2.2. Principios de la experimentación toxicológica	8
2.2.1. Es posible reproducir experimentalmente en animales la mayoría de los procesos tóxicos	8
2.2.2. La aplicación a animales de dosis altas de tóxicos es un procedimiento útil para descubrir posibles peligros para el hombre.	8
2.2.3. Es posible extrapolar cuantitativamente a humanos muchos de los efectos tóxicos observados en animales	8
2.2.4. Pueden emplearse determinadas especies animales o vegetales como centinelas o representantes de los efectos tóxicos en otras especies.	9
2.3. Diseño y componentes de los modelos toxicológicos experimentales	9
2.3.1. El sustrato biológico/ especie animal	9
2.3.2. Número y distribución de las unidades experimentales por grupo	10
2.3.3. Selección de las dosis y grupos	11
2.3.4. Elección del tipo de exposición	12
2.3.5. Periodo de exposición	12
2.3.6. Análisis de resultados	13
2.3.7. Condiciones generales	14
2.4. Toxicidad para el medio ambiente	15
3. Marco conceptual	16
4. Desarrollo central	18

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 3 de 129

4.1.	Revisión sistemática.....	18
4.1.1.	Diseño.....	18
4.1.2.	Criterios de exclusión.	24
4.1.3.	Resultados de la búsqueda.	24
4.2.	Impacto social, humanístico y ambiental del proyecto.	26
4.3.	Conclusiones y recomendaciones	27
4.3.1.	Conclusiones.....	27
4.3.2.	Recomendaciones	27
A.	Anexo: Guías de Prácticas de Laboratorio	28
	Bibliografía	123

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 4 de 129

Introducción.

Se presentan las siguientes guías de laboratorio: medidas de seguridad básicas en el laboratorio, métodos de análisis para resultados de toxicidad (PROBIT), test de inmovilización aguda 24h CE₅₀ para *Daphnia magna*, prueba de reproducción para *Daphnia magna*, prueba de toxicidad en *Artemia salina*, prueba de toxicidad por bioluminiscencia en *Vibrio fischeri*, evaluación de la CL₅₀ en el guppy (*Poecilia reticulata*), test de reproducción en lombriz de tierra, y prueba de reproducción en lenteja de agua (*Lemna valvidiana* y *Lemna minor*), con el objetivo de desarrollar algunas de estas prácticas en la electiva de toxicología ambiental, y así afianzar las competencias de los estudiantes.

Así mismo, para el caso de *Daphnia magna* y el guppy *Poecilia reticulata*, se expone un apartado, cuya sustancia de ensayo es agua residual, por lo que se encuentra el protocolo de muestreo y de laboratorio a llevar a cabo por los estudiantes, apoyados por el monitor y el docente, para el desarrollo de la prueba toxicológica.

Para la elaboración de las guías, se realizó una revisión bibliográfica de artículos científicos y protocolos de la OCDE y la EPA; la información encontrada se organizó en bases de datos de Excel, para la posterior selección de las metodologías y concentraciones de la sustancia de ensayo a utilizar en cada una de las prácticas anteriormente mencionadas.

Al finalizar las guías de laboratorio, se concluye principalmente que la Universidad Santo Tomás no cuenta con algunos de los materiales y equipos necesarios para el desarrollo de las pruebas toxicológicas, por lo que se requiere dotar el laboratorio de nuevos implementos, que contribuye en la realización de trabajos de investigación que involucren temáticas en toxicología ambiental.

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 5 de 129

Objetivos.

Objetivo general.

Apoyar la elaboración de las guías de laboratorio de toxicología ambiental para la Universidad Santo Tomás.

Objetivos específicos.

- Realizar una revisión bibliográfica a partir de las normas expuestas en la EPA y la OCDE, y de artículos científicos de los últimos cinco años, elaborando cada guía según las necesidades de Colombia.
- Elaborar el formato de las diferentes guías de laboratorio para cada especie a evaluar y de la prueba estadística PROBIT.
- Plantear los talleres a llevar a cabo por los estudiantes como actividades complementarias, y las labores de los monitores de la asignatura, en las diferentes prácticas de laboratorio.

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 6 de 129

1. Marco contextual

Teniendo en cuenta que la asignatura toxicología ambiental hace parte de la línea de profundización de salud Ambiental, y acorde con lo establecido en el protocolo de la línea en donde se resalta el marco de la Misión Institucional de la Universidad Santo Tomás, inspirada en el pensamiento humanista cristiano de Santo Tomás de Aquino; el desarrollo de las guías de toxicología brinda herramientas para el cumplimiento de uno de los objetivos institucionales que busca garantizar una de las exigencias de la vida humana: el bienestar de las personas.

Para ello permiten la toma de decisiones en temáticas que afectan la calidad de vida a nivel nacional o de las comunidades regionales.

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 7 de 129

2. Marco teórico

2.1. Fuentes del conocimiento toxicológico

La estimación del riesgo tóxico supone un complejo proceso que balancea los riesgos y los beneficios para organismos o poblaciones del empleo de las sustancias. La elaboración de una metodología propia, que se ha exportado a otras áreas solitarias, *confirma a la Toxicología una posición en el rango de las ciencias*. La evaluación de la eficacia y de la seguridad frente al riesgo derivado del uso de sustancias utilizadas como plaguicidas, medicamentos, aditivos, cosméticos o compuestos industriales, o de los lugares que pudieran presentar riesgo por exposición, es una imposición de las legislaciones nacionales y supranacionales para asegurar la protección del hombre y del medio ambiente, y precisa del adecuado conocimiento de sus perspectivas toxicológicas [1].

La experimentación con modelos biológicos, es decir, la utilización del método científico de ensayo y error, aplicando las sustancias sobre seres vivos o tejidos procedentes de ellos, en lo que se denomina Toxicología Experimental. Básicamente, se realiza *in vivo* en animales o vegetales, *in vitro* con fracciones de los mismos, en estudios conjuntos con múltiples especies. Todo ello persigue lo que actualmente se denomina *Toxicología basada en la evidencia*, es decir, en la mayor evidencia que pueda conseguirse [1].

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 8 de 129

2.2. Principios de la experimentación toxicológica.

2.2.1. Es posible reproducir experimentalmente en animales la mayoría de los procesos tóxicos.

Para la mayor parte de los tóxicos es posible encontrar algún modelo animal que permita modelar su acción en los humanos. Es conveniente insistir en que los ensayos de toxicidad no se diseñen para demostrar que un compuesto es seguro, sino para caracterizar los efectos que puede producir [2]. Posteriormente estos datos servirán para caracterizar su riesgo [1].

2.2.2. La aplicación a animales de dosis altas de tóxicos es un procedimiento útil para descubrir posibles peligros para el hombre.

El número de individuos sobre los que se realiza la experimentación está limitado en la práctica en comparación con las amplias poblaciones que estarán expuestas. Por ello, para obtener resultados estadísticamente válidos es preciso emplear dosis suficientemente altas para que los efectos ocurran con la suficiente frecuencia para ser detectados [3]. Lógicamente ello se fundamenta en que existe una correlación directa entre la dosis aplicada y los efectos observados, aunque la pendiente y la forma de la relación dosis-efecto pueden ser distintas para los diferentes tóxicos. Por ello, al aumentar la dosis se incrementan los efectos observados [1].

2.2.3. Es posible extrapolar cuantitativamente a humanos muchos de los efectos tóxicos observados en animales.

Se ha efectuado una amplísima investigación para tratar de determinar la correlación entre la toxicidad animal y la humana, llegándose a la conclusión de que ningún animal, ni siquiera el primate responde a los tóxicos exactamente igual que el hombre. A pesar de ello, la mayoría de los efectos que experimentan los animales de laboratorio por la acción de los xenobióticos los manifiesta también el hombre, y a la inversa [1].

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 9 de 129

2.2.4. Pueden emplearse determinadas especies animales o vegetales como centinelas o representantes de los efectos tóxicos en otras especies.

Para extrapolar los resultados al hombre se procura emplear una especie con similar sensibilidad para cada tipo particular de efecto tóxico, aunque esto es condicionado además por cuestiones de tipo práctico. Sin embargo, en los estudios medio ambientales es imposible evaluar los compuestos en todas las especies existentes, por lo que se seleccionan varias de cada nivel trófico como representantes de grandes grupos de organismos. Las usadas como centinelas suelen escogerse atendiendo a su sensibilidad, disponibilidad y facilidad de mantenimiento y uso. Por ejemplo, dentro de los cladóceros de agua dulce suele emplearse la *Daphnia magna* para compuestos puros y para vertidos. En el caso de aguas marinas se utiliza la *Artemia salina* [1].

2.3. Diseño y componentes de los modelos toxicológicos experimentales

2.3.1. El sustrato biológico/ especie animal

Es el material, generalmente orgánico, vivo o no, sobre el que se aplica el xenobiótico. La selección de la especie animal se realiza atendiendo a criterios de disponibilidad, sensibilidad y similitud [1].

En relación con la disponibilidad o conveniencia, en general se utilizan animales pequeños por razones económicas que condicionan la infraestructura, consumo de alimentos, gasto de producto y eliminación de residuos [1].

Los estudios toxicológicos con plantas están promovidos no solo en interés de los productos fitosanitarios y del conocimiento de la fitotoxicidad de productos de uso agrícola (y sus frecuentes contaminaciones), sino también por la necesidad de conocer el metabolismo, transformación y retención de las sustancias tóxicas por los vegetales de

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 10 de 129

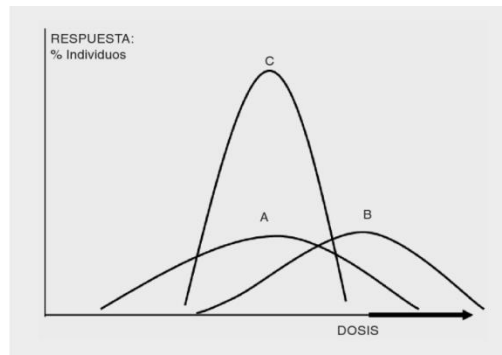
consumo animal o humano, que no pueden superar lo que se conoce como límite máximo de residuos (LMR) [1].

2.3.2. Número y distribución de las unidades experimentales por grupo.

Cada experimento se compone de varias unidades experimentales, como son una jaula de animales, un animal, un frasco de cultivo o un pocillo de una placa de cultivo. En el caso de las placas de cultivo, pueden considerarse como una unidad a los pocillos de una columna con el mismo tratamiento [1].

El tamaño muestral, es decir, el número de unidades experimentales o individuos necesario para cada grupo del experimento, se calcula con métodos estadísticos para usar el menor número posible que asegure la validez estadística de los resultados. En cualquier grupo habrá individuos más y menos sensibles que se distribuirán de forma gaussiana en relación al logaritmo de la dosis [1].

Figura 1. Distribución dosis-respuesta, entre poblaciones diferentes.



Fuente [1].

Cuanto más homogénea sea la población, más homogénea será la respuesta (porcentaje de individuos que experimentan el efecto) a ese compuesto, más alta será la curva y más estrecha su base, por lo que se precisará un número menor de individuos. Por eso se emplean habitualmente animales lo más parecidos posible [1].

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 11 de 129

La figura 1 muestra el comportamiento de tres poblaciones de diferente homogeneidad de respuesta frente a una misma sustancia, al ser la población C más compacta, se requerirá un número menor de animales [1].

Es esencial la aleatorización o asignación al azar de las unidades experimentales a cada grupo de tratamiento. Con ello se minimiza la heterogeneidad que pueda existir entre las unidades experimentales, es decir, las diferencias en respuesta debidas a factores no controlables (ejemplo, animales no consanguíneos) o controlables pero no evitables (ejemplo, sujetos humanos con dietas alimentarias diferentes. En los estudios con animales suele emplearse el diseño de aleatorización completa, que es el indicado cuando se asume que las unidades experimentales son iguales [1].

En todos los experimentos es imprescindible un grupo control o blanco, que tiene un número de animales o unidades igual o superior a los restantes grupos, y suele ser tratado de igual forma que los expuestos, pero no se le administra al compuesto. Un <<control positivo>> es el expuesto a alguna sustancia o procedimiento para provocar el efecto que se quiere estudiar en los grupos tratados. Para evitar sesgos es muy conveniente el trabajo en forma ciega, es decir con muestras codificadas sin que el experimentador conozca su composición [1].

2.3.3. Selección de las dosis y grupos

La selección de las dosis aplicadas a cada grupo experimental ha sido objeto de discusiones en organismos internacionales, sin que exista un consenso adecuado. En cualquier caso, dependerá del tipo de estudio que se desee realizar, siendo enormemente útil la realización previa de ensayos piloto. Las dosis intermedias entre a máxima y la mínima suelen escogerse separándolas geométricamente, usando un factor multiplicador ≤ 2 [1].

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 12 de 129

En los ensayos por dosis repetida, lo ideal es que la dosis menor no produzca toxicidad, pero que sea superior a la exposición esperada en humanos; que la intermedia sea ligeramente toxica; y que la mayor sea claramente toxica pero sin llegar a provocar la muerte a más del 10% de los individuos del grupo [1].

Para cuantificar la toxicidad aguda en exposiciones por vía inhalatoria o en medio acuático, el parámetro más empleado suele ser la DL_{50} y la CL_{50} pero también se utilizan las dosis que provocan un determinado efecto, como DE_{50} o CE_{50} (dosis o concentración efectiva media), muy empleadas en procedimiento *in vitro* [1].

2.3.4. Elección del tipo de exposición

En los ensayos experimentales con animales, la exposición se realiza de acuerdo con el tipo de producto y la posible vía por la que el hombre la pueda absorber. Así, un medicamento oral, cutáneo o parenteral requerirá tales vías de experimentación; un contaminante atmosférico deberá ser estudiado por las vías inhalatoria y cutánea. El sistema más cómodo para administrar el producto es añadirlo a la comida o al a bebida [1].

En las exposiciones en toxicología acuática e *in vitro* suele ser necesaria la disolución de los compuestos no hidrosolubles mediante algún disolvente orgánico, que después se disuelve en el medio de cultivo [1].

2.3.5. Periodo de exposición

Los estudios de toxicidad pueden desarrollarse con una sola administración (toxicidad aguda) o con tratamientos durante periodos cortos (toxicidad subcronica, denominación que, de acuerdo con las directrices de la OCDE, debe sustituirse por la de *toxicidad por dosis repetidas*), medios o largos (toxicidad crónica). Jamás debe olvidarse la observación a largo plazo y la posible inducción de carcinogénesis y teratogénesis, la

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 13 de 129

modificación de la fertilidad y todo lo que abarca las expresiones toxicidad para la reproducción y el desarrollo [1].

En tests agudos acuáticos o con cultivos celulares suelen emplearse periodos que van desde unas pocas horas hasta varios días [1].

2.3.6. Análisis de resultados

Una vez realizado el trabajo experimental es necesario procesar los datos obtenidos. El análisis de los resultados comprende la aplicación a los mismos del análisis estadístico, el análisis de los datos y la interpretación de los resultados [1].

El estudio estadístico es necesario incluso cuando los efectos son evidentes, ya que es preciso tener en cuenta la variabilidad de los resultados para extraer conclusiones. Al mostrar los resultados debe incluirse la magnitud y el intervalo de confianza, desviación estándar para indicar la precisión, y el valor exacto de los valores de probabilidad, en vez de decir $p < 0.05$. La falta de significación estadística no implica que no existan efectos, ya que podría ocurrir que el experimento sea pequeño, o la variabilidad muy grande [1].

Pueden aplicarse [1]:

- **Métodos paramétricos:** más versátiles y útiles, pero tienen condiciones de aplicación muy exigentes. Asumen que las varianzas son iguales, que los residuales siguen una distribución normal y que las observaciones son independientes entre sí.
- **ANOVA:** si concluye que no hay diferencias entre los grupos, el estudio es suficiente. Si se encuentran diferencias (ejemplo, $p < 0.05$), y existen varios grupos, el resultado se *confirma* con un método *post hoc*: Dunnett, Tukey, Fisher, Newman-Keuls.

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 14 de 129

- *Test de la t de student*: no debe emplearse si se comparan más de dos grupos de tratamiento, ya que se pierde potencia y se incrementa la posibilidad de falsos resultados positivos.
- **Pruebas no paramétricas**: de aplicación más general: Mann-Whitney, Kruskal-Wallis y Friedman.

La correcta aplicación de los métodos en toxicología y evaluación del riesgo es fundamental para asegurar la validez de los resultados, y se emplean algunos procedimientos típicamente desarrollados para la investigación toxicológica [1].

2.3.7. Condiciones generales

Antes de comenzar un experimento, es preciso redactar el protocolo detallado de lo que se pretende hacer. Ello facilita enormemente el desarrollo del mismo y la revisión de los resultados, y ahorra la repetición innecesaria de estudios en los que no se tuvieron en cuenta variables importantes [1].

En todo caso debe realizarse una observación previa de los animales, y una selección por pesos. Es necesario mantener a todos en ambiente idéntico y efectuar la administración y observación siempre a las mismas horas, para evitar influencias ambientales. También está reglamentada la temperatura, humedad, renovación de aire, iluminación, y otros muchos aspectos [1].

Finalmente, el experimentador debe estar atento y si aparecen señales de sufrimiento innecesario de los animales, debe solucionarlo, bien corrigiendo el experimento, o si fuera necesario, finalizándolo anticipadamente. Indican que el animal ha entrado en un estado de sufrimiento irreversible que invalida los resultados o no aporta información relevante para el mismo [1].

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 15 de 129

2.4. Toxicidad para el medio ambiente

En cuanto a los efectos tóxicos sobre el medio ambiente, cabe distinguir si el objeto del estudio son grupos o poblaciones aisladas (materia de la Toxicología ambiental) o si se pretende el estudio global de los efectos sobre los ecosistemas (materia de la Ecotoxicología) [1].

La profundidad y el número de los estudios dependen del tipo de producto y de su producción prevista. Son mucho más limitados para medicamentos que para vertidos o compuestos industriales o, sobre todo, para plaguicidas [1].

Para la evaluación en no mamíferos destacan los siguientes procedimientos de toxicidad aguda en pez, en *Daphnia magna* y en alga, que permiten en gran parte la clasificación de las sustancias. En una segunda etapa suele evaluarse la toxicidad prolongada, los efectos en etapas iniciales en embriones de peces, en el crecimiento de plantas terrestres y en la reproducción en *Daphnia magna*. También se estudia la toxicidad y reproducción en lombriz de tierra, la toxicidad en *Chironomid*, la reproducción en *Enchytraedae*, los microorganismos del suelo, los efectos en abejas y la toxicidad y alteración de la reproducción en aves [1].

Algunas normativas para la evaluación de vertidos, sobre todo los de la Agencia de Protección Ambiental norteamericana, incluyen otros muchos procedimientos con organismos como *Daphnia pulex*, erizos, rotíferos, etc.. También se utiliza un ensayo de inhibición de la luminiscencia en la bacteria *Vibrio fischeri* [1].

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 16 de 129

3. Marco conceptual

Bioluminiscencia: fenómeno en donde los organismos vivos emiten luz como resultado de procesos enzimáticos ligados a la respiración [4].

Dosis: la cantidad de una sustancia a la que se expone una persona durante un período de tiempo. La dosis es una medida de la exposición. Se expresa corrientemente en miligramos (cantidad) por kilo (medida del peso corporal) por día (medida del tiempo) cuando la gente come o bebe agua, comida o suelo contaminados. En general, cuanto mayor es la dosis, mayor es la probabilidad de un efecto [5] .

Efecto tóxico: se define como efecto tóxico o respuesta tóxica, cualquier desviación del funcionamiento normal del organismo que ha sido producida por la exposición a sustancias tóxicas [6].

Efecto tóxico agudo: es aquel que es inducido y observado en un período corto, que puede ser de 5 a 30 minutos para el caso de *Vibrio fischeri*. Este período de respuesta óptimo está definido a partir de estudios previos basados en el conocimiento de biología bacteriana, en conjunto con la química de los compuestos tóxicos. Se ha observado la existencia de procesos que facilitan el paso de los compuestos tóxicos al interior de las células bacterianas, siendo más ágiles y rápidos los relacionados a compuestos orgánicos que los de incorporación de elementos metálicos [4].

Efipio: significa un huevo en reposo que se desarrolla bajo el caparazón en respuesta a condiciones de estrés en *Daphnia* [7].

Especies inmóviles: aquellas especies que no pueden nadar dentro de los 15 segundos después de una agitación suave del recipiente de ensayo [8].

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 17 de 129

Fitotoxicidad: ésta se produce provocando cualquier alteración negativa del metabolismo o de la estructura de la planta, originada por la acción de un elemento ajeno, o producido por la misma. Pueden haber diferentes tipos de fitotoxicidad causados por plaguicidas, que podrían agruparse, según en qué parte de la planta se produzcan, en que momento vegetativo, que tipo de elemento es el causante, y de quién es la responsabilidad [9].

Liofilizado: congelado y deshidratado al vacío; es aplicado a la bacteria *Vibrio fischeri* usada en la prueba Microtox, la cual se comercializa [4].

LOEC (la más baja concentración sin efecto observado): es la concentración más baja que tiene un efecto adverso en los organismos de prueba, y es la concentración de ensayo inmediatamente por encima de la NOEC [7].

NOEC (concentración sin efecto observado): significa la más alta concentración que no tenga un efecto adverso en los organismos de prueba, y es la concentración de ensayo inmediatamente debajo de la LOEC [7].

Medidas fitosanitarias: las medidas sanitarias y fitosanitarias hacen referencia a mecanismos que garantizan que se suministren a los consumidores de un país alimentos inocuos [10].

Toxicología ambiental: la toxicología ambiental, le da una mayor importancia a los efectos dañinos producidos en el medio ambiente, sin dejar de destacar las alteraciones en los seres humanos, ya que de la interacción del hombre con su entorno también se derivan daños a la salud humana. La toxicología ambiental interactúa con diferentes sectores de la sociedad para aportar en conjunto a la comprensión del ambiente y al manejo adecuado de los recursos. Sectores como el de la comunidad científica, el industrial, las instituciones de control y el público en general [11].

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 18 de 129

Tóxico: Sustancia que puede producir algún efecto nocivo sobre un ser vivo, alterando sus equilibrios vitales [12].

Xenobiótico: un xenobiótico es un compuesto ajeno al cuerpo, pero que interactúa con un organismo que no es uno de sus componentes naturales [1,13].

24h CE₅₀: es la concentración estimada para inmovilizar el 50% de las especies de *Daphnia magna*, después de 24 horas de exposición [8].

4. Desarrollo central

4.1. Revisión sistemática

4.1.1. Diseño.

Se realizó una revisión bibliográfica de artículos científicos en las bases de datos Scopus y Sciente Direct, de cada una de los organismos de estudio: *Daphnia magna*, *Artemia salina*, *Vibrio fischeri*, Guppy (*Poecilia reticulata*), lombriz de tierra, y lenteja de agua (*Lemna minor* y *Lemna valdiviana*); manejando como criterio de búsqueda estudios toxicológicos que se hubiesen realizado con estas especies, y cuyo año de publicación fuese de los últimos cinco años, en su mayoría esto fue posible, aunque algunos artículos tienen una fecha de publicación del 2004 y 2005. Es importante resaltar que la búsqueda fue limitada a los idiomas inglés y español.

Así mismo, se debió realizar una revisión bibliográfica de pruebas toxicológicas en *Daphnia magna* y el guppy *Poecilia reticulata*, cuya sustancia de ensayo fuera agua residual, para la elaboración de una guía donde se expone el protocolo de muestreo y de laboratorio a llevar a cabo por los estudiantes, apoyados por el monitor y el docente, para el desarrollo de la práctica.

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



A partir de esta revisión, se consideró de cada artículo el resumen, introducción y metodología. En una base de datos de Excel se organizó la información de tal manera que facilitará la selección de la metodología a implementar en las guías de laboratorio de toxicología ambiental. El criterio de selección de la metodología fue aquella que fuese similar en la mayoría de la información revisada.

A continuación se expone la tabla que se elaboró para el desarrollo de esta actividad para cada uno de los organismos, aunque en el ejemplo solo se expone para *Daphnia magna*:

Tabla 1. Selección de las metodologías.

Fuente. Autores.

<i>Daphnia magna</i>	Año	Sustrato biológico - Especie animal	Número y distribución de las unidades experimentales por grupo	Aleatorización	Grupos Control	Selección de las dosis y grupos	Vías de exposición	Observaciones
Artículo 1								
Artículo 2								
Artículo 3								
Artículo 4								
Artículo 5								

Así mismo, para la selección de la sustancia de ensayo y sus concentraciones, se elaboró una nueva tabla como se muestra a continuación, igualmente, para cada una de las especies de estudio.

