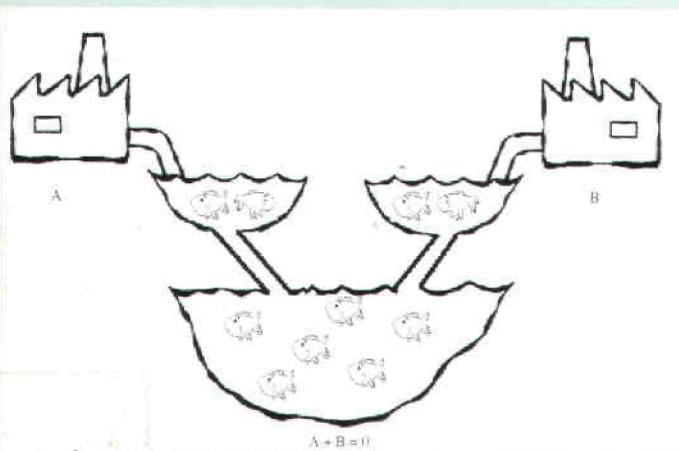


SERIE AUTODIDÁCTICA DE MEDICIÓN DE LA CALIDAD DEL AGUA, SEGUNDA PARTE

ANÁLISIS DE TOXICIDAD EN EL AGUA



15

Autora: Yolanda Pica Granados

Revisora IMTA: Alicia Lerdo de Tejada Brito

Revisores CNA: Irma Laura Medina Salazar

Luis Miguel Rivera Chávez

Editor: César G. Calderón Mólgora

G
628.1
A85
25789

INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA

CENTRO DE CONSULTA DEL AGUA

© Comisión Nacional del Agua,
CNA
© Instituto Mexicano de Tecnología
del Agua IMTA

Edita:

Comisión Nacional del Agua.
Subdirección General de
Administración del Agua.
Gerencia de Inspección y Medición.

Instituto Mexicano de Tecnología
del Agua.
Coordinación de Tratamiento y
Calidad del Agua.
Subcoordinación de Potabilización.

Imprime:
Instituto Mexicano de Tecnología
del Agua

ISBN
968-55-36-21-X

PARTICIPANTES

En la realización de este documento, colaboraron: Especialistas del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, IMTA y de la Subdirección General de Administración del Agua, CNA.

**Autora:
Yolanda Pica Granados**

**Revisora IMTA:
Alicia Lerdo de Tejada Brito**

**Revisores CNA:
Irma Laura Medina Salazar
Luis Miguel Rivera Chávez**

**Editor:
César G. Calderón Mólgora**

**Corrector de Estilo:
Antonio Requejo del Blanco**

**Ilustraciones:
Eduardo Rodríguez Martínez**

**Formación:
Gema Alín Martínez Ocampo**

**Portada:
Óscar Alonso Barrón**

Para mayor información dirigirse a:

COMISIÓN NACIONAL DEL AGUA
SUBDIRECCION GENERAL DE
ADMINISTRACIÓN DEL AGUA
GERENCIA DE INSPECCIÓN Y
MEDICIÓN.

Ing. Roberto Merino Carrión.
roberto.merino@cna.gob.mx
Insurgentes Sur No. 1228 5°. Piso,
Colonia Tlacoquemecatí del Valle
C.P. 03200, México D.F.
Teléfono. 01 (55) 55-75-44-47
Fax. 01 (55) 55-75-08-98

INSTITUTO MEXICANO DE
TECNOLOGÍA DEL AGUA.
COORDINACIÓN DE TRATAMIENTO
Y CALIDAD DEL AGUA.
Dr. Aldo Iván Ramírez Orozco.
aramirez@tlaloc.imta.mx
Paseo Cuauhnáhuac No. 8532,
Colonia Progreso, C.P. 62550,
Jiutepec, Morelos.
Teléfono y fax 01 (777) 3-19-43-81

Derechos reservados por Comisión
Nacional del Agua, Insurgentes Sur No.
2140, Ermita San Ángel; C.P. 01070,
México D.F., e Instituto Mexicano de
Tecnología del Agua, Paseo Cuauhná-
huac No. 8532, Colonia Progreso, C.P.
62550, Jiutepec, Morelos.

Esta edición y sus características son
propiedad de la Comisión Nacional del
Agua y del Instituto Mexicano de Tecno-
logía del Agua.

Clasif. 9628.1

A 85

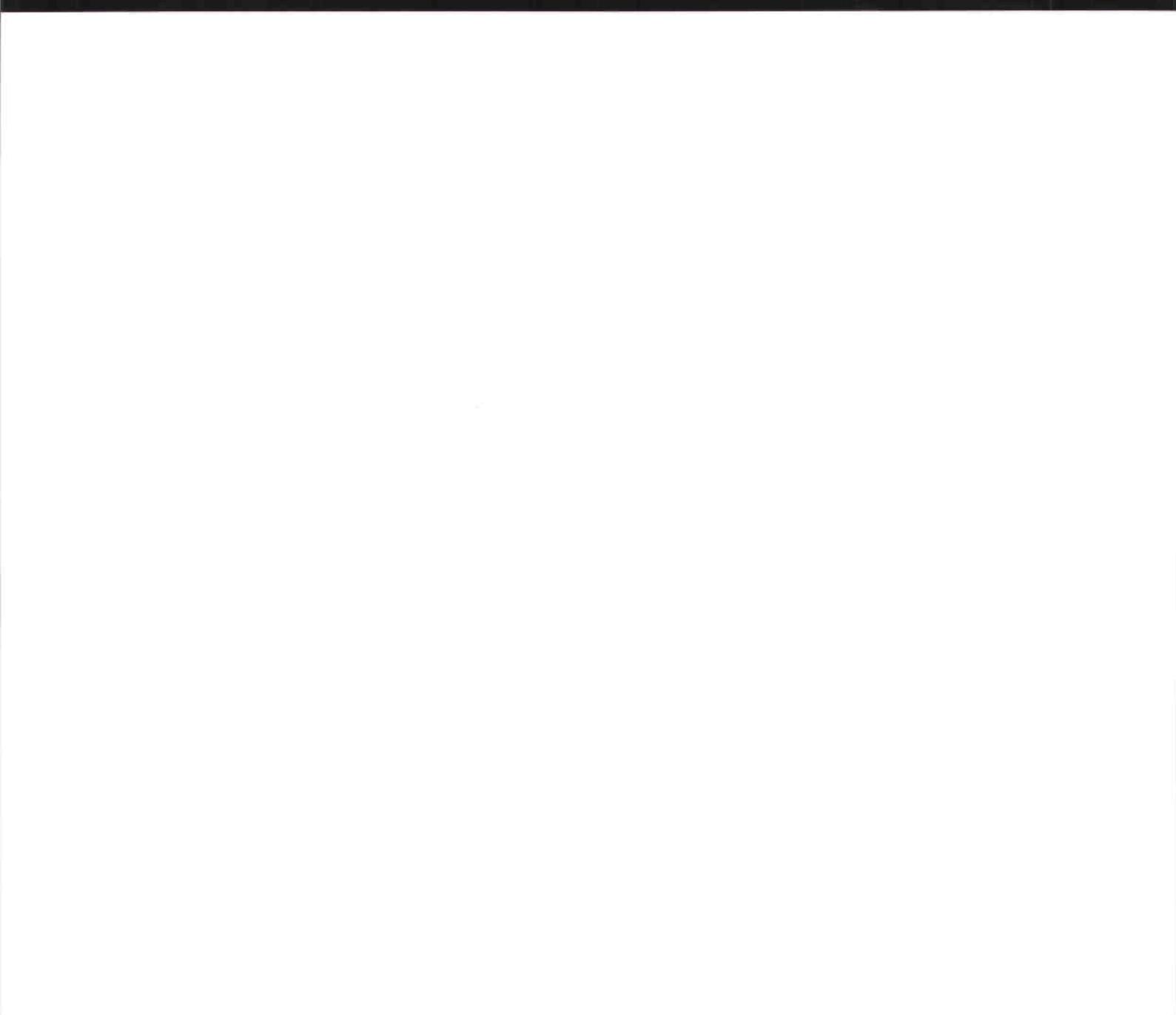
25789

C.B. 43190

Proced. DONACIÓN

Fecha 8.06.03

CONTENIDO	PÁGINA
PREFACIO	5
¿PARA QUIÉN? ¿PARA QUÉ? Y EVALÚA SI SABES	6
1 IMPORTANCIA DEL CONTROL DE LOS AGENTES TÓXICOS	7
2 TENTATIVAS DE CONTROL DE AGENTES TÓXICOS	9
3 PRUEBAS DE TOXICIDAD	13
4 MÉTODOS	15
5 COLECTA DE MUESTRAS	20
6 RESULTADOS	23
BIBLIOGRAFÍA	28
GLOSARIO	31
RESPUESTAS A LAS AUTOEVALUACIONES	32
ANEXOS	33



PREFACIO

La Comisión Nacional del Agua (CNA), órgano desconcentrado de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), tiene la atribución de administrar y custodiar las aguas nacionales y sus bienes públicos inherentes. Como parte de la estrategia de la CNA para preservar la calidad de las aguas nacionales, la Subdirección General de Administración del Agua, en colaboración con el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA) ha editado la segunda parte de la *Serie Autodidáctica de Medición de la Calidad del Agua*, que tiene como objetivo capacitar al personal que realiza visitas de inspección, a fin de que la toma y conservación de muestras de agua residual se realice de manera confiable, de forma segura y sin vicios técnicos que pudieran comprometer la representatividad del muestra y de esta forma invalidar la visita. Asimismo, la serie proporciona al personal los principios para identificar y describir diversos sistemas empleados para el tratamiento del agua residual y de los productos derivados.

Esta segunda parte consta de ocho unidades que se elaboraron con la finalidad de presentar los procedimientos de manera sintética, amena y sencilla, de tal manera que además de ser manuales de capacitación, sirvan como guías de referencia rápida que unifique los criterios en la aplicación de los procedimientos descritos y en la identificación de los sistemas de tratamiento tanto de aguas residuales como de los lodos residuales producto del tratamiento.

Las tres primeras unidades se refieren a sistemas de tratamiento de aguas residuales, en las que se abordan los principios de funcionamiento de los sistemas terciarios o avanzados, los sistemas naturales y las fosas sépticas y las letrinas; en el caso específico de las fosas y letrinas se explican, además, las rutinas de inspección.

La cuarta y quinta unidad se refieren a la identificación de los sistemas complementarios normalmente encontrados en las plantas de tratamiento de aguas residuales: los trenes de tratamiento de los lodos de desecho y los sistemas de desinfección. Con ello se cubren todos los aspectos de la depuración de las aguas residuales.

La sexta unidad trata sobre los residuos peligrosos, especialmente los lodos de desecho ya que de acuerdo con la legislación vigente es necesario que se compruebe la inocuidad de dicho residuo antes de su reúso o disposición final.

La séptima unidad plantea la importancia que tienen los análisis de toxicidad en el agua y la forma en que dichas pruebas se complementan con los análisis tradicionales comprendidos en la NOM-001-ECOL-1996.

La octava unidad trata sobre los procedimientos para la toma y preservación de muestras en emisores submarinos, tanto en la superficie, es decir, antes que el emisor entre al agua, como en los difusores que se encuentran al final del emisor submarino.

Cada unidad cuenta, con una presentación en disco compacto para PC (CD ROM), que resalta los aspectos más importantes señalados en el texto y se apoya en fotografías e ilustraciones que refuerzan los conceptos planteados.

¿Para quién?

Esta publicación tiene por objeto proporcionar a los especialistas técnicos que constituyen las brigadas de muestreo, inspección y verificación de descargas, la información básica sobre el uso de pruebas de toxicidad para el control de agentes tóxicos en efluentes líquidos.

¿Para qué?

A través de este manual el usuario será orientado en los aspectos técnicos y científicos vinculados al desarrollo de pruebas de toxicidad e iniciado en el conocimiento de los métodos disponibles adoptados por la *normatividad nacional* y sus formas de aplicación. También será introducido en las formas de manejo de la información que surge del empleo de las pruebas de toxicidad, en las estrategias de seguimiento para la inspección de calidad de resultados y criterios de clasificación y elementos interpretativos.

Evalúa si sabes

¿Qué es una prueba de toxicidad y cuál es su utilidad?

¿De qué pasos metodológicos se compone una prueba?

¿Cuáles son los organismos de prueba considerados en los protocolos de prueba aprobados en la legislación nacional y cuál es el punto de evaluación para cada uno de ellos?

¿Cuál es el significado de EC50, CL50, CEMO y CENO?

¿Cómo se obtienen los valores de EC50, CL50?

¿Qué son las unidades de toxicidad y cómo se obtienen?

¿Cuáles son los elementos de utilidad en la inspección de control de calidad de resultados de pruebas de toxicidad?

