

## PARTE C: MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ECOTOXICIDAD

### INTRODUCCIÓN GENERAL: PARTE C

Los métodos de ensayo descritos a continuación se destinan a la determinación de algunas de las propiedades ecotoxicológicas mencionadas en el Anexo VIII de la Directiva 79/831/CEE. Los notificantes deberán tener en cuenta que en el texto no se han incluido métodos para la determinación de las siguientes propiedades establecidas en el nivel 1 del Anexo VIII:

- estudio de toxicidad prolongada con *Daphnia magna*
- prueba sobre una planta superior
- estudio de toxicidad prolongada con un pez

Cuando se aprueben definitivamente métodos de ensayo adecuados para la determinación de estas propiedades, se publicarán en forma de otra adaptación al progreso técnico. Mientras tanto, los notificantes deberán utilizar métodos reconocidos internacionalmente que serán señalados por las autoridades competentes.

## C. 8

### TOXICIDAD PARA GUSANOS DE TIERRA

#### ENSAYO CON SUELO ARTIFICIAL

#### 1. MÉTODO

##### 1.1. Introducción

En este ensayo de laboratorio, la sustancia con la que se va a experimentar se añade a un suelo artificial en el que se colocan gusanos durante 14 días. Después de este período (que, opcionalmente, puede ser de siete días) se examina el efecto letal de la sustancia sobre los gusanos. Este ensayo provee un método que permite investigar, a relativamente corto plazo, los efectos causados por sustancias químicas sobre los gusanos, por absorción oral o cutánea.

##### 1.2. Definición y unidades

CL<sub>50</sub>: Concentración de una sustancia que se considera la causante de la muerte del 50% de los animales investigados durante el período de ensayo.

##### 1.3. Sustancia de referencia

Se utiliza periódicamente una sustancia de referencia como medio para demostrar que la sensibilidad del sistema de ensayo no ha cambiado de manera significativa.

Se recomienda que esta sustancia sea la cloroacetamida de grado analítico.

##### 1.4. Principio del ensayo

Por ser el suelo un medio variable, para este ensayo se utiliza marga artificial definida cuidadosamente. Los gusanos adultos de la especie *Eisenia foetida* (véase la nota del Anexo) se mantienen en una tierra artificial que se trata con diferentes concentraciones de la sustancia de ensayo. El contenido de los recipientes se extiende sobre una bandeja a los 14 días (opcionalmente, pueden ser siete) del comienzo del ensayo y se cuentan los gusanos supervivientes para cada concentración.

##### 1.5. Criterios de calidad

El ensayo se proyecta de forma que sea lo más reproducible posible con respecto al sustrato y al organismo de ensayo. La mortalidad en los controles no debe exceder del 10% al final del ensayo, o de lo contrario éste no es válido.

##### 1.6. Descripción del método de ensayo

###### 1.6.1. Materiales

###### 1.6.1.1. Sustrato de ensayo

Como sustrato básico de ensayo usa un suelo artificial definido.

a) Sustrato básico (los porcentajes se expresan en términos de peso en seco:

- 10% de turba esfúgnea (con un pH lo más cercano posible a 5,5-6,0, sin restos visibles de plantas y finamente molida).
- 20% de arcilla de caolinita, preferiblemente con más de un 50% de caolinita
- Alrededor del 69% de arena de cuarzo industrial (predominando la arena fina, en la que más del 50% de sus partículas sean de un tamaño de 0,05 a 0,2 mm). Si la sustancia no es lo suficientemente dispersable en agua, se deberán mantener disponibles 10 g por cada recipiente de ensayo para mezclarlos con la sustancia de ensayo más adelante.
- Alrededor de un 1% de carbonato cálcico (CO<sub>3</sub>Ca), pulverizado y químicamente puro, que se añade con el fin de que el valor del pH sea de 6,0 ± 0,5.

b) Sustrato de ensayo:

El sustrato de ensayo contiene el sustrato básico, la sustancia de ensayo y agua desionizada.

El contenido de agua oscila entre el 25 y el 42% del peso en seco del sustrato básico. El contenido de agua de un sustrato se determina secando una muestra a una temperatura de 105°C, hasta alcanzar un peso constante. El criterio clave consiste en humedecer la tierra artificial hasta un punto en que no quede agua estancada. Se debe tener cuidado al hacer la mezcla, de manera que se obtenga una distribución uniforme de la sustancia de ensayo y del sustrato. Deberá registrarse la manera en que se introduce la sustancia de ensayo en el sustrato.

c) Sustrato de control:

El sustrato de control contiene el sustrato básico y agua. Si se usa un agente aditivo, el sustrato de control adicional debe contener la misma cantidad de agente aditivo.

1.6.1.2. **Recipientes de ensayo**

Se utilizan recipientes de cristal (cubiertos adecuadamente con membranas, tapaderas o película de plástico con agujeros de ventilación) aproximadamente de un litro de capacidad y llenos de una cantidad de sustrato de ensayo húmedo o de control que sea equivalente a un peso en seco de 500 g de sustrato.

1.6.2. **Condiciones del ensayo**

Los recipientes se deberán mantener en cámaras climatizadas, a una temperatura de 20 (± 2)° C, con luz continua. La intensidad de la luz será de 400 a 800 lux.

El período de ensayo dura 14 días, aunque, opcionalmente, se puede evaluar la mortalidad a los siete días del comienzo del ensayo.

1.6.3. **Procedimiento de ensayo**

**Concentraciones del ensayo**

Las concentraciones de la sustancia de ensayo se expresan en peso de sustancia por peso en seco de sustrato básico (mg/kg).

**Ensayo para determinar la gama de concentraciones**

Por medio de este ensayo se determina la gama de concentraciones que ocasiona porcentajes de mortalidad de cero a 100; con esta información se establece la gama de concentraciones que se vaya a utilizar en el ensayo definitivo.

La sustancia se estudiará a las siguientes concentraciones: 1 000, 100, 10, 1, 0,1 mg de sustancia / kg de sustrato de ensayo (peso en seco).

Cuando vaya a realizarse un ensayo definitivo, bastará con un lote de ensayo para cada concentración y otro para el sustrato de control sin tratar, cada uno de ellos con diez gusanos, para llevar a cabo el ensayo de determinación de la gama de concentraciones.

**Ensayo definitivo**

Los resultados del ensayo para determinar la gama de concentraciones se usan para elegir cinco concentraciones como mínimo, en serie geométrica, que abarquen la gama de mortalidad del cero al 100% y que difieran entre sí en un factor constante que no exceda de 1,8.

En los ensayos en que se utilice esta serie de concentraciones se estimará el valor de CL<sub>50</sub> y de sus límites de confianza de la manera más precisa posible.

En el ensayo definitivo se utilizan, como mínimo, cuatro lotes de ensayo por concentración y cuatro sustratos de control sin tratar, cada uno de ellos con diez gusanos. Los resultados de estos lotes reproducidos son la media y la desviación típica.

Cuando de dos concentraciones consecutivas, en una proporción de 1,8, sólo se obtienen los porcentajes de mortalidad de 0% y 100%, estos dos valores son suficientes para indicar la gama en la que se encuentra el valor de CL<sub>50</sub>.

