

Intercalibración de las pruebas con *Daphnia magna* y *Pseudokirchneriella subcapitata* en México: herramientas potenciales para el monitoreo ambiental

Intercalibration of *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata* assays in Mexico: potential tools for environmental monitoring

Ania Mendoza Cantú,¹ Patricia Ramírez Romero,²
Yolanda Pica Granados,³ Ivonne Jaisibi Cuesta Zarco,⁴
Lucía Salazar Coria⁵ y Alma Socorro Sobrino Figueroa²

¹Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. Periférico Sur # 5000. Col. Insurgentes Cuicuilco. Del. Coyoacán. México, Distrito Federal, 04530. México

²Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco # 186. Col. Vicentina. Del. Iztapalapa. México, Distrito Federal. 09340, México

³Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Paseo Cuauhnáhuac # 8532. Col. Progreso. Jiutepec, Morelos, 62550. México

⁴Comisión Nacional del Agua, Gerencia de Saneamiento y Calidad del Agua. Av. San Bernabé #549. Col. San Jerónimo, Del. Magdalena Contreras. México, Distrito Federal. 10200. México

⁵Instituto Mexicano del Petróleo. Eje Central Norte Lázaro Cárdenas # 152. Col. San Bartolo Atepehuacan. Del. Gustavo A. Madero. México, Distrito Federal, 07730. México
e-mail: amendoza@ine.gob.mx

Mendoza Cantú A., P. Ramírez Romero, Y. Pica Granados, I. J. Cuesta Zarco, L. Salazar Coria y A. S. Sobrino Figueroa. 2013. Intercalibración de las pruebas con *Daphnia magna* y *Pseudokirchneriella subcapitata* en México: herramientas potenciales para el monitoreo ambiental. *Hidrobiológica* 23(1): 97-110.

RESUMEN

En México, como en otros países en desarrollo, el conocimiento sobre el grado de contaminación y sus efectos en los ecosistemas locales se ha generado siguiendo objetivos de investigación específicos que emplean metodologías de distinta naturaleza. Dado que aún existen vacíos de información en el tema, es importante impulsar el uso generalizado de pruebas ecotoxicológicas que empleen protocolos estandarizados y que sirvan como herramientas regulatorias para establecer medidas integrales de protección al ambiente. Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo demostrar, a través de ejercicios de intercalibración, previo desarrollo de talleres de homologación de capacidades, el potencial de los protocolos de ensayo con *Daphnia magna* y *Pseudokirchneriella subcapitata* (antes *Selenastrum capricornutum*) para generar resultados confiables en laboratorios con poca experiencia en este campo. Esto permitirá impulsar el empleo de herramientas bioanalíticas en México para el monitoreo ambiental, las cuales favorecen la evaluación integral de los problemas de contaminación en los cuerpos de agua. Los resultados de los ejercicios de calibración interna de los laboratorios demostraron que en un corto plazo es posible lograr una repetibilidad aceptable en las pruebas y un desempeño adecuado de los protocolos, lo cual apoya la idea de que estos protocolos son pertinentes para su empleo en programas de monitoreo ambiental, aún en países donde actualmente se cuenta con pocos recursos humanos capacitados y laboratorios aptos para tal fin.

Palabras clave: Intercalibración, *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, monitoreo ambiental, México.

ABSTRACT

In Mexico, as in other developing countries, the knowledge about pollution status and its effects in local ecosystems has been developed following specific research goals that make use of different methodologies. Since there are information gaps in this topic, it is important to promote the broad use of standardized ecotoxicity protocols as regulatory tools to establish comprehensive environmental protection measures. From this perspective, the goal of this study was to demonstrate, through intercalibration exercises, with previous capacity homologation workshops, the potential of *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata* (known before as *Selenastrum capricornutum*) protocols, to generate analytically reliable results in laboratories with little experience in this field. This will allow the promotion of bio-analytical tools in Mexico for environmental monitoring, which will favor the integral evaluation of pollution in water bodies. The results of the laboratories internal calibration exercises demonstrated that in a short term it is possible to achieve an acceptable analytical repeatability and an adequate performance of the protocols, which sustains the idea that these protocols are good environmental monitoring tools, even in countries where today there are very few qualified human resources and laboratories fit for this purpose.

Key words: Intercalibration, *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, environmental monitoring, Mexico.

INTRODUCCIÓN

Desde la década de 1950, con el inicio de los esfuerzos para evaluar los impactos de las sustancias sobre los organismos y ecosistemas, se ha reconocido la necesidad de contar con pruebas toxicológicas uniformes y estandarizadas que permitan obtener datos confiables y comparables entre distintos laboratorios y regiones del mundo (Doudoroff *et al.*, 1951). Desde entonces se ha advertido que uno de los elementos fundamentales para lograr la estandarización de estas pruebas es el uso de especies de referencia o subrogadas (Davis, 1977). Estas especies han sido seleccionadas porque son representativas de los diferentes niveles en la trama alimenticia y porque son suficientemente sensibles a los efectos adversos producidos por los contaminantes. Si los efectos observados en la biología (respuesta) de estas especies subrogadas son empleados como una alerta en el monitoreo ambiental de la contaminación, tanto ellas como las demás especies que forman parte del ecosistema quedarán protegidas, suposición que es clave en la evaluación de riesgo ecológico (Whitford *et al.*, 2003).

Adicionalmente, las especies subrogadas presentan ventajas como las siguientes:

- Sus protocolos de trabajo han sido ampliamente calibrados a nivel nacional e internacional.
- Se conoce con gran detalle la forma de mantener sus cultivos y de manejar sus pruebas para la evaluación de toxicidad.
- Se conocen los aspectos técnicos requeridos para el control de la variabilidad durante los ensayos y se han establecido criterios de control de calidad en sus pruebas.
- Se cuenta con cepas de sensibilidad controlada en instituciones del gobierno y académicas, a las que los laboratorios de prueba pueden acudir para obtener pies de cría.
- Gracias a lo anterior, el uso de especies subrogadas y protocolos calibrados permiten el control de la repetitividad y reproducibilidad de los resultados, lo cual facilita su aplicación como herramientas bioanalíticas en programas rutinarios de monitoreo ambiental, cuya relevancia puede tener implicaciones de orden legal e incluso económicas para las empresas que contaminan.

cibilidad de los resultados, lo cual facilita su aplicación como herramientas bioanalíticas en programas rutinarios de monitoreo ambiental, cuya relevancia puede tener implicaciones de orden legal e incluso económicas para las empresas que contaminan.

- Dado el extenso uso que de ellas se ha hecho a nivel internacional, los resultados de sus pruebas pueden ser comparados con aquellos obtenidos en otros países, ya sea para muestras ambientales, para sustancias o productos de nueva generación, para materias primas importadas o de fabricación nacional y para otros productos de aplicación o disposición final en el ambiente. Esto es relevante para definir políticas de control y disposición de sustancias.

El uso de las especies subrogadas surgió como una iniciativa de las organizaciones internacionales y los gobiernos de varios países, los cuales han desarrollado múltiples métodos o protocolos estandarizados de prueba para evaluar la toxicidad con estas especies (USEPA, 1991; ASTM, 1992; OECD, 2002; APHA, 2005) debido a la imposibilidad de evaluar la diversidad de respuestas de las diferentes especies que componen un ecosistema (Moore, 1987).