Menciona alguna escala de criterios para la clasificación del nivel de toxicidad.

1 IMPORTANCIA DEL CONTROL DE LOS AGENTES TÓXICOS

Al término de esta unidad el usuario será capaz de explicar la importancia del control de los agentes tóxicos y la relevancia del empleo de pruebas biológicas para evaluar el riesgo ambiental que resulta de la exposición a contaminantes químicos.

La contaminación ambiental por agentes químicos ha ocurrido de forma intencional o accidental, principalmente a partir de la industrialización de las actividades humanas, cuya importancia ha adquirido proporciones muy relevantes en los últimos cincuenta años (Gutrie *et al.*, 1980).

A partir de la intensificación de las actividades humanas, numerosos agentes químicos, estimados en más de nueve millones de sustancias (*Chemical Abstract Registre Service*, 2000), son liberados rutinariamente al ambiente y transportados por diversas vías tales

como son la atmósfera, el suelo o el agua. Sin importar su origen o rutas de transporte, estas sustancias terminan irremediablemente incorporándose a los ecosistemas acuáticos que se convierten en receptáculos de una vasta variedad de contaminantes tóxicos.

La presencia de estas sustancias en los ecosistemas es siempre un riesgo potencial para la salud de los seres vivos. El riesgo que un agente químico impone al ambiente acuático es evaluado a través de la probabilidad de daños que su concentración, ya sea medida o estimada, puede causar en el ambiente.

En consecuencia, el concepto de ambiente seguro puede ser entendido como un valor ponderado de la aceptabilidad de riesgo, es decir, que un agente químico a una determinada concentración será considerado como aceptable si sus riesgos son considerados también aceptables.

Para facilitar la comprensión del concepto anterior, se hace un símil con un medicamento. Las medicinas son consideradas seguras si al administrar las dosis necesarias

para controlar una enfermedad, los efectos colaterales son aceptables.

Para evaluar el riesgo que una sustancia contaminante impone al ambiente acuático no basta con conocer sus concentraciones, es necesario también considerar los efectos que son capaces de producir, que se estiman a través de la evaluación de su toxicidad. En este sentido, para comprender el significado del término toxicidad es importante establecer los siguientes conceptos:

- **La toxicidad es la propiedad inherente a un agente químico de producir efectos adversos en los organismos expuestos, por lo que el empleo de organismos y la medición de los efectos producidos en ellos es la única forma de evaluarla.**
- **Los efectos, medidos a través de pruebas de toxicidad, no sólo son el resultado de la concentración de una sustancia específica en la muestra; adicionalmente, la respuesta biológica involucra una suma de factores tales como la interacción de un contaminante**

con otras sustancias presentes en la mezcla, la acción de los procesos físicos, químicos y biológicos que persisten en el ambiente, así como un sin fin de variables más que determinan la disponibilidad de un contaminante y, en consecuencia, el potencial tóxico de una muestra.

El término *toxicidad*, ha sido con frecuencia empleado para definir "la evaluación química de contaminantes tóxicos", como es el caso de las pruebas del CRETIB. En estricto apego al concepto que define a la toxicidad, dicha analogía resulta inapropiada ya que en una evaluación química de contaminantes, los efectos sobre organismos no son evaluados.

El CRETIB es una evaluación dirigida a reconocer algunas propiedades de la muestra, tales como *corrosividad* (C), *reactividad* (R), *explosividad* (E); así como a evaluar el contenido de contaminantes tóxicos seleccionados (T), más no su toxicidad; inflamabilidad (I) y la identificación de bacterias y virus patógenos definida por el término *biológico infeccioso* (B).

RESUMEN

La presencia de sustancias químicas en los ecosistemas es siempre un riesgo potencial para la salud de los seres vivos. El riesgo que un agente químico impone al ambiente acuático es evaluado a través de la probabilidad de daños que su concentración, ya sea medida o estimada, puede causar en el ambiente.

Para evaluar el riesgo que una sustancia contaminante impone al ambiente acuático no basta con conocer sus concentraciones, es necesario también considerar los efectos que son capaces de producir, los cuales se estiman mediante la evaluación de su toxicidad. En este sentido, para comprender el significado del término toxicidad es importante establecer lo siguiente:

1) La toxicidad es la propiedad inherente a un agente químico de producir efectos adversos en los organismos expuestos, por lo que el empleo de organismos y la medición de los efectos producidos en ellos es la única forma de evaluarla.

2) Los efectos medidos mediante pruebas de toxicidad son el resultado de la concentración de una sustancia específica en la muestra, además de la interacción de un contaminante con otras sustancias presentes en la mezcla, la acción de los procesos físicos, químicos y biológicos que persisten en el ambiente y un sin fin de variables más que determinan la disponibilidad de un contaminante y, en consecuencia, el potencial tóxico de una muestra.

AUTOEVALUACIÓN

Responda si los enunciados siguientes son verdaderos o falsos:

1. Un ambiente seguro, desde el punto de vista de análisis de impacto, ¿es aquel donde no existen elementos dañinos para el hombre?
(V) (F)
2. Para evaluar el riesgo que una sustancia contaminante impone al ambiente, ¿es suficiente con conocer sus concentraciones en el ambiente?
(V) (F)

3. El término toxicidad está referido a la propiedad de un agente químico para producir efectos adversos en los organismos expuestos.

(V) (F)

4. ¿La toxicidad puede ser medida a través de análisis químicos?

(V) (F)

2 TENTATIVAS DE CONTROL DE AGENTES TÓXICOS

Al término de esta unidad el usuario será capaz de describir los principales eventos que han definido la evolución de las tendencias en materia de regulación para el control de la calidad del agua, así como los beneficios de su transformación dirigida al uso integrado de herramientas químicas y biológicas para la generación de criterios de control adecuados a cada industria y cuerpo receptor.

Tomando en cuenta la relevancia de fortalecer el marco legal dirigido al control de descargas de agentes químicos potencialmente peligrosos, y tratar de evitar daños deletéreos en los ecosistemas acuáticos, las pruebas de toxicidad adquieren una especial importancia ya que son la única clase de herramientas analíticas que permite evidenciar los efectos y complementar objetivamente la información que surge de los procedimientos químicos ya adoptados y tradicionalmente empleados para el control de la calidad y contaminación del agua.

Las regulaciones en materia de control de calidad de agua se encuentran en uso desde la década de los años setenta, tanto en México (SRH, 1973) como en otros países. Estas reglamentaciones están basadas en la evaluación y control de sustancias químicas específicas. Durante las décadas de los años setenta y ochenta, algunos países industrializados conscientes de las limitaciones de dichos criterios para el cumplimiento de los objetivos de protección de los ambientes acuáticos, promovieron el empleo de organismos de prueba. En un inicio, los peces fueron las especies más

empleadas para evaluar los efectos producidos por descargas en los cuerpos receptores (US EPA, 1978).

Para las décadas de los años ochenta y noventa, la lista de especies se amplió considerablemente incorporándose invertebrados (crustáceos, moluscos, equinodermos, celenterados, etcétera) algas y bacterias, y se desarrollaron protocolos de prueba normalizados (US EPA 1985, 1991, *Standard Methods* 1992; *Environment Canada*, 1990, 1992a, 1992b, 1994, 1998, 1999, 2000a, 2000b; DIN, 1998).

Con estos avances en la transformación de criterios para la preservación de los sistemas acuáticos a través del control de la calidad del agua, se ha promovido el uso de pruebas de toxicidad como herramienta de utilidad para su manejo.

El uso de estas herramientas biológicas contribuye a lograr un mejor entendimiento del riesgo en que se encuentra un cuerpo receptor al verse afectado por numerosas fuentes puntuales, ya que mediante el comportamiento de los efectos producidos de manera indepen-

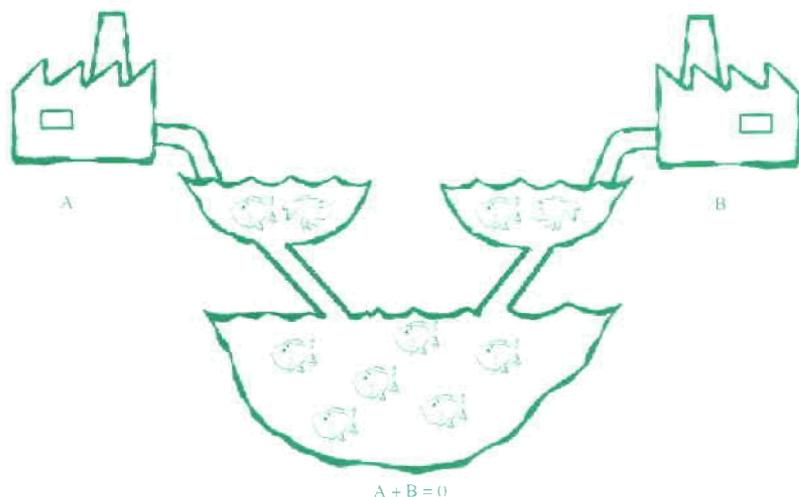


Figura 2.1 Efecto antagónico de sustancias tóxicas.

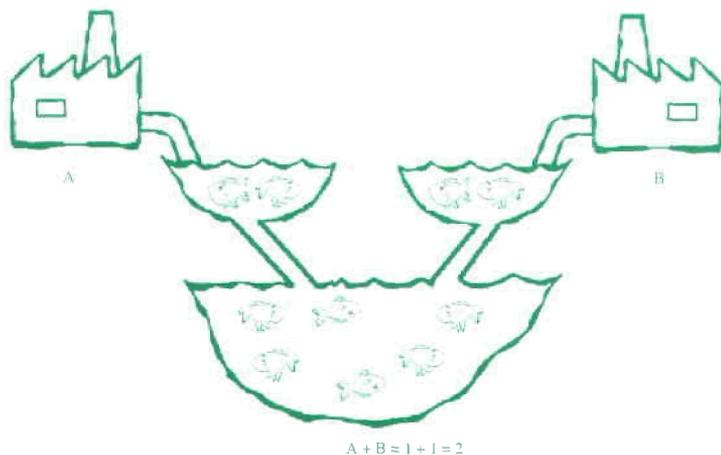


Figura 2.2 Efecto aditivo de las sustancias tóxicas.

diente por cada fuente, así como de los generados por sus mezclas en el cuerpo receptor, puede estimarse si la adición de las distintas descargas promueven:

- A) Antagonismo entre sus componentes, cuando una composición actúa sobre la otra reduciendo la incidencia de los efectos o potencial tóxico de la mezcla (figura 2.1).
- B) Aditividad, cuando las cargas contaminantes se suman y en consecuencia los efectos también (figura 2.2).
- C) Sinergia, cuando los componentes reaccionan entre ellos incrementando su potencial tóxico y promoviendo en las mezclas efectos muy superiores a la suma de los efectos individuales de cada efluente (figura 2.3).

De acuerdo con lo anterior, al evaluar la toxicidad de los efluentes líquidos es posible compatibilizar las descargas preexistentes en un cuerpo receptor de forma tal que sus mezclas no causen efectos tóxicos agudos ni crónicos a los sis-

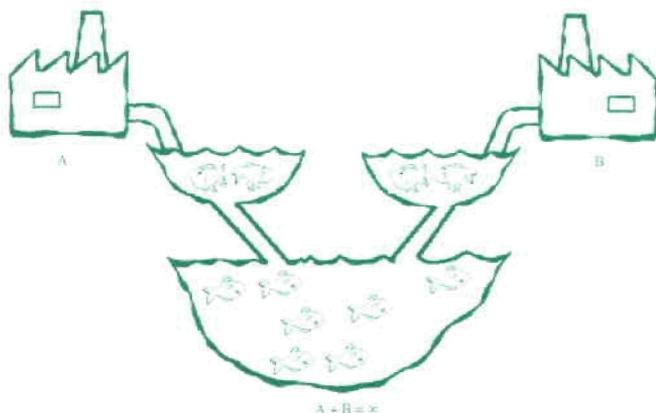


Figura 2.3 Efecto sinérgico de las sustancias tóxicas.

temas acuáticos. Por ello, es necesario cambiar la forma de evaluar y controlar la emisión de descargas potencialmente tóxicas.

2.1 La riqueza de conjuntar los beneficios de las herramientas químicas y biológicas para el control de la calidad del agua

Cabe resaltar que cada una de las dos tendencias de clasificación empleadas para el control de descargas, al ser aplicadas de manera independiente, presentan limitaciones que se resumen de la siguiente forma:

Control por análisis químicos de sustancias específicas

Para lograr un control efectivo de efluentes complejos, tendrían que ser evaluadas la totalidad de las sustancias químicas que lo constituyen, sin embargo, en términos económicos y analíticos esta condición resulta improcedente ya que:

- No hay posibilidad técnica y/o económica de identificar en su totalidad las sustancias químicas presentes en mezclas complejas.
- A través de las técnicas químicas y/o analíticas, no es posible determinar la biodisponibilidad de los agentes tóxicos.