**Mezcla del sustrato de ensayo básico y de la sustancia de ensayo**

Siempre que sea posible, el sustrato de ensayo no deberá estar compuesto de ningún otro agente adicional que no sea agua. Inmediatamente antes del comienzo del ensayo, se mezcla una emulsión o dispersión de la sustancia de ensayo en agua desionizada disolvente con el sustrato de ensayo básico, o se rocía dicha emulsión sobre éste de manera uniforme con un rociador cromatográfico fino o con un aparato similar.

Si la sustancia de ensayo no es soluble en agua, puede disolverse en el mínimo volumen posible de un disolvente orgánico apropiado (por ejemplo, hexano, acetona o cloroformo).

Para solubilizar, dispersar o emulsionar la sustancia de ensayo sólo pueden utilizarse los agentes que se volatilizan rápidamente. El sustrato de ensayo debe ser ventilado antes de usarlo. Se repondrá la cantidad de agua evaporada. El sustrato de control deberá contener la misma cantidad de agente aditivo. Si la sustancia de ensayo no fuese soluble, dispersable o emulsionable en disolventes orgánicos, se mezclarán 10 g de una mezcla de arena de cuarzo finamente molido y la cantidad necesaria de sustancia de ensayo para tratar 500 g (peso en seco) de suelo artificial, con 490 g (peso en seco) de sustrato de ensayo.

Por cada lote de ensayo, se coloca en cada recipiente de cristal una cantidad de sustrato de ensayo húmedo equivalente a 500 g de peso en seco, y en la superficie del mismo se colocan diez gusanos, que han sido acondicionados durante 24 horas en un sustrato básico húmedo similar y a los que, después de lavarlos rápidamente, se les ha extraído el exceso de agua con papel de filtro antes de usarlos.

Los recipientes se cubren con tapas de plástico perforado, platos o película para evitar el secado del sustrato, y se guardan bajo las condiciones de ensayo durante 14 días.

Se evaluarán los resultados después de 14 días (u opcionalmente, después de siete días) del comienzo del ensayo. El sustrato se extiende en una placa de vidrio o de acero inoxidable. Se examinan los gusanos y se determina el número de supervivientes. Los gusanos se consideran muertos si no responden a un suave estímulo mecánico en la parte frontal de su cuerpo.

Cuando el examen se efectúa a los siete días, el recipiente se vuelve a llenar con el sustrato y los gusanos supervivientes se colocan otra vez en la superficie del mismo.

1.6.4. **Organismos de ensayo**

Los organismos de ensayo deberán ser adultos de la especie *Eisenia foetida* (véase la nota en el Anexo) (como mínimo con dos meses de edad y con clíelo) y de un peso húmedo de 300 a 600 mg (véase el Anexo para el método de reproducción).

2. **DATOS**

2.1. **Tratamiento y evaluación de los resultados**

Las concentraciones de la sustancia ensayada se registran con referencia a los porcentajes correspondientes de gusanos de tierra muertos.

Cuando los datos son adecuados, el valor de  $CL_{50}$  y los límites de fiabilidad ( $p = 0,05$ ) se determinan por medio de métodos estándar (como el de Litchfield y Wilcoxon, 1949, o un método equivalente). El valor de  $CL_{50}$  debe ser expresado en mg de sustancia de ensayo por kg de sustrato de ensayo (peso en seco).

En los casos en que la pendiente de la curva de concentración es tan pronunciada que no puede calcularse el valor de  $CL_{50}$ , se considera suficiente una estimación gráfica de este valor.

Cuando de dos concentraciones consecutivas en una proporción de 1,8 sólo se obtienen porcentajes de mortalidad de 0% y 100%, estos dos valores son suficientes para indicar la gama en la que se encuentra el valor de  $CL_{50}$ .

3. **INFORMES**

3.1. **Informe del ensayo**

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- declaración en la que conste que el ensayo se ha efectuado de conformidad con los criterios de calidad mencionados anteriormente
- tipo de ensayo efectuado (ensayo de determinación de la gama de concentraciones y/o ensayo definitivo)
- descripción exacta de las condiciones del ensayo o declaración en la que conste que el ensayo se ha efectuado de conformidad con el método; se informará de cualesquiera diferencias con respecto a dicho método
- descripción exacta de la manera en que se ha mezclado la sustancia de ensayo con el sustrato de ensayo básico
- información acerca de los organismos de ensayo (especie, edad, peso medio y gama de variación, condiciones relativas a reproducción y cría, abastecedor)
- método usado en la determinación del valor de  $CL_{50}$
- resultados del ensayo, incluidos todos los datos utilizados
- descripción de los síntomas o de los cambios en el comportamiento de los organismos de ensayo que se hayan observado
- mortalidad en los sustratos de control
- valor de  $CL_{50}$  o la máxima concentración con mortalidad y la mínima con una mortalidad del 100%, después de 14 días (y opcionalmente después de siete días) del comienzo del ensayo
- trazado de la curva de concentración — respuesta
- resultados obtenidos con la sustancia de referencia, ya sea en relación con el ensayo actual o con ejercicios previos de control de calidad.

4. **REFERENCIAS**

- (1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 207*. Decisión del Consejo C(81) 30 final.
- (2) Edwards, D. A. and Lofty, J. R., 1977. *Biology of Earthworms*. London: Chapman and Hall, 331 pp.
- (3) Bouche, M. B. 1972. *Lombriciens de France, Ecologie et Systematique*. Publ. Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.
- (4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.*, 96, 99-113.
- (5) CEE 1983. *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*. Report EUR 8714 EN.
- (6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, *Verfahrensvorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden»*, in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

#### Anexo

##### Reproducción y cría de los gusanos con anterioridad al ensayo

A fines de reproducción, se colocan en una caja de cría con sustrato fresco de 30 a 50 gusanos adultos, y se sacan después de 14 días. Estos animales se pueden utilizar para lotes de reproducción adicionales. Los gusanos nacidos de los capullos se utilizan en los ensayos una vez que han alcanzado la madurez (según las condiciones prescritas, después de dos a tres meses).

##### Condiciones de reproducción y cría

Cámara climatizada: a una temperatura de  $20 (\pm 2)^{\circ} \text{C}$ , preferiblemente con luz continua (intensidad de 400 a 800 lux).

Cajas de reproducción: recipientes poco profundos apropiados, con un volumen de 10 a 20 litros.

Sustrato: *Eisenia foetida*: Se puede criar en los excrementos de varios animales. Como medio de crianza se recomienda utilizar una mezcla con un 50% en volumen de turba y el otro 50% de excrementos de vaca o caballo. Este medio debe tener un valor aproximado de pH entre 6 y 7 (regulado con carbonato cálcico) y una conductividad iónica baja (menos de 6 mmhos o una concentración de sal del 0,5%).

El sustrato debe estar húmedo, pero no demasiado mojado.

Además del método expuesto anteriormente, se pueden utilizar otros procedimientos con éxito.