El criterio tenido en cuenta para la selección de la sustancia de ensayo y sus concentraciones, fue aquella sustancia que pudiese adquirirse fácilmente, la obtención de las concentraciones no requiriera de una metodología complicada, y finalmente, enriqueciera el desarrollo de la práctica.

Tabla 2. Selección de la sustancia de ensayo y de las concentraciones.

Artículo	Año	Concentraciones
<i>Daphnia magna</i>		
1		
2		
3		
<i>Artemia salina</i>		
1		
2		
3		

Fuente. Autores.

En la metodología de algunos artículos se encontraba las referencias de los protocolos de la OCDE y la EPA que se habían tenido en cuenta para el desarrollo de la prueba toxicológica, por lo que se revisó la referencia y se buscaron los protocolos, que también se tuvieron en cuenta para la elaboración de las guías de laboratorio. Algunos protocolos son los siguientes:

- OCDE 211. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. *Daphnia magna* Reproduction Test.
- EPA. Ecological Effects Test Guidelines. Daphnid Chronic Toxicity Test.
- OCDE 202. OECD Guideline for Testing of Chemicals. "*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test".
- OCDE 222. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/ Eisenia andrei*).

A continuación se exponen algunos de los artículos científicos revisados, el año y la respectiva revista.

Tabla 3. *Daphnia magna*.

<i>Daphnia magna</i>	Año	Revista
Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to <i>Daphnia magna</i> assesmed at two temperatures	2013	Environmental Toxicology and Pharmacology
Integrated analysis of the ecotoxicological and genotoxic effects of the antimicrobial peptide melittin on <i>Daphnia magna</i> and <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	2015	Environmental Pollution

Fuente. Autores.

Tabla 4. *Artemia salina*.

<i>Artemia salina</i>	Año	Revista
Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on <i>Artemia salina</i> : assessment of nanoparticle aggregation, accumulation and toxicity	2013	Environmental Monitoring and Assessment
Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of Methanol Extract of Mentha Spicata L (Lamiaceae)	2014	Tropical Journal of Pharmaceutical Research

Fuente. Autores.

Tabla 5. *Vibrio fischeri*.

<i>Vibrio fischeri</i>	Año	Revista
Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO ₂ to bacteria <i>Vibrio fischeri</i> and crustaceans <i>Daphnia magna</i> and <i>Thamnocephalus platyurus</i>	2008	Chemosphere
Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using <i>Daphnia magna</i> and <i>Vibrio fischeri</i>	2014	Science of the Total Environment

Fuente. Autores.

Tabla 6. Guppy (*Poecilia reticulata*).

Guppy (<i>Poecilia reticulata</i>)	Año	Revista
Acute toxicity of alpha-cypermethrin to guppy (<i>Poecilia reticulata</i> , Pallas, 1859)	2004	Chemosphere
Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos-methyl on guppy <i>Poecilia reticulata</i>	2005	Chemosphere

Fuente. Autores.

Tabla 7. Lombriz de tierra.

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



Lombriz de tierra	Año	Revista
Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, <i>Eisenia fetida</i>	2012	Ecotoxicology and Environmental Safety
Earthworm bioassays and seedling emergence for monitoring toxicity, aging and bioaccumulation of anthropogenic waste indicator compounds in biosolids-amended soil	2012	Science of the Total Environment

Fuente. Autores.

Tabla 8. Lenteja de agua.

Lenteja de agua	Año	Revista
A novel bioassay using root re-growth in <i>Lemna</i>	2013	Aquatic Toxicology
Ecotoxicological effects evoked in hydrophytes by leachates of invasive <i>Acer negundo</i> and autochthonous <i>Alnus glutinosa</i> fallen off leaves during their microbial decomposition	2013	Environmental Pollution

Fuente. Autores.

Por otro lado, para mejorar el contenido de las metodologías de las diferentes guías de laboratorio, se realizó una búsqueda de imágenes y definiciones, cuya información debía ser clara y fiable.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 24 de 129

4.1.2. Criterios de exclusión.

- Aquellos artículos científicos cuya fecha de publicación estuviesen en una fecha inferior al año 2000.
- Aquellos artículos científicos que no tuvieran como mínimo la siguiente estructura: resumen, introducción, materiales y métodos, resultados y discusión, conclusiones y referencias.
- Aquellos artículos científicos donde no se evidenciara la revista, número y/o volumen, en su contenido.
- Aquellos artículos científicos cuyo idioma no fuera inglés o español.

4.1.3. Resultados de la búsqueda.

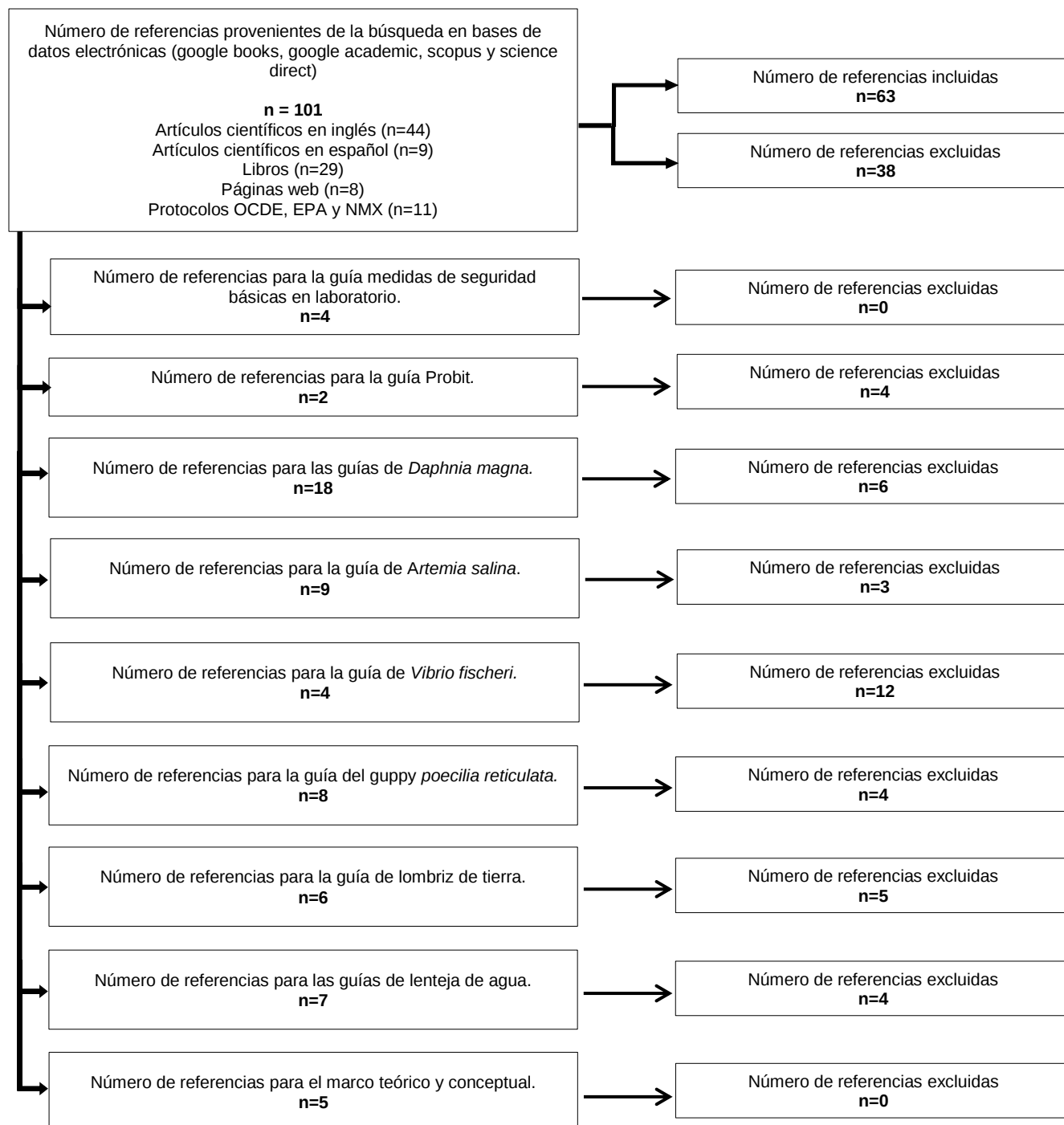
En la figura 2 se expone el diagrama de flujo de los resultados de la búsqueda, donde se muestra claramente, la cantidad de referencias revisadas y aquellas que se excluyeron. En primera instancia se presenta la información de manera general, y posteriormente la información revisada y excluida por cada especie, resaltando que la información tenida en cuenta para el desarrollo de las guías de laboratorio, fue aquella cuya metodología fuera similar. Además, se presenta la revisión para el desarrollo de la guía de medidas de seguridad básicas en el laboratorio, la guía prohibit y, para el marco teórico y conceptual.

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



Figura 2. Diagrama de flujo de los resultados de la búsqueda.



Fuente. Autores.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 26 de 129

4.2. Impacto social, humanístico y ambiental del proyecto.

Las guías de laboratorio de la asignatura toxicología ambiental, constituyen un paso fundamental en el afianzamiento por parte de los estudiantes de los conceptos teóricos desarrollados en la asignatura, de esta manera es posible reforzar las competencias de análisis e interpretación de la información, y la aplicación de las técnicas expuestas en cada una de las prácticas. Además promueven y permiten la ejecución de estudios de investigación, con miras a publicaciones científicas y desarrollo de trabajos de grado, beneficiando tanto a la facultad como a la Universidad.

En cuanto al impacto ambiental de las guías presentadas, las pruebas toxicológicas son herramientas en la evaluación de sustancias contaminantes, que permiten la determinación de aspectos e impactos ambientales en diferentes recursos, y el análisis de los efectos que pueden tener las sustancias tóxicas tanto en el ambiente y la salud de la población; en el marco de la salud ambiental.

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 27 de 129

4.3. Conclusiones y recomendaciones

4.3.1. Conclusiones

Se concluye de la prueba de toxicidad por bioluminiscencia en *Vibrio fischeri*, que su desarrollo se dificulta debido a la complejidad de su metodología, se requiere que dicha bacteria de estudio se encuentre en un estado de liofilización, y además es necesario contar con el equipo Microtox para la ejecución de la misma.

Se evidencia que la Universidad Santo Tomás no cuenta con algunos de los materiales y equipos de laboratorio necesarios para el desarrollo de los diferentes ensayos toxicológicos presentados.

Para el desarrollo de los ensayos toxicológicos expuestos en las diferentes guías de laboratorio, es necesario de un conocimiento previo en toxicología ambiental por parte de los estudiantes, que faciliten el manejo de las sustancias de ensayo, la manipulación de las especies de estudio, y el análisis de resultados.

4.3.2. Recomendaciones

Se recomienda que el laboratorio de la Universidad Santo Tomás cuente con los materiales y equipos necesarios para el desarrollo de las guías de toxicología ambiental, que fortalezcan las competencias de análisis e interpretación de resultados, y aplicación de las diferentes técnicas expuestas en las guías, al poder desarrollar los estudios de investigación de manera exitosa.

El docente, el monitor y los estudiantes deben tener en cuenta cada uno de los aspectos expuestos en la guía “Medidas de seguridad básicas en el laboratorio”, donde se presenta información referente a la disposición de los residuos, las normas generales del trabajo en laboratorio, los equipos de protección personal individual, normas para la utilización de productos químicos, manipulación de microorganismos y procedimientos de emergencia.

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 28 de 129

A. Anexo: Guías de Prácticas de Laboratorio

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

INGENIERÍA AMBIENTAL
UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

Guía de Prácticas de Laboratorio

Stefany Cobos Joya
Estudiante de Ingeniería Ambiental

Néstor Alejandro Miranda Sambony
Estudiante de Ingeniería Ambiental

Johan Alexander Álvarez Berrio
Ingeniero Ambiental y Sanitario

Bogotá
2015



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 30 de 129

Lista de prácticas

	Pág.
Métodos de análisis para resultados de toxicidad.	38
Test de inmovilización aguda 24h CE ₅₀ para <i>Daphnia magna</i>	46
Prueba de reproducción para <i>Daphnia magna</i>	52
Prueba de toxicidad en <i>Artemia salina</i>	68
Prueba de toxicidad por bioluminiscencia en <i>Vibrio fischeri</i>	75
Evaluación de la CL ₅₀ en el guppy <i>Poecilia reticulata</i>	87
Test de reproducción en lombriz de tierra	95
Prueba de toxicidad en lenteja de agua (<i>Lemna valdiviana</i>)	106
Prueba de toxicidad en lenteja de agua (<i>Lemna minor</i>).....	117

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 31 de 129

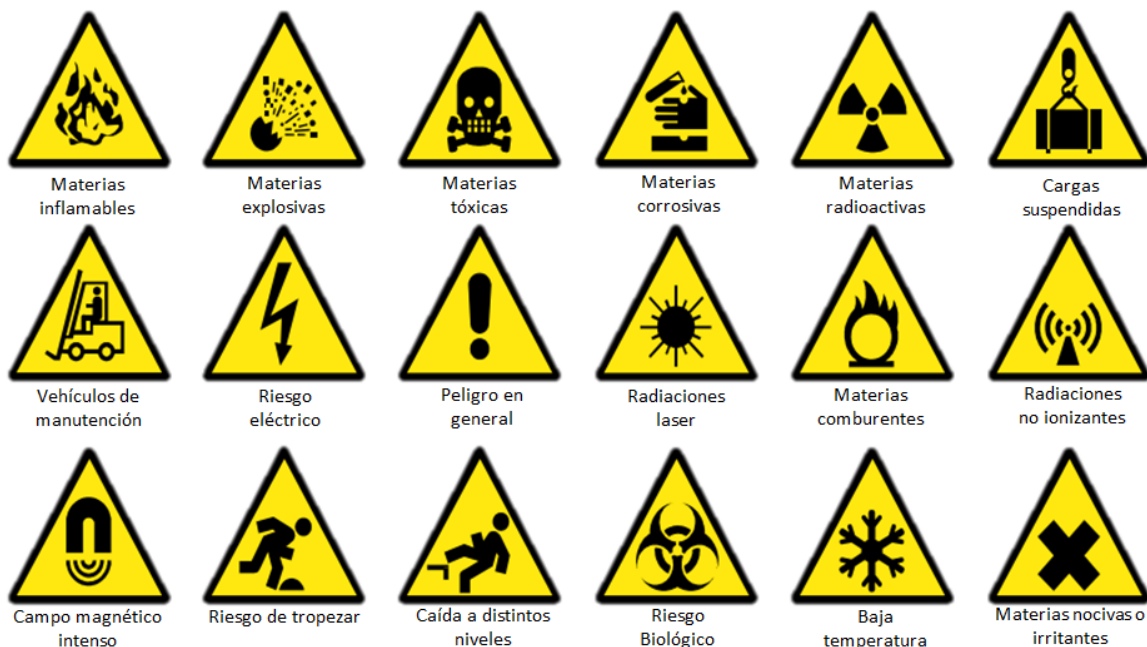
Medidas de seguridad básicas en el laboratorio

Normas generales.

- Durante la estancia en el laboratorio el alumno deberá llevar obligatoriamente gafas de seguridad y bata.
- El pelo largo debe llevarse recogido.
- Está terminantemente prohibido fumar o consumir alimentos o bebidas en el laboratorio.
- Hay que lavarse las manos y quitarse la bata antes de salir del laboratorio.
- Mantener abrochadas las batas.
- No llevar pulseras, collares, mangas anchas ni prendas sueltas que puedan engancharse en montajes, equipos o máquinas.
- Utilizar siempre gradillas y soportes.
- Recoger materiales, reactivos, equipo, etc., al terminar el trabajo.
- Mantener las mesas limpias y sin productos, libros, cajas o accesorios innecesarios para el trabajo que se está realizando.
- El laboratorio debe mantenerse ordenado y en elevado estado de limpieza. Se debe recoger inmediatamente todos los vertidos que ocurran, por pequeños que sean.
- Al finalizar la sesión de laboratorio recoger y guardar los materiales, reactivos y equipos utilizados para evitar su acumulación fuera de los lugares específicos, y asegurarse de la desconexión de los aparatos, agua corriente, gases, etc.

A continuación se exponen las señales de advertencia.

Figura 1. Señales de advertencia [2].



Equipos de protección individual.

- **Protección de las manos:** guantes para manipulación de sustancias corrosivas, irritantes, de elevada toxicidad o de elevado poder de penetración a través de la piel. Suelen utilizarse guantes de látex.
- **Protección de los ojos:** es recomendable la utilización permanente en el laboratorio de gafas de protección, que se hace imprescindible cuando hay riesgo de salpicaduras, protección o explosión.
- **Protección respiratoria:** aparatos filtrantes de protección respiratoria que protejan contra aerosoles y contra gases irritantes, peligrosos, tóxicos o radiotóxicos. Suelen utilizarse tapabocas.

A continuación se exponen las señales de obligación.

Figura 2. Señales de obligación [2].



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 34 de 129

Normas para la utilización de productos químicos.

- Evitar el contacto de los productos químicos con la piel.
- Para detectar el olor de una sustancia, no se debe colocar la cara directamente sobre el recipiente, utilizando la mano abierta como pantalla, es posible hacer llegar una pequeña cantidad de vapor hasta la nariz. Los frascos deben cerrarse inmediatamente después de su uso.
- En la preparación de disoluciones debe agitarse de modo suave y controlado para evitar salpicaduras.
- Antes de utilizar cualquier producto, los alumnos deben fijarse en los pictogramas de seguridad de la etiqueta, con el fin de tomar las medidas preventivas oportunas.
- En principio, si no se tiene otra información fiable, se debe suponer que todos los productos químicos son tóxicos, y que todos los disolventes orgánicos son inflamables debiendo mantenerlos alejados de las llamas.
- Obligatoriamente se debe leer la etiqueta o consultar las fichas de seguridad de los reactivos antes de utilizarlos por primera vez.
- Se deben etiquetar adecuadamente los frascos y recipientes a los que se haya transvasado algún producto o donde se hayan preparado mezclas, identificando su contenido, a quien pertenece y la información sobre su peligrosidad.
- No probar los productos químicos.
- Como norma higiénica básica, los alumnos deben lavarse las manos al entrar y al salir del laboratorio y siempre que haya habido contacto con algún producto químico.

A continuación se exponen los pictogramas de seguridad de las etiquetas de los reactivos.

Figura 3. Pictogramas de seguridad de la etiqueta [2].



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 36 de 129

Observaciones.

- Debe revisarse el material de vidrio para comprobar posibles fisuras.
- Los productos químicos de desecho se verterán sobre los recipientes dispuestos en el laboratorio para recogida de residuos (ácidos, bases, disolventes).
- La disposición de los residuos será acorde a los procedimientos con los que cuenten los laboratorios de la universidad para dicha actividad. Esto aplica para los residuos de las diferentes prácticas posteriormente expuestas.

Manipulación de microorganismos.

- Todo el material utilizado debe ser desinfectado o esterilizado correctamente, siguiendo procedimientos específicos.
- Se debe disponer de un almacén de seguridad para agentes biológicos.
- Todos los productos deben etiquetarse y guardarse en lugar seguro una vez finalizado el trabajo en el laboratorio.

Procedimientos de emergencia.

- En caso de tener que evacuar el laboratorio, cerrar la llave del gas y salir de forma ordenada
- Localizar al iniciar la sesión de prácticas los diferentes equipos de emergencia en el correspondiente laboratorio: duchas y lavajos, extintores, mantas ignífugas, botiquín, absorbente para derrames y salida de emergencia.
- En caso de vertidos accidentales, actuar rápidamente para su absorción, neutralización o eliminación. La actuación concreta a seguir para cada producto debe fijarse mediante la consulta a las fichas de seguridad de los productos y fijarse durante la planificación de las prácticas. Algunos ejemplos:
 - Líquidos inflamables: absorber con carbón activo o productos específicos.
 - Ácidos: neutralizar con bicarbonato.
 - Bases: neutralizar con bicarbonato.
- En caso de salpicaduras en piel y ojos, lavarse con abundante agua y acudir al médico inmediatamente.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 37 de 129

- En caso de ingestión, si es un ácido, beber solución de bicarbonato. Si es una base, tomar bebidas ácidas. Se debe disponer de información sobre los productos que se manipulan consultando sus fichas de seguridad o a un servicio de información toxicológica cuando sea posible. Si es necesario, acudir al médico con una etiqueta del producto.
- En caso de incendio, dar la alarma inmediatamente, apagar los pequeños fuegos tapándolos, sin utilizar agua, escoger el tipo de extintor adecuado, consultando el modo de empleo. Si se evacua el laboratorio, cerrar las puertas al salir.

Actividades de laboratorio.

- **Diagramas de flujo:** se entrega antes de iniciar la práctica de laboratorio, este diagrama debe explicar la metodología a llevar a cabo durante el desarrollo de la práctica.
- **Informe de laboratorio:** este debe contener resultados (como imágenes y tablas), análisis de resultados, donde se discute el trabajo de laboratorio, conclusiones, y la solución del cuestionario que fortalece los temas tratados en cada práctica. Debe referenciarse en IEEE.

Bibliografía.

- [1] Comisión Seguridad Laboratorios , Medidas de seguridad básicas en el laboratorio, España: Universidad de Valencia; Facultad de Química, 2007.
- [2] Universidad de Castilla - La Mancha , Guia de seguridad en laboratorios, España: Facultad de Ciencias Químicas .
- [3] Universidad de Sevilla , Normas de seguridad en los laboratorios químicos, España: Departamento de Química Orgánica , 2012.
- [4] Mutua de Accidentes de Trabajo y Enfermedades Profesionales de la Seguridad Social Número 61 , Manual de Seguridad y Salud en Laboratorios, España: FREMAP, 2003.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 38 de 129

Práctica 1.

Métodos de análisis para resultados de toxicidad.

Método Probit.

El Probit se basa en la cuantificación probabilística de la vulnerabilidad, ante efectos físicos de una magnitud determinada que se suponen conocidos. Dicho método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas, para estimar las consecuencias desfavorables sobre la población u otros elementos vulnerables a los fenómenos físicos peligrosos [2].

El método de análisis Probit permite estimar la CL_{50} , ajustando los datos de mortalidad mediante una técnica de probabilidad, para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancias. El porcentaje de organismos afectados o muertos por la acción tóxica de una sustancia se transforma a unidades Probit [2].

Una de las restricciones del método es que para el cálculo de la CL_{50} deben obtenerse valores intermedios entre 0 y 100% de mortalidad [2].

Análisis Probit.

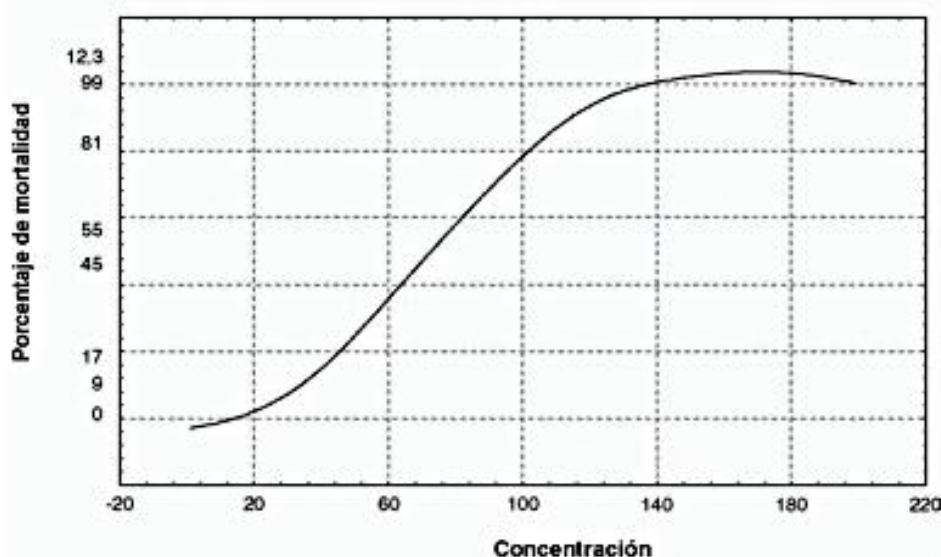
Al realizar las pruebas de toxicidad, se obtienen las siguientes variables para el cálculo de la CL_{50} :

- Concentración de la sustancia o dosis (d).
- Número de individuos (n).
- Número de organismos muertos o afectados (r).
- Porcentaje de efecto (p).

$$p = \left(\frac{r}{n} \right) \times 100$$

La representación gráfica de p vs. d , o relación dosis-respuesta, genera una curva parabólica que muchas veces presenta dificultades en la construcción de un modelo lineal. Una forma de abordar este problema es transformando d a una escala logarítmica ($X = \log_{10}(d)$), lo cual mostrará una relación dosis-respuesta de forma S o sigmoidea normal, como se muestra en la figura 1, para obtener la distribución de p vs. X que será de tipo normal [1,2].