- No es posible evidenciar las interacciones aditivas, antagónicas y/o sinérgicas que puedan tener lugar entre los agentes tóxicos de una muestra.

Control del efluente como un todo, por medio de pruebas de toxicidad

- La toxicidad de una muestra es evaluada en su conjunto sin dissociar los componentes que la conforman, ya que a través de las pruebas biológicas no es posible identificar los compuestos específicos que causan los efectos tóxicos y, tampoco, el determinar las propiedades específicas de los agentes químicos.

Por otra parte, el control por medio de las pruebas de toxicidad tiene dos grandes ventajas.

- Por medio de las pruebas de toxicidad puede ser evaluada la biodisponibilidad de los agentes tóxicos.
- Las pruebas biológicas permiten evidenciar la aditividad, antagonismo y/o sinergia que puede ocurrir entre los agentes tóxicos contenidos en las mezclas.

Los beneficios de conjuntar la caracterización química y la aplicación de pruebas de toxicidad radica en lograr una identificación plena de la toxicidad aguda o crónica del efluente y del cuerpo receptor, y de los agentes causales de la toxicidad, de tal forma que puedan plantearse estrategias de control adecuadas para cada cuerpo receptor, así como procesos de tratamiento para la remoción de los agentes dañinos presentes en uno o varios efluentes industriales.

RESUMEN

Con el objeto de fortalecer el marco legal para el control de las descargas y con el fin último de evitar efectos deletéreos en los ecosistemas acuáticos, es necesario el uso de las pruebas de toxicidad, ya que son las únicas herramientas analíticas que permiten evidenciar el impacto del vertido de aguas residuales en los cuerpos receptores y son el complemento objetivo de la información de los procedimientos químicos tradicionalmente empleados para el control de la contaminación del agua.

El uso de las herramientas biológicas contribuye a lograr un mejor entendimiento del riesgo en que se encuentra un cuerpo receptor al verse afectado por numerosas fuentes puntuales, ya que a través del comportamiento de los efectos producidos de manera independiente por cada fuente, así como de los generados por sus mezclas en el cuerpo receptor, puede estimarse si la adición de las distintas descargas promueven el antagonismo, la aditividad o la sinergia.

De acuerdo con lo anterior, la evaluación de toxicidad de los efluentes líquidos puede hacer posible el compatibilizar las características de las descargas preexistentes en un cuerpo receptor, de forma tal que sus mezclas no causen efectos tóxicos agudos ni crónicos a los sistemas acuáticos.

Los beneficios de conjuntar la caracterización fisicoquímica y las pruebas de toxicidad radica en identificar plenamente a los agentes causales de los efectos agudos y/o crónicos, de tal forma que puedan ser sugeridas estra-

tegias de tratamiento para la remoción de los agentes dañinos presentes en un efluente, así como criterios de control adecuados a cada industria y cuerpo receptor.

AUTOEVALUACIÓN

Responda si los enunciados son verdaderos o falsos

1. El marco regulatorio para el control de descargas vigente en México está fundamentado en criterios cuyo cumplimiento evita efectos tóxicos agudos o crónicos en el ambiente.
(V) (F)
2. La caracterización fisicoquímica y la aplicación de técnicas analíticas para identificación selectiva de contaminantes permite evaluar la aditividad, sinergia o antagonismo entre los compuestos tóxicos de una mezcla.
(V) (F)
3. El análisis químico puede evaluar e identificar exhaustivamente la composición íntegra de una mezcla compleja.
(V) (F)

4. A través de las pruebas de toxicidad es posible identificar a los agentes causales de los efectos medidos

(V) (F)

3. PRUEBAS DE TOXICIDAD

Al término de esta unidad el usuario será capaz de explicar los principios en que se basa en desarrollo de pruebas de toxicidad y la importancia interpretativa que tiene del empleo de diversas especies de prueba para una misma evaluación.

Las pruebas de toxicidad, bioensayos o ensayos biológicos, son empleadas para evaluar los efectos que un contaminante o una mezcla de ellos es capaz de causar en los organismos de prueba expuestos a diferentes dosis (medidas como series de diluciones de la muestra de prueba).

No todos los efectos observados en los organismos vivos pueden ser utilizados en el desarrollo de estu-

dios toxicológicos. Es necesario que los efectos tengan un significado ecológico bien definido. Por ello la muerte y la afectación sobre las funciones biológicas fundamentales, tales como la reproducción y el crecimiento, son las más empleadas en el desarrollo de pruebas, ya que son las que inciden de manera más relevante sobre el desempeño de las comunidades acuáticas, sus interrelaciones recíprocas y la dinámica de los ecosistemas.

Para la evaluación de una muestra, y con fines de obtener elementos de evaluación de riesgo, se sugiere el empleo de por lo menos tres diferentes organismos de prueba de distintos niveles tróficos:

- Productores primarios: las algas *Chorella vulgaris* o *Selenastrum capricornutum*.
- Consumidores primarios: los microcrustáceos *Daphnia magna*, *D. similis* o *Ceriodaphnia* sp.
- Consumidores secundarios: algunos peces como *Poecilia reticulata*, entre otros.
- Detritívoros y/o descomponedores, tales como rotíferos (Snell & Persoon, 1989) o bacterias, tales como *Vibrio*

fischeri (*Photobacterium phosphoreum*) o *Spirillum volutans* (Coleman & Qureshi, 1985).

Los protocolos de prueba con *Daphnia magna* y *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*) se encuentran publicados en México por la entonces Secofi (1995 a, b) y forman parte de los métodos normalizados para la evaluación de toxicidad en agua.

La importancia del empleo de por lo menos tres especies distintas de prueba para una misma evaluación radica en la diferencia de sensibilidad que puede presentarse entre los distintos organismos; algún efluente puede ser inocuo para una de las especies elegidas, mientras que para las otras los efectos pueden ser considerables. Esta diferencia de la respuesta o de la sensibilidad, se encuentra determinada por la forma de interacción entre las propiedades fisicoquímicas de los compuestos y el metabolismo, la fisiología y hábitos alimentarios y reproductivos de cada especie.

Las algas, por ejemplo, son más sensibles que otras especies de prueba a una amplia gama de tóxi-

cos, sin embargo son muy resistentes al DDT (Pica *et al.*, 2000). Por ello es recomendable, siempre que sea posible, evaluar el efecto de un efluente con más de una especie.

Para estimar con mayor certidumbre el efecto deletéreo o el impacto de un efluente en un cuerpo receptor se debe elegir el resultado obtenido para el organismo más sensible (US EPA 1985).

Para definir los efectos deletéreos de un agente tóxico o mezcla de ellos, son utilizados los términos efecto agudo y efecto crónico.

3.1 Efecto agudo

Se entiende como efecto agudo una respuesta severa o rápida de los organismos acuáticos a un estímulo. Se manifiesta por lo general en un periodo menor que 96 horas. Normalmente, la mejor expresión de dicho efecto es la mortalidad o alguna otra manifestación asociada con ésta, como puede ser la inmovilidad o la desintegración.

Para evaluar los efectos agudos de los agentes tóxicos es empleado con regularidad el concepto *concen-*

tración letal (CL_{50}) o *concentración efectiva* (CE_{50}) media, que indica la concentración de la muestra en que se produce la mortandad del 50% de la población de los organismos expuestos. Este nivel de daño o respuesta (50%), es considerado como el más significativo para ser extrapolado a una población.

3.2 Efecto crónico

El efecto crónico se entiende como la respuesta a un estímulo que persiste por largo tiempo. Comúnmente, es observado a través de pruebas cuya duración abarca el ciclo de vida de los organismos de prueba.

En términos generales, el efecto crónico se produce como resultado de alteraciones subletales. Se presenta cuando las concentraciones de un agente tóxico o la mezcla de éstos permite la sobrevivencia de los organismos, sin embargo, afectan una o varias de sus funciones biológicas, tales como reproducción, desarrollo de huevos, crecimiento o maduración, entre otras.

Para evaluar estos efectos se emplean pruebas de toxicidad crónica con las cuales puede determinarse

la CE_{50} pero también otros parámetros de gran importancia, como son la concentración del agente tóxico que no causa daño o efecto observable (CENO, concentración de efecto no observado) y la concentración más baja en que se inicia la producción de efectos (CEMO, concentración de efectos mínimos observables).

Cuando un efluente es arrojado de forma continua al ambiente acuático, pueden sobrevenir efectos crónicos producidos por la exposición continua de los organismos a bajas concentraciones de tóxicos. En estos casos las poblaciones expuestas presentan dificultades para mantener el equilibrio de su estructura y función dentro del ecosistema.

RESUMEN

Las pruebas de toxicidad son empleadas para evaluar los efectos que un contaminante o la mezcla de ellos es capaz de causar en los organismos de prueba.

Para la evaluación de una muestra y con fines de obtener elementos de evaluación de riesgo, se ha sugerido el empleo de por

lo menos tres diferentes organismos de prueba que deberán pertenecer a distintos niveles tróficos

En la actualidad los protocolos de prueba con *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*) y *Artemia franciscana*, se encuentran publicados en México por la entonces Secofi (1995) y forman parte de los métodos normados para la evaluación de toxicidad en agua.

La importancia del empleo de por lo menos tres distintas especies de prueba para una misma evaluación radica en la diferencia de sensibilidad que puede presentarse entre los diversos organismos, es decir, que un efluente puede ser inocuo para una de las especies elegidas, mientras que para las otras los efectos pueden ser considerables.

Para definir los efectos deletéreos de un agente tóxico o mezcla de ellos, es empleada la medición de efecto agudo y efecto crónicos. El primero es referido a una respuesta severa o rápida de los organismos acuáticos

a un estímulo. Se manifiesta por lo general en un periodo menor a 96 horas. Normalmente, la expresión de dicho efecto es la mortalidad o alguna otra manifestación asociada con ésta, como puede ser la inmovilidad o la desintegración.

El efecto crónico se traduce como la respuesta a un estímulo que persiste por largo tiempo. Generalmente, es observado a través de pruebas cuya duración abarca el ciclo de vida de los organismos de prueba.

AUTOEVALUACIÓN

Responda si los enunciados son verdaderos o falsos:

1. Una prueba de toxicidad es aquella que se emplea para evaluar la potencia relativa de un agente químico para comparar sus efectos en organismos vivos, respecto a los producidos por una preparación estándar sobre el mismo tipo de organismos
(V) (F)
2. Los efectos sobre las funciones biológicas fundamentales, tales

como reproducción, crecimiento e incluso la muerte, son los más empleados para evaluaciones con pruebas de toxicidad.

(V) (F)

3. Para la evaluación de una muestra o efluente, cuya finalidad es obtener elementos de evaluación de riesgo, es recomendable el empleo de por lo menos tres diferentes organismos de prueba, para evitar el aumento de la incertidumbre del resultado.

(V) (F)

4. La concentración de efecto no observado (CENO) y la concentración de efectos mínimos observables (CEMO) son parámetros derivados de una prueba de toxicidad crónica.

(V) (F)

4. MÉTODOS

Al término de esta unidad el usuario será capaz de explicar el diseño y las bases metodológicas para desarrollo de una prueba de toxicidad,

describir los elementos principales para su control de calidad y la guía básicas para el cálculo de la CE_{50} .

Los métodos biológicos empleados para evaluar la toxicidad de efluentes con fines de control, se encuentran estandarizados y bien establecidos metodológicamente. Tal es el caso de aquellos que actualmente forman parte de los protocolos aprobados por la entonces Secofi (1995 a, b; c), así como aquellos incluidos en regulaciones internacionales (US. EPA, 1991;1993; *Environment Canada*, 1990; 1992 a; 1992b; 2000 a; 2000 b).

4.1 Principios Básicos

Una prueba de toxicidad típica involucra a un *agente tóxico* (por ejemplo, un pesticida, una vitamina, un metal pesado o una muestra de efluente con contaminantes químicos), con el que se prepara una serie de diluciones y *organismos de prueba*, los cuales se exponen a las diluciones mencionadas (figura 4.1). Después de un determinado periodo de exposición, los efectos son medidos y/o cuantificados, pos-

teriormente tabulados y graficados para lograr la construcción de una curva que relacione la dosis con el efecto observado (respuesta) (figuras 4.1 y 4.2), también se obtiene la ecuación de la curva y con ella se calcula el valor de la dosis que promoverá la mortalidad o la expresión del efecto esperado en un 50% de la población de los organismos.

La *respuesta* de los organismos se evalúa mediante la cuantificación de un determinado efecto (muerte, inhibición en el crecimiento, etcétera) y generalmente la magnitud de

ésta depende de la dosis aplicada del tóxico.