*Nota*: Existen dos razas de *Eisenia foetida*, que algunos taxonomistas han subdividido en especies (Bouche, 1972). Estas dos razas son morfológicamente similares, aunque una de ellas, la *Eisenia foetida foetida*, exhibe rayas o bandas transversales típicas en los segmentos, mientras que a la otra, la *Eisenia foetida andrei*, de color rojizo jaspeado, le faltan. Siempre que sea posible se utilizará la *Eisenia foetida andrei*. Se pueden utilizar otras especies, siempre que se disponga de la metodología necesaria.

## C. 9

### BIODEGRADACIÓN

#### PRUEBA ZAHN — WELLENS

#### 1. MÉTODO

##### 1.1. Introducción

El objeto de este método es la evaluación de la máxima degradación potencial de sustancias orgánicas solubles en agua y no volátiles, cuando se encuentran expuestas a concentraciones relativamente elevadas de microorganismos en un ensayo estático.

Puede producirse una absorción físico-química sobre los sólidos en suspensión y esto hay que tenerlo en cuenta a la hora de interpretar los resultados (véase 3.2).

Las sustancias que vayan a estudiarse serán utilizadas en concentraciones equivalentes a valores de COD entre los 50 y 400 mg/litro o valores de DQO entre los 100 y 1 000 mg/litro (COD = carbón orgánico disuelto; DQO = demanda química de oxígeno). Estas concentraciones relativamente elevadas tienen la ventaja de ser analíticamente fiables. Los compuestos con propiedades tóxicas pueden retardar o inhibir el proceso de degradación.

En este método, la medida de la concentración de carbón orgánico disuelto, o la demanda de oxígeno químico, se utiliza para calcular la biodegradación máxima de la sustancia objeto del ensayo.

La utilización simultánea de un método analítico específico puede permitir calcular la biodegradación primaria de la sustancia (desaparición de la estructura química madre)

Este método es aplicable solamente a aquellas sustancias orgánicas que, a la concentración utilizada en el ensayo:

- sean solubles en agua en las condiciones del ensayo
- tengan una presión de vapor insignificante en las condiciones del ensayo
- no provoquen inhibición en las bacterias
- sean absorbidas dentro del sistema del ensayo sólo hasta un cierto punto limitado
- no se pierdan a causa de la formación de espuma a partir de la solución del ensayo.

La información sobre las proporciones relativas de los principales componentes del material del ensayo será necesaria para la interpretación de los resultados obtenidos, particularmente en los casos en que los resultados sean reducidos o marginales.

La información sobre la toxicidad de la sustancia para los microorganismos resulta conveniente para la interpretación de resultados reducidos y para la selección de las concentraciones apropiadas para el ensayo.

##### 1.2. Definiciones y unidades

La cantidad de degradación alcanzada al final del ensayo se presenta como la biodegradabilidad en la prueba Zahn — Wellens:

$$D_T (\%) = \left[ 1 - \frac{(C_T - C_V)}{(C_D - C_{VD})} \right] \times 100$$

$D_T$  = biodegradación (%) en el tiempo T

$C_D$  = valores de COD (o DQO) en la mezcla del ensayo medidos tres horas después del comienzo del mismo (mg/l). (COD = Carbón orgánico disuelto; DQO = demanda química de oxígeno)

$C_T$  = valores de COD o DQO en la mezcla del ensayo en el momento en que se toma la muestra (mg/l)

$C_V$  = valores de COD o DQO del blanco en el momento de la toma de la muestra (mg/l)

$C_{VD}$  = valores de COD y DQO en el blanco, medidos 3 horas después del comienzo de la prueba (mg/l).

El alcance de la degradación se redondea hasta llegar a completar la unidad de porcentaje más cercana.

El porcentaje de degradación se expresa como el porcentaje de supresión de COD (o DQO) de la sustancia objeto del ensayo.

La diferencia entre los valores medidos tras 3 horas y el valor inicial calculado, o preferiblemente medido, puede proporcionar una información útil sobre la eliminación de la sustancia (véase 3.2 «Interpretación de los resultados»).

### 1.3. Sustancias de referencia

En algunos casos, cuando se están investigando sustancias nuevas, las sustancias de referencia pueden resultar útiles; no obstante, todavía no se pueden recomendar sustancias de referencia específicas.

### 1.4. Principio del método de ensayo

Se ponen juntos, en un recipiente de vidrio de 1 a 4 litros de capacidad y equipado con un mezclador y un aireador, lodo activado, nutrientes minerales y el material del ensayo como única fuente de carbón en solución acuosa. Se remueve y se airea la mezcla a 20-25° C, bajo una iluminación difusa o en un cuarto oscuro por un período de hasta 28 días. El proceso de degradación se controla por medio de la determinación de los valores de COD (o DQO) en la solución filtrada a intervalos diarios o a intervalos regulares que resulten apropiados. La relación entre la cantidad de COD (DQO) eliminada tras cada intervalo y el valor 3 horas después del comienzo, se expresa en forma de porcentaje de biodegradación y sirve de medida del alcance de la degradación en ese momento.

El resultado se indica en un gráfico en función del tiempo para obtener así la curva de biodegradación.

Cuando se utiliza un método analítico específico, pueden medirse los cambios en la concentración de la molécula madre debidos a la biodegradación (biodegradabilidad primaria).

### 1.5. Criterios de calidad

Ha quedado demostrado que la reproducibilidad de esta prueba es satisfactoria en una prueba en varios centros.

La sensibilidad de este método viene determinada en gran medida por la variabilidad del blanco y, en menor medida, por la precisión de la determinación del carbón orgánico disuelto y el nivel del compuesto del ensayo en la mezcla líquida.

### 1.6. Descripción del procedimiento del ensayo

#### 1.6.1. Preparativos

##### 1.6.1.1. Reactivos

— Agua de ensayo: agua potable con un contenido de carbón orgánico menor de 5 mg/l. La concentración de iones de calcio y magnesio juntos no puede exceder los 2,7 mmoles/l; de otra manera, es necesaria una dilución suficiente con agua desionizada o destilada.

— Ácido sulfúrico, reactivo analítico (R.A.):	50 g/l
— Solución de hidróxido de sodio R.A.:	40 g/l
— Solución de nutriente mineral: disuélvase en un litro de agua desionizada:	
cloruro de amonio, NH <sub>4</sub> Cl, R.A.:	38,5 g
dihidrógeno fosfato de sodio, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O, R.A.:	33,4 g
dihidrógeno fosfato de potasio, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , R.A.:	8,5 g
monohidrógeno fosfato de dipotasio, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , R.A.:	21,75 g

La mezcla sirve a la vez de elemento nutritivo y de sistema tampón.

##### 1.6.1.2. Aparatos

- recipientes de vidrio de un volumen de 1 a 4 litros (p. ej., recipientes cilíndricos)
- mezclador con un agitador de vidrio o metal colocado en un eje apropiado. (El agitador debe girar a 5-10 cm por encima del fondo del recipiente). Se puede utilizar en su lugar un agitador magnético con una varilla de 7-10 cm de larga
- un tubo de vidrio de 2 a 4 mm de diámetro interior para introducir aire. La abertura del tubo debe estar a, más o menos, 1 cm por encima del fondo del recipiente
- una centrifuga (unos 3 550 g)
- un medidor de pH
- un medidor de oxígeno disuelto
- filtros de papel
- un aparato de filtración por membrana
- filtros de membrana, tamaño de los poros 0,45 μm. Los filtros de membrana son apropiados si es seguro que ni desprenden carbón ni absorben la sustancia en la fase de filtración
- un equipo analítico para determinar el contenido de carbón orgánico y la demanda química de oxígeno.