Figura 1: Relación dosis-respuesta [1].



Posteriormente, mediante las tablas de Probit se transforma p (porcentaje de efecto) a unidades Probit (buscando en una tabla de distribución normal el valor de z correspondiente a una probabilidad acumulada igual a p , y sumándole a continuación cinco unidades), se obtiene una distribución de puntos en un sistema bivariado de tipo lineal, los cuales se procesan según un análisis de regresión típico. Vale la pena enfatizar que el Probit es una transformación sobre la tasa de efecto (p), y la ecuación generada es de la forma [2]:

$$Y = a + bx$$

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 40 de 129

Donde,

Y (expresado en unidades Probit) = $z + 5$

z = Variable normal estándar = z_0 tal que la Prob ($z \leq z_0$) = p

a y b son los estimadores de los parámetros de la recta de regresión

Así, cuando $p = 50\%$ entonces $y = 5$, por lo tanto:

$$X_5 = \log_{10} CL_{50}, \text{ entonces } CL_{50} = 10^5$$

El procedimiento Probit permite encontrar estimadores m-verosímiles de parámetros de regresión y de tasas naturales (por ejemplo, tasas de mortalidad) de respuesta para ensayos biológicos, analizando porcentajes de efecto vs. dosis dentro del marco de la regresión [2].

Ejemplo de cálculo simplificado de la CL_{50} por el método Probit, a partir de los resultados obtenidos de un ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*.

Para el cálculo de la CE_{50} o CL_{50} por este método es necesario contar, por lo menos, con dos porcentajes intermedios del efecto esperado (valores entre 0 y 100%). Con los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda de efluentes con *D. magna* se construye la tabla 1, con los siguientes datos [1]:

- Concentración de la sustancia ensayada (en %).
- Logaritmo en base 10 de las anteriores concentraciones (x).
- Número de organismos en cada concentración (N).
- Número de organismos muertos en cada concentración (r).
- Porcentaje de mortalidad en cada concentración (P).
- Probit empírico (PE).
- Probit esperado o calculado (Y).

Los cinco primeros resultados corresponden a datos experimentales; el Probit empírico se obtiene de la tabla 2 con el porcentaje de mortalidad observada en cada una de las concentraciones [1].

Tabla 1. Ejemplo de cálculo de la CL_{50} por el método Probit [1].

Concentración del agente tóxico (%)	$\log_{10}$ de la concentración (x)	Núm. de organismos (N)	Núm. de muertos (n)	Porcentaje de mortalidad (P)	Probit empírico (PE)	Probit calculado (Y)
100	2,0	20	15	75	5,67	5,53
50	1,7	20	9	45	4,87	4,96
25	1,4	20	5	25	4,33	4,40
12,5	1,1	20	2	10	3,72	3,84
6,25	0,8	20	1	5	3,36	3,27

Tabla 2. Relación entre el Probit empírico y el porcentaje de mortalidad [1].

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99 ^a	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	9,09

^a Valores entre 99.0 y 99.9.

A partir de estos datos se elabora una gráfica en papel cuadrículado, colocando en el eje x el logaritmo de las concentraciones y en el eje Y el Probit empírico (ver figura 2), y se ajusta la recta a través de estos puntos. En el gráfico se traza una línea a partir del Probit 5.0 hasta cortar la línea trazada; el valor correspondiente en el eje x se denomina m y el antilogaritmo de este valor corresponderá a la CE_{50} o CL_{50} . En este ejemplo, $m = 1.72$, por tanto, $CL_{50} = 52.5$ miligramos por litro [1].

Para el cálculo del Probit esperado o calculado, debe hallarse el valor de S correspondiente a la tasa de incremento del log de la concentración (x) por unidad de incremento del Probit [1].

En la recta trazada se calcula la pendiente, tomando el porcentaje donde se halló el mayor y el menor efecto, así como los probits correspondientes a estos valores. En el ejemplo [1]:

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 42 de 129

$$x_m = 0.8$$

$$PE = 3.30$$

$$x_M = 2.0$$

$$PE = 5.55$$

$$Si: S = (X - x) / (PE - PE)$$

Siendo:

x_M = mayor concentración.

x_m = menor concentración.

PE = Probit empírico correspondiente a la mayor concentración.

PE = Probit empírico correspondiente a la menor concentración.

Para el ejemplo será:

$$S = (2.0 - 0.8) / (5.55 - 3.30)$$

$$S = 0.533$$

Así, los valores del Probit esperado o calculado (Y) para cada concentración podrán ser calculados utilizando la siguiente expresión [1]:

$$Y = 5 + \frac{\{(x - m)\}}{S}$$

Una vez calculados se colocan en la columna correspondiente de la tabla 2 [1].

La prueba de hipótesis utilizada para establecer la asociación entre la concentración de la sustancia tóxica y la respuesta en unidades probit es la prueba de Chi-cuadrado (X^2). Los datos para el cálculo de este valor se colocan en una tabla de la siguiente forma (ver tabla 3) [1]:

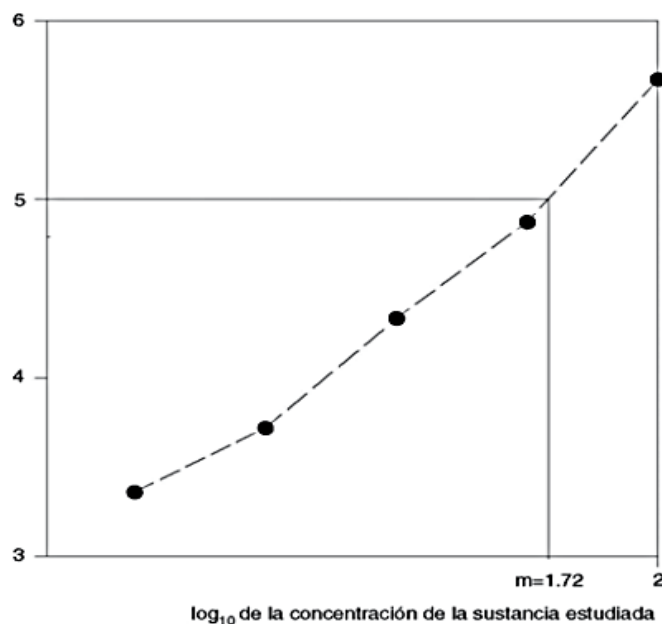
- Concentración de la sustancia estudiada (%).
- Logaritmo decimal de la concentración (x).
- Probit calculado o esperado (Y).
- Número de organismos (N).
- Mortalidad observada (r).
- Porcentaje de efecto esperado (P').

Los cinco primeros datos se obtienen de la tabla 1 y el último dato de la tabla 2, utilizando los valores de Y. Con los valores obtenidos se construye la tabla 3 dividiendo entre 100 [1].

Tabla 3. Determinación del Chi-cuadrado (X^2) [1].

Concentración de la sustancia tóxica (%)	$\log_{10}$ de la concentración (x)	Probit calculado (Y)	Porcentaje de efecto esperado (P')	Núm. de organismos (N)	Núm. de muertos (r)	Mortalidad esperada (NP')	Desviación (r - NP')	Contribuc. al X^2 $\frac{(r - NP')^2}{NP' (1 - P')}$
100	2,0	5,53	0,705	20	15	14,1	0,9	0,19
50	1,7	4,96	0,485	20	9	9,7	-0,7	0,09
25	1,4	4,40	0,275	20	5	5,5	-0,5	0,06
12,5	1,1	3,84	0,125	20	2	2,5	-0,5	0,11
6,25	0,8	3,27	0,045	20	1	0,9	0,1	0,01
								0,48

Figura 2. Representación gráfica del cálculo de la CL₅₀ [1].



La mortalidad esperada (NP') se calcula multiplicando el número de organismos en cada prueba (N) por el porcentaje de efecto esperado (P') [1].

El cálculo de la desviación de la mortalidad se obtiene hallando la diferencia entre la mortalidad observada y la esperada [1].

La contribución al Chi-cuadrado de cada uno de los valores se calcula [1]:

$$(r - NP')^2 / NP' (1 - P')$$

Y para el cálculo de los grados de libertad (n) [1]:

$$N = K - 2$$

donde K es el número de concentraciones utilizadas; en el ejemplo será [1]:

$$n = 5 - 2$$

$$n = 3$$

En la tabla 4 se determina el valor de χ^2 para tres grados de libertad. En el ejemplo, el valor obtenido es 7.82; al compararlo con el valor obtenido en la tabla, se observa que [1]:

$$7.82 > 0.482$$

Por lo tanto, la recta está bien ajustada; en caso contrario, trazar nuevamente la recta y volver a calcular el Chi cuadrado [1].

Tabla 4. Valores de χ^2 para una P = 0.05 [1].

Grados de libertad (n)	χ^2
1	3,34
2	5,99
3	7,82
4	9,49
5	11,4
6	12,6
7	14,4
8	15,5
9	16,9
10	18,8

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 45 de 129

Bibliografía.

- [1] G. Castillo Morales, Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones, México: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo , 2004.
- [2] C. M. Gamez Rojas y E. J. Ramirez Riveros , Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del herbicida Roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*, Bogotá: Universidad de la Salle; Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, 2008.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 46 de 129

Práctica 2.

Test de inmovilización aguda 24h CE₅₀ para *Daphnia magna*

Introducción.

La preocupación por la presencia y la detección de agentes tóxicos en los ecosistemas aumentó de manera importante en los últimos años, como consecuencia de la síntesis de nuevas sustancias que se liberan en el medio ambiente, siendo imposible evitar la exposición a éstas [1]. Por lo tanto, las pruebas de toxicidad son una herramienta útil en la evaluación del riesgo ambiental [2].

Una interpretación cercana a la realidad, referente a la toxicidad química en los sistemas biológicos, sólo puede llevarse a cabo mediante el uso de un sistema que emplee organismos vivos [2].

Daphnia magna fue seleccionada como organismo de prueba, ya que ha sido ampliamente utilizado en ecotoxicología, al ser un representante de los consumidores primarios de agua dulce que tienen un papel ecológico determinante, por ejemplo, controlan el fitoplancton y son presas importantes para los depredadores superiores [3]. Además son de tamaño pequeño, fácil de manejar y cultivar en el laboratorio, son relativamente sensibles a los productos químicos en comparación con otros invertebrados de agua dulce, y su tiempo de reproducción relativamente corto es favorable para la prueba de toxicidad [2,4].

Definiciones.

- **24h CE₅₀:** es la concentración estimada para inmovilizar el 50% de las especies de *Daphnia magna*, después de 24 horas de exposición [5].
- **Especies inmóviles:** aquellas especies que no pueden nadar dentro de los 15 segundos después de una agitación suave del recipiente de ensayo [5].

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 47 de 129

Figura 1. Vista general de *Daphnia magna* [7].



Principio de la Prueba.

En esta prueba de inmovilización aguda, un intervalo de concentraciones de la sustancia de estudio ejerce un efecto tóxico sobre la capacidad de natación de la especie *Daphnia magna*. Algunas concentraciones generan que ciertos porcentajes de *Daphnia magna* ya no sean capaces de nadar a las 24 horas.

Condiciones para la validez de la prueba.

- En el control, no más del 10% de las especies de *Daphnia magna* se deben considerar como especies inmóviles.
- La concentración de oxígeno disuelto al final de la prueba debe ser $\geq 60\%$ del valor de saturación del aire a la temperatura utilizada.

Materiales y equipos.

- **Material de vidrio:** normalmente beakers de vidrio o peceras, estos deben limpiarse con disolventes conocidos para eliminar los productos químicos utilizados en la prueba.
- **Agua de dilución:** cualquier agua adecuada para el cultivo de *Daphnia magna*, en este caso se utilizará agua natural.

- **Animales experimentales:** *Daphnia magna* de no más de 24 horas de edad, criadas en laboratorio, aparentemente sanas y con una historia conocida (método de cría).
- **Sustancia de ensayo:** Diazepam, que es un medicamento que se utiliza para aliviar la ansiedad, los espasmos musculares y las crisis convulsivas, y para controlar la agitación causada por la abstinencia de alcohol [6,8].
- Equipos para la medición de oxígeno y pH, además para la aireación del agua de prueba.

Procedimiento.

- Para el desarrollo de la prueba se requiere un total de 120 organismos, divididos en grupos de cinco, como se muestra a continuación:

		Concentraciones					
		Control	1	2	3	4	5
Repeticiones	1	5	5	5	5	5	5
	2	5	5	5	5	5	5
	3	5	5	5	5	5	5
	4	5	5	5	5	5	5

- La *Daphnia magna* no debe ser alimentada durante el ensayo.
- La temperatura de ensayo debe estar entre 18 y 22°C, $\pm 1^\circ\text{C}$.
- El ciclo de luz-oscuridad es opcional: completa oscuridad es aceptable.
- Concentraciones de ensayo: 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g/l}$ de Diazepam. Para producir la concentración adecuada, el medicamento se disuelve en agua destilada [6].

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 49 de 129

- El agua utilizada para el desarrollo de la prueba debe ser aireada antes de la adición de la sustancia de ensayo (mínimo 24 horas).
- La concentración de oxígeno, debe medirse al principio y al final de la prueba.
- El pH debe medirse al principio y al final de la prueba; tener que cuenta que el pH de las soluciones de ensayo no debe ser ajustado.

Análisis de resultados.

Se debe reportar el porcentaje de inmovilidad a las 24 horas, esto debe representarse gráficamente frente a la concentración. Se emplean procedimientos estadísticos normales para calcular la CE_{50} para el período de exposición apropiado. Los límites de confianza para los valores de CE_{50} calculados deben ser de $p=0.95$.

Actividades monitor.

- Leer previamente la práctica e información complementaria relacionada con la temática a trabajar, con el fin de tener un conocimiento claro y poder apoyar activamente a los estudiantes, en la resolución de dudas.
- Solicitar con anticipación los materiales y equipos que se requieren para el desarrollo de la práctica de laboratorio.
- Preparar los organismos para el desarrollo de la prueba, es decir, debe dividir los organismos en sus respectivos frascos de vidrio (beakers o peceras).
- En vista que para el desarrollo de la prueba el agua utilizada debe ser aireada antes de la adición de la sustancia de ensayo, el monitor debe encargarse de esta actividad. Se recuerda que la aireación previa requiere de un lapso mínimo de 24 horas.
- Preparar las concentraciones de la sustancia de ensayo, las cuales son: 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g/l}$ de Diazepam.
- Hacer seguimiento de la práctica de laboratorio, para que ésta se lleve a cabo teniendo en cuenta el protocolo expuesto.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 50 de 129

- Terminada la práctica de laboratorio, hacer entrega de los materiales y equipos utilizados, limpios y en buen estado.

Actividades estudiantes.

- Leer previamente la práctica de laboratorio y hacer entrega de un diagrama de flujo, donde se explique la metodología a desarrollar.
- Hacer entrega de un informe de laboratorio que contenga la siguiente información:
 - Resultados (imágenes o tablas)
 - Análisis de resultados
 - Conclusiones
 - Referencias en IEEE
- Resolver las siguientes preguntas:
 - ¿Con que otros organismos se pueden llevar a cabo pruebas de toxicidad aguda?
 - ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de utilizar *Daphnia magna* en el desarrollo de pruebas de toxicidad?
 - ¿Existe en la legislación colombiana y/o legislación internacional, algún apartado donde se mencione la necesidad de llevar a cabo pruebas de toxicidad, para la evaluación de riesgo ambiental?

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 51 de 129

Bibliografía.

- [1] E. Galdiero, V. Maselli, A. Falanga, R. Gesuele, S. Galdiero, D. Fulgione y M. Guida, «Integrated analysis of the ecotoxicological and genotoxic effects of the antimicrobial peptide melittin on *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata*,» *Environmental Pollution*, nº 203, pp. 145-152, 2015.
- [2] S. A. Mansour y M. F. Gad, «Risk assessment of pesticides and heavy metals contaminants in vegetables: A novel bioassay method using *Daphnia magna* Straus,» *Food and Chemical Toxicology*, nº 48, pp. 377-389, 2010.
- [3] A. Martins , L. Guimarães y L. Guilhermino, «Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to *Daphnia magna* assessed at two temperatures,» *Environmental Toxicology and Pharmacology*, nº 36, pp. 1022-1032, 2013.
- [4] H. Toumi, M. Boumaiza, M. Millet, C. Radetski, V. Felten, C. Fouque y J. Féraud, «Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera),» *Science of the Total Environment*, nº 458-460, pp. 47-53, 2013.
- [5] Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos , "*Daphnia sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test*" *Part I - 24h EC50 Acute Immobilisation Test*, OCDE 202 guideline for testing of chemicals, 1984.
- [6] C. Rivetti , B. Campos y C. Barata , «Low environmental levels of neuro-active pharmaceuticals alter phototactic behaviour and reproduction in *Daphnia magna*,» *Aquatic Toxicology*, vol. CLXX, pp. 289-296, 2015.
- [7] P. Romero Ramírez , A. Mendoza Cantú, M. C. Díaz Báez , Y. Pica Granados y A. Ronco, Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México - Ensayo de toxicidad aguda con el cladócero *Daphnia magna*, México D.F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales - Instituto Nacional de Ecología, 2008.
- [8] Medline Plus - Información de salud para usted, «Diazepam,» Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU., 1 Agosto 2010. [En línea]. Disponible en: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a682047-es.html>. [Último acceso: 16 Noviembre 2015].

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 52 de 129

Práctica 3.

Prueba de reproducción para *Daphnia magna*

Introducción.

Dentro del grupo de cladóceros, las especies del género *Daphnia* son las más utilizadas como organismos de prueba o de referencia en pruebas de toxicidad. La amplia distribución geográfica, el importante papel que cumplen al interior de la comunidad zooplanctónica, la facilidad de cultivo en el laboratorio, y el corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías, han hecho de este grupo un ideal para la evaluación de toxicidad, de carácter universal [1].

El género *Daphnia* se ubica dentro del orden cladócera de la clase crustácea, y especies como *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* y *Daphnia similis*, son utilizadas extensivamente en pruebas de toxicidad, por lo cual existe una extensa información sobre las técnicas de cultivo, los requisitos de temperatura, luz y nutrientes, así como su respuesta a muchos tóxicos. Específicamente, los ensayos de toxicidad con *Daphnia magna* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, y agua potable, entre otros [1].

Por otro lado, referente a la sustancia de ensayo, se expone que los productos farmacéuticos son ampliamente utilizados, y actualmente se consideran como contaminantes emergentes de interés, ya que se han detectado cada vez más en diferentes tipos de ecosistemas, tienen una considerable persistencia en el medio ambiente, y se espera que su uso aumente aún más mientras continúe el crecimiento poblacional [2].

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 53 de 129

Definiciones.

- **LOEC** (la más baja concentración sin efecto observado): es la concentración más baja que tiene un efecto adverso en los organismos de prueba, y es la concentración de ensayo inmediatamente por encima de la NOEC [4].
- **NOEC** (concentración sin efecto observado): significa la más alta concentración que no tenga un efecto adverso en los organismos de prueba, y es la concentración de ensayo inmediatamente debajo de la LOEC [4].

Consideraciones generales.

- La especie a utilizar es *Daphnia magna* (hembra).
- La duración de la prueba es de 21 días.

Principio de la prueba.

El objetivo principal del ensayo es evaluar el efecto de los productos químicos en el rendimiento reproductivo de *Daphnia magna*. Con este fin, *Daphnia magna* (hembra) de 24h de edad, se exponen a la sustancia de ensayo. El número total de descendientes vivos producidos por cada hembra viva al final de la prueba se evalúa. Esto significa que los descendientes producidos que mueren durante la prueba se excluyen de los cálculos. El rendimiento reproductivo de las hembras se puede expresar de otras maneras, por ejemplo, se observa el número de descendientes vivos producidos por hembra por día desde el primer día de descendencia. El rendimiento reproductivo de los animales expuestos a la sustancia de ensayo se compara con la del testigo(s), con el fin de determinar la concentración mínima con efecto observado (LOEC), y por tanto la concentración sin efecto observado (NOEC).

Además, y en la medida de lo posible, los datos se analizan mediante un modelo de regresión para estimar la concentración que provocaría un X% de reducción en la producción reproductiva, es decir CEx (por ejemplo, CE₅₀, CE₂₀ o CE₁₀). También se debe informar la supervivencia de las hembras y el tiempo de producción de la primera cría. Otros parámetros que también pueden ser evaluados son el crecimiento, por ejemplo, la longitud.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 54 de 129

Condiciones para la validez de la prueba.

Los siguientes criterios de rendimiento se deben cumplir en el control(es):

- La mortalidad de las hembras no debe exceder el 20% al final de la prueba.
- El número medio de descendientes vivos producidos por hembra viva al final de la prueba debe ser ≥ 60 .

Descripción del método.

Aparatos: los recipientes que entren en contacto con las soluciones de ensayo deben ser de vidrio (normalmente beakers o peceras).

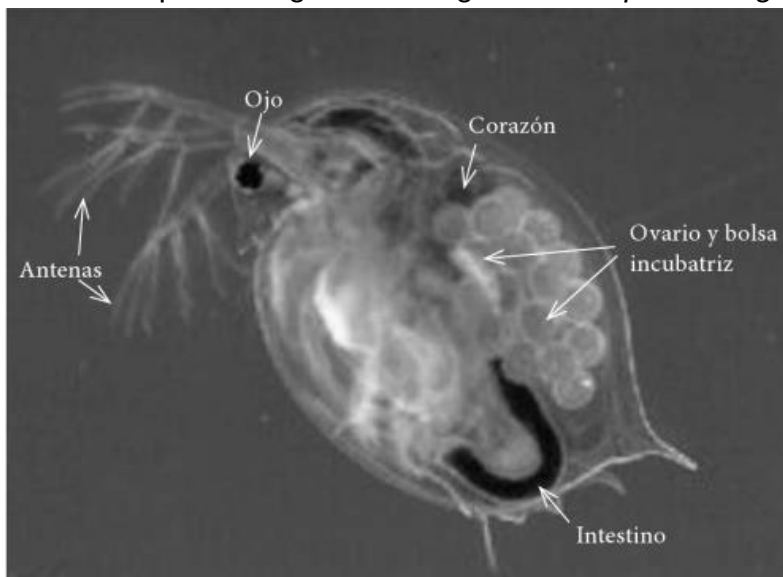
Además se requerirán algunos o todos de los siguientes equipos:

- Medidor de oxígeno.
- Un equipo adecuado para el control de la temperatura.
- Medidor de pH.
- Equipo para la determinación de la dureza del agua.
- Equipo adecuado para el control del régimen de iluminación y la medición de intensidad de la luz.

Los valores de concentración de oxígeno, temperatura, dureza y pH deben medirse al menos una vez a la semana.

Organismo de ensayo: la especie que se utilizará en el ensayo es *Daphnia magna* (hembra) de 24h de edad, que no muestre signos de estrés, alta mortalidad, presencia de machos y efipios, retraso en la producción de la primera camada y animales decolorados. Los animales deben ser mantenidos en condiciones de cultivo (luz, temperatura, medio de cultivo, alimentación y animales por unidad de volumen) similares a las que se utilizará en la prueba. Si el medio de cultivo de *Daphnia magna* para ser utilizado en la prueba es diferente, es una buena práctica incluir un período de aclimatación previa alrededor de 3 semanas.

Figura 1. Principales rasgos morfológicos de *Daphnia magna* [5].

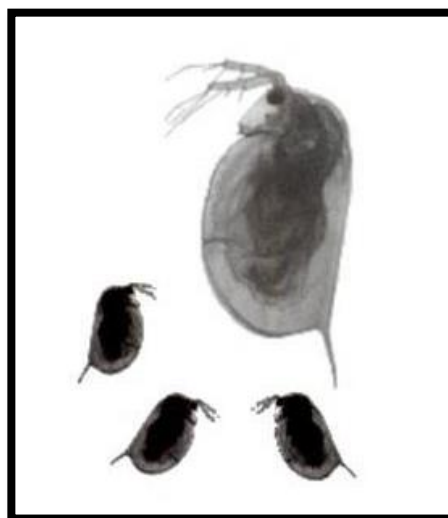


Es importante aclarar que los huevos de *Daphnia magna* se caracterizan por estar cubiertos de una capa extra, rica en queratina, llamada “efipio”. A los huevos latentes con efipio se les suele llamar “huevos enquistados”.