Entre las especies subrogadas de agua dulce, los cladóceros o pulgas de agua han sido utilizados con gran éxito como organismos de prueba; sobre todo, por su ciclo de vida corto, por su facilidad de cultivo y mantenimiento en el laboratorio y por su importancia ecológica, ya que funcionan como el enlace principal entre los productores primarios y los consumidores (Mount & Norberg, 1984; Deken, 2005) al convertir al fitoplancton y a las bacterias en proteína animal, la cual constituye una fracción importante de la dieta de numerosas especies acuáticas de eslabones superiores de la trama alimenticia. Entre los cladóceros, *Daphnia magna* Straus, 1820 es la especie subrogada más conocida y utilizada (Martínez-Jerónimo *et al.*, 2000). Tan sólo en Estados Unidos, es uno de los organismos recomendados con más frecuencia por la regulación federal para evaluar la toxicidad aguda y crónica de

efluentes, cuerpos de agua, muestras acuosas y productos químicos (USEPA, 1985; USEPA, 1986). La relevancia del uso de esta especie se puede constatar si se revisa el número de artículos sobre ecotoxicología de cladóceros que fueron publicados entre 1996 y 2006 y que hacen referencia a ella. Del total de artículos publicados en este tema en ese período (más de 900), cerca de 350 fueron realizados empleando a *D. magna* (Sarma & Nandini, 2006).

Por otra parte, la microalga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindák, en ocasiones identificada erróneamente y por ello también nombrada como *Selenastrum capricornutum* Printz, es actualmente el organismo más utilizado como especie subrogada de los vegetales acuáticos que viven en cuerpos de agua dulce y es una buena representante de los productores primarios en las redes alimenticias de ambientes dulceacuícolas (Larsen, 2002).

En México, como en otros países en desarrollo, conocer el grado de contaminación o degradación en el que se encuentran los ecosistemas en general, y los ecosistemas acuáticos en particular, es prioritario debido a los vacíos de información ambiental que aún no se han podido cubrir a cabalidad. Diversas leyes y normas se han desarrollado en México para medir y controlar ciertos parámetros fisicoquímicos en el agua; sin embargo, es muy escasa la regulación enfocada al control de la contaminación química, e inexistente aquella que considera la evaluación directa de los efectos biológicos de los contaminantes. Por tal motivo, es sumamente importante impulsar el uso generalizado de pruebas biológicas para la evaluación de la toxicidad, que sean de manejo accesible, de tiempos de respuesta cortos y adecuadamente sensibles, a fin de ser incorporadas como herramientas de análisis dentro del marco regulatorio integral en materia de protección al ambiente.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue demostrar, a través de los resultados de ejercicios de intercalibración, las ventajas de los ensayos con *D. magna* y *P. subcapitata* como pruebas que pueden implementarse exitosamente en laboratorios con poca experiencia, para impulsar su uso como herramientas bioanalíticas para el monitoreo ambiental en México y en otros países en desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de pruebas. La selección de las pruebas se llevó a cabo tomando en cuenta los criterios utilizados por Forget *et al.* (2000a) y aquellos discutidos en el año 2005 por un grupo de expertos mexicanos (Ramírez-Romero & Mendoza-Cantú, 2008), entre ellos se encuentran las siguientes características de las pruebas: a) basadas en métodos disponibles y de amplia aplicación, b) de fácil implementación y manejo rutinario, c) costo-efectivas, d) capaces de generar información confiable de utilidad científica y legal, y e) predictivas de efectos ecológicos.

Adicionalmente, se consideraron los resultados y conclusiones obtenidos por la red internacional *Water Tox*, de la cual México fue miembro, representado por el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA) (Pica-Granados *et al.*, 2000; Forget *et al.*, 2000a y 2000b). Esta red recapituló la experiencia de seis años y de tres ejercicios de intercalibración. Sus resultados mostraron la conveniencia de integrar una batería de pruebas constituida por organismos de prueba con rangos de sensibilidad distintos y complementarios. Entre ellos *D. magna* y *P. subcapitata* fueron dos de las especies candidatas. Respecto a ellas, se publicaron protocolos detallados (Castillo, 2004), y su confianza como herramientas de análisis quedó ampliamente demostrada en los resultados obtenidos por dicha red (Forget *et al.*, 2000b).

Por lo anterior, los protocolos seleccionados fueron la prueba de toxicidad aguda con *D. magna* (48 h) y el ensayo de inhibición del crecimiento poblacional con *P. subcapitata* (72 h) (medido por el método de conteo celular mediante hemocitómetro Neubauer) (Díaz-Báez & Pica-Granados, 2004; Pica-Granados *et al.*, 2008).

La cepa de *D. magna* utilizada fue donada por Canadá hace más de 10 años y desde entonces se mantiene en cultivo en el IMTA, mientras que la cepa de *P. subcapitata* se obtuvo de UTEX con el número 1648 y el nombre de *Selenastrum capricornutum*.

Selección de laboratorios. Un grupo reducido de laboratorios fue invitado a participar en este estudio. Todos los participantes debían contar con la infraestructura, el personal y el tiempo suficiente para llevar a cabo las pruebas, requisitos mínimos necesarios para garantizar el adecuado control de la calidad de los resultados que se obtendrían.

La selección final incluyó a las siguientes instituciones: Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM-I), Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental (CENICA), Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), Gerencia de Saneamiento y Calidad del Agua de la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) y la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Actividades preparatorias. Las actividades preparatorias incluyeron la entrega a cada laboratorio de un juego de materiales uniformizados que comprendieron los siguientes elementos: 1) los protocolos detallados para realizar las pruebas, para el mantenimiento y optimización de los cultivos y para el control de calidad; 2) un procedimiento para construir una cámara de iluminación simple y de bajo costo, necesaria para el desarrollo de la prueba con *P. subcapitata* (Hernández-Salgado, 2008), 3) un disco con los formatos electrónicos (hojas de cálculo) para la captura y el registro de los datos experimentales y de las condiciones ambientales durante las pruebas, para los cálculos de los resultados de las pruebas, para la construcción de las cartas control y el análisis de la significancia estadística en muestras replicadas; 4) una copia de los programas estadísticos para realizar los análisis Probit

para el cálculo de las concentraciones letales medias (CL_{50}) o de las concentraciones efectivas medias (CE_{50}); y 5) un paquete con los reactivos, consumibles y cepas de los organismos de prueba.

Taller de transferencia y capacitación. La capacitación técnica del personal de los laboratorios participantes se realizó mediante un taller diseñado con sesiones teóricas y prácticas, el cual estuvo a cargo del IMTA.

En este taller, los participantes presenciaron demostraciones y posteriormente efectuaron sus propios experimentos, atendiendo los detalles técnicos relevantes para el control de la variabilidad de los métodos de prueba y del cultivo de los organismos, y haciendo énfasis en las pautas y criterios del control de calidad.

Desarrollo de los cultivos y de las pruebas de autoentrenamiento (calibración interna). Con los materiales y cepas proporcionados, cada laboratorio adecuó espacios en sus instalaciones e inició de forma inmediata las actividades de mantenimiento y optimización del desarrollo de los cultivos. Una vez lograda la adecuada proliferación de los cladóceros y de las algas, los laboratorios iniciaron experimentos de autoentrenamiento empleando los siguientes compuestos tóxicos de referencia: Cr^{+6} , a partir de $K_2Cr_2O_7$, para *D. magna*, y Cu^{+2} , a partir de $CuSO_4$, para *P. subcapitata*, ambos compuestos con pureza mayor al 99.5%.