### 1.6.1.3. Preparación del inóculo

Se lava (repetidamente) el lodo activado recogido en una planta de tratamiento biológico, centrifugándolo o dejándolo sedimentarse con agua de iguales características a la que se usa para el ensayo (antes citado).

El lodo activado tiene que estar en condiciones adecuadas. Este fango puede encontrarse en una planta depuradora de aguas residuales que funcione debidamente. Para coger tantas especies o cepas de bacterias diferentes como sea posible, puede ser preferible mezclar inóculos de diferentes fuentes (p. ej. diferentes plantas depuradoras, extractos de suelos, aguas de río, etc.). La mezcla debe ser tratada como se describe anteriormente.

Para comprobar la actividad del lodo activado, véase «Control funcional».

### 1.6.1.4. Preparación de las soluciones del ensayo

Pónganse, en el recipiente que se utiliza para el ensayo, 500 ml de agua de ensayo, 2,5 ml/l de una solución de nutrientes minerales y lodo activado en una cantidad equivalente a 0,2 a 1,0 g/l de materia seca en la mezcla final. Añádase suficiente solución madre de la sustancia a ensayar como para que en la mezcla final se obtenga una concentración de COD de 50 a 400 mg/l. Los valores correspondientes de DQO son 100-1 000 mg/l. Añádase agua de ensayo hasta llegar a un volumen total de 1 a 4 litros. El volumen total que se elija dependerá del número de muestras que se vayan a tomar para las determinaciones del COD y DQO y las cantidades necesarias para el procedimiento analítico. Normalmente, puede considerarse satisfactorio un volumen de 2 litros.

Se dispone por lo menos un recipiente de control (blanco), paralelamente a cada una de las series de ensayo, que contenga tan sólo una solución de lodo activado y la solución de nutrientes minerales, que se completará con agua de ensayo hasta alcanzar un volumen total igual al de los recipientes de ensayo.

### 1.6.2. Realización del ensayo

Se agitan los recipientes del ensayo con agitadores magnéticos o hélices bajo una iluminación difusa o en un cuarto oscuro a 20-25° C. La aireación se efectúa con aire comprimido limpiado por medio de un filtro de algodón y lana y un frasco lavador si fuera necesario. Hay que asegurarse de que el lodo no sedimenta y de que la concentración de oxígeno no cae por debajo de los 2 mg/l.

Hay que controlar el pH a intervalos regulares (por ejemplo cada día) y, si fuera necesario, corregirlo ajustándolo a 7-8.

Las pérdidas por evaporación se compensan, justo antes de tomar cada muestra, con agua desionizada o destilada en las cantidades necesarias. Un buen procedimiento es marcar el nivel del líquido sobre el recipiente antes de iniciar el ensayo. Se hacen marcas nuevas después de cada toma (sin aireación y sin remover). Las primeras muestras se toman siempre 3 horas después del comienzo del ensayo, para detectar la absorción del material de ensayo por parte del lodo activado.

La eliminación del material de ensayo se controla por medio de las determinaciones de COD y DQO hechas diariamente o a intervalos regulares. Las muestras del recipiente utilizado para el ensayo y del recipiente de control son filtradas con un filtro de papel cuidadosamente lavado. Se desechan los primeros 5 ml de la solución filtrada. Los lodos difíciles de filtrar pueden ser separados previamente centrifugándolos durante 10 minutos. Las determinaciones de COD y DQO deben hacerse por lo menos por duplicado. El ensayo se lleva a cabo durante un período de hasta 28 días.

*Nota:* Las muestras que todavía estén turbias son filtradas con filtros de membrana. Los filtros de membrana no han de desprender ni absorber material orgánico alguno.

#### Control funcional del lodo activado

En un recipiente que contenga una sustancia conocida deben llevarse a cabo paralelamente cada serie de pruebas, con vistas a controlar la capacidad funcional del lodo activado. Se ha comprobado que el dietilenoglicol es de utilidad para este propósito.

#### Adaptación

Si los análisis se llevan a cabo a intervalos relativamente cortos (p. ej., diariamente), se puede reconocer claramente la adaptación por medio de la curva de degradación (véase la Figura 2). Así pues, el ensayo no debe iniciarse justo antes del fin de semana.

Si la adaptación tiene lugar al final del período, el ensayo puede prolongarse hasta que finalice la degradación.

*Nota:* Si fuera necesario un conocimiento más amplio del comportamiento del lodo adaptado, se expone de nuevo el mismo lodo activado al mismo material del ensayo, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Desconéctense el agitador y el aireador y permítase que el lodo activado se sedimente. Vacíese el líquido sobrenadante, añádase agua de ensayo hasta alcanzar los 2 litros, agítase durante 15 minutos y déjese sedimentar de nuevo. Después de haber vaciado de nuevo el líquido sobrenadante, utilícese el lodo que queda para repetir el ensayo con el mismo material, de acuerdo con los puntos 1.6.1.4 y 1.6.2. Se puede aislar el lodo activado centrifugando en vez de dejándolo sedimentar.

El lodo adaptado puede mezclarse con lodo fresco hasta alcanzar un total de 0,2 a 1 g de peso en seco, por litro.



#### Medios analíticos

Normalmente, se filtran las muestras con un filtro de papel cuidadosamente lavado (para lavarlo, utilícese agua desionizada).

Las muestras que sigan estando turbias se filtrarán con filtros de membrana (0,45 µm).

La concentración de COD se determina por duplicado en las muestras de líquido filtrado (se desechan los primeros 5 ml) por medio del instrumento TOC. Si el líquido filtrado no puede ser analizado el mismo día, tiene que almacenarse en el refrigerador hasta el día siguiente. No se recomienda un almacenaje más prolongado.

La concentración de DQO se determina por duplicado en las muestras de líquido filtrado con un sistema analítico siguiendo el procedimiento descrito en la referencia bibliográfica 2 posterior.

## 2. DATOS Y EVALUACIÓN

Las concentraciones de COD y DQO se determinan en las muestras, por lo menos por duplicado, de acuerdo con el punto 1.6.2. La degradación en el tiempo T se calcula según la fórmula (con definiciones) dada en el punto 1.2.

El alcance de la degradación se redondea hasta llegar a completar la unidad de porcentaje más cercana. La cantidad de degradación lograda al final del ensayo se presenta como la «biodegradabilidad en la prueba Zahn — Wellens».

*Nota:* Si se logra una degradación completa antes de que termine el periodo de duración del ensayo y si este resultado es confirmado por un segundo análisis al día siguiente, el ensayo puede darse por concluido.

## 3. PRESENTACIÓN DEL INFORME

### 3.1. Informe sobre el ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- la concentración inicial de la sustancia
- cualquier otra información y los resultados experimentales relativos a la sustancia objeto del ensayo, a la sustancia de referencia, si se utiliza alguna, y al control
- la concentración después de tres horas
- la curva de biodegradación con una descripción
- fecha y lugar en que se tomaron las muestras de los organismos utilizados en el ensayo, status de adaptación, concentración utilizada, etc.
- causas científicas de cualquier cambio en el procedimiento del ensayo.