Figura 2. Huevo enquistado y *Daphnia magna* juvenil recién salida de este.



Figura 3. Microfotografía de *Daphnia magna* adulto y neonatos [6].



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 56 de 129

Medio de ensayo: medio Elendt M4 y M7. Al utilizar sustancias que contengan metales, es importante reconocer las propiedades del medio de ensayo (por ejemplo, dureza y capacidad quelante) ya que pueden influir en la toxicidad de la sustancia problema. Ambos medios contienen el agente quelante EDTA. Por tal motivo, para las sustancias que contienen metales puede ser aconsejable utilizar un medio alternativo como por ejemplo, ASTM reconstituted hard fresh water, con extracto de algas marinas, que no contiene EDTA.

Lo expuesto, es una recomendación para futuras pruebas, donde se desee evaluar una sustancia de ensayo diferente a la que se utilizará para el presente ensayo experimental, pues la sustancia será la misma que para la práctica anterior, es decir, el medicamento Diazepam.

La concentración de oxígeno disuelto en el medio de ensayo debe ser superior a 3mg/l al inicio y durante la prueba. El pH debe estar dentro del rango 6-9, y normalmente no debe variar en más de 1.5 unidades. Se recomienda una dureza superior a 140 mg/l (como CaCO_3).

Sustancia y concentraciones de ensayo: 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g/l}$ de Diazepam. Para producir la concentración adecuada, el medicamento se disuelve en agua destilada [7].

En algunos casos, el uso de disolventes orgánicos o dispersantes puede ser necesario con el fin de producir una concentración adecuada. Ejemplos de disolventes son acetona, etanol, metanol, dimetilformamida y trietilenglicol. Ejemplos de dispersantes son Cremophor RH40, metilcelulosa 0.01% y el HCO-40.

Los disolventes se utilizan para producir una solución que puede ser dosificada con precisión en el agua. La concentración de disolvente recomendada en el medio de ensayo es de $\leq 0.1 \text{ ml/l}$.

Los dispersantes pueden ayudar en la dosificación exacta y la dispersión. La concentración recomendada en el medio de ensayo es de $\leq 0.1 \text{ ml/l}$.

Aunque para este caso, el uso de este tipo de disolventes o dispersantes no es necesario, como se mencionó, el medicamento se disuelve en agua destilada. Pero para futuras prácticas, donde se desee evaluar otra sustancia de ensayo, esta información debe tenerse en cuenta.

Procedimiento.

Carga (“loading”): si se utilizan volúmenes superiores a 100 ml de medio en cada recipiente, puede ser necesario aumentar la ración de alimento y así aumentar su disponibilidad.

Animales de ensayo: para las pruebas semi-estáticas, deben por lo menos haber 10 animales individualmente en cada concentración de ensayo, y al menos 10 animales individualmente en la serie de control, como se muestra a continuación:

Concentraciones	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Control	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Repeticiones									

Para los ensayos dinámicos, deben utilizarse como mínimo 20 animales por concentración, divididos en dos o más repeticiones con un número igual de animales (por ejemplo, cuatro repeticiones cada una con cinco especies), como se muestra a continuación:

		Concentraciones					
		Control	1	2	3	4	5
Repeticiones	1	5	5	5	5	5	5
	2	5	5	5	5	5	5
	3	5	5	5	5	5	5
	4	5	5	5	5	5	5

Se debe tener en cuenta, que para las pruebas donde los animales se mantienen en grupos, no será posible expresar el resultado de la reproducción, como el número total de descendientes vivos producidos por hembra viva al final de la prueba, si las hembras mueren. En estos casos el resultado de la reproducción debe expresarse como "el número total de descendientes vivos producidos por hembra al inicio de la prueba".

La manipulación de los recipientes de ensayo se debe hacer de una manera aleatoria. De no hacerlo puede resultar en sesgo que pudiera interpretarse como un efecto de la concentración.

Alimentación: para las pruebas semi-estáticas, la alimentación debe hacerse preferiblemente todos los días, pero por lo menos tres veces por semana (correspondiente a los cambios de medios).

Durante la prueba la dieta debe ser preferiblemente de células de algas vivas de una o más de las siguientes: *Chlorella* sp, *Selenastrum capricornutum* (ahora *Pseudokirchneriella subcapitata*) y *Scenedesmus subspicatus*. Se ha demostrado que, para *Daphnia magna*, una ración entre 0.1 y 0.2 mgC/*Daphnia magna*/día son suficientes para lograr el número requerido de descendencia para satisfacer los criterios de validez de la prueba. La ración se puede suministrar ya sea a una

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 59 de 129

velocidad constante durante todo el período de la prueba, o, si se desea, una tasa más baja se puede utilizar al principio y luego aumentarla durante la prueba para tener en cuenta el crecimiento de las hembras.

Con una suspensión de algas concentradas debe alimentarse la *Daphnia magna* para reducir al mínimo el volumen de medio de cultivo de algas transferido a los recipientes de ensayo. Esta concentración de algas se puede lograr mediante centrifugación seguida de una resuspensión en agua destilada, agua desionizada o medio de cultivo *Daphnia*.

Luz: 16 horas de luz a una intensidad no superior a $15\text{-}20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Temperatura: la temperatura debe estar dentro del rango de $18\text{-}22^{\circ}\text{C}$, no debe variar en más de 2°C dentro de estos límites (por ejemplo, $18\text{-}20$, $19\text{-}21$ o $20\text{-}22^{\circ}\text{C}$).

Aireación: los recipientes de ensayo no deben ser aireados durante la prueba.

Las concentraciones de ensayo: normalmente, debe haber por lo menos cinco concentraciones de ensayo, y el número adecuado de réplicas para cada concentración, como ya se expuso. Ya establecido el rango de concentraciones, lo siguiente debe tenerse en cuenta:

1. Si el objetivo es obtener LOEC/NOEC, la concentración de ensayo más baja, debe ser lo suficientemente baja para que la fecundidad a esa concentración no sea significativamente menor que en el control; y la concentración de ensayo más alta, debe ser lo suficientemente alta como para que la fecundidad a esa concentración sea significativamente menor que en el control.
2. Si se estima la CEx, es aconsejable que las concentraciones suficientes que se utilizan para definir la CEx tengan un nivel adecuado de confianza. Si se estima la CE_{50} para efectos sobre la reproducción, es aconsejable que la concentración de ensayo más alta sea mayor que la CE_{50} .

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 60 de 129

Controles: en general, en un ensayo realizado correctamente, el coeficiente de variación alrededor de la media del número de descendientes vivos producidos por cada hembra en el control (s) debe ser $\leq 25\%$.

Renovación del medio de ensayo: debe ser por lo menos tres veces por semana. Cuando se renueva el medio en las pruebas semi-estáticas, se prepara una segunda serie de recipientes de ensayo, y para la transferencia de hembras a estos, se utiliza una pipeta de vidrio de diámetro adecuado. El volumen de medio transferido con la *Daphnia magna* debe ser minimizado.

Observaciones:

- La descendencia producida por cada hembra debe ser removida y contada todos los días, desde la aparición de la primera camada, para evitar que consuman el alimento destinado para los adultos. Sólo se deben contar los descendientes vivos, aunque los huevos abortados o descendientes muertos deben registrarse.
- La mortalidad se registrará preferiblemente a diario, a la misma hora que se cuenta la descendencia.
- A pesar que esta práctica está diseñada principalmente para evaluar los efectos sobre la reproducción, es posible que otros efectos también deban cuantificarse para permitir el análisis estadístico. Las mediciones de crecimiento son muy deseables, ya que proporcionan información sobre posibles efectos subletales, que pueden ser más útiles que las medidas de reproducción solamente. Se recomienda la medición de la longitud de las hembras (la longitud del cuerpo excluyendo la espina anal) al final de la prueba. Otros parámetros que pueden ser medidos incluyen el tiempo de producción de la primera camada (y camadas posteriores), el número y tamaño de las camadas por animal, el número de camadas abortadas, y la presencia de machos o efipios.

- Los resultados de las observaciones realizadas durante la prueba deberán registrarse en la siguiente ficha de datos:

Fecha de inicio:																								
Medio de cultivo:																								
Alimento proporcionado:																								
Sustancia de ensayo:																								
Concentraciones:																								
Día	Réplicas										Renovación del medio	pH	O ₂ (mg/l)	°T (°C)	Dureza	No. de descendientes vivos	Huevos abortados	Descendientes muertos	Mediciones de crecimiento	Tiempo de producción de la primera camada	Tiempo de producción de las camadas posteriores	Número y tamaño de las camadas por animal	Presencia de machos o epifios	Observaciones
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10														
1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
11																								
12																								
13																								
14																								
15																								
16																								
17																								
18																								
19																								
20																								
21																								

Fuente. Los autores basados en OCDE 211 Guidelines for Testing of Chemicals - *Daphnia magna* Reproduction Test [3].

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 62 de 129

Análisis de resultados.

El propósito de este ensayo es determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre el número total de descendientes vivos producidos por hembra viva al final de la prueba. El número total de descendientes por hembra debe ser calculado para cada recipiente de ensayo. Si, en cualquier réplica la hembra muere durante el ensayo o resulta ser macho, entonces la réplica se excluye del análisis. El análisis a continuación, se basa en un número reducido de repeticiones.

Para la estimación de LOEC, y, por tanto, NOEC, para los efectos de la sustancia química en el rendimiento reproductivo, es necesario calcular el rendimiento reproductivo medio que se replica para cada concentración y la desviación estándar residual agrupada, esto se puede hacer mediante análisis de varianza (ANOVA).

Para la estimación de la concentración que provocaría una reducción del 50% en la producción reproductiva (CE_{50}), una curva adecuada, tal como la curva logística, debe ser ajustada a los datos utilizando un método estadístico como los mínimos cuadrados. La curva se parametriza para que la CE_{50} y su error estándar puedan estimarse directamente. Esto facilitará considerablemente el cálculo de los límites de confianza. Límites de confianza del 95% deben ser citados. Una curva logística se ajustó utilizando el siguiente modelo, aunque otros modelos adecuados pueden ser utilizados:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0} \right)^b}$$

Donde,

Y = número total de juveniles por hembra viva al final de la prueba (calculado para cada recipiente).

x = concentración.

c = número esperado de juveniles cuando x = 0

x_0 = CE_{50} en la población.

b = parámetro de la pendiente.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 63 de 129

Actividades monitor.

- Leer previamente la práctica e información complementaria relacionada con la temática a trabajar, con el fin de tener un conocimiento claro y poder apoyar activamente a los estudiantes, en la resolución de dudas.
- Solicitar con anticipación los materiales y equipos que se requieren para el desarrollo de la práctica de laboratorio.
- Preparar los organismos para el desarrollo de la prueba, es decir, debe dividir los organismos en sus respectivos frascos de vidrio (beakers o peceras).
- En vista que para el desarrollo de la prueba el agua utilizada debe ser aireada antes de la adición de la sustancia de ensayo, el monitor debe encargarse de esta actividad. Se recuerda que la aireación previa requiere de un lapso mínimo de 24 horas.
- En caso de ejecutarse una prueba semi-estática, el monitor junto con los estudiantes, deben organizarse para realizar la alimentación de los organismos, ya sea diariamente o tres veces por semana. Si se decide una alimentación de tres veces por semana, esto corresponde a los cambios de los medios, por lo que también debe llevarse a cabo esta actividad.
- En vista que los valores de concentración de oxígeno, temperatura, dureza y pH deben medirse al menos una vez a la semana, el monitor junto con los estudiantes, deben organizarse para llevar a cabo esta labor.
- En caso que se requiera un periodo de aclimatación previo, el monitor debe encargarse de esta actividad.
- Preparar las concentraciones de la sustancia de ensayo, las cuales son: 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 µg/l de Diazepam.
- Hacer seguimiento de la práctica de laboratorio, para que ésta se lleve a cabo teniendo en cuenta el protocolo expuesto.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 64 de 129

- Terminada la práctica de laboratorio, hacer entrega de los materiales y equipos utilizados, limpios y en buen estado.

Actividades estudiantes.

- Leer previamente la práctica de laboratorio y hacer entrega de un diagrama de flujo, donde se explique la metodología a desarrollar.
- Hacer entrega de un informe de laboratorio que contenga la siguiente información:
 - Resultados (imágenes o tablas)
 - Análisis de resultados
 - Conclusiones
 - Referencias en IEEE
- Resolver las siguientes preguntas:
 - ¿Cuál es la importancia de desarrollar pruebas de toxicidad donde se evalué la reproducción en *Daphnia magna*?
 - ¿Por qué la duración de la prueba debe ser de 21 días?
 - Consulte los resultados de 2 artículos científicos donde también se realicen pruebas de toxicidad en *Daphnia magna*, y realice un cuadro comparativo de los mismos.
 - Teniendo en cuenta que se utiliza la misma sustancia y las mismas concentraciones de ensayo, para las dos prácticas de laboratorio expuestas para *Daphnia magna*, ¿Cuáles son las diferencias entre los resultados obtenidos de los dos ensayos experimentales?

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 65 de 129

Ensayo de toxicidad de *Daphnia magna* para aguas residuales.

Esta práctica de laboratorio, presenta el siguiente ensayo de toxicidad, teniendo en cuenta que se debe manejar el mismo protocolo de reproducción para *Daphnia magna* anteriormente expuesto, con la única diferencia que se maneja como sustancia de ensayo una muestra de agua residual, por lo que a continuación se expone el protocolo de muestreo y el trabajo en laboratorio que debe llevarse a cabo [8,9]:

1. Para la toma de muestras, al ser un vertimiento de agua residual, se deben tener en cuenta las medidas de protección personal adecuadas como lo son el uso de guantes de látex, tapabocas, botas, cofia de plástico, y un traje de pantalón y blusa de plástico.
2. En un frasco de plástico, completamente limpio y rotulado, recolectar una muestra compuesta, resultante de la sumatoria de las alícuotas que se deben tomar cada media hora durante un periodo de 6 horas. Cada media hora debe tomarse una muestra de 100ml, para un total de 1200ml. En caso de ser necesario se debe utilizar un extensor para la toma de las muestras.
3. La muestra se transporta hacia el laboratorio en una nevera con hielo, con el fin de mantener una temperatura aproximada de 4°C y así preservar la muestra [10].
4. Los parámetros que se deben medir en campo haciendo uso del multiparámetro son: pH, sólidos suspendidos totales, conductividad, temperatura, oxígeno disuelto y turbidez. Con el fin de hacer una caracterización del agua residual.
5. En el laboratorio se debe hacer la medición de aluminio, DBO y DQO.
6. El docente junto con el monitor y los estudiantes, teniendo en cuenta el protocolo de reproducción para *Daphnia magna* y los datos obtenidos, deben establecer las diluciones necesarias para la obtención de las concentraciones.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 66 de 129

Los estudiantes deben realizar las siguientes actividades, culminada la práctica de laboratorio donde se utiliza agua residual como sustancia de ensayo.

- Responder las siguientes preguntas:

¿Cuál es la diferencia de los resultados obtenidos entre la prueba de reproducción para *D. magna* donde la sustancia de ensayo es Diazepam, frente a la prueba donde se utiliza agua residual?

¿Qué implicaciones tendría una prueba para toxicidad de aguas residuales en la cual los microcrustáceos logren reproducirse de manera exitosa?

- Entregar un informe de laboratorio que contenga la siguiente información: resultados (imágenes o tablas), análisis de resultados, conclusiones y referencias en IEEE.

Bibliografía.

- [1] G. Castillo Morales, Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones, México: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo , 2004.
- [2] A. Martins, L. Guimarães y L. Guilhermino, «Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to *Daphnia magna* assessed at two temperatures,» *Environmental Toxicology and Pharmacology* , vol. XXXVI, nº 3, pp. 1022-1032, 2013.
- [3] Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, *Daphnia magna Reproduction Test*, OCDE 211 Guidelines for Testing of Chemicals, 1998.
- [4] Environmental Protection Agency, *Daphnid Chronic Toxicity Test*, United States: EPA Ecological Effects Test Guidelines, 1996.
- [5] P. Romero Ramírez , A. Mendoza Cantú, M. C. Díaz Báez , Y. Pica Granados y A. Ronco, Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México - Ensayo de toxicidad aguda con el cladóceros *Daphnia magna*, México D.F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales - Instituto Nacional de Ecología, 2008.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 67 de 129

- [6] M. C. Díaz Báez , M. C. Bustos López y A. J. Espinora Ramírez , Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos, Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. , 2004.
- [7] C. Rivetti , B. Campos y C. Barata , «Low environmental levels of neuro-active pharmaceuticals alter phototactic behaviour and reproduction in *Daphnia magna*,» *Aquatic Toxicology*, vol. CLXX, pp. 289-296, 2015.
- [8] J. d. C. Reinoso Carrasco , Determinación de toxicidad del aluminio presente en el sistema de alcantarillado de aguas residuales de la planta de tratamiento de Ucubamba de la ciudad de Cuenca, Cuenca, Ecuador : Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas , 2014.
- [9] L. E. Barba-Ho, Y. V. Ballesteros, P. J. Patiño y C. Ramírez Callejas, «Impacto generado por los vertimientos de las curtiembres en corrientes superficiales usando pruebas de toxicidad,» *Revista Ingeniería de los Recursos Naturales y del Ambiente - EIDENAR*, nº 12, 2013.
- [10] R. Mezquida Lucas, Laboratorio de Calidad de Aguas - Toma de muestras, Córdoba, Montería : Corporación Autónoma Regional de los Valles del Sinú y del San Jorge , 2012.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 68 de 129

Práctica 4.

Prueba de toxicidad en *Artemia salina*

Este método es atractivo, porque es muy simple, barato y sensible [1].

Introducción.

El área total de la tierra es de 150 millones de km², donde el 10% está dedicado a la producción agrícola. La agricultura intensiva es responsable de la contaminación del aire y del agua del subsuelo, y de la eutrofización de los sistemas acuáticos. Además, la amplitud y los métodos agrícolas han conducido a la pérdida extensiva y permanente de la biodiversidad. En este contexto, se suman las consecuencias ecológicas del uso de insecticidas que causan gran preocupación, teniendo en cuenta que su objetivo específico es matar plagas de insectos y por consiguiente puede que tenga un impacto letal o subletal en organismos que no son su objetivo (por ejemplo, recicladores de nutrientes del suelo, polinizadores de plantas y depredadores de plagas) y reducir o contaminar productos alimenticios para los niveles tróficos superiores [2].

Para este caso en específico, se debe exponer que las piretrinas y los piretroides se liberan principalmente al aire debido a su uso como insecticidas. Debido a que muchos de estos compuestos son extremadamente tóxicos para los peces, generalmente no se rocían directamente sobre el agua, sin embargo, pueden entrar a los lagos, lagunas, ríos y arroyos a través de la lluvia o de agua de escorrentía proveniente de terrenos agrícolas. Estos compuestos se adhieren fuertemente al suelo. Eventualmente son degradados por los microorganismos presentes en el suelo y el agua. También pueden ser degradados por la luz solar en la superficie del agua, el suelo o las plantas. Sin embargo, algunos de los piretroides que se han desarrollado recientemente llegan a persistir en el ambiente durante meses antes de ser degradados [3].

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 69 de 129

Las personas pueden estar expuestas a las piretrinas y a los piretroides de varias maneras. La manera más común es al comer alimentos que están contaminados con estos compuestos. También pueden respirar aire que los contiene. Esto es muy probable que suceda inmediatamente después de que se hayan aplicado. Además, después de ser rociados, estos compuestos pueden entrar en contacto con la piel. Las piretrinas y los piretroides interfieren con el funcionamiento normal de los nervios y el cerebro [3].

Por otro lado, se resalta que el uso de la *Artemia* se ha extendido a las investigaciones de toxicología aplicada dada su disponibilidad comercial de quistes secos, útiles como material vivo de prueba [4]. En vista, que la selección de la especie animal se realiza atendiendo a criterios de disponibilidad, sensibilidad y similitud [9]

Sumado a lo anteriormente expuesto, se decide evaluar un insecticida y utilizar *Artemia salina* como organismo de ensayo, en vista que las intoxicaciones agudas originadas por plaguicidas son frecuentes y han sido muy estudiadas, y las áreas costeras y los estuarios son particularmente sensibles a la contaminación, porque su facultad para la eliminación de residuos puede ser pequeña e inadecuada para ciertas clases de contaminantes [4].

Materiales y equipos.

- Cloruro de sodio
- Agua destilada
- Una botella
- Recipientes de plástico cónicos de 1l
- Estereoscopio
- Equipo para medir la temperatura y el pH

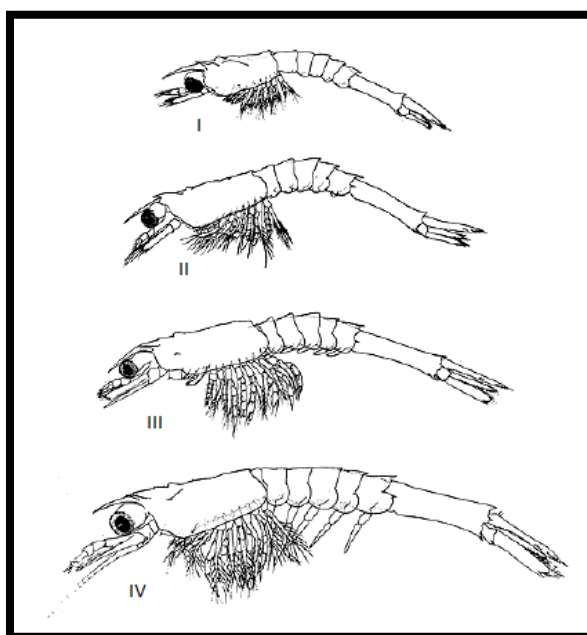
Sustancia de ensayo: dos plaguicidas cuyo principio activo sea piretroides de uso comercial: cipermetrina y permetrina.

Procedimiento.

Figura 1. *Artemia Salina* [8].



Figura 2. Estadios de la *Artemia salina*: nauplio (I), metanauplio (II), juvenil (III) y adulto (IV) [8].



1. Quistes secos se colocan en una botella que contiene agua de mar artificial que se prepara disolviendo 35g de cloruro de sodio en 1L de agua destilada. Se incuban durante 48h a temperatura ambiente (28-30°C) en condiciones de fuerte aireación e iluminación continua.
2. Después de la eclosión, las larvas (nauplios activos) se separan de las conchas y los huevos no eclosionados, con un tubo de plástico, pues el ensayo se lleva a cabo sobre larvas de camarón de salmuera (*A. salina*).

3. **Preparación de las concentraciones de la sustancia de ensayo:** se presentan las concentraciones para dos piretroides de uso comercial, aunque para el desarrollo de esta práctica solo se evaluará una sustancia, por lo que se debe seleccionar cuál de los dos insecticidas se utilizará.

Las concentraciones por tanto son: 0.2, 1.15, 4.2, 6.1 y 10 mg/ml de cipermetrina y, 15.5, 21, 28, 37 y 42 mg/ml de permetrina. Conociéndose las características de los piretroides cipermetrina y permetrina, estos se premezclan a razón de 1:10. El diluyente a utilizar es agua de mar [4].

4. Posteriormente, se añaden 10 nauplios en cada recipiente de plástico cónico de un 1l. Las exposiciones se realizan en 500 ml de agua de mar artificial, y se incuban a temperatura ambiente durante 24h, teniendo en cuenta que los experimentos se realizan por triplicado para cada concentración, manteniendo un régimen de luz:oscuridad de 16:8h, una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, y salinidad de 29-30‰. El pH del medio se mide al principio y al final de la exposición. No se proporciona alimento durante el transcurso de la exposición.

Los recipientes de control contienen 10 nauplios y agua de mar artificial únicamente.

		Concentraciones					
		Control	1	2	3	4	5
Repeticiones	1	10	10	10	10	10	10
	2	10	10	10	10	10	10
	3	10	10	10	10	10	10

5. Los números de nauplios que sobreviven se cuentan bajo un estereoscopio.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 72 de 129

6. Los porcentajes de muertes se calculan comparando el número de sobrevivientes en los recipientes de prueba y control. La letalidad se calcula utilizando la fórmula de Abbott de la siguiente manera:

$$\% \text{ de letalidad} = [(\text{Test} - \text{Control}) / \text{Control}] \times 100.$$

Análisis estadístico.

Los datos experimentales se procesan utilizando t-test, correlación de Pearson y el análisis de regresión lineal del software SPSS. La toxicidad se calcula a partir de la dosis letal 50% (DL₅₀) por medio del análisis Probit de Finney.