En algunos casos, la relación directa de estas dos variables (dosis-respuesta) puede verse afectada por la variación aleatoria entre las replicas de cada dilución, o por factores no controlados durante el experimento. Sin embargo, una vez controlados los factores que induce variabilidad, la relación dosis respuesta puede establecerse y ser de utilidad para inferir el potencial tóxico de una dosis gracias a la magnitud de la respuesta observada.

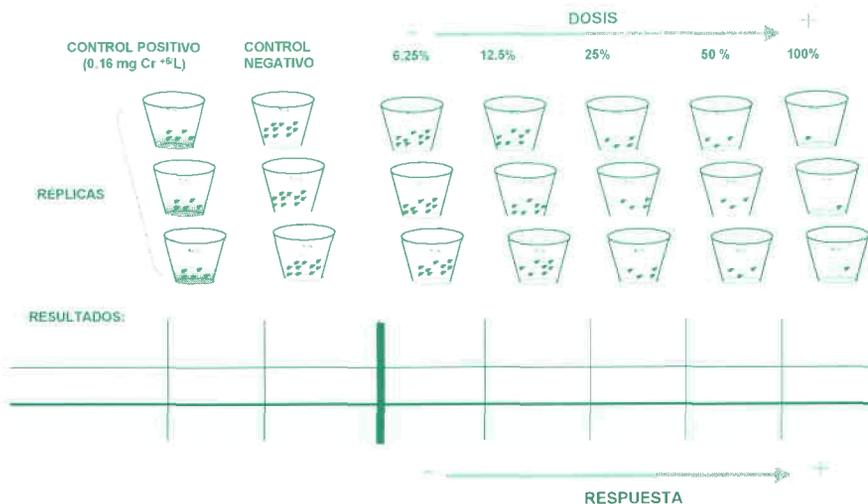


Figura 4.1 Esquema general del desarrollo de una prueba de toxicidad.

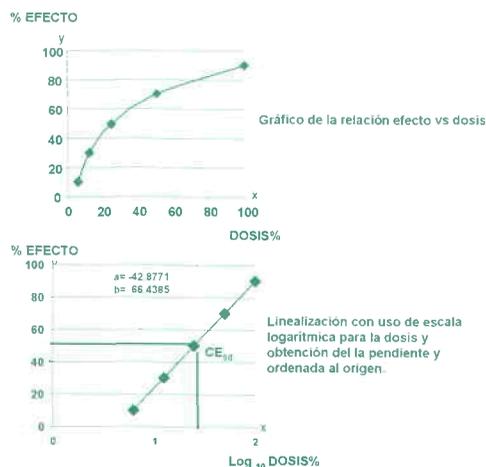


Figura 4.2 Graficación, como es el caso del protocolo con la bacteria *Vibrio fischeri*.

Normalmente, el diseño de las pruebas de toxicidad involucra el análisis de una solución estándar también conocida como *control positivo* o *tóxico de referencia*, y de un *control negativo*.

El *control positivo* o *tóxico de referencia* es una solución preparada con un compuesto preseleccionado (ej. cloruro de sodio, dicromato de potasio, sulfato de zinc, sulfato de cobre, dodecil sulfato de sodio, etcétera). El uso de un tóxico de referencia permite el control de la sensibilidad de la especie, ya que el efecto de una determinada concentración de dicho

Calculo para obtención de la CE_{50}

$y = a + bx$ $a =$ intersección u ordenada al origen
 $b =$ pendiente

Sustituyendo: $y = -42.8771 + 66.4385 (X)$

Si deseamos saber el valor de X cuando $y = 50$ (CE_{50})

Entonces:

$X = \frac{50 - (-42.8771)}{66.4385} = 1.3979409$

$X = \text{anti log } 1.3979409$

$X = 25$

Por lo tanto la $CE_{50} = 25\%$

agente tóxico se encuentra previamente establecido y cualquier cambio en ella indicará variación de la sensibilidad de la especie de prueba.

El *control negativo* se compone del medio líquido óptimo para el adecuado desarrollo de las especies de prueba, permite mostrar que los organismos con los que se desarrolla la determinación son sanos y metabólicamente estables.

El seguimiento de estos controles es fundamental para el control de calidad analítico de los métodos de prueba y de sus resultados.

Para cada grupo taxonómico probado, se ha determinado experimentalmente el tiempo mínimo de exposición necesario para que una sustancia genere una respuesta biológica, así por ejemplo, 96 horas de exposición son suficientes para que el efecto agudo en peces y/o en algas se exprese y no es necesario ampliar por más tiempo el periodo de contacto con el agente tóxico.

En el caso de microcrustáceos del género *Daphnia*, se ha estandarizado un tiempo de exposición de 48 horas. Para los ensayos con bacterias un tiempo de exposición entre cinco y quince minutos es suficiente para que los efectos se expresen, como es el caso del protocolo con la bacteria *Vibrio fischeri*.

La confiabilidad de los resultados de cualquiera de las pruebas de toxicidad depende de un control adecuado de las condiciones de prueba. Esas condiciones abarcan los factores abióticos y bióticos, que son definidos a detalle en cada uno de los protocolos de prueba normalizados (Anexo 1) que publican las instancias de protección ambiental tanto de México como de otros paí-

Tabla 4.1. Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con *D magna*.

1. Tipo de ensayo	Estático
2. Temperatura	22 ± 2°C
3. Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
4. Intensidad luminosa	< 800 lux (luz blanca fría) en la superficie del líquido
5. Fotoperiodo	16 luz/8 oscuridad
6. Volumen del recipiente	Viales plásticos de 50 mL
7. Volumen de la solución de prueba	30 mL
8. Edad de los organismos empleados	<24 h
9. No. de organismos por recipiente	10
10. Número de réplicas por dilución	3
11. Agua de dilución	Agua dura (160 - 180 mg CaCO ₃ /L)
12. Factor de dilución	0,3 o 0,5
13. Duración de la prueba	48 h
14. Efecto medido Mortalidad	(inmovilidad)(conteo) CL ₅₀
15. Resultado final	
16. Aceptabilidad de los resultados	
<ul style="list-style-type: none"> • Control negativo • Control positivo 	<10% de mortalidad CL ₅₀ dentro del intervalo de confianza preestablecido para el tóxico de referencia seleccionado.

ses. Como ejemplos se presentan los resúmenes de condiciones para algunos organismos de prueba (tablas 4.1, 4.2 y 4.3).

RESUMEN

Una prueba de toxicidad típica involucra un agente tóxico (ya

sea una sustancia específica o una muestra de efluente) con el que son preparadas una serie de diluciones, y organismos de prueba que se exponen a las diluciones mencionadas. Después de un determinado periodo de exposición los efectos son medidos y/o cuantificados, y con esa información se construye una

curva dosis-respuesta y se obtiene la ecuación que describe a esa curva. Con dicha ecuación se calcula el valor de la dosis que promoverá la mortalidad o la expresión del efecto esperado en un 50% de la población de los organismos.

La respuesta de los organismos se evalúa mediante la cuantificación de un determinado efecto (muerte, inhibición en el crecimiento, etcétera) y generalmente la magnitud de ésta depende de la dosis aplicada del tóxico.

Normalmente, el diseño de las pruebas de toxicidad involucra el análisis de una solución estándar también conocida como control positivo o tóxico de referencia, y de un control negativo. El control positivo o tóxico de referencia es una solución preparada con un compuesto preseleccionado, cuyo efecto a una determinada dosis, se encuentra previamente establecido.

El control negativo se compone del medio líquido óptimo para el adecuado desarrollo de las especies de prueba, permite mostrar

Tabla 4.2. Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*).

1. Tipo de ensayo	Estático
2. Temperatura	15 ± 2°C
3. Lector	Luminómetro de luz fluorescente
4. Intensidad luminosa por detectar	490 nm
5. Volumen del recipiente	celdillas de 3mL
7. Volumen de la solución de prueba	1 mL
8. Cultivo usado para inóculo	1 mL de liofilizado bacteriano (10 ⁸ células/mL)
9. Densidad celular del inóculo / celdilla	10 ⁶ células/mL (10 µL de liofilizado)
10. Número de réplicas	No necesarias
11. Agua de dilución	Solución salina 2%
12. Factor de dilución	0,3 o 0,5
13. Duración de la prueba	5 a 15 minutos
14. Efecto medido	Inhibición de la emisión luminosa
15. Resultado final	CE ₅₀
16. Aceptabilidad de los resultados	
<ul style="list-style-type: none"> • Control negativo • Control positivo 	Emisión >90 unidades de emisión CE ₅₀ dentro del intervalo de confianza preestablecido para el tóxico de referencia seleccionado (Fenol 13- 26 mg/L)

que los organismos con los que se desarrolla la determinación son sanos y metabólicamente estables
El seguimiento de estos controles es fundamental como evidencia de la calidad analítica de los métodos de prueba y sus resultados.

AUTOEVALUACIÓN

Responda si los enunciados son verdaderos o falsos:

1. Una prueba de toxicidad se realiza a partir de la preparación de

una serie de diluciones de la muestra, a las cuales se exponen organismos de prueba por determinado periodo.

(V) (F)

2. Al término del periodo de exposición, los efectos son medidos y/o cuantificados, posteriormente tabulados y graficados para lograr la construcción de una curva que relacione la dosis con el efecto observado (respuesta).

(V) (F)

3. La ecuación de la curva se usa para calcular el valor de la dosis que promoverá la mortalidad o la expresión del efecto esperado en un 50% de la población de los organismos.

(V) (F)

4. El control positivo y negativo son elementos que deben integrarse rutinariamente durante el desarrollo de pruebas de toxicidad, ya que son elementos de utilidad para el control de calidad analítico de los métodos de prueba y sus resultados.

(V) (F)

Tabla 4.3. Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con *Selenastrum capricornutum*.

1. Tipo de ensayo	Estático
2. Control de parámetros	pH 7-9, Conductividad
2. Temperatura	22 ± 2°C
3. Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
4. Intensidad luminosa	86 ± 8.6 mE / m ² / s (4.000 lux)
5. Fotoperiodo	Iluminación continua
6. Volumen del recipiente	Viales de 20 mL
7. Volumen de la solución de prueba	2.6 mL
8. Edad del cultivo usado como inóculo	4 a 7 días
9. Densidad celular inicial	10 ⁴ células/mL
10. Número de réplicas por dilución	3
11. Velocidad de agitación	Manual, discontinua
12. Agua de dilución	Solución amortiguadora (NaHCO ₃ 0,15 mg/L)
13. Factor de dilución	0,3 ó 0,5
14. Duración de la prueba	72 h
15. Efecto medido	Crecimiento de la población (conteo)
16. Resultado final	CE ₅₀
17. Aceptabilidad de los resultados	
• Control negativo	Densidad celular >1.6 x10 ⁵ cel/mL
• Control positivo	CE ₅₀ dentro del intervalo de confianza preestablecido para el tóxico de referencia seleccionado.

5. COLECTA DE MUESTRAS

Al término de esta unidad el usuario será capaz de llevar a

cabo de manera adecuada la colecta y preservación de muestras destinadas al desarrollo de pruebas de toxicidad.

El muestreo de efluentes es un aspecto fundamental en cualquier programa de monitoreo, ya que es la base para evaluar las propiedades y efectos potenciales de un efluente.

Se sabe que los efluentes varían en caudal, concentración y por sus constituyentes. Esas variaciones ocurren debido a una serie de factores, como son: cambios en los ciclos de producción de la industria y variaciones en el desempeño de los sistemas de tratamiento de la misma, principalmente.

Pocos efluentes permanecen constantes durante largos periodos; incluso aquellas industrias que operan procesos continuos están sujetas a variaciones por los cambios de la calidad de las materias primas empleadas en su producción y que también causan alteraciones en las concentraciones de los constituyentes y en los volúmenes.

Tomando en cuenta lo anterior tiene que hacerse la selección de la forma de muestreo, ya sea colectando muestras compuestas o

instantáneas. La decisión dependerá en gran medida del conocimiento de los procesos industriales y de tratamiento, así como de la disponibilidad financiera y de tiempos de análisis.

Si la información de los ciclos productivos y de tratamiento se encuentra disponible, el muestreo más apropiado sería aquel diseñado en periodos acordes con la variabilidad del efluente y con la toma de muestras instantáneas.

Como en escasas ocasiones se tiene acceso a la información mencionada, la forma alternativa para el muestreo se define en la Norma Mexicana NMX AA-003 (SCFI, 1980) y consiste en establecer periodos regulares, como pueden ser cada cuatro horas por un ciclo de 24 horas, en los cuales se sugiere optar por la toma de muestras instantáneas o simples.

De esta manera, la toma de muestras instantáneas posibilita la identificación de los picos máximos y mínimos de efecto tóxico, si los periodos de muestreo resultan suficientemente cortos.