Con fines de calibración interna, cada laboratorio realizó pruebas de toxicidad para construir su carta control. Las cartas control permitieron verificar el desarrollo y sostenimiento de la capacidad de análisis y fueron de utilidad para determinar la repetibilidad o variabilidad intralaboratorios.

Posteriormente, los datos de las cartas control de los distintos laboratorios se conjuntaron para construir una carta control integrada para cada especie de prueba. Estas cartas integradas permitieron analizar las diferencias entre ellos, detectar datos o grupos de datos aberrantes, atender los problemas técnicos que los produjeron y, una vez resueltos, determinar la variabilidad interlaboratorios de cada uno de los métodos de prueba.

Análisis de muestras ciegas. Para el desarrollo de esta fase se prepararon dos lotes con cuatro muestras ciegas cada uno, los cuales se acompañaron con un instructivo detallado para su manejo, en donde se describía la forma de preparación y las diluciones para cada muestra y ensayo.

Dado que se trabajó con muestras ciegas, los reportes de resultados de la CL_{50} o CE_{50} emitidos por los laboratorios participantes fueron expresados inicialmente como porcentaje. Una vez recibidos y analizados estos reportes por la coordinación técnica, los valores porcentuales fueron convertidos a unidades de concentración (mg/L) en los casos en que fue posible.

Los compuestos tóxicos seleccionados para elaborar las muestra ciegas fueron preparados con reactivos certificados y de pureza igual o mayor al 99.5% para ambos lotes. El Cr^{+6} (muestra 1) se obtuvo a partir de $K_2Cr_2O_7$, el Cu^{+2} (muestra 5) de $CuSO_4$, el 2,4-D (muestra 6) a partir de su estándar certificado y el Hg^{+2} (muestras 2, 4 y 7) a partir del $HgCl_2$. Esta última sustancia se empleó como muestra replicada con el objetivo de verificar la evolución de la precisión de los análisis efectuados por los laboratorios participantes. La muestra 3 se preparó con agua dura y constituyó el control negativo del proceso. La muestra 8, por su parte, se empleó como control para muestras cuya preparación requería el uso de disolventes como vehículo (Tabla 1). Estos controles permitieron discernir eventos de sobrestimación de los valores de toxicidad o resultados falsos positivos no deseables.

Análisis estadístico de los datos. Para el análisis del desempeño de los laboratorios durante la elaboración de sus cartas control, se calcularon los parámetros estadísticos básicos (promedio, desviación estándar y coeficiente de variación) para la CL_{50} o CE_{50} del total de experimentos (réplicas) realizados en cada laboratorio para cada una de las pruebas. Para determinar las diferencias de los valores de CL_{50} o CE_{50} entre los diferentes laboratorios se aplicó la prueba de Dunnett-Tukey-Kramer para comparaciones múltiples en experimentos desbalanceados (Dunnett, 1980), con un 95% de confianza. Esta prueba fue realizada en R y DTK package (Lau, 2011).

Los mismos parámetros estadísticos básicos fueron calculados para cada una de las muestras ciegas utilizando los resultados de los cinco laboratorios. Las diferencias estadísticas entre los resultados de la CL_{50} o CE_{50} de cada una de las muestras ciegas y el promedio de la CL_{50} o CE_{50} de la carta control de cada laboratorio se calcularon mediante el método de regresión para muestras duplicadas desarrollado por la American Public Health Association (APHA, 1992; descrito por Díaz-Báez *et al.*, 2006). Este mismo método se aplicó para calcular las diferencias entre las muestras ciegas 2, 4 y 7, empleadas para verificar la reproducibilidad de los

Tabla 1. Identificación y concentración inicial de los compuestos tóxicos de las muestras ciegas empleadas en el ejercicio de intercalibración.

Primer lote	Muestra 1 0.2 mg/L Cr^{+6}	Muestra 2 0.4 mg/L Hg^{+2}	Muestra 3 Agua dura	Muestra 4 0.4 mg/L Hg^{+2}
Segundo lote	Muestra 5 0.4 mg/L Cu^{+2}	Muestra 6 12 mg/L 2,4-D	Muestra 7 8 mg/L Hg^{+2}	Muestra 8 Solución 0.4 % isooctano en agua dura

resultados de los diferentes laboratorios participantes. Para este último cálculo se indicó cuántas muestras resultaron positivas, es decir, con diferencia estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Elaboración de cartas control. En lo relativo a las pruebas realizadas con *D. magna*, la información de las cartas control de los cinco laboratorios se encuentra sintetizada en la tabla 2, en ella se puede observar que los valores de CL_{50} para el Cr^{+6} variaron

entre 0.144 mg/L y 0.255 mg/L, con coeficientes de variación (CV) que en general fueron menores del 10%. Al promediar los datos de los cinco laboratorios, la CL_{50} tomó el valor de 0.189 mg/L y el CV se incrementó hasta 20%; este incremento obedeció a la variabilidad interlaboratorios. También se pudieron apreciar dos grupos de valores (Fig. 1): el primero formado por los datos proporcionados por los laboratorios 1, 4 y 5, los cuales se ubicaron por debajo de la CL_{50} de la carta control integrada, con valores de CL_{50} muy similares entre sí (0.154 mg/L a 0.160 mg/L; CV de 4% a 7%). El segundo grupo estuvo compuesto por los datos de los

Tabla 2. Resultados del análisis de toxicidad del Cr^{+6} (compuesto tóxico de referencia) con *Daphnia magna*, obtenidos en el ejercicio de intercalibración.

Laboratorio	Número de experimento	CL_{50} Cr^{+6} (mg/L) Análisis Probit	Parámetros estadísticos		
			Promedio CL_{50}	DE	CV (%)
1	1	0.144	0.154	0.10	7
	3	0.170			
	4	0.147			
	5	0.157			
	6	0.151			
	6	0.151			
2	1	0.201	0.220	0.023	10
	2	0.235			
	3	0.189			
	4	0.222			
	5	0.218			
	6	0.227			
	7	0.255			
	8	0.254			
3	1	0.203	0.222	0.015	7
	2	0.232			
	3	0.242			
	4	0.214			
	5	0.218			
4	2	0.173	0.160	0.010	7
	3	0.159			
	4	0.163			
	6	0.144			
	7	0.159			
5	1	0.160	0.158	0.0067	4
	2	0.153			
	3	0.167			
	4	0.153			
Resultados generales			0.189	0.037	20

DE = desviación estándar.

CV = coeficiente de variación.

laboratorios 2 y 3, que se ubicaron por arriba de la CL₅₀ de la carta control integrada, (CL₅₀ intra-laboratorio 0.220 mg/L y CV de 7% a 10%) (Tabla 2; Fig. 1). La variabilidad observada entre estos dos grupos de valores fue también corroborada a través de la apli-

cación de la prueba de Dunnett-Tukey-Kramer, cuyos resultados mostraron una diferencia significativa en los valores de la CL₅₀ entre la mayoría de los laboratorios, con excepción de las parejas siguientes: laboratorio 4 con 1, 5 con 1, 3 con 2 y 5 con 4 (Fig. 2).