Actividades monitor.

- Leer previamente la práctica e información complementaria relacionada con la temática a trabajar, con el fin de tener un conocimiento claro y poder apoyar activamente a los estudiantes, en la resolución de dudas.
- Solicitar con anticipación los materiales y equipos que se requieren para el desarrollo de la práctica de laboratorio.
- Hacer seguimiento de la práctica de laboratorio, para que ésta se lleve a cabo teniendo en cuenta el protocolo expuesto.
- Junto con el docente, los estudiantes y el monitor se debe seleccionar la sustancia de ensayo para el desarrollo de la práctica de laboratorio.
- Preparar las concentraciones de la sustancia de ensayo seleccionada, teniendo en cuenta la premezcla a razón de 1:10, y siendo el diluyente a utilizar, agua de mar.
- Terminada la práctica de laboratorio, hacer entrega de los materiales y equipos utilizados, limpios y en buen estado.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 73 de 129

Actividades estudiantes.

- Leer previamente la práctica de laboratorio y hacer entrega de un diagrama de flujo, donde se explique la metodología a desarrollar.
- Hacer entrega de un informe de laboratorio que contenga la siguiente información:
 - Resultados (imágenes o tablas)
 - Análisis de resultados
 - Conclusiones
 - Referencias en IEEE
- Resolver las siguientes preguntas:
 - ¿Se han realizado pruebas de toxicidad en *Artemia salina*, en Colombia?, en caso de ser afirmativo, ¿Cuál fue el propósito del estudio y los resultados obtenidos?
 - ¿Qué sustancias comúnmente se pueden evaluar a partir de pruebas de toxicidad con *Artemia salina*?
 - ¿Qué diferencias significativas se pueden encontrar entre los resultados obtenidos en las pruebas de toxicidad con *Daphnia magna* frente a *Artemia salina*?

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 74 de 129

Bibliografía.

- [1] J. R. Naidu, R. Ismail y S. Sasidharan, «Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of Methanol Extract of *Mentha Spicata* L (Lamiaceae),» *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. XIII, nº 1, pp. 101-107, 2014.
- [2] G. J. Devine, D. Eza, E. Ogusuku y M. J. Furlong, «Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas,» *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, vol. XXV, nº 1, pp. 74-100, 2008.
- [3] Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, Resumen de Salud Pública: piretrinas y piretroides, Estados Unidos : Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU. - Servicio de Salud Pública, 2003.
- [4] G. Arencibia-Carballo, R. A. Tizol-Correa y R. Oscar Rodríguez, «Toxicidad de nauplios de *Artemia franciscana* a dos piretroides de uso comercial,» *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*, vol. XXVII, nº 1, pp. 47-53, 2010.
- [5] S. Rajabi, A. Ramazani, M. Hamidi y T. Naji, «*Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles,» *DARU Journal of Pharmaceutical Scienc*, vol. XXIII, nº 20, pp. 1-6, 2015.
- [6] M. Ates, J. Daniels, Z. Arslan y I. O. Farah, «Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation and toxicity,» *Environ Monit Assess*, vol. CLXXXV, nº 4, pp. 3339-3348, 2013.
- [7] A. de Sousa Leite, A. Ferreira Dantas, G. Laylson da Silva Oliveira, A. L. Gomes Júnior, S. Gonçalo de Lima, A. M. d. G. Lopes Citó, R. M. de Freitas, A. A. d. C. Melo-Cavalcante y J. A. Dantas Lopes, «Evaluation of Toxic, Cytotoxic, Mutagenic, and Antimutagenic Activities of Natural and Technical Cashew Nut Shell Liquids Using the *Allium cepa* and *Artemia salina* Bioassays,» *BioMed Research International*, pp. 1-16, 2015.
- [8] J. J. Cabrera Dorado, Estudio sobre la toxicidad de los vertidos en Huelva. Métodos de ensayo: ensayo de toxicidad aguda en *Artemia salina*, Huelva, España, 2010.
- [9] M. Repetto Jiménez y G. Repetto Kuhn, Toxicología Fundamental, Cuarta ed., Diaz de Santos, 2009.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 75 de 129

Práctica 5.

Prueba de toxicidad por bioluminiscencia en *Vibrio fischeri*

Introducción.

Este bioensayo es estandarizado, rápido, simple y económico para la evaluación ecotoxicológica de aguas residuales y lixiviados de residuos, así como para las disoluciones de sustancias y preparados, a través de la exposición de la bacteria marina bioluminiscente *Vibrio fischeri*. Debido a su alta reproducibilidad y bajo costo, este método es uno de los exámenes estandarizados utilizados para evaluar la toxicidad de las muestras ambientales, y de identificar las fracciones tóxicas en mezclas ambientales tales como efluentes de aguas residuales, las aguas subterráneas contaminadas, lixiviados de vertederos, y el suelo/extractos de sedimentos a través de bioensayos de fraccionamientos dirigidos [1] [2].

Además, es aplicable en estudios de toxicología acuática; control legal de descargas agrícolas, industriales y municipales; evaluación de procesos de tratamiento y estudios integrales de contaminación, donde para el análisis de toxicidad se requiera manejar una concentración inicial de la muestra del 100%. Este método puede emplearse también para el análisis de extractos orgánicos y elutriados de suelos y sedimentos, o sustancias puras líquidas, o sólidos solubilizables [3].

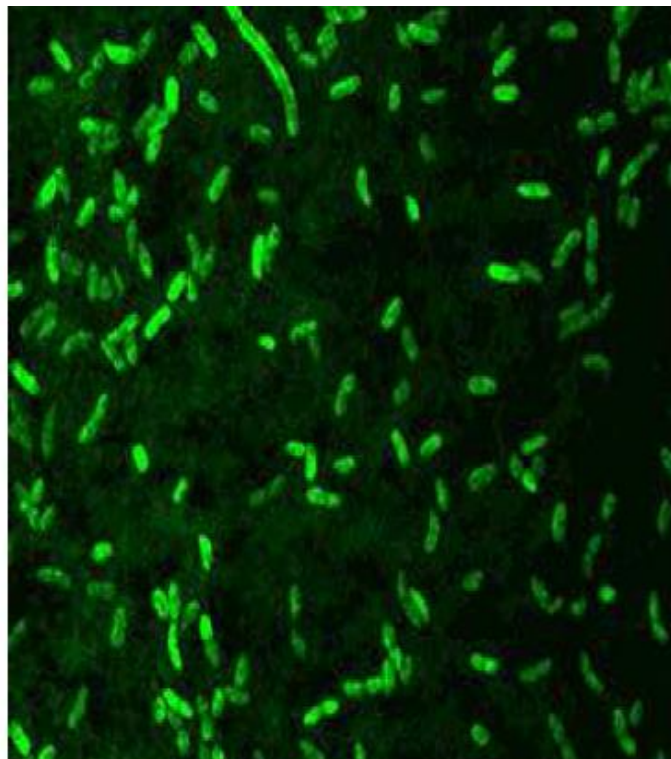
Principio de la prueba.

La prueba se basa en la medición de la luminiscencia emitida por las bacterias *V. fischeri* después de su exposición a una muestra problema por un periodo de 5 a 30 minutos. La intensidad de la luz emitida por las bacterias expuestas a la muestra problema se compara con la emitida por bacterias que permanecen en las condiciones óptimas del sistema control.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 76 de 129

Ante la presencia de sustancias tóxicas, la luminiscencia de *V. fischeri* disminuye de forma proporcional a la carga tóxica en la muestra problema. Este decaimiento se produce como resultado del daño ocasionado a los procesos metabólicos asociados con la respiración bacteriana.

Figura 1. *Vibrio fischeri* [1].



Definiciones.

- **Bioluminiscencia:** fenómeno en donde los organismos vivos emiten luz como resultado de procesos enzimáticos ligados a la respiración [3].
- **Efecto tóxico agudo:** es aquel que es inducido y observado en un período corto, que puede ser de 5 a 30 minutos para el caso de *V. fischeri*. Este período de respuesta óptimo está definido a partir de estudios previos basados en el conocimiento de biología bacteriana, en conjunto con la química de los

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 77 de 129

compuestos tóxicos. Se ha observado la existencia de procesos que facilitan el paso de los compuestos tóxicos al interior de las células bacterianas, siendo más ágiles y rápidos los relacionados a compuestos orgánicos que los de incorporación de elementos metálicos [3].

- **Liofilizado:** congelado y deshidratado al vacío; es aplicado a la bacteria usada en la prueba Microtox, la cual se comercializa [3].

Materiales y equipos.

- Hielera.
- Hielo o geles refrigerantes.
- Pipetas automáticas de 250, 500 y 1000 μ l (de volumen fijo o ajustable).
- Pipeta automática de 10 μ l o de repetición ajustable a mediciones de 10 μ l.
- Puntas para micropipetas.
- Jeringas de 0.6 ml para pipeta de repetición.
- Celdillas de vidrio de borosilicato.
- Sistema Microtox Modelo 500 constituido por: fotosensor (Luminómetro); pozos de incubación con temperatura controlada de 15°C; pozo para reactivo reconstituido con temperatura controlada de 5°C (pozo activación) y congelador a una temperatura de -20° C. Sistema de cómputo con software acoplado a sistema Microtox, Probit u otro que sea de utilidad, y con hoja de cálculo.

Reactivos.

Reactivo liofilizado (bacteria liofilizada), solución diluyente (solución de cloruro de sodio (NaCl) al 2%), solución de ajuste osmótico (solución de cloruro de sodio (NaCl) 22 %), solución de reconstitución (agua desionizada).

Sustancia de ensayo: agua epicontinental.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 78 de 129

Procedimiento.

Obtención, manejo y transporte: la bacteria *Vibrio fischeri* se encuentra en el mercado en una presentación liofilizada. Durante su traslado debe conservarse siempre en congelación, a una temperatura de $-20 \pm 4^{\circ}\text{C}$. El inadecuado manejo de las bacterias afecta la sensibilidad de estos microorganismos y por consecuencia la confiabilidad de los resultados. Para el transporte de las bacterias se deben utilizar hieleras con geles refrigerantes, hielo o hielo seco, para mantener una temperatura de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$. De esta forma las bacterias liofilizadas pueden permanecer hasta 8 horas. En caso de traslados breves puede emplearse bandejas con hielo o geles fríos [3].

Para el desarrollo de la práctica, en vista que se manipulan bacterias, se deben tener en cuenta condiciones asépticas para su ejecución.

Reactivación:

- Con el equipo Microtox encendido, se realiza la estabilización automática de las temperaturas en los pozos de incubación ($15 \pm 1^{\circ}\text{C}$) y de activación ($5 \pm 1^{\circ}\text{C}$). El tiempo requerido es de aproximadamente 15 minutos, lo cual se verifica al apagarse la señal de termómetro en la pantalla del equipo.
- Colocar 5 celdillas en los pozos de incubación del sistema Microtox (ver figura 2).
- Colocar un vial en la celdilla del pozo de activación o de reactivo del sistema Microtox.
- Agregar a la celdilla del pozo de activación 1000 μl de solución de reconstitución (agua desionizada). Dejar estabilizar por un tiempo aproximado de 5 a 10 minutos para que esta alcance una temperatura de $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$, la cual es controlada internamente por el equipo.
- Sacar un frasco de bacteria liofilizada del congelador, manejar en frío hasta que se vacíe en ella la solución de reconstitución, mantenida en el pozo de activación a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$, y disolver. Estas acciones deben efectuarse rápidamente

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 79 de 129

para evitar un efecto de choque osmótico a las bacterias. Transferir la mezcla nuevamente a la celdilla de activación y continuar su incubación a $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

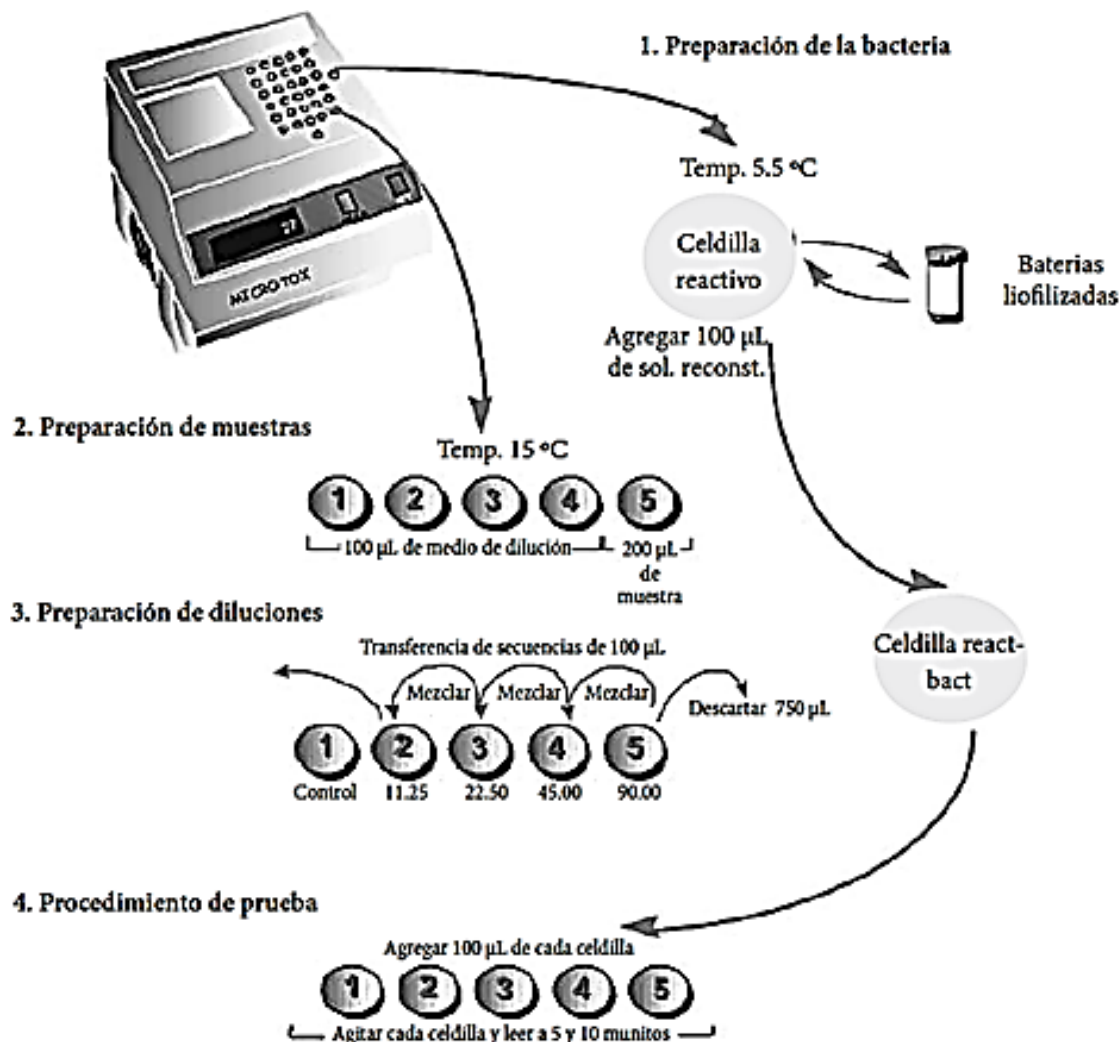
- Mezclar la bacteria, ya sea con ayuda de una pipeta automática, aspirando y eyectando la mezcla en la celdilla, o por medio de agitación suave generando un efecto ligero de vórtice. Dejar reposar por un tiempo aproximado de 15 minutos con el propósito de que la bacteria se hidrate y revitalice.

Preparación de la prueba: para el análisis de agua epicontinental, el sistema se prepara de la siguiente manera (ver tabla 1):

- Agregar 1000 μl de solución diluyente (solución de cloruro de sodio (NaCl) al 2%) en las celdillas 1, 2, 3 y 4.
- Agregar 250 μl de solución de ajuste osmótico (solución de cloruro de sodio (NaCl) al 22%) y 2500 μl de la muestra problema en la celdilla 5. Mezclar por pipeteo, absorbiendo y eyectando la solución tres veces con ayuda de la pipeta de 1000 μl .

El empleo del análisis de la muestras con y sin ajuste osmótico ayuda a elegir el método de trabajo adecuado para las muestras problema ya que, cuando la adición de la solución de ajuste osmótico representa un exceso de sales para la bacteria, los niveles de luminosidad adquieren valores significativamente más elevados que los del control negativo, datos que denotan interferencia por exceso de sales en el sistema de prueba y no pueden ser empleados para la obtención de la concentración efectiva media (CE_{50}). Cuando esto sucede, el sistema preparado en ausencia de la solución de ajuste osmótico generalmente provee de lecturas útiles para los cálculos de la CE_{50} .

Figura 2. Procedimiento de prueba para el ensayo con *Vibrio fischeri* [3].



Preparación del control de prueba: en forma paralela, se prepararan muestras replicadas y blancos de procedimiento (cuando esto aplique) consideradas para el control de calidad analítico, así como un control positivo y otro negativo.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 81 de 129

El control positivo corresponde a una prueba efectuada con una solución de fenol, que es el compuesto tóxico de referencia para la prueba con *V. fischeri*. A través de él es posible verificar la adecuada sensibilidad y el estado fisiológico de los microorganismos liofilizados antes de iniciar el análisis de muestras problema. Alternativamente, pueden ser empleados otros compuestos cuya respuesta sea bien conocida, tal es el caso del Zn (II).

Es necesario elaborar una solución de prueba de aproximadamente 100 µg/ml (ppm). La solución de fenol deberá ser valorada de forma regular (por lo menos una vez cada tres meses), empleando el método de titulación con tiosulfato en su apartado de valoración de solución madre de fenol, al que se hace mención en la norma NMX-AA-050 de la SCFI [4].

La solución de fenol debe mantenerse en frascos ámbar o protegidos de la luz con cubierta de papel aluminio a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ (refrigeración). En estas condiciones, la solución de prueba podrá preservarse por un promedio de 20 días. Se puede continuar su empleo siempre y cuando el valor de CE_{50} no exceda los límites del ámbito de respuesta preestablecido para el compuesto tóxico de referencia, que es de 13 a 26 µg/ml después de 5 minutos de exposición y cuya concentración, verificada a través de la valoración, no indique cambios relevantes.

A partir de la solución de fenol mencionada, se prepara una serie de cuatro diluciones a las que se expondrán (por cinco minutos) a los microorganismos y cuyo efecto medido permitirá la determinación de la CE_{50} correspondiente.

El control negativo se prepara con una solución de agua desionizada libre de compuesto tóxicos, adicionada con solución diluyente al 2%. Los valores de luminosidad en la celda del control negativo deben ser siempre superiores al valor de 90.

En caso de que los valores de CE_{50} para el control positivo o los de luminosidad para el control negativo excedan los intervalos establecidos, la prueba deberá repetirse para verificar la alteración de la respuesta. Si esta alteración persiste entonces la bacteria o las soluciones diluyentes o de ajuste osmótico deberán desecharse y sustituirse o, en su defecto, preparar nuevamente la solución del compuesto tóxico de referencia y verificar la respuesta.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 82 de 129

Preparación de diluciones: elaborar una serie de diluciones transfiriendo 1000µl de la celdilla 5 a la 4, de la 4 a la 3 y de la 3 a la 2, mezclando cada vez. Efectuar la transferencia en el orden indicado, con una pipeta automática de 1000 µl.

Desechar 1000 µl de la celdilla 2 y 750 µl de la celdilla 5 con el objetivo de uniformizar volúmenes a 1000 µl. La celdilla 1 será considerada como control negativo. Para la preparación de las diluciones mencionadas se debe emplear pipetas automáticas para volúmenes de 1000, 500 y 250 µl.

Dejar estabilizar la temperatura de las diluciones por espacio de 5 minutos con el fin de que alcancen una temperatura de $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para ello, las celdillas deben permanecer en el interior de los pozos del equipo Microtox.

Preparativos para capturar los datos: una vez preparado el sistema experimental de prueba, se deben disponer las herramientas de captura de datos. Con este fin, puede emplearse el sistema en línea de captación automática por software o cualquier otro de utilidad. De no ser posible, con el empleo del software integrado a la tecnología Microtox, se puede efectuar la toma de datos directa de la pantalla de dicho equipo y registrarlos en una bitácora o en una hoja de cálculo electrónico. La corrección de los valores de luminiscencia a porcentaje de efecto se explica más adelante.

En el caso de haber empleado la opción de toma directa de datos, los valores pueden ser posteriormente ingresados de forma manual al software que acompaña a la tecnología Microtox, al programa Probit o a cualquier otro de utilidad para el cálculo de la CE_{50} . De efectuarse la toma de datos de forma manual es importante el uso de un cronómetro o reloj que permita el control del término del tiempo de exposición (por ejemplo 5 o 15 minutos), para dar inicio a la lectura de cada celdilla.

Inoculación y lectura de prueba: una vez revitalizada la bacteria en el pozo de activación, preparadas las diluciones y listo el sistema de captura de datos, iniciar la adición de 10 µl de la bacteria reconstituida a cada una de las celdillas del sistema experimental (por ejemplo de la 1 a la 5), y de forma simultanea activar el cronómetro programado al tiempo de exposición seleccionado que puede ser 5, 10 o 30 minutos.

Al término del tiempo de exposición se debe realizar la lectura de las celdillas. Para ello, colocar la celdilla 1 (control negativo) en el pozo de lectura y efectuar la auto calibración, presionando el botón identificado con la palabra SET (aparecerán en la pantalla del equipo valores entre 90-100). Posteriormente, oprima el botón READ. La lectura de la celdilla 1 aparecerá en la pantalla y deberá ser registrada en la bitácora, en el software o en la hoja de cálculo, en el sitio asignado para las lecturas de las celdillas control negativo.

Retire la celdilla 1 (control negativo) y continúe con la lectura de las celdillas restantes o experimentales (por ejemplo 2, 3, 4 y 5), iniciando con la de menor concentración. Oprima el botón READ con cada celdilla. Ingrese una nueva celdilla para lectura de forma inmediata a la expulsión de la anterior, registrando los datos que aparecen en la pantalla del equipo.

Tabla 1. Condiciones recomendadas para la prueba de toxicidad aguda con *Vibrio fischeri* [3].

Tipo de ensayo	Estático
Organismo de prueba	<i>Vibrio fischeri</i> , cepa NRRL B-11177 liofilizada
Equipamiento	Fotómetro Microbiocs (Microtox *)
Temperatura	15 ± 0.3 °C
Recipientes de prueba*	Viales de 2 mL
Volumen de la solución de prueba	1 mL
Número de organismos por recipientes	Aproximadamente 1 x 10 ⁶ bacterias
Número de réplicas	No requiere réplicas
Número de diluciones	≥ 4
Agua de dilución	Agua destilada con NaCl al 2%
Factor de dilución	0.3 o 0.5
Duración de la prueba	5 o 15 minutos u otro tiempo (< 1hora) que resulte apropiado a los objetivos
Efecto medido	Inhibición de la emisión luminosa
Resultado final	IC ₅₀ o EC ₅₀
Aceptabilidad de los resultados	La emisión luminosa en el control negativo debe ser > 90
Control positivo	Solución de fenol

* Celdillas del equipo Microtox.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 84 de 129

Expresión de resultados.

Los resultados se expresan a través de la CE_{50} y las unidades pueden estar en porcentaje, ml/l, mg/l, eq. mg/ml o cualquier otra unidad acorde con el tipo y manejo de muestra que se analice.

Los cálculos para la determinación de la CE_{50} , así como la elaboración de la curva asociada, pueden ser realizados a través de diversas herramientas como el software MTX 7 o la versión más reciente, ambos producidos por el fabricante de Microtox para el registro automático de datos. Estos programas despliegan la información en pantalla y si se desea puede ser impresa.

De no contarse con estos programas, también puede emplearse el programa Probit (versión USEPA 1.5) o cualquier otro que pueda efectuar dicho análisis. En caso de emplear el Probit será necesario hacer la conversión de los valores de luminiscencia a porcentajes de efecto los cuales deberán ser capturados en el programa Probit en los espacios correspondientes al número de organismos afectados para cada dilución. Para efectuar la corrección deberá realizar los siguientes pasos:

- Tomar el valor de luminiscencia del control (si es solo uno) o promediar el valor de los controles (si se cuenta con más de uno) y hacerlo equivalente a 100%.
- Tomar el valor de luminiscencia de cada dilución para obtener su valor en equivalencia respecto al control, a través de una regla de tres.