### 3.2. Interpretación de los resultados

La eliminación de COD (o DQO) que tiene lugar gradualmente, durante días o semanas, indica que la sustancia objeto del ensayo se está biodegradando.

No obstante, la absorción físico-química puede, en algunos casos, desempeñar un papel, y esto se pone de manifiesto cuando hay una eliminación completa o parcial desde el principio, dentro de las tres primeras horas, y la diferencia entre las mezclas líquidas sobrenadantes del control y del ensayo se mantienen a un nivel inesperadamente bajo.

Son necesarias pruebas adicionales si se quiere establecer una diferencia entre biodegradación (o biodegradación parcial) y absorción.

Esto puede hacerse de varias maneras, pero lo más conveniente es usar el sobrenadante como inóculo en un ensayo de base fija (una prueba respirométrica preferentemente).

Las sustancias que en este ensayo den una eliminación de COD (o DQO) alta, y no debida a la absorción, deben ser consideradas como potencialmente biodegradables. Una eliminación parcial y no debida a la absorción indica que el producto químico puede sufrir al menos cierta biodegradación.

Una eliminación baja o nula de COD (o DQO) puede deberse a que la sustancia objeto del ensayo provoca la inhibición de los microorganismos. Esto puede asimismo ponerse de manifiesto a través de una desintegración y pérdida del lodo, produciendo sobrenadantes turbios. Se debe repetir el ensayo utilizando una concentración inferior de la sustancia objeto de estudio.

La utilización de un método analítico específico para el compuesto, o de una sustancia del ensayo marcada con  $^{14}\text{C}$ , puede permitir una mayor sensibilidad. En el caso del compuesto de ensayo marcado con  $^{14}\text{C}$  la obtención de  $^{14}\text{CO}_2$  confirmará que se ha producido biodegradación.

Cuando los resultados se presenten en términos de biodegradación primaria, se debe dar, si fuera posible, una explicación sobre el cambio de estructura química que lleva a la pérdida de respuesta de la sustancia madre utilizada en el ensayo.

La validación del método analítico tiene que presentarse junto con la respuesta encontrada con el medio de ensayo control (blanco).

#### 4. REFERENCIAS

- (1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 302 B*. Decisión del Consejo C(81) 30 final.
- (2) Anexo V C.9 Degradación: Demanda química de oxígeno, Directiva 84/449/CEE de la Comisión, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* N° L 251 de 19. 9. 1984.

Anexo

EJEMPLO DE EVALUACIÓN

**Compuesto orgánico:** ácido 4-Etoxibenzoico  
**Concentración teórica de ensayo:** 600 mg/l  
**COD teórico:** 390 mg/l  
**Inóculo:** planta depuradora de aguas residuales . . .  
**Concentración:** 1 g de material seco/litro  
**Status de adaptación:** no adaptado  
**Análisis:** determinación de COD  
**Cantidad de muestra:** 3 ml  
**Sustancia de control:** dietilenglicol  
**Toxicidad del compuesto:** sin efectos tóxicos por debajo de los 1 000 mg/l.  
 Ensayo utilizado: Ensayo de fermentación con tubos.

Tiempo de ensayo	Sustancia de control				Sustancia de ensayo		
	COD (1) del control mg/l	COD (1) mg/l	COD neto mg/l	Degradación (%)	COD (1) mg/l	COD neto mg/l	Degradación (%)
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 h	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 d	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 d	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 d	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 d	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 d	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 d	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 d	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 d	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Valores medios de determinaciones por triplicado.

Figura 1

Ejemplos de curvas de biodegradación

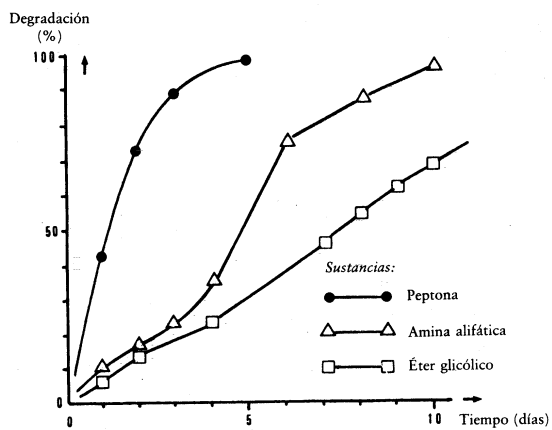
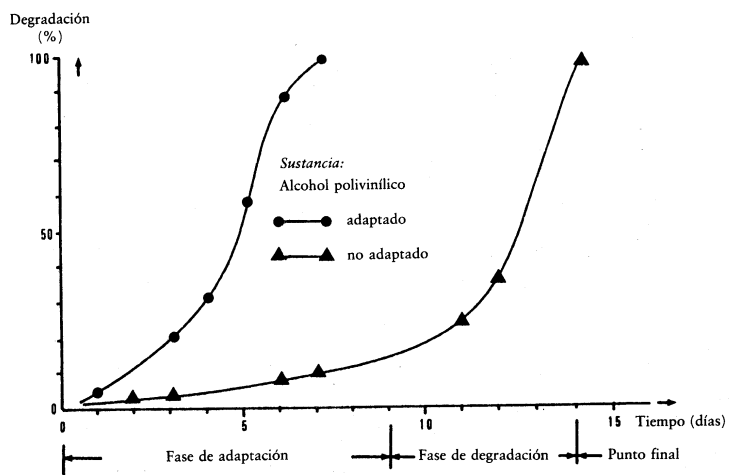


Figura 2

Ejemplos de adaptación del lodo



## C. 10

### BIODEGRADACIÓN

#### ENSAYO DE SIMULACIÓN CON LODO ACTIVADO

#### 1. MÉTODO

##### 1.1. Introducción

###### 1.1.1. Comentarios generales

Este método sólo es aplicable a aquellas sustancias orgánicas que, a la concentración utilizada en el ensayo:

- sean tan solubles en agua como sea necesario para la preparación de las soluciones de ensayo
- sometidas a las condiciones del ensayo, tengan una presión de vapor insignificante
- no provoquen inhibición en las bacterias.

La información sobre las proporciones relativas de los principales componentes del material de ensayo será necesaria para la interpretación de los resultados obtenidos, particularmente en los casos en que los resultados sean reducidos o marginales.

La información sobre la toxicidad de la sustancia para los microorganismos resulta conveniente para la interpretación de resultados reducidos y para la selección de las concentraciones apropiadas para el ensayo.

###### 1.1.2. Determinación de la biodegradabilidad máxima (análisis del COD/DQO)

El objeto de este método es determinar la biodegradabilidad máxima a través de la medición de la eliminación de la sustancia y de cualquier metabolito en un modelo de planta de lodo activado con una concentración equivalente a > 12 mg de COD/l (o aproximadamente 40 mg de DQO/l). 20 mg de COD/l parece ser la óptima.

(COD = carbón orgánico disuelto por litro, DQO = demanda química de oxígeno). El contenido de carbón orgánico (o la demanda química de oxígeno) del material de ensayo tiene que ser determinado.