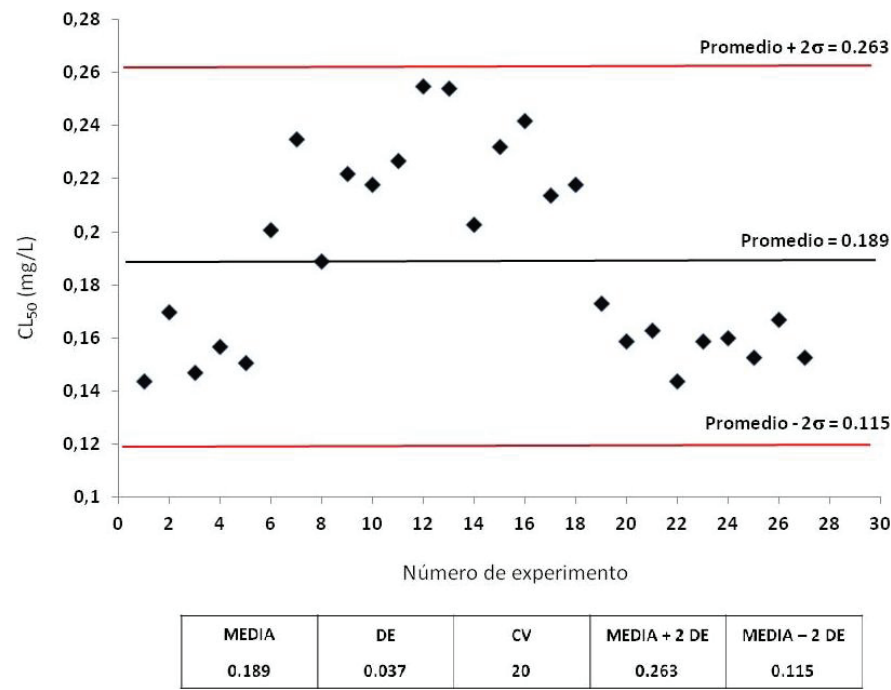


Figura 1. Carta control integrada para *Daphnia magna* con los resultados de los cinco laboratorios participante en el ejercicio de intercalibración. Los valores de CL₅₀ fueron calculados a partir de los datos de mortalidad a las 48 h, usando Cr⁺⁶ en agua dura como compuesto tóxico de referencia.

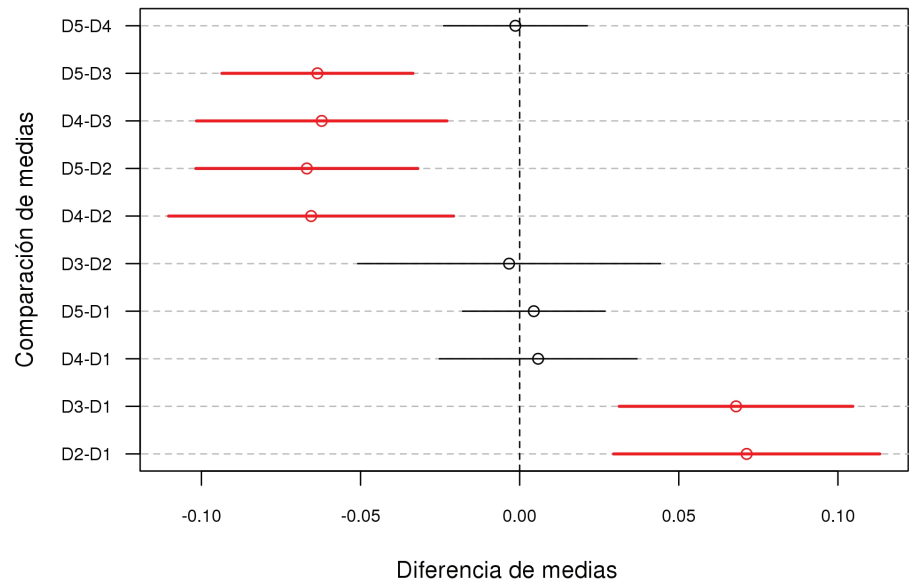


Figura 2. Comparación de medias de los valores de la CL₅₀ obtenidos por los cinco laboratorios participantes en el ejercicio de intercalibración para la prueba de *Daphnia magna*. D1 = laboratorio 1, D2 = laboratorio 2, D3= laboratorio 3, D4 = laboratorio 4 y D5 = laboratorio 5. Intervalo de confianza del 95%.

No obstante y a pesar de la variabilidad anterior, el CV obtenido entre todos los laboratorios fue aceptable y tendió a ser similar a los valores reportados por laboratorios miembros de la red *Water Tox*, como lo señalaron Ronco *et al.* (2000), Castillo y Schafer (2000) y Pica-Granados *et al.* (2000), quienes obtuvieron valores de CL_{50} para Cr^{+6} de 0.155 mg/L a 0.170 mg/L y CV de 10% a 17% (Ramírez-Romero *et al.*, 2006).

Con respecto a *P. subcapitata*, la CE_{50} para el Cu^{+2} fue de 0.018 mg/L a 0.045 mg/L, con una mayor variabilidad intralaboratorio que la obtenida para *D. magna* (CV de 8% a 16%). Al analizar la

tabla 3 se observaron dos grupos de valores: el primero formado por los datos de cuatro laboratorios, cuyas CE_{50} promedio fueron similares a la CE_{50} de la carta control integrada, con valores de 0.029 mg/L a 0.042 mg/L. Solo el laboratorio 5 presentó valores segregados de esta tendencia, con una CE_{50} promedio de 0.021 mg/L, menor a la CE_{50} de la carta control integrada, y con un CV de alrededor de 9%. La discrepancia del laboratorio 5 con respecto al resto de los laboratorios se confirmó también con la prueba de Dunnett-Tukey-Kramer, la cual mostró que solo se presentaron diferencias significativas para los valores de CE_{50} entre las parejas de laboratorios 5 con 1, 5 con 2 y 5 con 4 (Fig. 3).

Tabla 3. Resultados del análisis de toxicidad del Cu^{+2} (compuesto tóxico de referencia) con *Pseudokirchneriella subcapitata*, obtenidos en el ejercicio de intercalibración.

Laboratorio	Número de experimento	CE ₅₀ Cu ⁺² (mg/L)	Análisis Probit		
			Parámetros estadísticos		
			Promedio CE ₅₀	DE	CV (%)
1	1	0.036	0.036	0.006	16
	2	0.043			
	3	0.039			
	4	0.029			
2	1	0.04	0.042	0.003	8
	2	0.045			
	3	0.044			
	4	0.038			
3	1	0.036	0.029	0.004	15
	2	0.031			
	3	0.027			
	4	0.025			
	5	0.027			
4	1	0.030	0.033	0.003	9
	2	0.034			
	3	0.034			
	4	0.033			
	5	0.030			
	6	0.036			
	7	0.033			
	8	0.028			
5	1	0.022	0.021	0.002	9
	2	0.022			
	3	0.022			
	4	0.018			
	5	0.020			
Resultados generales			0.032	0.008	24

DE = desviación estándar.

CV = coeficiente de variación.

La variabilidad total de los datos proporcionados por los laboratorios se presentó en la carta integrada, la cual indica una CE_{50} promedio de 0.032 mg/L, con un CV interlaboratorio de 24% (Fig. 4), valor que es aceptable de acuerdo a los miembros de la red *Water Tox* (Forget *et al.*, 2000a).

Análisis de muestras ciegas. Los resultados de ambos lotes de muestras ciegas se emplearon para evaluar la evolución de la precisión de los análisis efectuados por los laboratorios participantes, así como la consistencia de sus datos respecto a las cartas control elaboradas para el Cr^{+6} y el Cu^{+2} .