Ejemplo de una dilución:

Luminiscencia del control	96	100%
Luminiscencia de la dilución	70	X

Resultado: $X = 72.91$

Restar de 100 cada valor de dilución obtenido de la corrección:

$$100 - 72.91 = 27.09$$

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 85 de 129

El valor de 27.09 es el porcentaje de efecto que deberá ingresarse al Probit como el número de organismos afectados. Realizar este ajuste a cada una de las distintas diluciones.

Actividades monitor.

- Leer previamente la práctica e información complementaria relacionada con la temática a trabajar, con el fin de tener un conocimiento claro y poder apoyar activamente a los estudiantes, en la resolución de dudas.
- Solicitar con anticipación los materiales y equipos que se requieren para el desarrollo de la práctica de laboratorio.
- Solicitar las bacterias *Vibrio fischeri* en un laboratorio autorizado (apoyado por el docente).
- Hacer seguimiento de la práctica de laboratorio, para que ésta se lleve a cabo teniendo en cuenta el protocolo expuesto.
- Previo a la disposición de las muestras contaminadas con bacterias y de los materiales usados en la prueba con contaminantes, se debe realizar un procedimiento de esterilización (apoyado por los estudiantes).
- Terminada la práctica de laboratorio, hacer entrega de los materiales y equipos utilizados, limpios y en buen estado.

Actividades estudiantes.

- Leer previamente la práctica de laboratorio y hacer entrega de un diagrama de flujo, donde se explique la metodología a desarrollar.
- Hacer entrega de un informe de laboratorio que contenga la siguiente información:
 - Resultados (imágenes o tablas)
 - Análisis de resultados

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 86 de 129

- Conclusiones
 - Referencias en IEEE
- Resolver las siguientes preguntas:
- ¿Por qué las bacterias luminiscentes irradian luz cuando se encuentran en presencia de algún compuesto?
 - ¿Por qué es importante que los compuestos que sean utilizados para este tipo de ensayos deban estar a 2% de NaCl?

Bibliografía.

- [1] J. J. Cabrera Dorado, *Proyecto fin de master: Estudio sobre la toxicidad de los vertidos*, Huelva - España: Universidad de Sevilla-master en tecnología química y ambiental, 2010.
- [2] S.-Y. Lee, H.-J. Kang y J.-H. Kwon , «Toxicity cutoff of aromatic hydrocarbons for luminescence inhibition of *Vibrio fischeri*,» *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. XCIV, pp. 116-122, 2013.
- [3] Y. Pica Granados y G. Trujillo Domínguez, «Ensayo de toxicidad aguda con la bacteria *Vibrio fischeri*,» de *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo La experiencia en México*, Delegación Tlalpan, México D.F., 2008, pp. 307-317.
- [4] Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI), Análisis de Agua. Determinación de fenoles totales en aguas naturales potables, residuales y residuales tratadas. Método de prueba de la DGN, Norma Mexicana NMX-AA-050-SCOFI, 2001.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 87 de 129

Práctica 6.

Evaluación de la CL₅₀ en el guppy *Poecilia reticulata*

Organismo de ensayo: Guppy macho adulto (*Poecilia reticulata*)

Sustancia de ensayo: alfa-cipermetrina: es un insecticida piretroide que actúa por contacto e ingestión, interfiriendo en la transmisión de los impulsos nerviosos de los insectos. Presenta una rápida acción, con buena persistencia foliar y resistente al lavado por lluvias. Así mismo posee propiedades repelentes en los insectos, sin afectar a las abejas [1].

Toxicidad: grupo II Producto moderadamente peligroso [1].

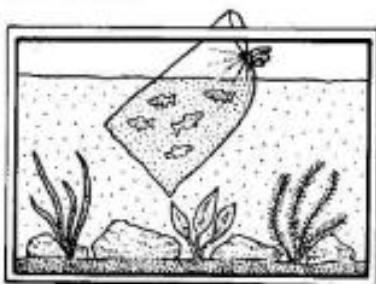
Materiales y equipos

- Bolsas de plástico.
- Acuarios de 100l y 25l.
- Comida comercial de bolas para peces.
- Equipo para mantener una aireación constante en el acuario.
- Equipo para medir temperatura, oxígeno disuelto (OD), salinidad y pH.

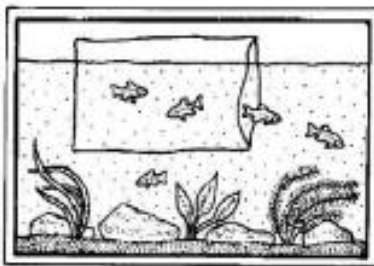
Procedimiento.

Transporte al laboratorio: los organismos de ensayo son transportados al laboratorio en bolsas de plástico adecuadamente aireadas.

Acondicionamiento: las bolsas de plástico se colocan en el acuario durante unos 30-35 minutos. Luego las bolsas se abren y a los peces se les permite nadar en el agua del acuario, como se muestra a continuación:



30 -35 min



Es importante mencionar, que el agua del acuario no debe contener residuos de cloro, por lo que se debe airear continuamente durante un periodo de 48h antes de poner los peces.

En el laboratorio los organismos deben tener un periodo de acondicionamiento a temperatura ambiente durante 15 días, por lo que son aclimatados en acuarios de 100L.

Alimentación: los peces son alimentados con comida comercial de bolas una vez al día durante el período de acondicionamiento. Los peces aclimatados no son alimentados 24h antes del comienzo de las pruebas, y ningún alimento debe ser dado a los peces durante el experimento.

Aireación: la aireación se detiene durante el periodo de dosificación de la sustancia de ensayo.

Acuarios de ensayo: para los ensayos se deben utilizar acuarios de 25L.

Concentraciones sustancia de ensayo: alfa-cipermetrina se debe almacenar a +4°C hasta la preparación de las concentraciones. Éstas se preparan pesando una cierta cantidad de alfa-cipermetrina, diluyéndola en acetona para conseguir las concentraciones de dosificación de 5, 8, 10, 15 y 20 µg/l. El grupo control se debe someter al nivel máximo de acetona utilizada para la dilución de las concentraciones de dosificación [2].

Distribución de los organismos: los organismos de ensayo se distribuyen al azar.

Cantidad de organismos requeridos: el experimento requiere un total de 240 peces, en vista que se utilizan 10 peces por cada repetición de cada concentración, y se manejan cuatro repeticiones, como se muestra a continuación, teniendo en cuenta el grupo control:

		Concentraciones					
		Control	1	2	3	4	5
Repeticiones	1	10	10	10	10	10	10
	2	10	10	10	10	10	10
	3	10	10	10	10	10	10
	4	10	10	10	10	10	10

Comportamientos que se deben registrar: los cambios de comportamiento se determinan para cada concentración, se debe observar y registrar la siguiente información: nado en forma desequilibrada, zozobra, peces adjuntos a la superficie, dificultad en la respiración y reunión alrededor del filtro de ventilación, lentitud en el movimiento y hundimiento hasta el fondo.

Parámetros de calidad del agua: los parámetros de calidad del agua (temperatura, oxígeno disuelto (OD), salinidad y pH) en los acuarios se determinan antes y diariamente durante la prueba. La temperatura del agua se debe mantener entre 21 y 23°C y, el medio experimental se debe airear con el fin de mantener la cantidad de oxígeno no menos de 4 mg/l.

Duración de la prueba: el periodo de experimentación es de 96h. El número de peces muertos se cuenta cada 12 horas y se retiran inmediatamente de los acuarios. La tasa de mortalidad se determina cada 24, 48, 72 y 96h.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 90 de 129

Observaciones:

- Se debe mantener la tasa de mortalidad menor al 5% en los peces de ensayo.
- Los peces muertos deben retirarse de inmediato.
- El grupo control se debe mantener en agua experimental sin agregar la sustancia de ensayo, manteniendo constantes las demás condiciones. La tasa de mortalidad en el grupo control no debe superar el 10%, y el 90% de los peces deben mantener un aspecto saludable durante todo el experimento.

Análisis estadístico.

La toxicidad se calcula a partir de la dosis letal 50 (DL₅₀) por medio del análisis Probit de Finney. Los datos también fueron evaluados de acuerdo al 'método Behrens-Karber' haciendo uso de la siguiente fórmula:

$$LC_{50} = LC_{100} - \frac{ab + \dots + ab}{n}$$

Donde,

El valor "a" da la diferencia entre las dos dosis consecutivas, "b" la media aritmética de la mortalidad causada por dos dosis consecutivas, y "n" el número de muestras en cada grupo.

El límite de confianza debe ser del 95%.

Actividades monitor.

- Leer previamente la práctica e información complementaria relacionada con la temática a trabajar, con el fin de tener un conocimiento claro y poder apoyar activamente a los estudiantes, en la resolución de dudas.
- Solicitar con anticipación los materiales y equipos que se requieren para el desarrollo de la práctica de laboratorio.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 91 de 129

- En vista que el agua del acuario no debe contener residuos de cloro, y por lo tanto durante 48h debe airearse, el monitor debe encargarse de esta actividad.
- El monitor junto a los estudiantes, deben organizarse para la alimentación diaria de los peces durante los 15 días correspondiente al periodo de acondicionamiento. Además para el conteo y retiro de los peces muertos cada 12 horas, y para la determinación de la tasa de mortalidad cada 24, 48, 72 y 96h.
- Preparar las concentraciones de la sustancia de ensayo; éstas se preparan pesando una cierta cantidad de alfa-cipermetrina, diluyéndola en acetona para conseguir las concentraciones de dosificación de 5, 8, 10, 15 y 20 µg/l. Para ello se debe tener en cuenta lo expuesto en las “Medidas de seguridad básicas en el laboratorio”.
- Hacer seguimiento de la práctica de laboratorio, para que ésta se lleve a cabo teniendo en cuenta el protocolo expuesto.
- Terminada la práctica de laboratorio, hacer entrega de los materiales y equipos utilizados, limpios y en buen estado.

Actividades estudiantes.

- Leer previamente la práctica de laboratorio y hacer entrega de un diagrama de flujo, donde se explique la metodología a desarrollar.
- Hacer entrega de un informe de laboratorio que contenga la siguiente información:
 - Resultados (imágenes o tablas)
 - Análisis de resultados
 - Conclusiones
 - Referencias en IEEE

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 92 de 129

- Resolver las siguientes preguntas:

- ¿Por qué la duración de la prueba debe ser de 96h?
- ¿Por qué se utilizan peces machos adultos para el desarrollo de la prueba, se podrían reemplazar por peces hembras?
- ¿Existen otras especies de peces que se puedan utilizar en pruebas de toxicidad?

Ensayo de toxicidad en el guppy *Poecilia reticulata* para aguas residuales.

Esta práctica de laboratorio, presenta el siguiente ensayo de toxicidad, teniendo en cuenta que se debe manejar el mismo protocolo anteriormente expuesto, con la única diferencia que se maneja como sustancia de ensayo una muestra de agua residual, por lo que a continuación se expone el protocolo de muestreo y el trabajo en laboratorio que debe llevarse a cabo [6,7]:

1. Para la toma de muestras, al ser un vertimiento de agua residual, se deben tener en cuenta las medidas de protección personal adecuadas como lo son el uso de guantes de látex, tapabocas, botas, cofia de plástico, y un traje de pantalón y blusa de plástico.
2. En un frasco de plástico, completamente limpio y rotulado, recolectar una muestra compuesta, resultante de la sumatoria de las alícuotas que se deben tomar cada media hora durante un periodo de 6 horas. Cada media hora debe tomarse una muestra de 100ml, para un total de 1200ml. En caso de ser necesario se debe utilizar un extensor para la toma de las muestras.
3. La muestra se transporta hacia el laboratorio en una nevera con hielo, con el fin de mantener una temperatura aproximada de 4°C y así preservar la muestra [8].
4. Los parámetros que se deben medir en campo haciendo uso del multiparámetro son: pH, sólidos suspendidos totales, conductividad, temperatura, oxígeno disuelto y turbidez. Con el fin de hacer una caracterización del agua residual.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 93 de 129

5. En el laboratorio se debe hacer la medición de aluminio, DBO y DQO
6. El docente junto con el monitor y los estudiantes, teniendo en cuenta los datos obtenidos en la caracterización del agua residual, deben establecer las diluciones necesarias para la obtención de las concentraciones.

Los estudiantes deben realizar las siguientes actividades, culminada la práctica de laboratorio donde se utiliza agua residual como sustancia de ensayo.

- Responder la siguiente pregunta: ¿Cuál es la diferencia entre los resultados obtenidos en la prueba donde se evaluó la CL₅₀ en el guppy *Poecilia reticulata*, y cuya sustancia de ensayo fue alfa-cipermetrina, frente a la prueba de toxicidad donde se utilizó agua residual?
- Entregar un informe de laboratorio que contenga la siguiente información: resultados (imágenes o tablas), análisis de resultados, conclusiones y referencias en IEEE.

Bibliografía.

- [1] Antalien Agro Químicos , Ficha técnica - AlfaCipermetrina, Antalien Agro Químicos, 2014.
- [2] M. Yilmaz, A. Gul y K. Erbasli, «Acute toxicity of alpha-cypermethrin to guppy (*Poecilia reticulata*, Pallas, 1859),» *Chemosphere*, vol. LVI, pp. 381-185, 2004.
- [3] M. Yilmaz, A. Gul y E. Karakose, «Investigation of acute toxicity and the effect of cadmium chloride (CdCl₂.H₂O) metal salt on behavior of the guppy (*Poecilia reticulata*),» *Chemosphere*, vol. LVI, pp. 375-380, 2004.
- [4] M. Selvi, R. Sarıkaya, F. Erkoç y O. Kocak , «Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos-methyl on guppy *Poecilia reticulata*,» *Chemosphere*, vol. LX, pp. 93-96, 2005.
- [5] T. Lopes Rocha, A. P. Rezende dos Santos, Á. Tatsumi Yamada, C. M. de Almeida Soares, C. Luiz Borges, A. Melo Bailão y S. M. Teixeira Sabóia-Morais, «Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide,» *Environmental Toxicology and pharmacology* , vol. XL, pp. 175-186, 2015.

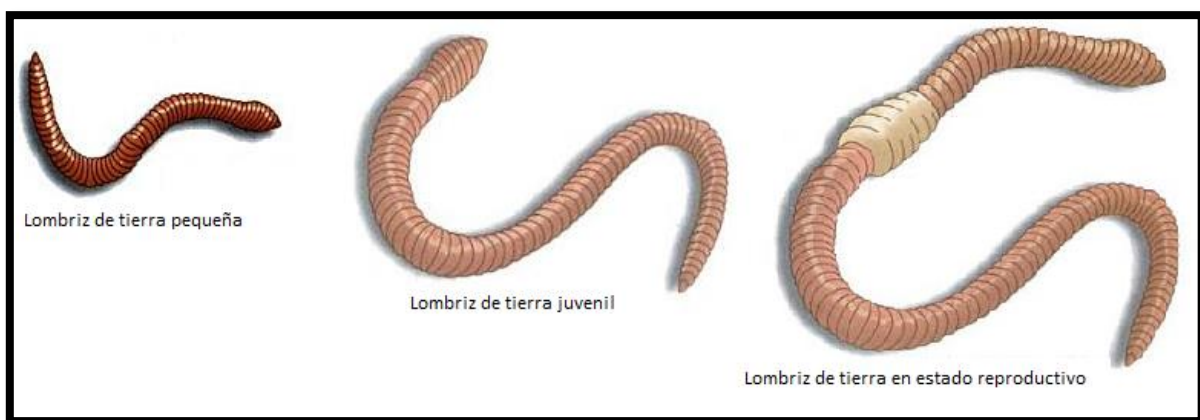
 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 94 de 129

- [6] J. d. C. Reinoso Carrasco , Determinación de toxicidad del aluminio presente en el sistema de alcantarillado de aguas residuales de la planta de tratamiento de Ucubamba de la ciudad de Cuenca, Cuenca, Ecuador : Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas , 2014.
- [7] L. E. Barba-Ho, Y. V. Ballesteros, P. J. Patiño y C. Ramírez Callejas, «Impacto generado por los vertimientos de las curtiembres en corrientes superficiales usando pruebas de toxicidad,» *Revista Ingeniería de los Recursos Naturales y del Ambiente - EIDENAR*, nº 12, 2013.
- [8] R. Mezquida Lucas, Laboratorio de Calidad de Aguas - Toma de muestras, Córdoba, Montería : Corporación Autónoma Regional de los Valles del Sinú y del San Jorge , 2012.

Práctica 7.

Test de reproducción en lombriz de tierra (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*)

Figura 1. Lombrices de diferentes edades, hasta el estado adulto [3].



Principio de la prueba.

Los ensayos con lombrices son ampliamente reconocidos como pruebas para evaluar la toxicidad de suelos contaminados. Cuando se tienen concentraciones subletales que pueden afectar el crecimiento o reproducción de la lombriz (como representante de los organismos del suelo), esta respuesta puede ser empleada como un centinela de procesos destructivos que pudieran presentarse en el suelo [2].

Lombrices adultas son expuestas al menos a cinco concentraciones diferentes de un compuesto, ya sea que se encuentre mezclado con el suelo o se aplique superficialmente (para el caso de plaguicidas). Los efectos letales sobre los organismos se observan en un plazo de 8 semanas. En las lombrices adultas la mortalidad y los efectos sobre el crecimiento se determinan después de 4 semanas. Por su parte, en las lombrices juveniles se realiza un recuento a las 8 semanas [1].

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 96 de 129

Condiciones para la validez de la prueba.

Los siguientes criterios deben ser satisfechos en los controles:

- Cada réplica (que contiene 10 adultos) debe producir ≥ 30 juveniles al final de la prueba.
- El coeficiente de variación de la reproducción debe ser $\leq 30\%$
- La mortalidad en adultos durante las primeros 4 semanas de la prueba debe ser $\leq 10\%$.

Descripción del método.

Materiales y equipos: se deben utilizar recipientes de ensayo de vidrio o de otro material químicamente inerte de aproximadamente uno a dos litros de capacidad. El diseño de la tapa del recipiente debe permitir el intercambio gaseoso entre el sustrato y la atmósfera y el acceso a la luz, para lo cual se puede colocar una tela recubierta con papel aluminio o un plástico al que se le perforan pequeños orificios, previniendo que los organismos se escapen. Un ejemplo se expone a continuación:

Figura 2. Frasco con tela para la prueba de toxicidad con lombriz de tierra [2].



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 97 de 129

Se requieren los siguientes equipos y materiales de laboratorio:

- Armario de secado.
- pHmetro y fotómetro.
- Balanza analítica.
- Equipos adecuados para el control de la temperatura (termómetro).
- Equipos adecuados para el control de la humedad (higrómetro).
- Incubadora o pequeña habitación con aire acondicionado.
- Pinzas, ganchos.
- Pipetas volumétricas y micropipetas.
- Espátula de acero inoxidable.
- Guantes.
- Papel filtro.
- Agua destilada o deionizada.
- Carbonato de calcio (CaCO_3).

Sustancia de ensayo: triclosán (pureza > 97%), que es un biocida que se emplea en jabones, desodorantes, dentífricos, antisépticos, desinfectantes y detergentes, para matar microorganismos e inhibir su crecimiento [4,5].

Debido a su uso generalizado, el triclosán termina en las aguas residuales. La mayor parte se retira en las plantas de tratamiento, y el resto se vierte en aguas superficiales. El triclosán retirado se biodegrada en parte, pero aproximadamente la mitad termina en los lodos de tratamiento, pudiendo introducirse en el medio ambiente si se utilizan dichos lodos para fertilizar los suelos agrícolas [4].

Algunos estudios han evaluado la ecotoxicología del triclosán. En una investigación donde se evaluó su fitotoxicidad, se obtuvo como resultado, la inhibición del crecimiento de algunas plantas. En otro estudio, se demostró que el triclosán a dosis inferiores de 10 mg/Kg puede alterar el ciclo del nitrógeno en los suelos. Sin embargo, los datos acerca de la respuesta bioquímica y genotóxica en las lombrices de tierra son muy limitados o inexistentes. Por lo tanto, se deben realizar estudios adicionales sobre la toxicidad del triclosán [5].

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 98 de 129

Suelo a utilizar: suelo artificial que tiene una composición de 10% musgo (materia orgánica), 20% arcilla y 70% arena. Se utiliza CaCO_3 para ajustar el pH a 7.0 ± 0.5 . Para el ensayo se deben pesar de 250 a 500 g de suelo artificial, con 4 réplicas por cada concentración.

Selección y preparación de animales de prueba: las especies utilizadas en la prueba son *Eisenia fetida* o *Eisenia andrei*. Se requieren lombrices adultos entre dos meses y un año de edad. Los individuos en un grupo de prueba no deben diferir en la edad por más de 4 semanas.

Las lombrices seleccionadas deberán aclimatarse durante al menos un día con el tipo de suelo artificial que se utilizará en la prueba. Durante este período las lombrices deben ser alimentadas con la misma comida que se utilizará en la prueba. Grupos de 10 lombrices deben ser pesados, se debe realizar una asignación al azar de los grupos que se adicionarán a los recipientes de ensayo.

Procedimiento.

Grupos de ensayo y controles: una carga de 10 lombrices en 500-600g de masa seca de suelo artificial (es decir, 50 a 60g de suelo por lombriz) se recomienda. Las lombrices se lavan con agua desionizada y se limpian, luego se colocan sobre papel absorbente por un período corto para permitir que el exceso de agua drene.

Los procedimientos pertinentes descritos se siguen para la preparación de los controles a excepción que la sustancia de ensayo no se adiciona.

Condiciones de prueba: la temperatura de ensayo es $20 \pm 2^\circ\text{C}$. El ensayo se lleva a cabo bajo ciclos de luz-oscuridad controlados (preferiblemente 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) con iluminación de 400 a 800lux en el área de los recipientes de ensayo.

Los recipientes de ensayo no se airean durante la prueba, pero el diseño de las pruebas debe proporcionar oportunidades para el intercambio gaseoso limitando la evaporación de la humedad.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 99 de 129

El contenido de agua del sustrato de suelo en los recipientes de ensayo se mantiene durante todo el ensayo. Las pérdidas se reponen cuando sea necesario con agua desionizada. Al final de la prueba, no debe haber una diferencia mayor de 10% en relación a la humedad inicial.

Alimentación: se ha demostrado que la avena, o el estiércol de vaca o caballo son un alimento adecuado. El estiércol debe ser secado al aire, finamente molido y pasteurizado antes de su uso. Para llevar a cabo este proceso de pasteurización, se envuelve el estiércol en una malla de tela para colocarlo dentro de una autoclave abierta a una temperatura de 70°C durante 3 minutos, este tiempo es suficiente para destruir organismos patógenos. Durante este proceso debe monitorearse que la temperatura no suba más allá de los 7°C. El transcurrir los 3 minutos, se saca inmediatamente el estiércol y se coloca en un envase con hielo, para bajar la temperatura, durante 5 minutos. Finalmente, el estiércol se guarda en un envase y se mantiene en refrigeración. Previo a su uso se saca del refrigerador hasta que alcance la temperatura ambiente para así deshacerlo en moronas [6].

La comida debe proporcionarse por primera vez el día después de la adición de las lombrices y la aplicación de la sustancia de ensayo en el suelo. Aproximadamente se esparcen 5g de alimento en la superficie del suelo de cada recipiente, y se humedece con agua desionizada (aproximadamente 5 ml a 6 ml por envase). A partir de entonces la alimentación tiene una frecuencia de una vez por semana durante el periodo de prueba de 4 semanas. Si el alimento no es consumido la ración se debe reducir a fin de evitar el crecimiento de hongos. Los adultos son removidos del suelo el día 28 de la prueba. A continuación, se administran los 5g de alimento en cada recipiente de prueba. Las lombrices no se alimentan las 4 semanas siguientes.

Preparación de concentraciones de ensayo: dos métodos de aplicación de la sustancia de ensayo se pueden utilizar: mezclando la sustancia de ensayo en el suelo o la aplicación a la superficie del suelo. En general, se recomienda la mezcla de la sustancia de ensayo en el suelo. Si se trata de compuestos en general, se mezcla la sustancia en el suelo. Si se trata de un plaguicida, se aplica en la superficie del suelo.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 100 de 129

La sustancia de prueba puede ser soluble en agua o en disolventes orgánicos. En el caso de ser soluble en agua, se prepara la cantidad necesaria para ajustar la humedad (35 a 50% de máxima capacidad de campo), y la solución es mezclada con el suelo antes de ser colocada en los contenedores.

Si el compuesto es insoluble en agua, pero soluble en un disolvente orgánico se disuelve en un mínimo de disolvente (por ejemplo, acetona). El disolvente se puede remover posteriormente colocando el suelo en una campana de extracción y mezclando continuamente (1 a 6 horas) o utilizando un rotavapor. Después de la evaporación del disolvente, se ajusta la humedad del suelo a máxima capacidad de campo y se coloca en los contenedores.