La toma de muestras instantáneas se sugieren para el análisis de:

- Descargas con régimen de intermitencia.
- Descargas provenientes de tratamiento con periodos de residencia superiores a catorce días.
- Descargas cuya variación de la toxicidad ya es conocida.

La toma de muestras instantáneas o simples, si bien es la mejor alternativa para dar seguimiento a la toxicidad de un efluente, puede verse restringida por limitaciones de orden económico y disponibilidad de tiempo de análisis, en cuyo caso podría ser factible la toma de muestras compuestas; sin embargo, en la interpretación de los resultados que de esta clase de muestras se obtendría, debe tenerse presente que la resultante es un valor medio que subestima la toxicidad del efluente al perderse la información de los picos máximo y mínimo. En este sentido, es importante no olvidar que la exposición a altos niveles de contaminantes por periodos cortos puede generar en el ambiente impactos que se manifiestan a través de efectos agudos.

5.1 Preservación de muestras

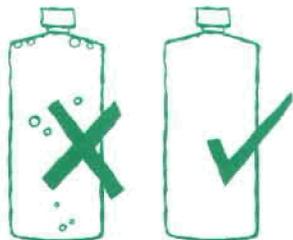
Las muestras, tanto instantáneas como compuestas, deben ser colectadas en frascos nuevos de materiales inertes, como son el vidrio ámbar, polipropileno o polietileno (en este orden de preferencia), de boca angosta y tapa de rosca, preferentemente de baquelita y contratapa de teflón. En caso de no contar con esta clase de contratapa, puede emplearse papel aluminio.



El material tendrá que ser preparado con enjuagues previos de: 1) ácido nítrico 1N, y 2) agua destilada o desionizada, y posteriormente secado, ya sea por drenado o al horno a 100°C por una hora.

El volumen a ser colectado dependerá del tipo de pruebas que serán realizadas. En el caso de optar por métodos tales como *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* y *Selenastrum capricornutum*, un volumen de 1L será suficiente para el desarrollo de las tres pruebas.

La muestra debe llenar en su totalidad el recipiente evitándose la formación de burbujas en su interior o el burbujeo durante la toma de la muestra.



El análisis debe ser efectuado a la brevedad, preferentemente de inmediato después de la colecta. De no ser posible, el inicio del análisis deberá realizarse antes de las 48 horas posteriores al muestreo (ISO 5667-16), mientras tanto la muestra debe mantenerse en refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 2$) a partir del momento de la colecta y no deberá hacerse uso de ninguna clase de preservadores.

RESUMEN

Los efluentes están sujetos a variaciones tanto en el caudal como en la concentración de sustancias. Esas variaciones ocurren debido a cambios en los ciclos de producción y variaciones del desempeño de los sistemas de tratamiento.

Tomando en cuenta lo anterior, tiene que hacerse la selección de la forma de muestreo, ya sea colectando muestras compuestas o instantáneas.

Como en escasas ocasiones se tiene acceso a la información de los ciclos productivos, la forma alternativa para el muestreo se define en la Norma Mexicana NMX AA-003 y consiste en establecer periodos regulares, como puede ser cada cuatro horas por un ciclo de 24 horas, en los cuales se sugiere optar por la toma de muestras instantáneas o simples.

Las muestras deben ser colectadas en frascos de materiales inertes como son el vidrio ámbar, polipropileno o polietileno (en este orden de preferencia), de

boca angosta y tapa de rosca, preferentemente de baquelita, y contratapa de teflón. En caso de no contar con esta clase de contratapa, puede emplearse papel aluminio.

El volumen a ser colectado dependerá del tipo de pruebas que se desea realizar. La muestra debe llenar en su totalidad el recipiente evitándose la formación de burbujas en su interior y preservarla en refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 2$) hasta su análisis, que debe efectuarse dentro de las 48 horas posteriores al muestreo.

AUTOEVALUACIÓN

Responda si los enunciados son verdaderos o falsos:

1. La forma de muestreo de efluentes para el análisis de toxicidad más recomendada es aquella que se realiza de acuerdo con sus ciclos de producción con toma de muestras simples. (V) (F)
2. La toma de muestras compuestas puede emplearse como alternativa, siempre y cuando se

tenga presente que la resultante es un valor medio que puede subestimar la toxicidad del efluente.

(V) (F)

3. Los recipientes de muestreo pueden emplearse varias veces, siempre y cuando el material se depure mediante un lavado exhaustivo.

(V) (F)

4. El análisis puede realizarse ya sea a la brevedad o antes de las 48 horas, siempre y cuando sea adicionada con los preservadores adecuados.

(V) (F)

6. RESULTADOS

Al término de esta unidad el usuario será capaz de manejar los resultados obtenidos del desarrollo de pruebas de toxicidad e integrarlos con información adicional del propio efluente y del cuerpo receptor, con el fin de estimar la factibilidad de riesgo de toxicidad aguda y crónica en el sistema acuático y determinar los niveles máximos permisibles de una descarga.

Una vez conocido el valor de toxicidad de la muestra del efluente, es posible estimar la contribución de carga tóxica de cada efluente vertido en un cuerpo receptor. Esta estimación constituye un instrumento útil para la jerarquización de los efluentes y consecuentemente para la generación de estrategias para su respectivo control.

Los valores numéricos de la toxicidad aguda o crónica son expresados como CE_{50} , CL_{50} , y CEMO o CENO (ver 3.2), éstas denotaciones expresan una relación inversa, es decir, cuanto más pequeño es el valor, mayor es la toxicidad del efluente.

Con fines de manejo de la información que resulte del análisis de efluentes, ya sea para su reporte directo o manejo de datos con fines diversos, como puede ser la determinación de la carga tóxica, los valores son transformados en unidades de toxicidad aguda (U_a) o crónica (U_c) siguiendo las siguientes fórmulas:

$$U_a = 100 / CE_{50} \text{ o } CL_{50}$$
$$U_c = 100 / CENO$$

De esta forma, cuanto mayor sea el valor numérico de U_T , también será

mayor la toxicidad. Con esta conversión se permite que la expresión de la toxicidad se encuentre en una relación directa con la magnitud del valor.

6.1 Estimación del potencial de impacto ambiental

La parte más importante del control de efluentes es la protección al ambiente acuático. En este sentido los resultados de las pruebas de toxicidad de un efluente pueden ser empleadas para la evaluación de su impacto en el cuerpo receptor. Esto se logra al comparar la concentración de efecto tóxico (CE_{50} o CL_{50}) del efluente con la concentración del efluente encontrada en el cuerpo receptor, una vez diluido por la corriente del sistema.

Con este fin pueden ser aplicados dos conceptos originados por la EPA. El criterio de concentración máxima (CCM), empleado para proteger los cuerpos receptores de efectos de toxicidad aguda; y el criterio de concentración continua (CCC), como medio de protección para efectos crónicos.

El valor del criterio de concentración máxima (CCM)

De acuerdo con la EPA, el valor del CCM es de $0.3 UT_a$, es decir, que el valor de toxicidad (CL_{50} o CE_{50}) obtenido para la especie más sensible de una batería de tres distintas especies de prueba, no deberá de exceder de $0.3 UT_a$.

El factor 0.3 es empleado para ajustar el valor típico de la CL_{50} o CE_{50} de una prueba de toxicidad aguda a un valor de CL_1 (concentración que promueve la muerte a sólo el 1% de la población expuesta), que representa prácticamente el valor de no mortalidad.

El valor de 0.3 fue determinado por la EPA después del análisis de alrededor de quinientos efluentes. En el 91% de estos casos, el factor de 0.3 aplicado lleva el valor de concentración al 1% de efecto, razón por lo que fue definido como criterio.

EL valor del criterio de concentración continua (CCC)

El valor del CCC no debe exceder de 1.0 unidades de toxicidad cróni-

ca (UT_c) para la especie más sensible de la triada de organismos seleccionados.

Tanto para el criterio de toxicidad aguda (CCM), como crónica (CCC), la toxicidad es probada en por lo menos tres especies, de las cuales se selecciona el resultado de la más sensible. Sin embargo, en caso de que la toxicidad sea evaluada en un número menor de especies (una o dos), el resultado de toxicidad de la especie más sensible, tendrá que ser dividido entre 10. Este factor debe ser aplicado a los criterios previamente indicados de CCC ($1.0 Ut_c$) y CMC ($0.3 Ut_a$), que serán transformados a $0.1 Ut_c$ y $0.03 Ut_a$, respectivamente.

La utilización de un número menor de tres especies de prueba incrementará la incertidumbre del resultado. En algunos estudios se ha demostrado que la respuesta o efecto de un efluente puede ser muy distinta entre las especies debido a su sensibilidad diferencial, por lo que el empleo de un número menor de ellas hace necesario el uso del factor de corrección de incertidumbre.

6.2 Relación aguda-crónica (RAC)

Ha sido comúnmente empleada para extrapolar la *concentración de toxicidad crónica* empleando datos disponibles de toxicidad aguda. El valor de RAC expresa la relación entre la concentración de un efluente o un tóxico que causa toxicidad aguda a una especie y la concentración de un efluente o tóxico que causa toxicidad crónica en la misma especie

$$(RAC = LC_{50}/CENO).$$

La investigación relativa a efluentes, desarrollada por la EPA sugiere que cuando uno enfrenta la problemática de toxicidad de efluentes, y en los casos en que no se cuente con mediciones de toxicidad crónica, puede emplearse un factor de 10 (US EPA, 1985). Este valor puede ser empleado para extrapolar valores de concentración crónica a concentración aguda, así como también para establecer límites permisibles para la toxicidad crónica aún cuando ésta no haya sido directamente medida.

El empleo de este factor puede permitir el llevar a cabo de forma

económica y eficiente el monitoreo empleando sólo pruebas de toxicidad aguda. Sin embargo, debe tenerse presente la conveniencia de ratificarlo a partir de evaluaciones de toxicidad crónica en efluentes seleccionados de México.

Ejemplos:

Si se asume que un efluente es la única fuente de toxicidad en un cuerpo receptor, y la evaluación se ha efectuado con tres distintas especies de prueba seleccionando el valor de la más sensible, entonces podemos plantearnos dos formas de pregunta:

- 1) Aplicable para efluentes en funcionamiento.

La carga tóxica del efluente, una vez vaciada y mezclada en el cuerpo receptor ¿representa un riesgo para el cuerpo receptor?

Datos de utilidad: Parámetro	Valor
Gasto medio del efluente (Q_e)	2 L/s
Gasto crítico del cuerpo receptor (${}_7Q_{10}$)	30 L/s
Toxicidad aguda en el efluente	$CE_{50} = 3.6$ Obtenido para la especie más sensible.

Concentración del efluente en el cuerpo receptor (CER)

Es la relación porcentual del volumen del efluente en el volumen del cuerpo receptor (% v/v)

$$CER = Q_e / (Q_e + {}_7Q_{10}) \times 100$$

Sustituyendo:

$$CER = 2 / (2 + 30) \times 100 = 6.25\%, \text{ v/v}$$

En este caso, la concentración del efluente en la zona mezclada del cuerpo receptor 6.25 (% v/v) es mayor a la CL_{50} o de CE_{50} (3.6%). Por lo tanto, es de esperarse que exista un impacto de tipo agudo en el cuerpo receptor. Es decir, que el potencial de impacto de un efluente en un cuerpo receptor será reducido en la medida que la CER alcance valores mínimos menores que la concentración de efecto o, por lo contrario, el riesgo será mayor cuando la CER sea superior a la concentración de efecto.

A partir de este análisis, el planteamiento siguiente sería determinar el valor de la CE_{50} que el efluente deberá alcanzar para evitar riesgos de toxicidad crónica al sistema

Para ello se aplica el factor de 10, estimado para la relación aguda-crónica (RAC) o, en su caso, se emplea el valor de CENO obtenido experimentalmente, en cuyo caso la CER debe ser menor o igual a su valor ($CER \leq CENO$).

El cálculo se realiza a partir de:

$$CER = CE_{50} / 10$$

Sustituyendo

$$6.25 = CE_{50} / 10$$

Despejando

$$CE_{50} = 6.25 \times 10$$

$$CE_{50} = 62.5$$

El resultado indica que un valor de toxicidad aguda en el efluente de 62.5% (CE_{50}) o su equivalente de 1.6 UT_a , garantiza la ausencia de efectos tóxicos crónicos en el cuerpo receptor.

- 2) Aplicable para industrias aún no instaladas en el cuerpo receptor.

¿Cuál es la carga tóxica máxima (CL_{50} o CE_{50}) del efluente que puede permitirse sin que se lleguen a exceder los valores de CCM y CCC?