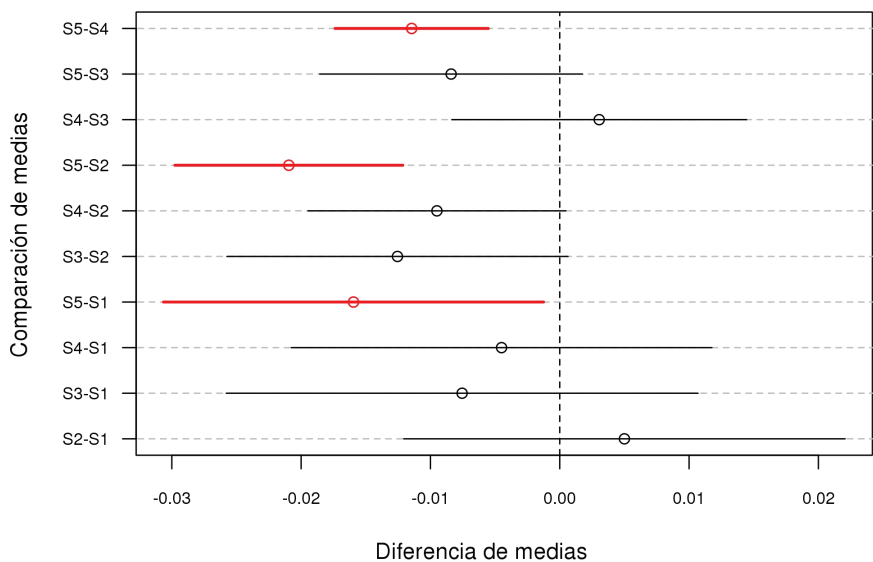


Figura 3. Comparación de medias de los valores de la CE_{50} obtenidos por los cinco laboratorios participantes en el ejercicio de intercalibración para la prueba de *Pseudokirchneriella subcapitata*. S1 = laboratorio 1, S2 = laboratorio 2, S3= laboratorio 3, S4 = laboratorio 4 y S5 = laboratorio 5. Intervalo de confianza del 95%.

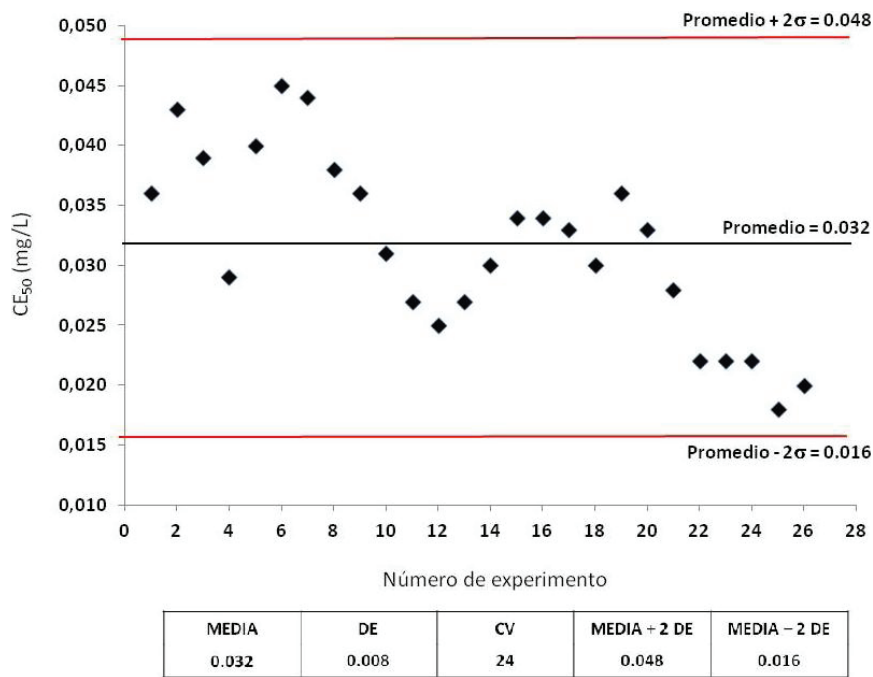


Figura 4. Carta control integrada para *Pseudokirchneriella subcapitata* con los resultados de los cinco laboratorios en el ejercicio de intercalibración. Los valores de CE_{50} fueron calculados a partir de los datos de inhibición de crecimiento a las 72 h, usando Cu^{+2} en medio mineral como compuesto tóxico de referencia.

En las tablas 4 y 5 se presentan los valores de la CL_{50} para *D. magna* y de la CE_{50} para *P. subcapitata*, respectivamente, obtenidas para las muestras ciegas analizadas. En la tabla 4 se puede observar que la muestra ciega 1, que contenía Cr^{+6} , presentó valores de CL_{50} de 0.171 mg/L a 0.250 mg/L, los cuales concordaron con los obtenidos para este mismo compuesto durante los ensayos para elaborar las cartas control de cada laboratorio (0.144 mg/L a 0.255 mg/L), así como con el valor de la carta control integrada (Fig. 1). Los resultados de los cinco laboratorios obtenidos para esta muestra 1, al contrastarse con los valores promedio de la CL_{50} de las cartas control (Tabla 2), presentaron un CV de solo 16%, indicando con ello la consistencia en los resultados de los análisis entre todos los laboratorios (Tabla 6).

En la tabla 5 se presentan los resultados para la muestra 5, que contenía Cu^{+2} . El rango de valores de la CE_{50} para los cinco laboratorios fue de 0.021 mg/L a 0.039 mg/L, el cual fue consistente con el obtenido para este mismo compuesto durante la construc-

ción de las cartas control para la prueba con *P. subcapitata* (0.021 mg/L a 0.042 mg/L) (Tabla 3), así como con el valor derivado de la carta integrada (Fig. 4). Para la muestra 5 se calculó la variabilidad intralaboratorio comparando el CV obtenido para esta muestra con respecto al CV obtenido para las cartas control respectiva de cada laboratorio. Esta comparación mostró C.V. menores o iguales a 10%. De manera similar, la variabilidad interlaboratorio para esta muestra también fue reducida, presentando un valor de 22% (Tabla 7).

Las muestras 2, 4 y 7 fueron réplicas para evaluar la reproducibilidad de los laboratorios. Si se consideran las CL_{50} obtenidas por los cinco laboratorios para *D. magna* en estas tres muestras, se observó que prácticamente todos los valores se encontraron en un intervalo de 0.009 mg/L a 0.047 mg/L, exceptuando el valor obtenido por el laboratorio 1 para la muestra 1 (Tabla 4). De manera similar, los valores para la CE_{50} con *P. subcapitata* se encontraron entre 0.011 mg/L y 0.060 mg/L, excluyendo

Tabla 4. Resultados de toxicidad (CL_{50}) con *Daphnia magna*, obtenidos del análisis de muestras ciegas.

Laboratorio	CL_{50} (mg/L) primer lote				Diferencia de la muestra 1 con respecto a la CL_{50} de la carta control integrada
	Muestra 1 Cr^{+6}	Muestra 2 Hg^{+2}	Muestra 3 Agua dura**	Muestra 4 Hg^{+2}	
1	0.190	0.100*	NT	0.047	Negativa
2	0.250	0.030	NT	0.032	Negativa
3	0.171	0.015	NT	0.019	Negativa
4	0.192	0.039	NT	0.033	Negativa
5	0.177	0.009	NT	0.013	Negativa
Promedio	0.196	0.023	—	0.029	
DE	0.031	0.014	—	0.013	
CV (%)	16	59	—	46	
Laboratorio	CL_{50} (mg/L) segundo lote				Significancia estadística entre réplicas (2, 4 y 7)
	Muestra 5 Cu^{+2}	Muestra 6 2,4-D	Muestra 7 Hg^{+2}	Muestra 8 isooctano en agua dura**	
1	0.017	NT	0.026	NT	Positiva 3/3
2	0.012	NT	0.029	NT	Negativa 3/3
3	0.016	NT	0.017	NT	Negativa 3/3
4	0.027	NT	0.045	NT	Negativa 3/3
5	0.026	NT	0.019	NT	Negativa 3/3
Promedio	0.020	—	0.027	—	
DE	0.007	—	0.011	—	
CV (%)	34	—	41	—	

*Valores excluidos de la estadística por presentar diferencias significativas que las denota como no reproducibles.