Aplicación de la sustancia de ensayo en la superficie del suelo: el suelo es tratado, después se añaden las lombrices. Los recipientes de ensayo se llenan primero con el sustrato del suelo humedecido y las lombrices pesadas se colocan en la superficie. Las lombrices sanas normalmente penetran inmediatamente en el sustrato, y en consecuencia, cualquier remanente en la superficie después de 15 minutos se definen como dañadas y deben ser reemplazadas. La sustancia de ensayo se debe aplicar a la superficie del suelo lo más uniformemente posible.

Los contenedores de prueba deben ser dejados al descubierto por un período de una hora para permitir que cualquier disolvente volátil asociado a la aplicación de la sustancia problema se evapore. Se debe tener cuidado que ninguna lombriz se escape de los recipientes de ensayo dentro de este tiempo.

Selección de concentraciones de ensayo: el conocimiento previo de la toxicidad de la sustancia problema debe ayudar en la selección de concentraciones de ensayo adecuadas. Cuando sea necesario, una prueba para la determinación del intervalo se lleva a cabo con, por ejemplo, cinco concentraciones de ensayo de 0.1, 1.0, 10, 100, y 1000 mg/kg (masa seca de suelo). La duración del ensayo preliminar es de dos semanas, y la mortalidad se evalúa al final de la prueba.

Para determinar la NOEC se preparan 5 concentraciones con un factor de diferencia entre ellas no mayor de 2; por ejemplo, 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 mg/kg. Si se desea además determinar la LOEC, se preparan 10 concentraciones diferentes bajo el mismo esquema anterior.

En esta práctica de laboratorio, se menciona en general la metodología para ejecutar ensayos de toxicidad en lombriz de tierra, facilitando así el desarrollo de nuevas prácticas donde se desee evaluar otra sustancia de ensayo. Aunque, para el desarrollo del presente ensayo se debe tener en cuenta la sustancia a utilizar, en este caso triclosán, y la preparación de las concentraciones de ensayo, donde las cantidades apropiadas de triclosán se disuelven en acetona, para lograr las siguientes concentraciones: 1, 10, 50, 100, y 300 mg/kg suelo. El grupo control se debe someter al nivel máximo de acetona utilizada para la dilución de las concentraciones de dosificación [5].

Diseño experimental: se utilizan 4 réplicas por concentración, considerando un mínimo de 5 concentraciones, como se muestra a continuación:

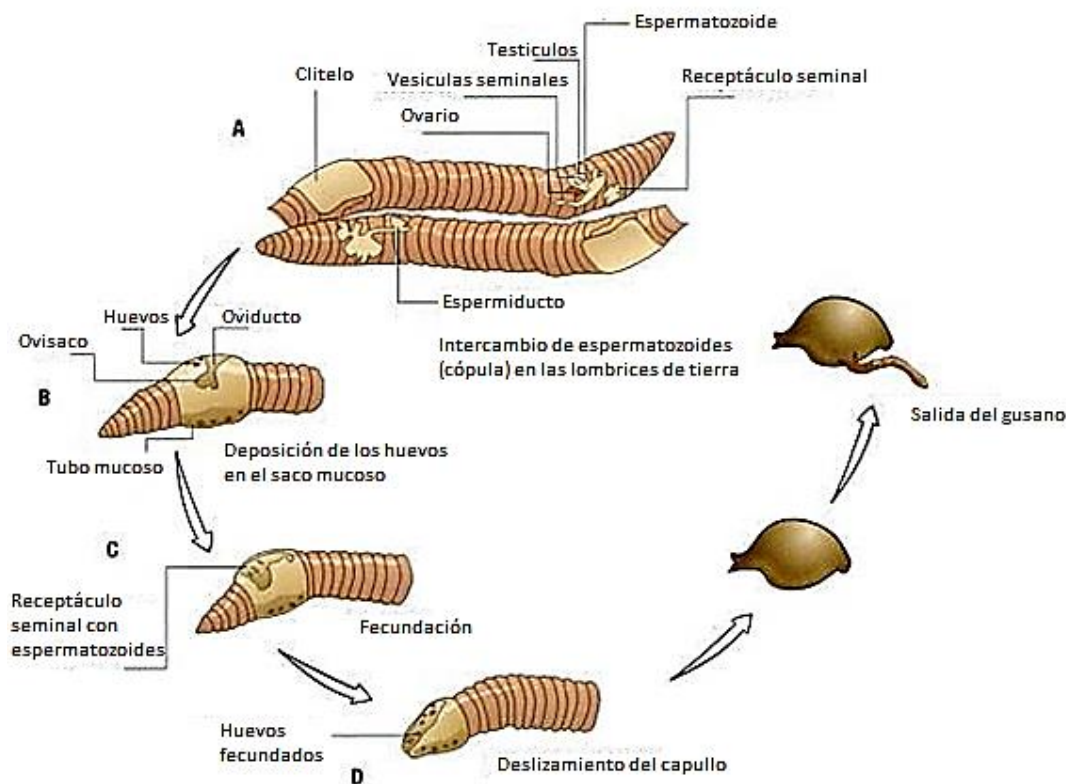
		Concentraciones					
		Control	1	2	3	4	5
Repeticiones	1	10	10	10	10	10	10
	2	10	10	10	10	10	10
	3	10	10	10	10	10	10
	4	10	10	10	10	10	10

Duración de la prueba y mediciones: los contenedores se abren a los 7, 14, 21 y 28 días para la evaluar a las lombrices. A los 7 días se revisan los contenedores para evaluar el movimiento o muerte de las lombrices; la mortalidad también se determina a los 14 días. A los 28 días (4 semanas) se hace una evaluación más detallada de las lombrices; las adultas son pesadas y contadas y se revisa su

morfología, cualquier anomalía debe anotarse (por ejemplo, incapacidad para cavar en el suelo y heridas abiertas). Las lombrices extraídas del suelo se deben lavar antes del pesaje (con agua desionizada), y el exceso de agua se elimina colocando brevemente las lombrices en papel filtro. Cualquier lombriz que no se encuentre en ese momento debe registrarse como muerta.

Las lombrices adultas son separadas y los capullos o lombrices juveniles son contados, dejándolas en el contenedor 28 días (4 semanas) más, bajo las mismas condiciones, adicionando alimento solo al inicio de esta fase. Al final de estas 4 semanas los capullos y lombrices juveniles se cuentan para determinar su viabilidad.

Figura 3. Cópula y formación del capullo de huevos de la lombriz de tierra [3].



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 103 de 129

Análisis de resultados.

Cambios en el comportamiento (por ejemplo, incapacidad para cavar en el suelo; inmovilidad contra la pared de vidrio del recipiente de ensayo) y la morfología (por ejemplo, heridas abiertas) de las lombrices adultas deben registrarse junto con la presencia de juveniles. Análisis Probit o regresión logística deben aplicarse para determinar la CL_{50} .

Para la reproducción, correspondiente al número de juveniles, se calcula la media aritmética y la varianza por tratamiento y por control. La media y varianza son usadas para el análisis de varianza (ANOVA) utilizando técnicas tales como t-Student, Dunnet o Williams, o un software como SAS, para obtener el intervalo de confianza de 95%. Se determina la NOEC y la CEX. La CL_{50} y la CEX se pueden determinar por los métodos Probit, Logit o Spearman-Trimmed Karber.

Actividades monitor.

- Leer previamente la práctica e información complementaria relacionada con la temática a trabajar, con el fin de tener un conocimiento claro y poder apoyar activamente a los estudiantes, en la resolución de dudas.
- Solicitar con anticipación los materiales y equipos que se requieren para el desarrollo de la práctica de laboratorio.
- Hacer seguimiento de la práctica de laboratorio, para que ésta se lleve a cabo teniendo en cuenta el protocolo expuesto.
- El monitor junto con los estudiantes, deben organizarse para llevar a cabo correctamente las actividades referentes a la alimentación, y a la mediciones a los 7, 14, 21 y 28 días para la evaluar a las lombrices.
- Preparar las concentraciones de la sustancia de ensayo, donde las cantidades apropiadas de triclosán se disuelven en acetona, para lograr las siguientes concentraciones: 1, 10, 50, 100, y 300 mg/kg suelo.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 104 de 129

- Seguimiento en la aplicación adecuada de la sustancia de ensayo, teniendo en cuenta que el grupo control se debe someter al nivel máximo de acetona utilizada para la dilución de las concentraciones de dosificación.
- Terminada la práctica de laboratorio, hacer entrega de los materiales y equipos utilizados, limpios y en buen estado.

Actividades estudiantes.

- Leer previamente la práctica de laboratorio y hacer entrega de un diagrama de flujo, donde se explique la metodología a desarrollar.
- Hacer entrega de un informe de laboratorio que contenga la siguiente información:
 - Resultados (imágenes o tablas)
 - Análisis de resultados
 - Conclusiones
 - Referencias en IEEE
- Resolver las siguientes preguntas:
 - Investigue un artículo donde la sustancia de ensayo evaluada sea un plaguicida o pesticida, y a partir de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta su criterio como ingeniero ambiental en formación, responda la siguiente pregunta: ¿Cuáles son las posibles afectaciones a los ecosistemas y la salud de la población? Además, mencione alguna(s) solución(es) para esta problemática.
 - ¿Qué sustancias son importantes evaluar a partir de los ensayos de toxicidad de suelos contaminados, y por qué?
 - ¿Existen otras pruebas para evaluar la toxicidad de suelos contaminados?

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 105 de 129

Bibliografía.

- [1] Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, *Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*, OCDE 222 Guideline for the testing of chemicals , 2004.
- [2] M. d. C. Cuevas Díaz , R. Ferrera Cerrato , A. Roldán Martín y R. Rodríguez Vázquez , Ensayo de toxicidad subcrónica con la lombriz de tierra *Eisenia andrei*, Ensayos para suelos , 2008.
- [3] M. R. García Conde y V. Solano Fajardo , Cría de la lombriz de tierra: Una alternativa ecológica y rentable, Bogotá: Fundación Hogares Juveniles Campesinos , 2005.
- [4] GreenFacts - Hechos sobre la salud y el Medioambiente, Triclosán y resistencia a los antibióticos, Comité Científico de Seguridad de los Consumidores, 2010.
- [5] D. Lin, Q. Zhou, X. Xie y Y. Liu, «Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*)», *Chemosphere*, vol. LXXXI, nº 10, pp. 1328-1333, 2010.
- [6] P. Ramírez Romero y A. Mendoza Cantú, Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México, México D.F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología , 2008.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 106 de 129

Práctica 8.

Prueba de toxicidad en lenteja de agua (*Lemna valdiviana*)

Figura 1. *Lemna valdiviana* [3].



Introducción.

Los resultados de los estudios ecotoxicológicos son una valiosa herramienta de predicción, para definir los umbrales que pueden soportar determinados ecosistemas ante una contaminación específica, los cuales servirán como guía para la toma de decisiones de las entidades reguladoras, además de informar y alertar sobre la peligrosidad de las alternativas del desarrollo, y de la degradación del medio ambiente, y así garantizar una evaluación de los riesgos planteados por los contaminantes para la salud ambiental y humana. Se debe resaltar que los métodos de ensayo empleados deben ser sensibles, rápidos, sencillos y de relevancia ecológica [1].

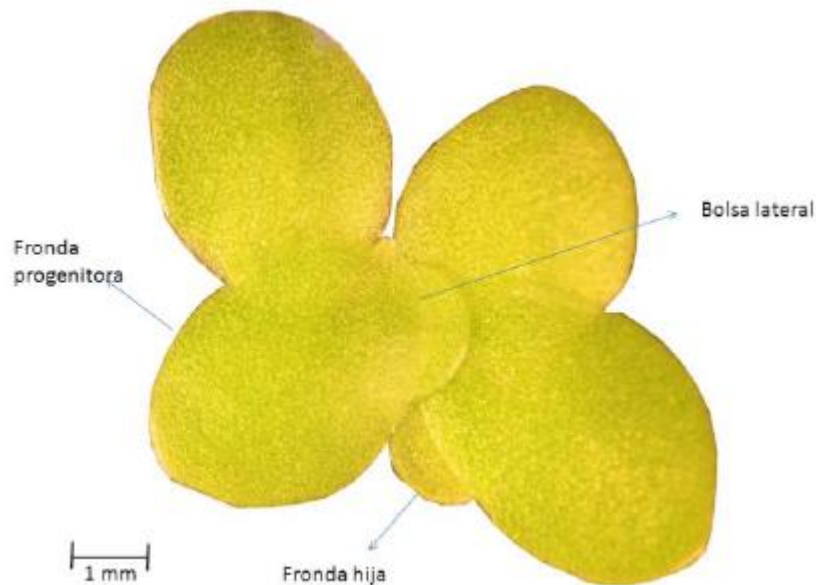
 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 107 de 129

Las plantas vasculares acuáticas pertenecientes al género *Lemna* han ganado una amplia aceptación como bioensayos ecotoxicológicos. *Lemna* spp presenta diferentes ventajas como organismos de prueba, por su estructura simple, tamaño pequeño, altas tasas de crecimiento (un tiempo de duplicación de 1-4 días), facilidad de cultivo y manipulación, alto grado de homogeneidad de tal manera que la mayoría de los clones son morfológicamente similares, la sensibilidad a una amplia gama de contaminantes, importancia ecológica como productores primarios, y su amplia presencia geográfica [1].

Características de las lemnáceas: las lemnáceas son plantas vasculares que flotan libremente sobre la superficie del agua, son de tamaño pequeño y se componen de estructuras similares a las hojas, llamadas frondes. Son de forma elíptica desde la cual emerge una raíz. Prosperan en ambientes de agua estancadas o corriente lenta. La producción de nuevas frondes es muy rápida en condiciones óptimas de luz, temperatura y nutrientes, alcanzando un crecimiento exponencial duplicando su número de frondes en un período de 2 a 4 días. Su tamaño por lo general no supera los 5 mm de diámetro. Se reproducen por vía vegetativa a partir de yemas que nacen desde cavidades laterales ubicadas en la región basal de la fronda, las cuales permanecen unidas a la fronda progenitora hasta alcanzar el tamaño suficiente, formándose así grupos clonales de la planta [2].

***Lemna valdiviana*:** es una de las lemnáceas más difíciles de reconocer. Pueden ser distinguidas de otros congéneres por sus cuerpos muy delgados, a veces transparentes. Estas plantas pueden estar en grupos de 4-8 frondas con textura de superficie translúcida uniforme y alargada. El cuerpo de la planta presenta una sola vena larga (generalmente visible en plantas vivas o muertas con retroiluminación). Ésta característica parece ser la más fiable para distinguir esta especie de otras [2].

Figura 2. Morfología externa de *Lemna valdiviana* [2].



Metodología.

Recolección y cultivo del material biológico: las plantas son transportadas al laboratorio en botellas con agua del mismo sector donde se colectaron. En el laboratorio se seleccionan a pulso las colonias de mejor aspecto visual para ser inoculadas con la misma agua traída, esperando su aclimatación. Luego de una semana se modifica el medio por una preparación salina (preparación de Steinberg), el cual les provee nutrientes necesarios para su crecimiento óptimo en condiciones controladas. El medio nutritivo de Steinberg se reemplaza 3 veces por semana, para evitar efectos alelopáticos que pueden provocar la aparición de microalgas, eutrofización y/o ataque bacteriano. Se busca lograr que los individuos alcancen un crecimiento sostenido en el tiempo, libre de factores estresores y contaminantes, para ser utilizados en los bioensayos [2].

Preparación del medio de cultivo: el agua reconstituida se prepara a partir de 5 soluciones salinas mezcladas (medio de Steinberg), diluidas en 1L de agua destilada. Esta mezcla nutritiva se utiliza tanto para la mantención de las colonias de plantas como para la exposición al tóxico.

Tabla 1. Soluciones nutritivas para el cultivo de *Lemna valdiviana* según medio de Steinberg [2].

Macronutrientes	mg/l
KNO ₃	350
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	295
KH ₂ PO ₄	90
K ₂ HPO ₄	12,6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100
Micronutrientes	µg/l
H ₃ BO ₃	120
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	180
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	44
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180
FeCl ₃ ·6H ₂ O	760
EDTA Disodium-dihidratado	15000

Sustancia de ensayo: mercurio.

Preparación de las concentraciones de la sustancia de ensayo: para la obtención de las concentraciones de mercurio, se prepara una solución madre del metal a partir de la sal HgCl₂ diluida en agua destilada, con el fin de obtener las concentraciones por simple dilución en el medio de cultivo [4].

Rango de concentraciones: 0.01; 0.10; 1.00; 10 mg/l [4].

Diseño Experimental: para los tóxicos de referencia se evalúa la sensibilidad fitotóxica de *Lemna valdiviana*, según 4 parámetros como puntos finales para la estimación de los efectos de inhibición del crecimiento (IC): área foliar (AF), número de frondas (NF), biomasa según su peso húmedo (PH) y el contenido de clorofila total (CTC), por cada tratamiento. Los bioensayos se realizan con 3 réplicas y 4 concentraciones para la evaluación de fitotoxicidad. Como se muestra a continuación, teniendo en cuenta el grupo control:

Concentraciones

	Grupo control	1	2	3	4
1	10	10	10	10	10
2	10	10	10	10	10
3	10	10	10	10	10

Réplicas

El volumen final de preparación por cada recipiente de exposición es de 100 ml cada uno, que incluye además un porcentaje de medio de cultivo concentrado y agua destilada para la dilución final. La cantidad de tóxico a utilizar, así como también la cantidad de agua de dilución en los tratamientos, se calcula de la siguiente manera:

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2$$

Donde,

V_1 = volumen de tóxico a añadir

C_1 = concentración inicial

V_2 = volumen final

C_2 = concentración final.

La duración del experimento es de 7 días en condiciones controladas de laboratorio (temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 14 horas luz/10 horas oscuridad, y una luminosidad de 5000 lúmenes).

Inoculación de los organismos: en cada uno de los vasos se inoculan 20 frondas (10 colonias de *Lemna valdiviana*), las cuales son previamente pesadas (peso húmedo). El criterio de elección de los organismos es que cada colonia tenga 2 frondas de similar tamaño y sin evidentes rasgos de división vegetativa, para evitar sesgos que puedan producirse por una mala estimación del crecimiento.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 111 de 129

Tasa de crecimiento: para realizar la estimación del crecimiento de la lenteja de agua, se lleva registro fotográfico diario de cada una de las réplicas ensayadas en las distintas concentraciones, con el fin de evaluar por conteo el número total de cada réplica ensayada, así como también el aumento de la superficie foliar total cada 24 horas.

Numero de frondas (NF): el conteo de las frondas se realiza mediante la observación de fotografías que se capturan día tras día a la misma hora. Se considera como criterio para la discriminación entre una yema interna y una hoja nueva, la línea perimetral de la fronda progenitora.

Utilizando los datos de número de frondas en el comienzo, durante la exposición y al final de ésta, se calcula la curva de crecimiento para cada control y cada concentración. La tasa de crecimiento (frondas en número de días) se calcula con la siguiente fórmula (**fórmula 2**):

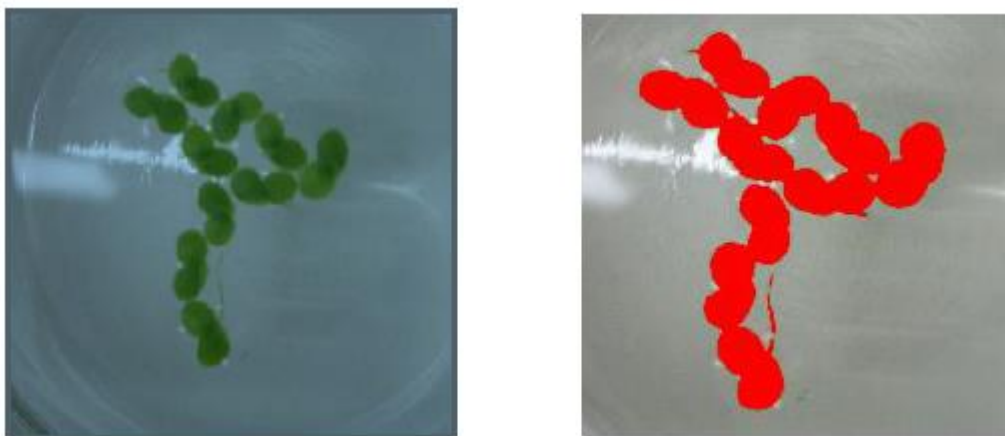
$$\mu = (\ln x_{t2} - \ln x_{t1}) / t_n$$

Donde,

x_{t1} y x_{t2} representan los parámetros de observación (número de frondas) en el tiempo t_n de duración del test.

Área de las frondas (AF): usando el programa computacional - "image-j"- se evalúa cada una de las fotografías tomadas a lo largo del test, para estimar el aumento o disminución de su área. Como resultado se obtiene información individual de cada réplica ensayada en centímetros cuadrados (cm²) que se compara con el control. La estimación de la tasa de crecimiento para este parámetro se calcula según la **fórmula 2**.

Figura 3. Metodología de estimación del área foliar de *L. valdiviana* mediante desfase de contraste utilizando Image – J [2].



Peso húmedo (PH): las frondas son pesadas antes y después del bioensayo, teniendo especial cuidado en mantener el mismo criterio del tiempo de secado y manejo de las frondas. La estimación de la tasa de crecimiento para este parámetro se calcula según la **fórmula 2**.

Contenido Total de Clorofila (CTC): finalizados los 7 días de exposición, todas las frondas se incuban durante 48h en 3 ml de acetona al 90%, a temperatura ambiente y en absoluta oscuridad. Completado este periodo de extracción se mide su coeficiente de absorción de luz a , haciendo uso de un espectrofotómetro, a tres longitudes de onda: 647, 664 y 645. El contenido de clorofila a , b y total se calcula de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
 \text{Chl } a &= 12,63 A_{664,5} - 2,52 A_{647} \\
 \text{Chl } b &= 20,47 A_{647} - 4,73 A_{664,5} \\
 \text{Chl Total} &= 17,95 A_{647} + 7,90 A_{664,5}
 \end{aligned}$$

Figura 4. Cubeta con extracto de clorofila post-ensayo, lista para ser medida en espectrofotómetro [2].



Evaluación de los puntos finales: La respuesta tóxica en los puntos finales mencionados, frente a la exposición a los contaminantes se expresa como IC₅₀ (concentración de tóxico que produce el 50% de inhibición en el parámetro considerado como punto final). Para este cálculo se utiliza el programa ToxRat®, el cual estima el IC₅₀ mediante un método no paramétrico de interpolación lineal, obteniendo los límites de confianza mediante “bootstrapping” por remuestreos al azar de los datos ingresados. Además, se estima el porcentaje de inhibición con respecto al control para los parámetros utilizados como puntos finales, mediante la siguiente formula:

$$I_i = (V_c - V_{si}) / V_c \cdot 100$$

Donde,

I_i: es la inhibición resultante al final del test. Si I_i < 0 ocurre inhibición; si I_i > 0 ocurre estimulación.

V_C: clorofila total en el control.

V_{si}: clorofila total en cada concentración de la muestra testeada.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 114 de 129

Actividades monitor.

- Leer previamente la práctica e información complementaria relacionada con la temática a trabajar, con el fin de tener un conocimiento claro y poder apoyar activamente a los estudiantes, en la resolución de dudas.
- Solicitar con anticipación los materiales y equipos que se requieren para el desarrollo de la práctica de laboratorio.
- El monitor debe encargarse de la preparación del medio de cultivo y de las concentraciones de la sustancia de ensayo.
- El monitor junto con los estudiantes, deben organizarse para llevar a cabo la actividad correspondiente al reemplazo cada 3 veces por semana del medio nutritivo de Steinberg.
- Hacer seguimiento continuo de las actividades correspondientes al conteo de las frondas, mediante la observación de fotografías que se capturan día tras día a la misma hora (se debe determinar la hora), la estimación del área foliar, el cálculo del peso húmedo y el contenido total de clorofila. Además de la estimación del crecimiento de la lenteja de agua, donde se lleva un registro fotográfico diario, como también el aumento de la superficie foliar total cada 24 horas.
- Hacer seguimiento de la práctica de laboratorio, para que ésta se lleve a cabo teniendo en cuenta el protocolo expuesto.
- Terminada la práctica de laboratorio, hacer entrega de los materiales y equipos utilizados, limpios y en buen estado.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 115 de 129

Actividades estudiantes.