###### 1.1.3. Determinación de la biodegradabilidad primaria (análisis específico)

El objeto del método es determinar la biodegradabilidad primaria de una sustancia en un modelo de planta de lodo activado, con una concentración de unos 20 mg/l, por medio de un método analítico específico (se puede utilizar una concentración superior o inferior si el método analítico y su toxicidad lo permiten). Esto permite la valoración de la biodegradabilidad primaria de la sustancia (desaparición de la estructura química madre).

El objeto de este método *no* es la determinación de la mineralización de la sustancia ensayada.

Se tiene que contar con un método analítico adecuado para la determinación de la sustancia.

##### 1.2. Definiciones y unidades

###### 1.2.1. Análisis del COD/DQO

El grado de eliminación de la sustancia viene dado por:

$$GE = \frac{T - (E - E_0)}{T} \times 100\% \quad [1 a)]$$

donde:

GE = grado de eliminación en porcentaje de COD (o DQO) dentro del tiempo de retención medio dado con respecto al material de ensayo

T = concentración del material de ensayo en el afluente en mg de COD/litro (o mg de DQO/litro)

E = concentración de COD (o DQO) en el efluente de la unidad de ensayo en mg de COD/litro (o DQO/litro)

E<sub>0</sub> = concentración de COD (o DQO) en el efluente del blanco en mg de COD/litro (o DQO/litro).

La degradación se expresa, como la eliminación, en porcentaje de COD (o DQO) dentro del tiempo de retención dado con respecto al material de ensayo.

1.2.2. *Análisis específico*

La eliminación porcentual de la sustancia ensayada de su fase acuosa ( $R_a$ ) dentro del tiempo medio de retención dado viene dada por:

$$R_a = \frac{C_1 - C_0}{C_1} \times 100 \% \quad [1 b)]$$

donde:

$C_1$  = concentración de la sustancia en el afluente de la unidad en la que se realiza el ensayo (mg de sustancia por litro, determinada por medio de un análisis específico)

$C_0$  = concentración de la sustancia en el efluente de la unidad en la que se realiza el ensayo (mg de sustancia por litro, determinada por medio de un análisis específico).

1.3. **Sustancias de referencia**

En algunos casos, cuando se está investigando una sustancia nueva, las sustancias de referencia pueden resultar útiles; no obstante, todavía no pueden recomendarse sustancias de referencia específicas.

1.4. **Principios de los métodos de ensayo**

Para determinar la biodegradabilidad máxima, se organizan paralelamente dos unidades piloto de lodo activado (unidades de ensayo confirmatorio OCDE o de depósito poroso). Se vierte la sustancia objeto del ensayo en el afluente (aguas residuales domésticas o sintéticas) de una de las unidades, mientras que la otra recibe tan sólo aguas residuales. Para la determinación de la biodegradación primaria con un análisis específico en el afluente y el efluente, sólo se utiliza una unidad.

Las concentraciones de COD (o DQO) se miden en los efluentes, o se determinan las concentraciones de sustancia por medio de un análisis específico.

El COD debido al material del ensayo no es medido sino simplemente especificado.

Cuando se realizan las mediciones de COG (o DQO), se supone que las diferencias entre las concentraciones medias de los efluentes del ensayo y del control se deben a material del ensayo no degradado.

Cuando se realizan análisis específicos, se pueden medir los cambios en la concentración de la molécula madre (biodegradación primaria).

Las unidades pueden manejarse siguiendo el «método de unidades acopladas», por medio de un procedimiento de transinoculación.

1.5. **Criterios de calidad**

La concentración inicial de la sustancia depende del tipo de análisis que se vaya a realizar y su limitación.

1.6. **Descripción del método de ensayo**

1.6.1. *Preparación*

1.6.1.1. **Aparatos**

Se necesitan un par de unidades del mismo tipo, excepto cuando se realizan análisis específicos. Se pueden utilizar dos tipos de dispositivos:

La prueba confirmatoria OCDE:

El equipo (Anexo I) consiste en un recipiente de almacenaje (A) para las aguas residuales sintéticas, una bomba de dosificación (B), un recipiente de aireación (C), un separador (D), una bomba de aire (E) para reciclar el lodo activado y un recipiente (F) para recoger el efluente tratado.

Los recipientes (A) y (F) tienen que ser de vidrio o de un plástico apropiado y deben tener una capacidad de 24 litros por los menos. La bomba (B) tiene que proporcionar una corriente constante de aguas residuales sintéticas en el recipiente de aireación; se puede usar cualquier sistema conveniente, con tal que la corriente de entrada y la concentración queden aseguradas.

Durante el funcionamiento normal, se fija la altura del separador de modo que el volumen contenido en el recipiente de aireación sea de 3 litros de mezcla líquida. Se cuelga en el recipiente (C), en el vértice del cono, un cubo de aireación sintetizado (G). La cantidad de aire soplado a través del aireador puede controlarse por medio de un contador de corriente.

La bomba de aire (E) se coloca de manera que el lodo activado del separador sea continua y regularmente reciclado en el recipiente de aireación (C).

El depósito poroso:

El depósito poroso está construido a base de láminas de polietileno poroso (2 mm de espesor, tamaño máximo de los poros 95  $\mu\text{m}$ ), que adoptan la forma de cilindros de 14 cm de diámetro con una base cónica a 45° (Figuras 1 y 2 del Anexo II). El depósito poroso se encuentra en el interior de un recipiente impermeable, hecho de un plástico conveniente, de 15 cm de diámetro y con una salida a una altura de 17,2 cm en la parte cilíndrica, que determina el volumen (3 l) en el depósito. Hay un anillo rígido de soporte, hecho de un plástico conveniente, alrededor de la parte superior del recipiente interior, de modo que hay un espacio de 0,5 cm para el efluente entre el recipiente interior y el exterior.

Los depósitos porosos pueden montarse en la base de un baño maría termostáticamente regulado. Se suministra aire en la base del recipiente interior, en el que se colocan unos difusores apropiados.

Los recipientes (A) y (E) tienen que ser de vidrio o de un plástico conveniente y deben tener una capacidad de 24 litros por lo menos. La bomba (B) tiene que proporcionar una corriente constante de aguas residuales sintéticas al recipiente de aireación; puede usarse cualquier sistema apropiado, con tal que se asegure la corriente de entrada y la concentración.

Se necesitan depósitos porosos interiores de recambio para reemplazar a los que puedan bloquearse; los depósitos bloqueados se limpian por medio de una inmersión de 24 horas en una solución de hipoclorito seguida de un minucioso lavado con agua del grifo.

#### 1.6.1.2. Filtración

Aparatos de filtración por membrana y filtros de membrana con poros de un tamaño de 0,45  $\mu\text{m}$ . Los filtros de membrana son apropiados si es seguro que ni desprenden carbón ni absorben la sustancia en la fase de filtración.

#### 1.6.1.3. Aguas residuales

Se puede usar tanto afluente sintético apropiado como aguas residuales domésticas.

Ejemplo de afluente sintético:

disuélvase en cada litro de agua del grifo:

peptona	160 mg
extracto de carne	110 mg
urea	30 mg
NaCl	7 mg
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28 mg.