**La concentración está expresada en porcentaje.

NT= muestra no tóxica.

DE = desviación estándar.

CV = coeficiente de variación.

Tabla 5. Resultados de toxicidad (CE₅₀) con *Pseudokirchneriella subcapitata*, obtenidos del análisis de muestras ciegas.

Laboratorio	CE ₅₀ (mg/L) primer lote				Diferencia de la muestra 5 con respecto a la CE ₅₀ de la carta control integrada
	Muestra 1 Cr ⁺⁶	Muestra 2 Hg ⁺²	Muestra 3 Agua dura**	Muestra 4 Hg ⁺²	
1	0.190*	0.018	NT	0.039	Negativa
2	NT	0.016	NT	0.018	Negativa
3	NT	0.060	NT	0.011	Negativa
4	NT	0.059	NT	0.042	Negativa
5	NT	0.022	NT	0.055	Negativa
Promedio	—	0.035	—	0.033	
DE	—	0.022	—	0.018	
CV (%)	—	64	—	55	

Laboratorio	CE ₅₀ (mg/L) segundo lote				Significancia estadística entre réplicas (2, 4 y 7)
	Muestra 5 Cu ⁺²	Muestra 6 2,4-D	Muestra 7 Hg ⁺²	Muestra 8 isooctano en agua dura**	
1	0.039	0.52*	0.200*	NT	Positiva 3/3
2	0.036	NT	0.032	NT	Positiva 1/3
3	0.031	NT	0.016	NT	Positiva 1/3
4	0.030	NT	0.048	NT	Negativa 3/3
5	0.021	NT	0.012	NT	Positiva 3/3
Promedio	0.031	—	0.027	—	
DE	0.007	—	0.016	—	
CV (%)	22	—	61	—	

*Valores excluidos de la estadística por presentar diferencias significativas que las denota como no reproducibles

**La concentración está expresada en porcentaje.

NT= muestra no tóxica.

DE = desviación estándar.

CV = coeficiente de variación.

el valor de la muestra 7 reportado también por el laboratorio 1 (Tabla 5).

En relación con la variabilidad interlaboratorio, para la prueba con *D. magna* el análisis de las muestras replicadas mostró CV reducidos (< 15%) para los laboratorios 2, 3 y 4, y mayores para los laboratorios 1 y 5 (CV de 41% y 37%, respectivamente) lo cual amplía en consecuencia la variabilidad interlaboratorio hasta el 45% (Tabla 6).

Para la prueba con *P. subcapitata*, sólo el laboratorio 4 obtuvo un CV de 17% para la muestras replicadas, mientras que el resto de los laboratorios presentaron CV mayores al 40%. De esta forma la variabilidad interlaboratorio para esta prueba se incrementó a 57% para las muestras 2, 4 y 7 (Tabla 7).

Las muestras 3 y 8 se emplearon como controles negativos, por lo tanto para ellas se esperaba obtener respuestas no tóxicas. Los resultados observados para las pruebas con *D. magna* y *P.*

subcapitata (Tablas 4 y 5) corroboraron este pronóstico para los cinco laboratorios.

La muestra 6 contenía 2,4-D, un plaguicida de limitada solubilidad en agua con un coeficiente de partición *n*-octanol-agua (K_{ow}) de 2.81 (USEPA, 2012), el cual se integró como muestra ciega con la finalidad de probar el desempeño de un compuesto de esta naturaleza, mediado por un disolvente (isooctano) en una concentración no tóxica (<1%) para los organismos de prueba. Los resultados para las dos pruebas desarrolladas mostraron en general la ausencia de efectos tóxicos, con la excepción de los datos obtenidos para *P. subcapitata* por el laboratorio 1, el cual detectó una CE₅₀ de 0.52 mg/L.

DISCUSIÓN

Cuando se vinculó la información de la precisión de las cartas control con los resultados del análisis de las muestras ciegas, se

Tabla 6. Coeficientes de variación de los resultados obtenidos con *Daphnia magna* para el análisis de las muestras ciegas.

Laboratorio	Coeficiente de variación				
	Muestra 1 Cr ⁺⁶		Muestras 2, 4 y 7 Hg ⁺²		Muestra 5 Cu ^{+2*}
	Intra. Lab**	Inter. lab	Intra. lab	Inter. lab	Inter. lab
1	15	16	41	45	34
2	7		5		
3	18		12		
4	13		15		
5	8		37		

*Para esta muestra no hay cálculo Intra. lab., ya que solo se analizó una sola vez.

**Se refiere la diferencia entre la CL₅₀ de la muestra ciega y la que corresponde al valor promedio de la CL₅₀ del compuesto tóxico de referencia (Cr⁺⁶), de la carta control de cada laboratorio.

Tabla 7. Coeficientes de variación de los resultados obtenidos con *Pseudokirchneriella subcapitata* para el análisis de las muestras ciegas.

Laboratorio	Coeficiente de variación				
	Muestra 1 Cr ^{+6*}		Muestras 2, 4 y 7 Hg ⁺²		Muestra 5 Cu ⁺²
	Inter. lab	Intra. lab	Inter. lab	Intra. lab	Inter. lab
1	NC	52	57	4.20	22
2		40		10	
3		93		4.22	
4		17		5.11	
5		76		0.00	

*Para esta muestra no hay cálculo intra. Lab., ya que solo se analizó una sola vez.

**Se refiere a la diferencia entre la CE₅₀ de la muestra ciega y la que corresponde al valor promedio de la CE₅₀ del compuesto tóxico de referencia (Cu⁺²), de la carta control de cada laboratorio.

NC = no calculable debido a que la muestra no fue tóxica en las concentraciones empleadas.

observó que la variabilidad intralaboratorio fue menor a la interlaboratorios en todos los casos. Esto indica que, a pesar de que los resultados variaron en términos generales, la respuesta obtenida de forma interna por cada laboratorio logró ser altamente consistente. Con excepción de algunos valores obtenidos por el laboratorio 1, el cual mostró, en cuatro muestras de los 16 ensayos totales realizados con las dos especies de prueba, CL₅₀ o CE₅₀ mayores a las del resto de los laboratorios y a los obtenidos por sí mismo en su carta control (Tablas 4-5). Los resultados con este laboratorio indican básicamente problemas con el manejo de las muestras ciegas, los cuales parecen asociarse a pérdidas del compuesto tóxico durante la preparación de las soluciones de prueba y de sus diluciones, ya que en algunos casos se obtuvo una menor toxicidad de la esperada; o bien a una inadecuada homogenización de las soluciones de prueba, ya que en otros casos las muestras presentaron una respuesta tóxica cuando no deberían haber mostrado ninguna toxicidad. Por ello se piensa que un seguimiento más cuidadoso de las indicaciones proporcionadas para el manejo de las soluciones de prueba podría reducir significativamente estos problemas.