Datos de utilidad:

Parámetro	Valor
Gasto medio del efluente (Q_e)	2 L/s
Gasto crítico del cuerpo receptor (${}_7Q_{10}$)	30 L/s
Criterios: CCM CCC	0.3 U_{t_a} 1.0 U_{t_c}

Concentración permisible en el efluente (CPE)

CPE aguda = Criterio de concentración seleccionado x Fd

CPE crónica = Criterio de concentración seleccionado x Fd

Fd (Factor de dilución)

$$Fd = ({}_7Q_{10} + Q_e) / Q_e$$

Donde

Q_e = Gasto del efluente

${}_7Q_{10}$ = Gasto mínimo anual del río (7, el gasto de siete días en periodo más crítico y 10 es el estimado del tiempo de retorno en diez años).

Sustituyendo

$$Fd = (30 + 2) / 2$$

$$Fd = 16$$

Criterio aplicado:

1) CCM

Sustituyendo

$$CPE_a = 16 \times 0.3 U_{t_a}$$

Resultado final

$$CPE = 4.8 U_{t_a}$$

2) CCC

Sustituyendo

$$CPE_a = 16 \times 1 U_{t_c}$$

Resultado final

$$CPE = 16 U_{t_c}$$

Empleando la ecuación anterior, resulta que la toxicidad aguda permisible para el efluente deberá ser menor o igual a $4.8 U_{t_a}$ o, lo que es lo mismo, la CL_{50} o CE_{50} debería ser $\geq 20.83\%$.

En relación a la toxicidad crónica, el efluente no deberá exceder de 16 U_{t_c} o su equivalente de 6.25% de CENO ($CENO = 100/U_{t_c}$).

RESUMEN

La parte más importante del control de efluentes es la protección

al ambiente acuático, en este sentido los resultados de las pruebas de toxicidad de un efluente pueden ser empleadas para la evaluación de su impacto en el cuerpo receptor. Esto se logra al comparar la concentración de efecto tóxico (CE_{50} o CL_{50}) del efluente con la concentración del efluente encontrada en el cuerpo receptor, una vez diluido por la corriente del sistema.

Con este fin pueden ser aplicados dos conceptos originados por la EPA. El criterio de concentración máxima (CCM), empleado para proteger los cuerpos receptores de efectos de toxicidad aguda, y el criterio de concentración continua (CCC), como medio de protección para efectos crónicos.

Tanto para el criterio de toxicidad aguda (CCM) como crónica (CCC), la toxicidad es probada en por lo menos tres especies, de las cuales se selecciona el resultado de la más sensible. Sin embargo, en caso de que la toxicidad sea evaluada en un número menor de especies (una o dos), será necesario el uso del factor

de corrección de incertidumbre para el resultado de toxicidad de la especie más sensible.

Con base en el manejo de los criterios antes mencionados y en forma conjunta a las mediciones de gasto del efluente, del cuerpo receptor y la determinación de la concentración de efecto del efluente, puede ser determinada la concentración máxima permisible para un efluente, así como también estimar la factibilidad de riesgo de toxicidad aguda y crónica en el cuerpo receptor, vinculada a su descarga.

AUTOEVALUACIÓN

Responda si los enunciados son verdaderos o falsos:

1. Las unidades de toxicidad aguda (Uta) y/o crónica (Utc) es el valor inverso de la CL_{50} o CE_{50} que permite expresar de manera proporcional la toxicidad de una muestra en relación con sus efectos, es decir, que cuanto mayor es el valor de las UT, mayor será la toxicidad de una muestra.

(V) (F)

2. El criterio de concentración máxima (CCM) y/o el criterio de concentración continua (CCC) se emplean para el desarrollo de cálculos que permitan obtener el valor de concentración permisible en el efluente, el cual puede ser de gran utilidad para el control de descargas.

(V) (F)

3. Cuando la concentración del efecto en el efluente (CL_{50} o CE_{50}) es mayor a la concentración del efluente en el cuerpo receptor (CER), se considera que esa descarga tiene un elevado potencial de impacto al sistema.

(V) (F)

7. BIBLIOGRAFÍA

CETESB, 1990. *Procedimiento para utilizacao de testes de toxicidad no controle de efluentes líquidos*. Serie "Manuais", 17pp.

CETESB, 1992, L50.17. *Análise estatística de resultados de testes de toxicidade aguda*.

Coleman, R. N. & Qureshi, A. A. "Microtox and *Spirillum volutans* Tests for Assessing Toxicity of Environmental Samples". *Bull. Env. Toxicol.* 35: 443-451

ISO 5667-16:1998. "Water quality- Sampling-" Part 16: *Guidance on biotesting of samples* y UNE- EN ISO 5667-16. ("Calidad del agua. Muestreo". Parte 16: *Guía para los ensayos biológicos de muestras*).

DIN, 1998 *German Standard Methods for the Examination of Water, Waste water and Sludge*. Bio-assays (group L) "Determination of the Inhibitory Effect of Waste Water on the Light Emission of *Photobacterium phosphoreum*." DIN 38412

Environment. Canada (1990). *Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to *Daphnia magna**. "Environmental Protection Series". EPS 1/RM/14 July, 1990.

Environment Canada. 1992a. *Biological Test Method: Toxicity Test using Luminiscent Bacteria (*Photobacterium phosphoreum*)*. "Environmental Protection Series". EPS 1/RM/24 November 1992.

Environment Canada, 1992b. *Biological Tests Method: Growth Inhibition Test using the Freshwater Alga *Selenastrum capricornutum**; Environment Canada. "Environmental Protection Series", Report EPS1/RM/25.

Environment Canada. (1994). *Guidance Document on Collection and Preparation of Sediments for Physicochemical Characterization and Biological Testing*. "Environmental Protection Series". EPS 1/RM/29 December 1994.

Environment Canada. (1998). *Biological Test Method: Toxicity Test Using early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout)*. "Environmental Protection Series". EPS 1/RM/28 Second Edition-July 1998..

Environment Canada. 1999. *Guidance Documents on Application and Interpretation of single species test in Environmental Toxicology*. "Environmental Protection Series". EPS 1/RM/34 December 1999, pp 210.

Environment Canada. 2000. *Biological Test Method: Reference Method for determining Acute Lethality of Effluents to Daphnia magna*. "Environmental Protection Series". EPS 2ª Ed. 1/RM/14 November 1992.

Environment Canada. 2000. *Biological Test Method: Reference for Determining Acute Lethality of Effluents to Rainbow Trout*. "Environmental Protection Series". EPS 1/RM/13 Second Edition- December 2000.

Grothe, D.R. 1990. "A Perspective on Biological Assessment". *Wat. Environ. & Tech.* April p.62-67, 1990.

Pica-Granados, Y., Trujillo D. G., Hernández H.S. 2000. "Bioassay Standardization for Water Quality Monitoring in Mexico". *Environmental Toxicology*, Vol. 15(4): 322-330 pp.

SCFI. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1980. Norma Mexicana NMX-AA- 003. *Aguas residuales. Muestreo*. *Diario Oficial de la Federación*, México.

SCFI. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1987. Norma Mexicana NMX-AA- 42. *Calidad del Agua. Determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (Termotolerantes) y Escherichia coli presuntiva*. *Diario Oficial de la Federación*, México

SCFI. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1995a. Norma Mexicana NMX-AA-112- SCOFI. *Análisis de agua y sedimentos. Evaluación de toxicidad aguda con Photobacterium phosphoreum*. Método de pruebas DGN. P. 36

SCFI. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1995b. Norma Mexicana NMX-AA-087- SCOFI. *Análisis de agua. Evaluación de toxicidad con Daphnia magna*. Straus, (Crustacea-Cladóccera). Método de prueba. DGN P. 28

SCFI. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1995 Norma Mexicana NMX-AA-110 SCOFI. *Análisis de Agua. Evaluación de toxicidad aguda con Artemia sp.* Método de Prueba DGN P. 28.

SCFI. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 2001. Norma Mexicana NMX-AA- 115. *Análisis de agua—Criterios generales para el control de la calidad de resultados analíticos*. *Diario Oficial de la Federación*, México.

Snell , T. W. & Persoon , G. 1989. "Acute Toxicity Bioassays using Rotifers. I. A Test for Brackish and Marine Environments with *Brachionus picautilus* II. A Freshwater Test with *Brachiornus rubens*". *Aquatic Toxicology*. 14(1): 65-91.

SRH. Secretaría de Recursos Hidráulicos, 1973. *Reglamento de prevención y control de la contaminación de aguas*.

Standard Methods. 1992. *For the Examination of Water and Wastewater*. 18th Ed. American Public Health Association. Ap. 8010G. p. 8-20, 8-23.

US EPA. Environmental Protection Agency, 1985. *Technical Support Document for Water Quality- Based Toxics Control*. Washington D.C. 74 p.

U.S EPA. Environmental Protection Agency, 1991. *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*. EPA-600/4-90-027. 4th Edition. Cornelius Y. Weber.

GLOSARIO

Bioensayo. Ensayo en el cual el poder o potencia de una sustancia es medido a través de la respuesta de organismos vivos o sistemas vivientes.

Contaminante. Sustancia ajena, presente en un sistema natural, o presente en una concentración más elevada a lo normal, por causa de actividad antrópica directa o indirecta.

Cumplimiento. De acuerdo con reglamentaciones gubernamentales o requerimientos para el otorgamiento de un permiso.

CE50. Concentración efectiva o de inhibición media. Concentración de la sustancia en el agua, que se estima afecta al 50% de los organismos de ensayo. La EC50 y sus límites de confianza (95%) son usualmente derivados de análisis estadístico.

Ensayo de toxicidad. Determinación del efecto de un material sobre un grupo de organismos seleccionados bajo condiciones definidas. Mide las proporciones de organismos afectados (efecto cuantal) o el grado de efecto (graduado) luego de la exposición a la muestra.

CL50. Concentración letal media, concentración del material en agua, suelo o sedimento que se estima letal para el 50% de los organismos de ensayo. La CL50 y sus límites de confianza (95%) son usualmente derivados de análisis estadístico.

CEMO. La concentración del efecto mínimo observable.

CENO. Concentración más baja a la cual no se observa efecto.

Protocolo. Es un conjunto de procedimientos explícitos para un ensayo o experimento, en acuerdo con lo establecido entre las partes, descrito en un documento escrito.

Toxicidad aguda. Efecto adverso (letal o subletal) inducido sobre los organismos de ensayo durante un periodo de exposición, usualmente de pocos días, al material de ensayo.

Toxicidad crónica. Implica efectos a largo plazo relacionados con cambios en el metabolismo, crecimiento o capacidad de supervivencia.