Aguas residuales domésticas:

Deben recogerse frescas cada día en una cañería de desagüe de un tanque de sedimentación primaria de una planta de tratamiento que trate aguas residuales domésticas predominantemente.

#### 1.6.1.4. Solución madre del material del ensayo

Debe prepararse una solución del material del ensayo (p. ej. 1 %) para ser añadida a la unidad en que se realiza el ensayo. La concentración del material tiene que determinarse, de modo que se conozca el volumen apropiado que hay que añadir a las aguas residuales o directamente a la unidad por medio de una segunda bomba, para obtener la concentración necesaria para el ensayo.

#### 1.6.1.5. Inóculo

*Nota:* Cuando se utilizan aguas residuales domésticas, no vale la pena utilizar un inóculo de baja concentración bacterial, sino que se puede utilizar lodo activado.

Pueden utilizarse diversos inóculos.

Tres ejemplos de inóculos apropiados son:

##### a) Inóculo procedente de un efluente secundario:

El inóculo debe obtenerse a partir de un efluente secundario de buena calidad recogido en una planta de tratamiento que trate predominantemente aguas residuales domésticas. Hay que mantener el efluente en condiciones aeróbicas durante el tiempo que va desde la recogida de las muestras hasta su uso. Para preparar el inóculo, se filtra la muestra en un filtro poco fino y se desechan los primeros 200 ml. El líquido así filtrado es mantenido en condiciones aeróbicas hasta su uso. El inóculo tiene que ser usado el mismo día que es recogido. Se deben usar por lo menos 3 ml para la inoculación.

b) Inóculo compuesto:

Inóculo procedente de un efluente secundario:

Véase la descripción anterior.

Inóculo procedente de suelo:

Se suspenden 100 g de suelo de jardín (fértil, no estéril) en 1 000 ml de agua potable sin cloro (Los suelos con una proporción extremadamente elevada de arcilla, arena o humus son inadecuados). Tras agitar la mezcla, se deja que la suspensión se deposite durante 30 minutos. Se filtra el sobrenadante con un filtro de papel poco fino y se desechan los primeros 200 ml. Se airea el líquido filtrado inmediatamente y hasta su uso. El inóculo tiene que usarse el mismo día en que es recogido.

Inóculo procedente de aguas superficiales:

Un tercer inóculo parcial se obtiene de aguas superficiales mesosapróbicas. La muestra se filtra con un papel poco fino y se desechan los primeros 200 ml. El líquido así filtrado es mantenido en condiciones aeróbicas hasta su uso. El inóculo tiene que usarse el mismo día en que es recogido.

Se reúnen y mezclan bien volúmenes iguales de las 3 muestras parciales de inóculo y se extrae de esta mezcla la muestra final. Deben usarse por lo menos 3 ml para la inoculación.

c) Inóculo procedente de lodo activado:

Se puede usar como inóculo un volumen (no más de 3 litros) de lodo activado (contenido de sólidos en suspensión de hasta 2,5 g/l) sacado del tanque de aireación de una planta que trate predominantemente aguas residuales domésticas.

1.6.2. Procedimiento

El ensayo se realiza a temperatura ambiental; ésta debe mantenerse entre los 18 y los 25° C.

Si fuera apropiado, el ensayo puede realizarse a una temperatura inferior (de hasta 10° C): si la sustancia se degrada, entonces no es necesario ningún trabajo más. Si, sin embargo, la sustancia no se degrada, el ensayo debe llevarse a cabo a una temperatura constante entre los 18° y los 25° C.

1.6.2.1. Período de rodaje: Formación/estabilización del lodo de las unidades

El período de crecimiento/estabilización del lodo activado es el período durante el cual la concentración de los sólidos en suspensión del lodo activado y el funcionamiento de las unidades, progresan hasta llegar a un estado constante en las condiciones de explotación empleadas.

El período de rodaje es el período que va desde el momento en que la sustancia objeto de ensayo es añadida por primera vez hasta el momento en que su eliminación alcanza un trazado constante (valor relativamente constante). Este período no tiene que sobrepasar las seis semanas.

El período de evaluación es un período de tres semanas, tres semanas desde el momento en que la eliminación de la sustancia alcanza un valor relativamente constante, generalmente alto. Para aquellas sustancias que muestran escasa o nula degradación durante las primeras seis semanas, las tres semanas siguientes se consideran como el período de evaluación.

Al principio, lléne(n)se la(s) unidad(es) necesaria(s) para un ensayo con el inóculo mezclado con afluente.

Entonces se ponen en funcionamiento el aireador (y la bomba de aireación [E] en el caso de tener unidades de prueba confirmatoria OCDE) y el mecanismo de administración (B).

El afluente sin la sustancia tiene que pasar a través del recipiente de aireación (C) bien a la velocidad de un litro por hora, bien a la velocidad constante de medio litro por hora; esto da un tiempo medio de retención de tres o seis horas respectivamente.

La velocidad de aireación debe regularse de modo que el contenido del recipiente (C) se mantenga constantemente en suspensión, mientras el contenido de oxígeno disuelto es por lo menos de 2 mg/l.

Hay que evitar la formación de espuma de una manera apropiada. No hay que usar agentes antiespuma que inhiban el lodo activado.

El fango que se acumula alrededor de la parte superior del recipiente de aireación (C), (y, en el caso de las unidades de prueba confirmatoria OCDE, en la base del recipiente de sedimentación [D] y en el circuito de circulación) debe ser devuelto a la mezcla líquida al menos una vez al día rascando con un cepillo o de cualquier otro modo que resulte apropiado.

Cuando el fango no se sedimenta, puede aumentarse su densidad añadiendo porciones de 2 ml de una solución al 5 % de cloruro de hierro; repítase si fuera necesario.

El efluente se acumula en un recipiente (E o F) durante 20 a 24 horas, y se toma una muestra después de mezclarlo concienzudamente. Hay que limpiar el recipiente (E o F) cuidadosamente.

A fin de supervisar y controlar la eficiencia del proceso, se mide por lo menos dos veces a la semana la demanda química de oxígeno (DQO) o el carbón orgánico disuelto (COD) del líquido filtrado a partir del efluente acumulado, así como la del líquido filtrado a partir del efluente (utilizando una membrana de poros de tamaño 0,45 µm). Los primeros 20 ml (aproximadamente) del líquido filtrado se desechan.



La reducción del DQO o COD debe estabilizarse cuando se obtiene una degradación diaria más o menos regular.

El contenido de materia seca del lodo activado que está en el tanque de aireación debe determinarse dos veces a la semana (en g/l). Las unidades pueden operarse de dos maneras: bien se determina el contenido de materia seca del lodo activado dos veces a la semana y, si éste es superior a 2,5 g/l, se desecha el exceso de lodo activado; o bien se retiran cada día 500 ml de mezcla líquida, de cada depósito, para conseguir un tiempo medio de retención de seis días.

Cuando los parámetros [eficiencia del proceso (eliminación de DQO o COD), concentración del lodo, sedimentabilidad del lodo, turbidez de los efluentes, etc . . .] medidos y calculados de las dos unidades, son suficientemente constantes, se puede introducir la sustancia objeto de ensayo en el afluente de una de las dos unidades (como se indica en 1.6.2.2).