A pesar de las desviaciones observadas con el laboratorio 1, la consistencia general de los datos obtenidos en este ejercicio, sobre todo para la construcción de las cartas control, indicó que los laboratorios participantes lograron resultados reproducibles en corto tiempo y un avance significativo de su capacidad en el desempeño en estos protocolos. Asimismo, demostró que estos métodos son fácilmente transferibles, especialmente el de *D. magna* y en menor medida el de *P. subcapitata*. En el caso de esta última, el protocolo tiene una mayor complejidad y requiere del control de un mayor número de pasos metodológicos para lograr precisión y exactitud en los resultados, los cuales pueden ser controlados en la medida en que el analista adquiera mayor pericia en el manejo de los volúmenes de prueba y de inóculo, así como en el conteo celular. El procedimiento para esta especie demanda un mayor periodo de práctica en el manejo del hemocitómetro Neubauer y del microscopio óptico, así como de la calibración y verificación de las micropipetas automáticas. En el caso de la prueba con *D. magna* tales problemas no se presentan. El manejo de volúmenes no requiere de una precisión del mismo orden y no es necesario adicionar un inóculo, sino un número definido de

organismo que es fácilmente cuantificable a simple vista, tanto al inicio como al término del ensayo. Esta situación permite prever que, en la medida en que los laboratorios desarrollen mayor experiencia y capacidad de análisis, la variabilidad interlaboratorio se verá reducida significativamente.

Asimismo, la menor reproducibilidad de la prueba con *P. subcapitata* pudo estar relacionada con el manejo del cultivo en cada laboratorio, lo cual se reflejó en la condición del alga al iniciar las pruebas. Dicho cultivo requiere de un control más estricto que el caso de *D. magna*. Para ello, debe cuidarse con especial atención la edad del cultivo, la frecuencia de renovación, la concentración inicial del inóculo, la preparación de los medios de cultivo y la vigencia de los reactivos.

La variabilidad observada en los resultados pudo estar asociada a diferentes problemas durante el desarrollo de este ejercicio de intercalibración. Los principales problemas se relacionaron con el establecimiento y mantenimiento de los organismos de prueba. A este respecto, para algunos laboratorios fue evidente la dificultad de lograr la proliferación adecuada del cultivo de *D. magna*. Este obstáculo estuvo asociado principalmente al suministro deficiente de alimento y al mantenimiento inadecuado de las condiciones ambientales. Una vez ajustadas todas las condiciones ambientales, dichos laboratorios lograron mejorar el estado de los cultivos y así continuar con las actividades subsecuentes.

Varias circunstancias resultaron claves para alcanzar el buen desempeño de los laboratorios. Algunas de estas se contemplaron desde el diseño del ejercicio de intercalibración y otras se dieron a lo largo de su desarrollo. Entre las situaciones previstas se puede mencionar la eficacia del taller de transferencia, cuyas sesiones prácticas permitieron a los participantes conocer a detalle el “conocimiento fundamental” o “*know-how*” y experimentar personalmente todos los detalles del procedimiento que se requerían para desarrollar los ensayos. Otro elemento clave fue el material proporcionado a los laboratorios. Este material permitió al personal contar en todo momento con una guía para aclarar dudas y recordar algunos aspectos metodológicos importantes. Asimismo, permitió uniformizar los materiales empleados y los procedimientos de registro y análisis de resultados, de tal manera que se agilizó y facilitó la comparación de los datos de todos los laboratorios y se redujo al máximo la variabilidad que podría haberse presentado por el uso de materiales distintos.

La comunicación oportuna y clara (vía telefónica o por la Internet) entre los laboratorios y los coordinadores, así como entre los propios laboratorios, también fue un elemento crucial. Con ella fue posible circular información, brindar asesoría, aclarar dudas, compartir experiencias y resolver problemas técnicos, puntos críticos para una buena supervisión y operación del ejercicio.

El reconocimiento de los elementos críticos antes mencionados fue importante para retomar sus aspectos positivos y evi-

tar limitantes en futuros ejercicios de intercalibración de pruebas biológicas que se desarrollen en México. Asimismo, es relevante dar a conocer esta experiencia a otros laboratorios que se inician en la aplicación de estas pruebas o que busquen mejorar su desempeño, ya que con ello podrían identificar aspectos clave que permitieran mejorar los procedimientos que llevan a cabo.

Los coeficientes de variación obtenidos en este trabajo se encontraron dentro del rango de variación que es propio de esta clase de ejercicios de intercalibración (Lewis *et al.*, 1994; De Graeve *et al.*, 1990), tal como lo muestran los valores presentados por Forget *et al.* (2000a) para los resultados de la intercalibración de la red *Water Tox*. Estos autores señalan que para el Hg^{+2} los CV interlaboratorio e intralaboratorios alcanzaron valores de 64% y 18%, respectivamente, que son similares a los obtenidos por los laboratorios participantes en la presente investigación (Tablas 6-7). Por otro lado, la USEPA (1991) señala que en ejercicios de intercalibración de pruebas biológicas se considera aceptable que el CV interlaboratorios sea de dos a tres veces mayor que el intralaboratorio. Este hecho confirmó el buen desempeño alcanzado por los laboratorios participantes y la bondad de las pruebas de *D. magna* y *P. subcapitata* como ensayos fáciles de manejar, aún con personal poco experimentado.

La precisión interna en los resultados de los análisis de cada laboratorio apoyó la idea de que estos bioensayos pueden ser aplicables en programas de monitoreo ambiental y en estudios de la evolución y diagnóstico de calidad del agua de cuerpos de agua, de descargas residuales y de control de sustancias tóxicas de disposición en el ambiente, en países en desarrollo, como México, los cuales en muchos casos cuentan con pocos laboratorios con experiencia en el desarrollo de pruebas biológicas y con pocos recursos humanos entrenados, por lo que se ven obligados a implementar estos programas con personal que se involucra por primera vez en la realización de este tipo de pruebas.

Asimismo, estos resultados demuestran que es posible capacitar, en corto tiempo y con un mínimo de sesiones y asesorías, a los laboratorios que sean necesarios para el desarrollo de estas pruebas, y así poder atender la demanda nacional de análisis que se generaría si estas pruebas fueran solicitadas como obligatorias para el control ambiental en general y de descargas residuales en particular, ya que hasta ahora en México este control se efectúa principalmente con base en parámetros fisicoquímicos y eventualmente de metales pesados, excluyendo la detección de los contaminantes de naturaleza orgánica que constituyen todo un universo de sustancias nocivas para los ecosistemas y para la salud humana. Estos contaminantes tóxicos con frecuencia están presentes en las mezclas de descarga y pasan inadvertidos a la regulación mexicana, ya que los criterios y las normas para su control son insuficientes para proteger el ambiente, aun cuando los responsables de generar estos contaminantes cumplan con ellos a cabalidad. Por tal motivo, es sumamente importante impul-

sar el uso generalizado de pruebas biológicas para la evaluación de la toxicidad y su incorporación en el marco regulatorio para la protección del ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Homero Hernández Salgado y Gissel Trujillo Domínguez del IMTA por el apoyo para la capacitación de los grupos participantes, así como a Cecilia Vanegas, Isabel Romero Terán, Sonia González Rebollar, Sonia Rangel Villafranco, Juan Cayetano Cid Núñez, Susana Alejandre y Luz Elvira Piña Chacón su valiosa participación en el desarrollo de los ensayos toxicológicos. Asimismo, agradecemos el financiamiento proporcionado por el Instituto Nacional de Ecología para el desarrollo de este estudio.