- Leer previamente la práctica de laboratorio y hacer entrega de un diagrama de flujo, donde se explique la metodología a desarrollar.
- Hacer entrega de un informe de laboratorio que contenga la siguiente información:
 - Resultados (imágenes o tablas)
 - Análisis de resultados
 - Conclusiones
 - Referencias en IEEE
- Desarrollar las siguientes actividades:
 - Investigar acerca de los siguientes tipos de lemnáceas: *Lemna minuta*, *Lemna valdiviana* y *Lemna minor*. Consultar lo referente a la raíz, forma del cuerpo, tamaño, venas, posición bolsa de florecimiento, posición de la flor, disposición de los clústeres clonales, hábitat y distribución geográfica. Hacer un cuadro comparativo.
 - ¿Cuál de las tres especies investigadas en el punto anterior, es la que más se utiliza en bioensayos de toxicidad, y por qué?

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 116 de 129

Bibliografía.

- [1] A. Park, Y.J. Kim, E.M. Choi, M. T. Brown y T. Han, «A novel bioassay using root re-growth in *Lemna*,» *Aquatic Toxicology*, Vols. CXL-CXLI, pp. 415-424, 2013.
- [2] J. T. Valenzuela Pérez, Calibración y estimación de la sensibilidad toxicológica de *Lemna valdiviana* Phil (Araceae) en la realización de bioensayos de toxicidad crónica mediante dicromato de potasio y sulfato de cobre como tóxicos de referencia, Valdivia: Universidad Austral de Chile , 2013.
- [3] A. Zinovjev , «Go Botany Discover thousands of New England plants,» New England Wild Flower Society , 2011. [En línea]. Disponible en: <https://gobotany.newenglandwild.org/species/lemna/valdiviana/>. [Último acceso: 20 Noviembre 2015].
- [4] M. I. Posada y M. d. P. Arroyave , «Efectos del mercurio sobre algunas plantas acuáticas tropicales,» *EIA*, nº 6, pp. 57-67, 2006.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 117 de 129

Práctica 9.

Prueba de toxicidad en lenteja de agua (*Lemna minor*)

Introducción.

Una prueba de toxicidad es un ensayo en el cual un organismo o grupo de organismos son expuestos a un agente (químico, físico o biológico), para establecer y medir una respuesta previamente seleccionada. La respuesta se valora mediante la cuantificación del cambio en la característica o la ocurrencia de un determinado fenómeno (muerte, inhibición del crecimiento, entre otros). Se han desarrollado distintos tipos de ensayos de toxicidad, pero sus diferencias principales se centran en las concentraciones de tóxico empleadas y en la longitud de exposición a él [1].

La aplicación de los ensayos de toxicidad se ha convertido en una herramienta de manejo del medio ambiente, pues permiten la obtención de información para identificar y clasificar muestras potencialmente tóxicas, y definir el grado y extensión real de la contaminación tóxica. Los ensayos de toxicidad dan una visión integrada del efecto tóxico generado por diversos contaminantes presentes en una muestra, y los resultados expresan el peligro potencial para los organismos [1].

Para este caso, es importante resaltar que la contaminación acuática por mercurio, se debe principalmente a los residuos de actividades productivas como la minería y la industria, además de las debidas causas naturales por fenómenos geológicos como la meteorización, la erosión de las rocas y la lixiviación, siendo esta contaminación uno de los problemas ambientales más críticos en la actualidad, debido a su alta toxicidad, persistencia y capacidad de bioacumulación y bioconcentración (también conocida como biomagnificación). En los ambientes contaminados por metales pesados se altera la capacidad de supervivencia de los organismos, lo que afecta la dinámica poblacional de las especies y, por tanto, la estructura y función ecosistémica [1].

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 118 de 129

El mercurio es uno de los metales pesados que mayor preocupación está causando en el mundo por su acción sumamente tóxica para los organismos y para el hombre. Se considera poco peligroso en forma metálica y en sales minerales, pero en compuestos orgánicos su acción se torna muy tóxica para el hombre como último consumidor de pescados y mariscos, que tienen la propiedad de acumularlo en sus tejidos. El mercurio funciona como una neurotoxina una vez dentro del cuerpo humano, interfiriendo con el cerebro y el sistema nervioso [1].

Por otro lado, referente al organismo de ensayo, se expone que *Lemna* spp., *L. gibba* y *L. minor* se han utilizado más ampliamente en las pruebas de fitotoxicidad. En el caso de *Lemna minor*, en los bioensayos utilizando criterios de valoración tradicionales como el número de frondas, biomasa húmeda o seca y tasas de crecimiento de frondas, requieren duraciones de exposición estándar de al menos 7 días para detectar la toxicidad [2].

Materiales y equipos:

- **Sustancia de ensayo:** mercurio.
- Sal $HgCl_2$.
- Agua destilada.
- Pinza.
- Estereoscopio.
- Equipo para la medición de pH, temperatura, conductividad e iluminación.
- Vasos de precipitado de 150 ml.

Figura 1. Lenteja de agua [3].



Procedimiento.

Preparación de las concentraciones de la sustancia de ensayo: para la obtención de las concentraciones de mercurio, se prepara una solución madre del metal a partir de la sal HgCl_2 diluida en agua destilada, con el fin de obtener las concentraciones por simple dilución en el medio de cultivo.

Ensayos:

1. Para los ensayos, las plantas deben ser seleccionadas y transferidas desde el recipiente de cultivo con una pinza, verificando con el estereoscopio que la colonia cumpla los requisitos (3 plantas de similar tamaño y edad).
2. Para el presente ensayo se manejan 4 concentraciones, 3 réplicas y 9 plantas por cada recipiente (vasos de precipitado de 150 ml), como se expone a continuación, teniendo en cuenta el grupo control:

Concentraciones

	Grupo control	1	2	3	4
1	9	9	9	9	9
2	9	9	9	9	9
3	9	9	9	9	9
4	9	9	9	9	9

3. Durante los siete días siguientes a la siembra se registra el número de plantas vivas y muertas y el número de colonias.
4. Adicionalmente, se deben evaluar el pH, la temperatura, la conductividad y la iluminación como factores de control.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 120 de 129

5. Con los datos anteriores se generan las curvas de crecimiento poblacional y de mortalidad para cada concentración del metal y para el control.

A continuación se expone un resumen de las condiciones experimentales para el ensayo de toxicidad con lenteja de agua.

Tabla 1. Condiciones experimentales para el ensayo de toxicidad con lenteja de agua *Lemna minor* [1].

VARIABLE	RECOMENDACIÓN
Agua de dilución	Destilada
Número de concentraciones	4
Rango de concentraciones	0.01; 0.10; 1.00; 10 mg/l
Número de réplicas	4
Número de ejemplares por recipiente	9 plantas: 3 colonias de 3 plantas
Fotoperiodo	Continuo, 24 horas luz
Temperatura	25 ± 2°C
Iluminación	2.150 lux o 4.300 lux en la superficie del agua
Duración	7 días
Conteo	Diario
Observación	Estereoscopio

Actividades monitor.

- Leer previamente la práctica e información complementaria relacionada con la temática a trabajar, con el fin de tener un conocimiento claro y poder apoyar activamente a los estudiantes, en la resolución de dudas.
- Solicitar con anticipación los materiales y equipos que se requieren para el desarrollo de la práctica de laboratorio.
- Preparar las concentraciones de la sustancia de ensayo.
- Hacer seguimiento de la práctica de laboratorio, para que ésta se lleve a cabo teniendo en cuenta el protocolo expuesto. Por lo que el monitor junto con los estudiantes, deben organizarse para llevar a cabo las actividades referentes al

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 121 de 129

conteo, el registro del número de plantas vivas y muertas, y la evaluación del pH, temperatura, conductividad y la iluminación, cuya frecuencia es diaria.

- Terminada la práctica de laboratorio, hacer entrega de los materiales y equipos utilizados, limpios y en buen estado.

Actividades estudiantes.

- Leer previamente la práctica de laboratorio y hacer entrega de un diagrama de flujo, donde se explique la metodología a desarrollar.
- Hacer entrega de un informe de laboratorio que contenga la siguiente información:
 - Resultados (imágenes o tablas)
 - Análisis de resultados
 - Conclusiones
 - Referencias en IEEE
- Desarrollar las siguientes actividades:
 - ¿Qué otras especies de plántulas también se utilizan para llevar a cabo ensayos de toxicidad?
 - A partir del punto anterior, investigue y mencione los resultados de un artículo científico, donde se haya realizado un ensayo de toxicidad con alguna de las plántulas mencionadas.
 - Teniendo en cuenta que se evalúa la misma sustancia de ensayo (mercurio), para las dos prácticas de laboratorio de lenteja de agua, mencione cuales son las diferencias más significativas de los resultados obtenidos en los ensayos experimentales.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 122 de 129

Bibliografía.

- [1] M. I. Posada y M. d. P. Arroyave , «Efectos del mercurio sobre algunas plantas acuáticas tropicales,» *EIA*, nº 6, pp. 57-67, 2006.
- [2] A. Park, Y.J. Kim, E.M. Choi, M. T. Brown y T. Han, «A novel bioassay using root re-growth in *Lemna*,» *Aquatic Toxicology*, Vols. CXL-CXLI, pp. 415-424, 2013.
- [3] Infojardin, «Lenteja de agua - *Lemna minor*,» 2002. [En línea]. Disponible en: <http://fichas.infojardin.com/acuaticas/lemma-minor-lenteja-de-agua-lentejas-agua.htm>. [Último acceso: 25 Noviembre 2015].

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 123 de 129

Bibliografía

- [1] M. Repetto Jiménez y G. Repetto Kuhn, Toxicología Fundamental, Cuarta ed., Díaz de Santos, 2009.
- [2] C. Klaassen y J. Watkins, Casarett y Doull Fundamentos de toxicología, Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, 2005.
- [3] D. Neubert, «Risk assessment and preventive hazard minimization,» de *Toxicology*, H. Marquardt, S. Schäfer, R. McClellan y F. Welsch, Editores., San Diego, Academic Press, 1999, pp. 1153-1190.
- [4] Y. Pica Granados y G. Trujillo Domínguez, «Ensayo de toxicidad aguda con la bacteria *Vibrio fischeri*,» de *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en aguas y suelo. La experiencia en México*, P. Ramírez Romero y A. Mendoza Cantú, Editores, Delegación Tlalpan, México, D.F., Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales-Instituto Nacional de Ecología, 2008, pág. 307-317.
- [5] ATSDR - Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, «Glosario de términos,» 26 Junio 2002. [En línea]. Disponible: http://www.atsdr.cdc.gov/es/es_glossary.html. [Último acceso: 1 Febrero 2016].
- [6] Universidad de Arizona, «Efecto tóxico,» 25 Marzo 2004. [En línea]. Disponible: <http://toxamb.pharmacy.arizona.edu/c1-2-6.html>. [Último acceso: 1 Febrero 2016].
- [7] Environmental Protection Agency, «Daphnid Chronic Toxicity Test,» United States: EPA Ecological Effects Test Guidelines, 1996.
- [8] Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, de "*Daphnia sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test*" PART I - 24h EC50 Acute Immobilisation Test, OECD 202 guideline for Testing of Chemicals, 1984.
- [9] Asociación Valenciana de Agricultores, «Tratamientos fitosanitarios y fitotoxicidad,» 25 Julio 2005. [En línea]. Disponible: http://www.avaasaja.org/index.php?option=com_revistas&task=verarticulo&id=649&Itemid=73. [Último acceso: 01 Febrero 2016].

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 124 de 129

- [10] Ministerio de Comercio, Industria y Turismo, «Medidas Sanitarias y Fitosanitarias,» 03 Octubre 2011. [En línea]. Disponible: <http://www.mincit.gov.co/publicaciones.php?id=15030>. [Último acceso: 01 Febrero 2016].
- [11] Univerisidad Nacional Abierta y a Distancia, «Curso de Toxicología Ambiental,» [En línea].Disponible: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358027/358027/leccin_1_toxicologa_toxicologa_ambiental_y_ecotoxicologa.html. [Último acceso: 1 Febrero 2016].
- [12] Universidad Autónomo de Manizales , «Toxicología ambiental y salud pública - Concepto actual de tóxico,» Facultad de Ciencias Biológicas - Licenciatura de Ciencias Ambientales, Manizales, 2011.
- [13] R. K. Murray, «Metabolismo de xenobióticos,» de HARPER. *BIOQUÍMICA ILUSTRADA*, 28a ed., México D.F., McGraw-Hill, 2010, p. 609.
- [14] G. Castillo Morales, Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones, México: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo , 2004.
- [15] C. M. Gamez Rojas y E. J. Ramirez Riveros , Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del herbicida Roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*, Bogotá: Universidad de la Salle; Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, 2008.
- [16] E. Galdiero, V. Maselli, A. Falanga, R. Gesuele, S. Galdiero, D. Fulgione y M. Guida, «Integrated analysis of the ecotoxicological and genotoxic effects of the antimicrobial peptide melittin on *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata*,» *Environmental Pollution*, nº 203, pp. 145-152, 2015.
- [17] S. A. Mansour y M. F. Gad, «Risk assessment of pesticides and heavy metals contaminants in vegetables: A novel bioassay method using *Daphnia magna* Straus,» *Food and Chemical Toxicology*, nº 48, pp. 377-389, 2010.
- [18] A. Martins , L. Guimarães y L. Guilhermino, «Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to *Daphnia magna* assessed at two temperatures,» *Environmental Toxicology and Pharmacology*, nº 36, pp. 1022-1032, 2013.

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 125 de 129

- [19] H. Toumi, M. Boumaiza, M. Millet, C. Radetski, V. Felten, C. Fouque y J. Féraud, «Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, [Cladocera],» *Science of the Total Environment*, nº 458-460, pp. 47-53, 2013.
- [20] C. Rivetti , B. Campos y C. Barata , «Low environmental levels of neuro-active pharmaceuticals alter phototactic behaviour and reproduction in *Daphnia magna*,» *Aquatic Toxicology*, vol. CLXX, pp. 289-296, 2015.
- [21] P. Romero Ramírez , A. Mendoza Cantú, M. C. Díaz Báez , Y. Pica Granados y A. Ronco, Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México - Ensayo de toxicidad aguda con el cladócero *Daphnia magna*, México D.F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales - Instituto Nacional de Ecología, 2008.
- [22] Medline Plus - Información de salud para usted, «Diazepam,» Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU., 1 Agosto 2010. [En línea]. Disponible en: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a682047-es.html>. [Último acceso: 16 Noviembre 2015].
- [23] G. Castillo Morales, Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones, México: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo , 2004.
- [24] A. Martins, L. Guimarães y L. Guilhermino, «Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to *Daphnia magna* assessed at two temperatures,» *Environmental Toxicology and Pharmacology* , vol. XXXVI, nº 3, pp. 1022-1032, 2013.
- [25] Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, *Daphnia magna Reproduction Test*, OCDE 211 Guidelines for Testing of Chemicals, 1998.
- [26] P. Romero Ramírez , A. Mendoza Cantú, M. C. Díaz Báez , Y. Pica Granados y A. Ronco, Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México - Ensayo de toxicidad aguda con el cladócero *Daphnia magna*, México D.F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales - Instituto Nacional de Ecología, 2008.

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 126 de 129

- [27] M. C. Díaz Báez , M. C. Bustos López y A. J. Espinora Ramírez , Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos, Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. , 2004.
- [28] C. Rivetti , B. Campos y C. Barata , «Low environmental levels of neuro-active pharmaceuticals alter phototactic behaviour and reproduction in *Daphnia magna*,» *Aquatic Toxicology*, vol. CLXX, pp. 289-296, 2015.
- [29] J. d. C. Reinoso Carrasco , Determinación de toxicidad del aluminio presente en el sistema de alcantarillado de aguas residuales de la planta de tratamiento de Ucubamba de la ciudad de Cuenca, Cuenca, Ecuador : Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas , 2014.
- [30] L. E. Barba-Ho, Y. V. Ballesteros, P. J. Patiño y C. Ramírez Callejas, «Impacto generado por los vertimientos de las curtiembres en corrientes superficiales usando pruebas de toxicidad,» *Revista Ingeniería de los Recursos Naturales y del Ambiente - EIDENAR*, nº 12, 2013.
- [31] R. Mezquida Lucas, Laboratorio de Calidad de Aguas - Toma de muestras, Córdoba, Montería : Corporación Autónoma Regional de los Valles del Sinú y del San Jorge , 2012.
- [32] J. R. Naidu, R. Ismail y S. Sasidharan, «Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of Methanol Extract of *Mentha Spicata* L (Lamiaceae),» *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. XIII, nº 1, pp. 101-107, 2014.
- [33] G. J. Devine, D. Eza, E. Ogusuku y M. J. Furlong, «Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas,» *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* , vol. XXV, nº 1, pp. 74-100, 2008.
- [34] Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades , Resumen de Salud Pública: piretrinas y piretroides, Estados Unidos : Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU. - Servicio de Salud Pública , 2003.
- [35] G. Arencibia-Carballo, R. A. Tizol-Correa y R. Oscar Rodríguez, «Toxicidad de nauplios de *Artemia franciscana* a dos piretroides de uso comercial,» *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras* , vol. XXVII, nº 1, pp. 47-53, 2010.

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 127 de 129

- [36] S. Rajabi, A. Ramazani, M. Hamidi y T. Naji, «*Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles,» *DARU Journal of Pharmaceutical Scienc*, vol. XXIII, nº 20, pp. 1-6, 2015.
- [37] M. Ates, J. Daniels, Z. Arslan y I. O. Farah, «Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation and toxicity,» *Environ Monit Assess*, vol. CLXXXV, nº 4, pp. 3339-3348, 2013.
- [38] A. de Sousa Leite, A. Ferreira Dantas, G. Laylson da Silva Oliveira, A. L. Gomes Júnior, S. Gonçalo de Lima, A. M. d. G. Lopes Citó, R. M. de Freitas, A. A. d. C. Melo-Cavalcante y J. A. Dantas Lopes, «Evaluation of Toxic, Cytotoxic, Mutagenic, and Antimutagenic Activities of Natural and Technical Cashew Nut Shell Liquids Using the *Allium cepa* and *Artemia salina* Bioassays,» *BioMed Research International*, pp. 1-16, 2015.
- [39] J. J. Cabrera Dorado , Estudio sobre la toxicidad de los vertidos en Huelva. Métodos de ensayo: ensayo de toxicidad aguda en *Artemia salina*, Huelva, España , 2010.
- [40] J. J. Cabrera Dorado, *Proyecto fin de master: Estudio sobre la toxicidad de los vertidos*, Huelva - España: Universidad de Sevilla-master en tecnología química y ambiental, 2010.
- [41] S.-Y. Lee, H.-J. Kang y J.-H. Kwon , «Toxicity cutoff of aromatic hydrocarbons for luminescence inhibition of *Vibrio fischeri*,» *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. XCIV, pp. 116-122, 2013.
- [42] Secretaria de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI), Análisis de Agua. Determinación de fenoles totales en aguas naturales potables, residuales y residuales tratadas. Método de prueba de la DGN, Norma Mexicana NMX-AA-050-SCOFI, 2001.
- [43] Antalien Agro Químicos , Ficha técnica - AlfaCipermetrina, Antalien Agro Químicos, 2014.
- [44] M. Yilmaz, A. Gul y K. Erbasli, «Acute toxicity of alpha-cypermethrin to guppy (*Poecilia reticulata*, Pallas, 1859),» *Chemosphere*, vol. LVI, pp. 381-185, 2004.
- [45] M. Yilmaz, A. Gul y E. Karakose, «Investigation of acute toxicity and the effect of cadmium chloride ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) metal salt on behavior of the guppy (*Poecilia reticulata*),» *Chemosphere*, vol. LVI, pp. 375-380, 2004.

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 128 de 129

- [46] M. Selvi, R. Sarıkaya, F. Erkoç y O. Kocak , «Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos-methyl on guppy *Poecilia reticulata*,» *Chemosphere*, vol. LX, pp. 93-96, 2005.
- [47] T. Lopes Rocha, A. P. Rezende dos Santos, Á. Tatsumi Yamada, C. M. de Almeida Soares, C. Luiz Borges, A. Melo Bailão y S. M. Teixeira Sabóia-Morais, «Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide,» *Environmental Toxicology and pharmacology* , vol. XL, pp. 175-186, 2015.
- [48] J. d. C. Reinoso Carrasco , Determinación de toxicidad del aluminio presente en el sistema de alcantarillado de aguas residuales de la planta de tratamiento de Ucubamba de la ciudad de Cuenca, Cuenca, Ecuador : Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas , 2014.
- [49] L. E. Barba-Ho, Y. V. Ballesteros, P. J. Patiño y C. Ramírez Callejas, «Impacto generado por los vertimientos de las curtiembres en corrientes superficiales usando pruebas de toxicidad,» *Revista Ingeniería de los Recursos Naturales y del Ambiente - EIDENAR*, nº 12, 2013.
- [50] R. Mezquida Lucas, Laboratorio de Calidad de Aguas - Toma de muestras, Córdoba, Montería : Corporación Autónoma Regional de los Valles del Sinú y del San Jorge , 2012.
- [51] Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, *Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*, OCDE 222 Guideline for the testing of chemicals , 2004.
- [52] M. d. C. Cuevas Díaz , R. Ferrera Cerrato , A. Roldán Martín y R. Rodríguez Vázquez , Ensayo de toxicidad subcrónica con la lombriz de tierra *Eisenia andrei*, Ensayos para suelos , 2008.
- [53] M. R. García Conde y V. Solano Fajardo , Cría de la lombriz de tierra: Una alternativa ecológica y rentable, Bogotá: Fundación Hogares Juveniles Campesinos , 2005.
- [54] GreenFacts - Hechos sobre la salud y el Medioambiente, Triclosán y resistencia a los antibióticos, Comité Científico de Seguridad de los Consumidores, 2010.

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia



 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA	FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL	
	Guía de Prácticas de Laboratorio	Pág. 129 de 129

- [55] D. Lin, Q. Zhou, X. Xie y Y. Liu, «Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*),» *Chemosphere*, vol. LXXXI, nº 10, pp. 1328-1333, 2010.
- [56] D. Corona Valdillo, S. Cram Heydrich y E. Rojas del Castillo, «Ensayo de genotoxicidad con la lombriz de tierra *Eisenia andrei*,» de *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*, P. Ramírez Romero y A. Mendoza Cantú, Editores, Delegación Tlalpan, México D.F., Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales-Instituto Nacional de Ecología, 2008, pág. 233-273.
- [57] A. Park, Y.J. Kim, E.M. Choi, M. T. Brown y T. Han, «A novel bioassay using root re-growth in *Lemna*,» *Aquatic Toxicology*, Vols. CXL-CXLI, pp. 415-424, 2013.
- [58] J. T. Valenzuela Pérez, Calibración y estimación de la sensibilidad toxicológica de *Lemna valdiviana* Phil (Araceae) en la realización de bioensayos de toxicidad crónica mediante dicromato de potasio y sulfato de cobre como toxicos de referencia, Valdivia: Universidad Austral de Chile, 2013.
- [59] A. Zinovjev, «Go Botany Discover thousands of New England plants,» New England Wild Flower Society, 2011. [En línea]. Disponible en: <https://gobotany.newenglandwild.org/species/lemna/valdiviana/>. [Último acceso: 20 Noviembre 2015].
- [60] M. I. Posada y M. d. P. Arroyave, «Efectos del mercurio sobre algunas plantas acuáticas tropicales,» *EIA*, nº 6, pp. 57-67, 2006.
- [61] M. I. Posada y M. d. P. Arroyave, «Efectos del mercurio sobre algunas plantas acuáticas tropicales,» *EIA*, nº 6, pp. 57-67, 2006.
- [62] A. Park, Y.J. Kim, E.M. Choi, M. T. Brown y T. Han, «A novel bioassay using root re-growth in *Lemna*,» *Aquatic Toxicology*, Vols. CXL-CXLI, pp. 415-424, 2013.
- [63] Infojardin, «Lenteja de agua - *Lemna minor*,» 2002. [En línea]. Disponible en: <http://fichas.infojardin.com/acuaticas/lemma-minor-lenteja-de-agua-lentejas-agua.htm>. [Último acceso: 25 Noviembre 2015].

Sede Principal: Cra.9 N° 51-11 PBX: 57(1) 587 87 97 - **Sede de Lourdes:** Cra. 9A N° 63-28 PBX: 57(1) 595 00 00

Campus San Alberto Magno: Autopista Norte, calle 205, Av. Los Arrayanes Km 1.6
www.usta.edu.co - E-mail: usantotomas@usantotomas.edu.co - Bogotá, D.C. – Colombia