RESPUESTAS A LAS AUTOEVALUACIONES

Capítulo 1

1. F
2. F
3. V
4. F

Capítulo 2

1. F
2. F
3. F
4. F

Capítulo 3

1. V
2. V
3. V
4. V

Capítulo 4

1. V
2. V
3. V
4. V

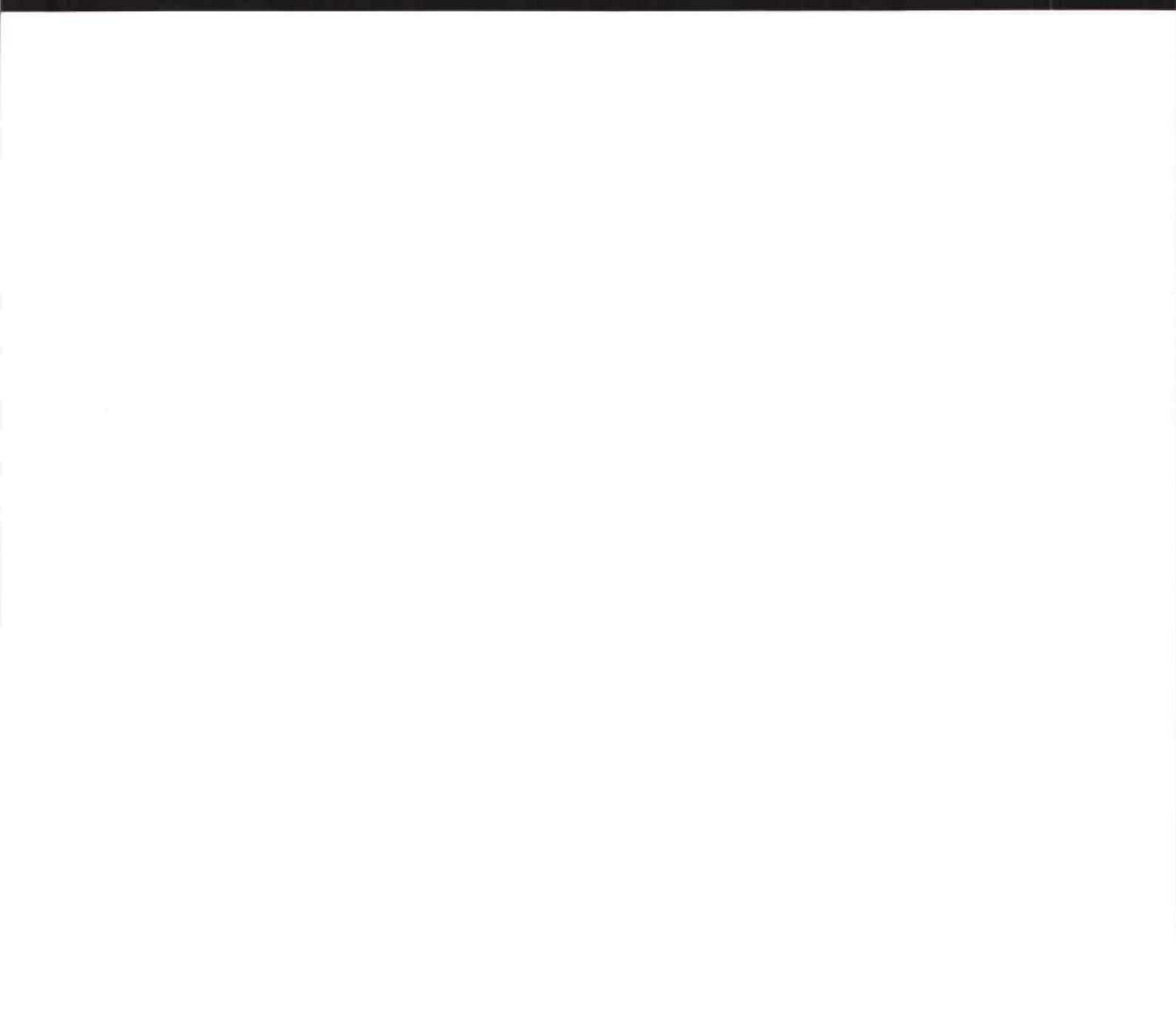
Capítulo 5

1. V
2. V
3. F
4. F

Capítulo 6

1. V
2. V
3. V

ANEXOS



Cómo se hacen las pruebas y su control de calidad

Descripción de protocolos de prueba

El análisis de toxicidad con la bacteria marina luminiscente *Vibrio fischeri* se lleva a cabo a partir del empleo de un inóculo de aproximadamente 1×10^6 cél/mL de la bacteria marina *Vibrio fischeri*. Los organismos son expuestos a una serie de cuatro diluciones secuenciales preparadas con la muestra de descarga o del sistema experimental y la adición de NaCl al 22%, para el ajuste osmótico del organismo de prueba. En forma paralela se emplean los sistemas de control de calidad señalados anteriormente. Para la determinación de la concentración efectiva media (CE_{50}) del tóxico de referencia, se emplean cuatro diluciones y en paralelo se prepara una celdilla como control negativo, conteniendo agua destilada y la solución de NaCl (figura 1).

Las muestras inoculadas son incubadas a 15°C en el sector de tem-

peratura controlada del sistema Microtox (Mod 5000) y posteriormente con ayuda del luminómetro integrado a este mismo instrumento, se efectúa la medición de la emisión de luz después de 5 y 15 minutos de exposición.

Cualquier cambio significativo de la emisión de luz respecto al control se considera indicativo de la acción de agentes tóxicos presentes en la muestra.

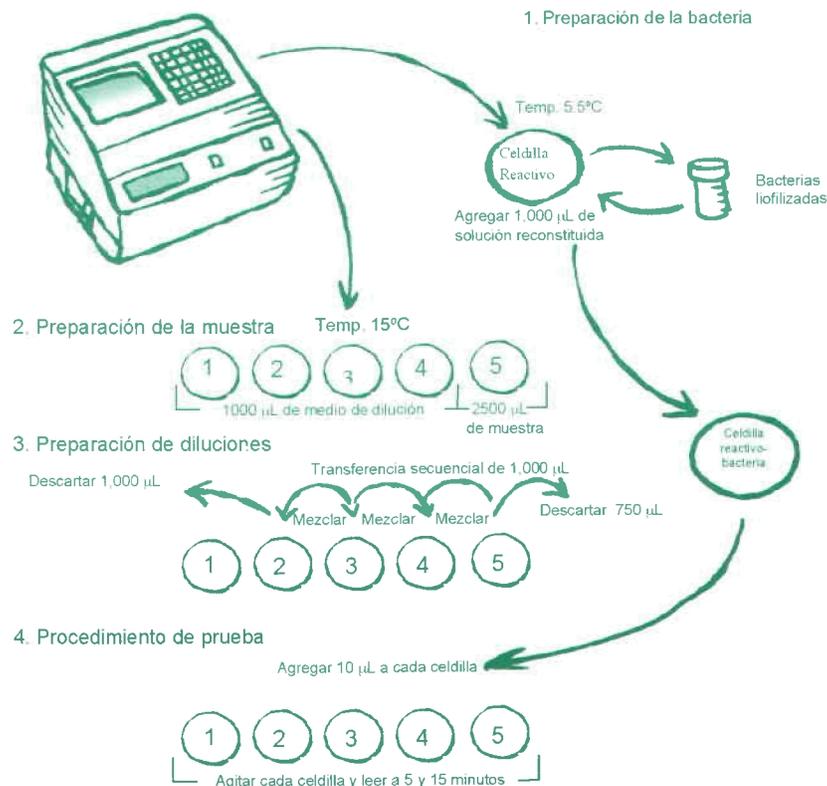
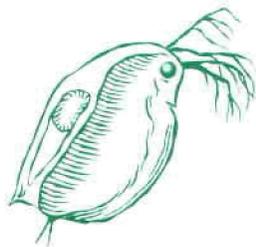


Figura 1. Procedimiento de prueba con *Vibrio Fischeri*.



Daphnia magna (pulga de agua):

Organismos de menos de 24 horas de nacidos (neonatos) de *D. magna*, se exponen a una serie de cinco a siete diluciones secuenciales preparadas el agua de la muestra y agua dura reconstituida (APHA, 1998), como medio de dilución.

Los valores de porcentaje de mortalidad que se obtengan para la serie de diluciones, se relacionan gráficamente con la concentración correspondiente de la muestra para construir un gráfico logarítmico que defina la curva que explica el fenómeno. En esta curva puede ser interpolada la dosis que genera un porcentaje de efecto elegido y que en términos estándar es el efecto medio o letalidad media (CE_{50} o CL_{50}). Este término indica la dosis en la que la mitad de la población de organismos expuestos muere.

1. Preparación de diluciones.

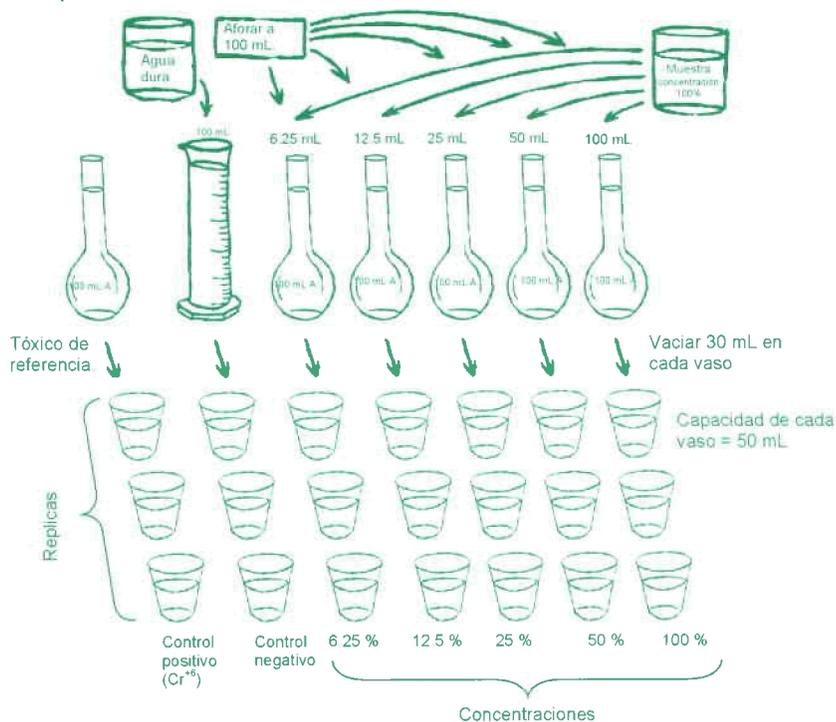


Figura 2a Protocolo de prueba con *Daphnia magna* (preparación de diluciones).

La prueba con *Selenastrum capricornutum* es una de las pruebas más sensibles, ya que el factor de evaluación está basado en el concepto de prueba crónica. Una prueba crónica permite poner en evidencia daños subletales que afectan en el tiempo el desarrollo

de una especie, ya sea dañando su reproducción o provocando daños a su metabolismo de consecuencias a largo plazo. La prueba con la microalga permite detectar la presencia de agentes tóxicos que puedan influir en el metabolismo vegetal, aun cuando éstos se encuen-

2. Preparación de prueba

22 ± 2°C, e iluminación 800 lux ___
10 % por 48 h.



8 h/16 h

Agregar 10 organismos a cada vaso

Daphnias de < 24 h de nacidas

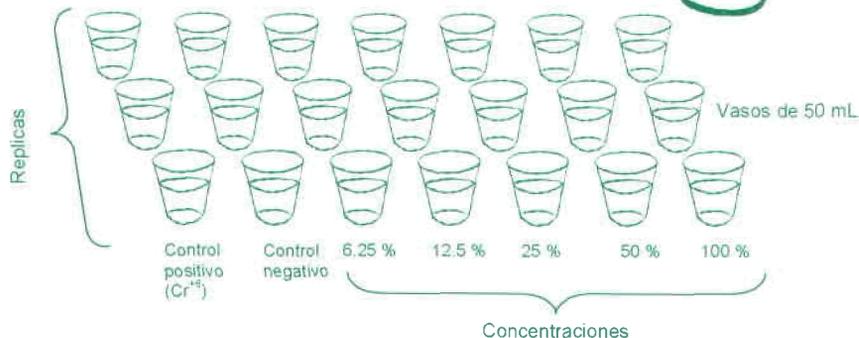


Figura 2b Protocolo de prueba con *Daphnia magna* (preparación de la prueba).

tren en dosis menores a mg/mL, ya que los daños a las células independientes se traducen de forma transgeneracional en desarrollos alterados de la población.

Las microalgas, en densidad de 10,000 cél/mL, son inoculadas en distintas diluciones de la muestra por analizar (ej. muestra al 100, 50, 25, 12.5, 6.25% etcétera) y en para-

lelo en un control negativo. Después de 72 horas se efectúa el conteo de la población de algas final, tanto en las diluciones de la muestra como en el control. En este último pueden obtenerse hasta 1,350 000 cél./mL (figuras 3a y 3b).

Cuando existe la presencia de tóxicos en la muestra se afecta el crecimiento normal de la población, re-

duciendo significativamente la densidad de las células respecto al control negativo. El porcentaje de efecto de cada dilución se obtiene por la relación del número de células/mL de la muestra respecto al sistema control.

Estos porcentajes obtenidos para la serie de diluciones se relacionan gráficamente con la concentración correspondiente y se construye un gráfico logarítmico que define la curva que explica el fenómeno. En esta curva puede ser interpolada la dosis que genera un porcentaje de efecto medio también reconocida para la prueba con alga como efecto de inhibición media (CE_{50} o CI_{50}).

Expresión de resultados

Para determinar la concentración que causa el 50% de pérdida de la emisión luminosa, mortalidad o inhibición del crecimiento, según corresponda de acuerdo con el punto de medición de cada prueba, será empleado el método estándar de la curva dosis-respuesta. En el caso de *Vibrio fischeri* se emplea un *software* conteniendo un modelo estándar logarítmico-lineal y, en el caso

de las pruebas con *D. magna* y *S. capricornutum*, se aplica el modelo estadístico Probit, Sperman and Karber o promedios móviles. El uso de cada uno de ellos dependerá de cuál modelo se ajuste adecuadamente al comportamiento de los datos (US EPA, 1991).

Control de calidad analítico para pruebas de toxicidad

Para el control de la calidad de los resultados, se llevan a cabo diversas actividades técnicas vinculadas a las pruebas y mediciones de interés, así como el empleo de los crite-

rios analíticos para la aceptación y rechazo de los resultados que están dirigidos a garantizar la precisión y exactitud de los datos experimentales.