REFERENCIAS

- APHA (American Public Health Association). 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18th edition. Washington, DC, USA. pp. 8-20-8-23.
- APHA (American Public Health Association). 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th edition. Washington, DC, USA. 1369 p.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). 1992. *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians*. Designation E 729-88a. Annual Book of ASTM Standards. Vol. 11.04: 403-422.
- Castillo, G. (Ed.). 2004. *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua & International Development Research Center. México. 188 p.
- Castillo, G. C. & L. Schafer. 2000. Evaluation of a bioassay battery for water toxicity testing: A Chilean experience. *Environmental Toxicology* 15 (4): 331-337.
- Davis, J. 1977. Standardization and protocols of bioassays, their role and significance for monitoring, research and regulatory usage. *Aquatic Toxicity Workshop*. Halifax, Nova Scotia, Canada. pp.1-14.
- De Graeve, G. M., J. D. Cooney, B. H. Marsh, T. L. Pollock & N. G. Reichenbach. 1990. Precision of EPA Seven-day *Ceriodaphnia dubia* survival and reproduction test, Intra- and interlaboratory study. *NCASI Technical Bulletin* 588: 6.1-6.5.
- Deken, A. 2005. Seeing Red: *Daphnia* and Hemoglobin. A Middle School Curriculum Unit Modeling Ecological Interactions and the Significance of Adaptations. Ste. Genevieve du Bois School, Warson Woods, Missouri, USA. 15 p.
- Díaz-Báez, C. & Y. Pica-Granados. 2004. Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*. In: Castillo, G.C. (Ed.). *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua & International Development Research Center. México. pp. 52-63.
- Díaz-Báez, C., Y. Pica-Granados & M. C. Sobrero. 2006. Aseguramiento y control de bioensayos, In: Mendoza-Cantú, A. & P. Ramírez-Romero (Compiladoras). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. pp. 347-360.
- Doudoroff, P., B. G. Anderson, G. E. Burdick, P. S. Galtsoff, W. G. Hart, R. Patrick, E. K. Strong, E. W. Surber & W. M. Van Horn. 1951. Bioassays methods for the evaluation of acute toxicity of industrial wastes to fish. *Sewage and Industrial Wastes* 23 (11): 1380-1397.
- Dunnett, C. W. 1980. Pairwise Multiple Comparisons in the Unequal Variance Case. *Journal of the American Statistical Association* 75 (372): 796-800.
- Federal Register. 1985. *Toxic Substances Control Act*. Test Guidelines, Final Rules 50 (23): 39252-39516.
- Forget, G., P. Gagnon, W. A. Sánchez & B. Dutka. 2000a. Overview of methods and results of the eight country International Development Research Centre (IDRC) Water Tox project. *Environmental Toxicology* 15 (4): 264-276.
- Forget, G., A. Sánchez-Bain, V. Arkhipchuk, T. Beaurregard, C. Blaise, G. Castillo, L. E. Castillo, M. C. Díaz-Báez, Y. Pica-Granados, A. Ronco, R. C. Sirvastava & B. J. Dutka. 2000b. Preliminary data of a single-blind Multicountry trial of six bioassays for water toxicity monitoring. *Environmental Toxicology* 15 (4): 362-369.
- Hernández-Salgado, H. 2008. Construcción de una cámara de iluminación casera para el ensayo de toxicidad con el alga *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*). In: Ramírez-Romero, P. & A. Mendoza-Cantú (Compiladoras). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. pp. 395-399.
- Ramírez-Romero, P., A. Mendoza-Cantú & Y. Pica-Granados. 2006. *Pruebas Biológicas para la Evaluación de Sustancias Químicas*. Segunda etapa de laboratorio. Informe final. Instituto Nacional de Ecología, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa & Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México. 137 p.
- Larsen, K. 2002. CALFED Funded Algae Toxicity. Study Update. Sacramento River Watershed Program. *Waterways* 5: 3, available online at: http://www.sacriver.org/news/waterways/2002_01.pdf (downloaded May 2011).
- Lau, M. K. 2011. Dunnett-Tukey-Kramer Pairwise Multiple Comparison Test Adjusted for Unequal Variances and Unequal Sample Sizes, Publication 2012-10-29, R-package.
- Lewis, P. A., D. J. Klemm, J. M. Lazorchak, T. J. Norberg-King, W. H. Peltier & M. A. Heber (Eds.). 1994. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater*

- organisms. EPA/600/4-91/002. United States Environmental Protection Agency. USA. 315 p.
- Martínez-Jerónimo, F., F. Espinosa-Chávez & R. Villaseñor-Córdova. 2000. Effect of culture volume and adult density on the neonate production of *Daphnia magna*, as test organisms for aquatic toxicity tests. *Environmental Toxicology* 15 (3): 155-159.
- Moore, J. A. 1987. Environmental effects: rhetoric versus reason. *Environmental Toxicology and Chemistry* 6(10): 727-729.
- Mount, D. I. & T. J. Norberg. 1984. A seven-day life-cycle cladoceran toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 3 (3): 425-434.
- OECD (Organization for Economical Cooperation and Development). 2002. *Freshwater Alga and Cyanobacteria Growth Inhibition Test*. Guideline for the Testing of Chemicals. Proposal for updating guideline 201. Draft Document.
- Pica-Granados, Y., G. D. Trujillo & H. S. Hernández. 2000. Bioassay standardization for water quality monitoring in Mexico. *Environmental Toxicology* 15 (4): 322-330.
- Pica-Granados, Y., A. Ronco & M. C. Díaz-Báez. 2008. Ensayo de toxicidad crónica con el alga *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*) por el método de enumeración celular basado en el uso de hemocitómetro Neubauer. In: Ramírez-Romero, P. & A. Mendoza-Cantú (Compiladoras.). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. 69-87.
- Ramírez-Romero, P. & A. Mendoza-Cantú. 2008. Introducción. In: Ramírez-Romero, P. & A. Mendoza-Cantú (Compiladoras.). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. pp. 5-13.
- Ronco A., C. Sobrero, V. Grassi, L. Kaminski, I. Massolo & L. Mina. 2000. Water Tox bioassay intercalibration network: Results from Argentina. *Environmental Toxicology* 15 (4): 287-296.
- Sarma S. S. S. & S. Nandini. 2006. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 41(8): 1417-1430.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1985. *Standard Evaluation Procedure: Acute Toxicity Test for Freshwater Invertebrates*. Hazard Evaluation Division. EPA-540/9-85-005. USA
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1986. *Standard Evaluation Procedure: Daphnia magna Life-Cycle (21 days Renewal) Chronic Toxicity Tests*. EPA-540/9-86-141. Hazard Evaluation Division. USA. 8 p.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1991. Technical Support Document For Water Quality-based Toxics Control. Washington D.C. EPA/505/2-90-001. pp. 335.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 2012. Technical Factsheet on: 2, 4-D. Office of Ground Water and Drinking Water. Available online at: <http://www.epa.gov/ogwdw/pdfs/factsheets/soc/tech/24-d.pdf> (downloaded May 2012).
- Whitford, F., D. Urban, M. Mayes & J. Wolt. 2003. *Pesticides and Ecological Risk Assessment. History, Science and Process*. Purdue Pesticide Program. Purdue University Cooperative Extension Service. pp 41. Available online at: <http://www.btny.purdue.edu/Pubs/PPP/PPP-41/PPP41.html> (downloaded May 2011).

Recibido: 6 de junio de 2011.

Aceptado: 4 de febrero de 2013.