Con este fin y de forma paralela a la determinación o evaluación de toxi-

1. PREPARACION DE INOCULO ALGAL

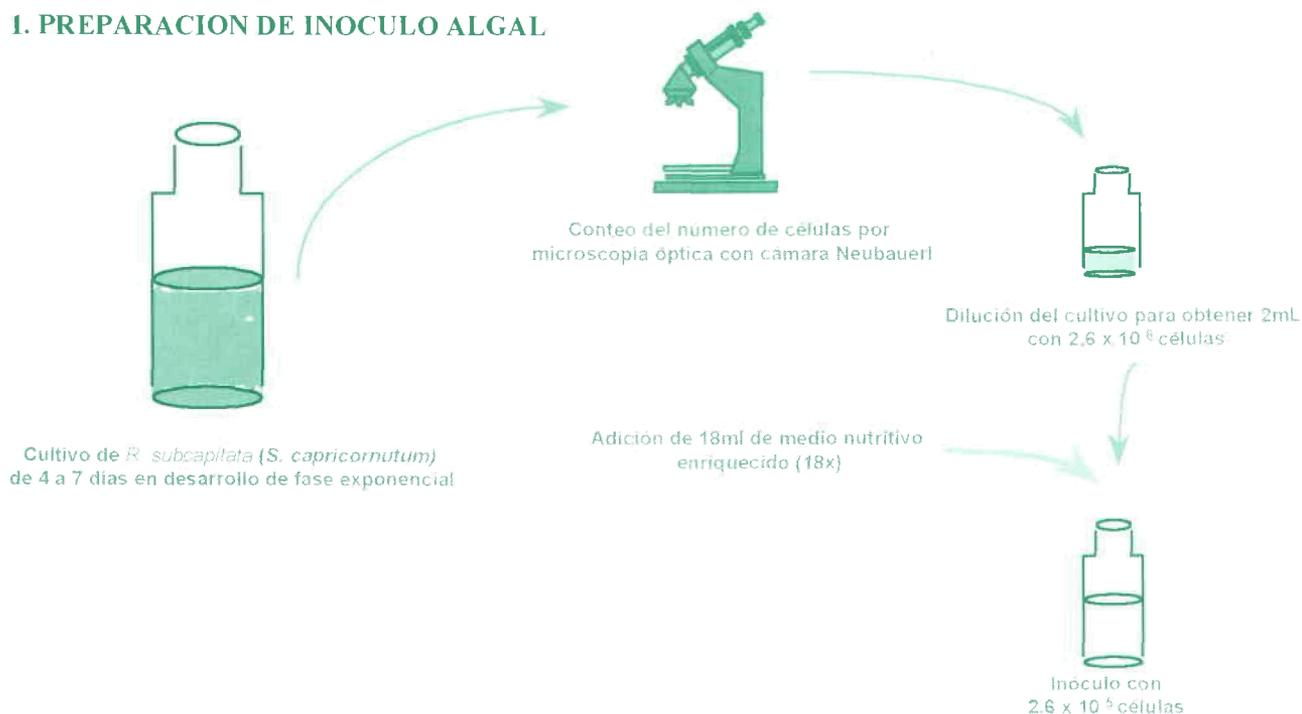


Figura 3a. Procedimiento de prueba con *Selenastrum capricornutum*.

2. MÉTODO DE DILUCION DE MUESTRAS

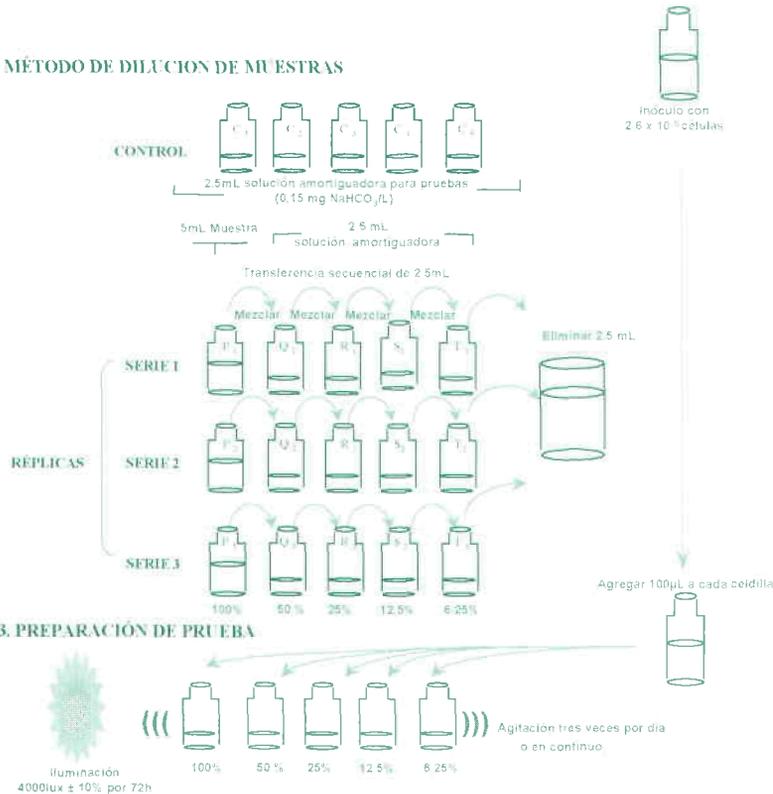


Figura 3b. Procedimiento de prueba con *Selenastrum capricornutum*.

idad de las muestras, se preparan diversos sistemas de control, entre los que se incluyen el control positivo y negativo previamente descritos, así como el blanco de procedimiento y el análisis replicado.

- Control negativo. Es preparado con agua dura reconstituida (*Daphnia magna*), agua destilada con solución salina (*Vibrio fischeri*) o con medio mineral (*Selenastrum capricornutum*),

dependiendo de la prueba de que se trate. En estos medios se colocan los organismos de prueba. Su desempeño, durante el tiempo de exposición, será de utilidad para comprobar el óptimo estado de salud del material biológico empleado en los análisis que lo acompañan.

- Control positivo. Para esta clase de control se emplean tóxicos de referencia. Su empleo es de utilidad para determinar la precisión del método y poner en manifiesto la sensibilidad y estabilidad de respuesta biológica. El efecto del tóxico, llamado de referencia, se encuentra previamente definido para cada organismo de prueba y el valor de la EC_{50} obtenida de pruebas sucesivas con el tóxico seleccionado, es empleado para la construcción de una carta control (figura 4).

- La carta control es la herramienta de registro que brinda los elementos de juicio para establecer los intervalos aceptables de variación de la respuesta de los organismos de prueba a un tóxico de referencia, con un margen de

Fecha	No. secuencial de experimentos	Cr ⁺⁶ CE ₅₀ (mg/L) Análisis Probit
Sep-99	1	0.17
Ene-00	2	0.166
Abr-00	3	0.166
Jul-00	4	0.164
Oct-00	5	0.164
Dic-00	6	0.167
Mar-01	7	0.166
Mar-01	8	0.161
Mar-01	9	0.168
Jun-01	10	0.1577
Jun-01	11	0.1577
Jun-01	12	0.1577
Jun-01	13	0.1587
Oct-01	14	0.1587
Oct-01	1	0.1617
Oct-01	5	0.1568
Oct-01	16	0.1577
Ene-02	17	0.1636
Ene-02	18	0.16
Ene-02	19	0.1587
Ene-02	20	0.16
Mar-02	21	0.1555
Mar-02	22	0.1586
Mar-02	23	0.1638
Jul-02	24	0.1679
Jul-02	25	0.1669
Jul-02	26	0.172

Promedio 0.162
 Desv. Est. (DE) 0.004
 Coef. Variación 2.77%

Promedio +2 DE 0.171
 Promedio - 2DE 0.153

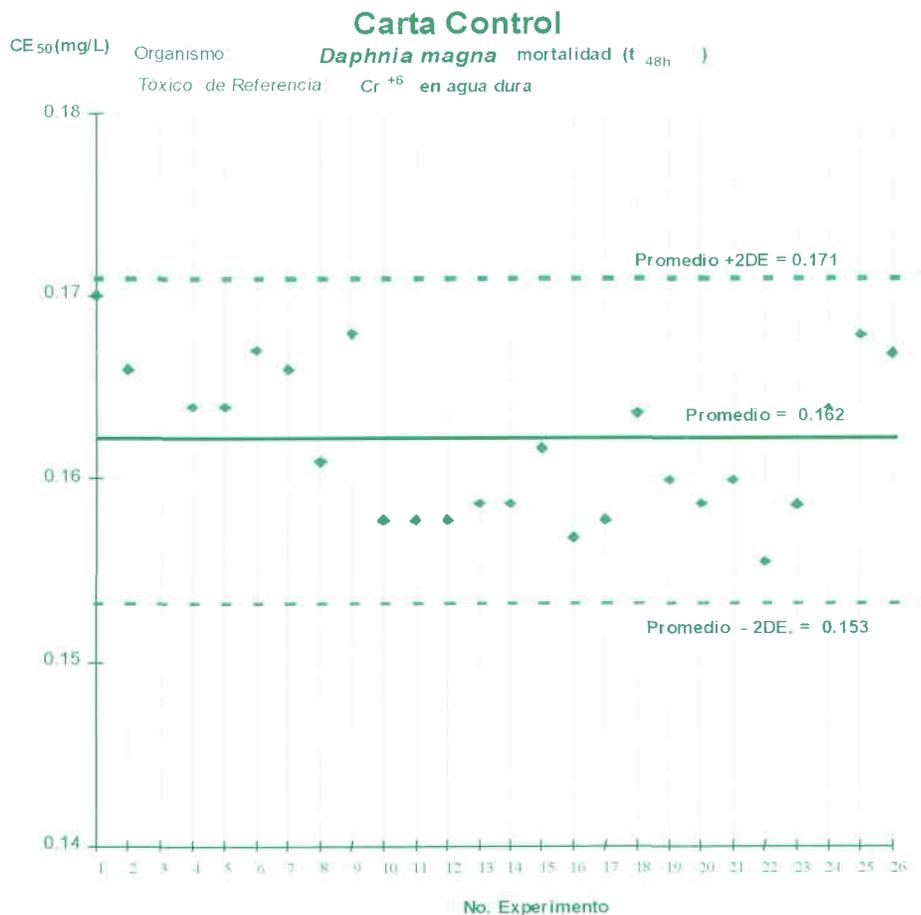


Figura 4. Carta Control para el tóxico de referencia.

confianza del 95%. Esta carta, además de su utilidad en el control de la sensibilidad, permite evidenciar la repetibilidad (exactitud) de los resultados obtenidos.

Como tóxicos de referencia se sugieren: el Cr ⁺⁶ a partir de K₂Cr₂O₇, para *D. magna* ; fenol para *Vibrio*

fischeri y Cu ⁺² a partir de CuSO₄ para *S. capricornutum* (US EPA, 1991).

- Blanco de método. Se emplea sólo en los caso en que la muestra es sometida a un tratamiento previo al análisis de toxicidad y es de utilidad para determinar si el manejo de procesamiento de muestra, junto con los reactivos y

materiales involucrados, no generan interferencias o contaminación a la muestra por analizar.

- Análisis replicado. Se seleccionará al azar una muestra por cada lote para efectuar su análisis por duplicado. El resultado permite demostrar la repetibilidad del método de análisis.



IMTA

INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGIA DEL AGUA

CENTRO DE CONSULTA DEL AGUA

PAPELETA DE DEVOLUCION

El lector se obliga a devolver este libro antes del
vencimiento del préstamo señalado por el último sello

28/1/99 4/01/99 01 ABR 2016	sin CO	
--	-----------	--

IMTA/CCA/F/PD

FORMA IMTA-D-036

Apartado Postal 202 CIVAC, Mor. 62500
Jutepec, Mor.



43190

IMTA

CENTRO DE CONSULTA DEL AGUA

SERIE VERDE

ISBN	TÍTULO	AUTORES
968-5536-23-6	IDENTIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS TERCARIOS PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.	MANUEL FUENTES DÍAZ
968-5536-25-2	INSPECCIÓN EN FOSAS SÉPTICAS Y LETRINAS.	ARTURO GONZÁLEZ HERRERA
968-5536-27-9	IDENTIFICACIÓN DE SISTEMAS NATURALES PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.	CÉSAR G. CALDERÓN MÓLGORA
968-5536-26-0	IDENTIFICACIÓN DE SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE LODOS RESIDUALES.	LINA CARDOSO VIGUEROS
968-5536-24-4	IDENTIFICACIÓN DE SISTEMAS DE DESINFECCIÓN DE AGUAS RESIDUALES.	MARTHA AVILÉS FLORES LETICIA MONTELLANO
968-5536-28-7	CARACTERÍSTICAS Y EFECTOS DE LOS RESIDUOS PELIGROSOS.	LINA CARDOSO VIGUEROS
968-5536-21-X	ANÁLISIS DE TOXICIDAD EN EL AGUA.	YOLANDA PICA GRANADOS
968-5536-22-8	TOMA Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE AGUA RESIDUAL EN EMISORES SUBMARINOS.	LUIS BRAVO INCLÁN JAVIER SÁNCHEZ