Por otra parte, la sustancia puede asimismo añadirse al principio del período de crecimiento del lodo (1.6.2.1) especialmente cuando el lodo es añadido en tanto que inóculo.

#### 1.6.2.2. Procedimiento de ensayo

Se mantienen las condiciones de explotación del período de rodaje y se añade la suficiente cantidad de solución madre (aproximadamente el 1%) del material de ensayo afluente de la unidad en que se realiza el mismo, de modo que se obtenga la concentración deseada del material en las aguas residuales (aproximadamente 10 ó 20 mg de COD/l o 40 mg de DQO/l). Esto se puede lograr mezclando la solución de reserva con las aguas residuales diariamente o por medio de un sistema de bombeo separado. Esta concentración puede alcanzarse progresivamente. Si la sustancia objeto de ensayo no tiene efectos tóxicos sobre el lodo activado, se pueden probar concentraciones superiores.

Se alimenta el blanco sólo con afluente sin sustancias añadidas. Se toman para su análisis volúmenes suficientes de efluentes y se filtran con filtros de membrana (0,45 µm). Se desechan los primeros 20 ml (aproximadamente).

Las muestras filtradas tienen que analizarse el mismo día, si no, hay que preservarlas por medio de un método apropiado, por ejemplo, usando 0,05 ml de una solución de cloruro de mercurio al 1% por cada 10 ml de líquido filtrado o almacenándolas a 2 ó 4° C hasta 24 horas, o por debajo de los -18° C para períodos más largos.

El período de rodaje, con la adición de la sustancia a ensayar, no debe exceder las seis semanas y el período de evaluación no debe ser inferior a tres semanas, esto es, debe haber disponibles unas 14 ó 20 determinaciones para calcular el resultado final.

Método de unidades acopladas:

El acoplamiento de las unidades se consigue intercambiando 1,5 litros de mezcla líquida (incluido el lodo) de los recipientes de aireación del lodo activado entre las dos unidades una vez al día. Cuando los materiales de ensayo son fuertemente absorbentes, se sacan sólo 1,5 litros de líquido sobrenadante de los recipientes de sedimentación y se vierten en el recipiente de lodo activado de la otra unidad.

#### 1.6.2.3. Análisis

Se pueden realizar dos tipos de análisis para examinar el comportamiento de la sustancia:

COD y DQO:

Las concentraciones de COD se realizan por duplicado con el analizador de carbón y/o los valores de DQO según la referencia bibliográfica 2.

Análisis específico:

Las concentraciones de la sustancia en estudio se determinan por medio de un método analítico apropiado. Cuando sea posible, se debe llevar a cabo la determinación específica de la sustancia absorbida en el lodo.

## 2. DATOS Y EVALUACIÓN

### 2.1. Método de unidades acopladas

Cuando se utiliza el «método de unidades acopladas», los grados de eliminación diaria GE % se calculan de acuerdo con 1.2.1.

Estos grados de eliminación diaria GE son corregidos con la ecuación [2] para un tiempo medio de retención de tres horas y la ecuación [3] para seis horas, dando GE<sub>c</sub> para la transferencia de material debida al procedimiento de transinoculación.

$$GE_c = \frac{8}{7} GE - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$GE_c = \frac{4}{3} GE - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Se calcula la media de la serie de valores de  $GE_c$ , así como la desviación estándar de acuerdo con la ecuación [4]:

$$s_{GE_c} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{GE}_c - GE_{c_i})^2}{n-1}} \quad [4]$$

donde:

$s_{GE_c}$  = Desviación estándar de la serie de valores de  $GE_c$

$\overline{GE}_c$  = media de los valores de  $GE_c$

$n$  = número de determinaciones.

Los valores atípicos de la serie de  $GE_c$  se eliminan conforme a un procedimiento estadístico adecuado, p. ej. Nalimov (referencia 6), al nivel de probabilidad del 95%, y se vuelven a calcular la media y la desviación estándar de la serie de valores de  $DR_c$  una vez libre de valores atípicos.

El resultado final se calcula entonces con la ecuación [5]:

$$GE_c = \overline{GE}_c \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} s_{GE_c} \quad [5]$$

donde:

$t_{n-1;\alpha}$  = valor tabular de  $t$  para  $n$  pares  $E$  y  $E_0$ , y fiabilidad estadística  $P$  ( $P = 1 - \alpha$ ), según la cual  $P$  se fija en un 95% (referencia 1).

El resultado se expresa dando la media con límites de tolerancia al nivel de probabilidad del 95%, la respectiva desviación estándar y el número de valores de la serie  $DR_c$ , una vez libre de valores atípicos, así como el número de éstos, p. ej.:

$GE_c = 98,6 \pm 2,3\%$  de eliminación de COD

$s$  = 4,65% de eliminación de COD

$n$  = 18

$x$  = número de valores atípicos.

## 2.2. Modo de unidades no acopladas

El funcionamiento de las unidades puede controlarse como sigue:

$$\text{porcentaje de eliminación} = \frac{\text{DQO o DOC de las aguas residuales} - \text{DQO o DOC del efluente}}{\text{DQO o COD de las aguas residuales}} \times 100$$

Estas eliminaciones diarias pueden trazarse gráficamente para revelar las tendencias, p. ej. a una aclimatación.

### 2.2.1. Cómo utilizar las determinaciones de DQO/COD

El grado diario de eliminación  $GE$  % se calcula según 1.2.1.

Se calcula la media de la serie de valores de  $GE$ , así como la desviación estándar de acuerdo con:

$$s_{GE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{GE} - GE_i)^2}{n-1}} \quad [6]$$

donde:

$s_{GE}$  = Desviación estándar de la serie de valores de  $GE_i$

$\overline{GE}$  = Media de los valores de  $GE_i$

$n$  = Número de determinaciones.

Los valores atípicos de la serie de GE se eliminan conforme a un procedimiento estadístico adecuado, p. ej. Nalimov (referencia 6), al nivel de probabilidad del 95 %, y se vuelven a calcular la media y la desviación estándar de la serie de los valores de GE una vez libre de valores atípicos.

El resultado final se calcula entonces con la ecuación [7]:

$$GE = \overline{GE} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} s_{GE} \quad [7]$$

donde:

$t_{n-1;\alpha}$  = valor tabular de t para n pares de valores de E y  $E_O$  y fiabilidad estadística  $P (P = 1 - \alpha)$  según la cual P se fija en un 95 % (referencia 1).

El resultado se expresa dando la media con límites de tolerancia al nivel de probabilidad del 95 %, la respectiva desviación estándar, y el número de valores de la serie GE una vez libre de valores atípicos, así como el número de éstos, p. ej.:

GE = (98,6 ± 2,3 %) de eliminación de COD

s = 4,65 % de eliminación de COD

n = 18

x = número de valores atípicos.

#### 2.2.2. *Cómo utilizar un análisis específico*

El porcentaje de eliminación de la sustancia objeto de estudio en la fase acuosa ( $R_a$ ) se calcula de acuerdo con 1.2.2.

### 3. PRESENTACIÓN DEL INFORME

#### 3.1. Informe sobre el ensayo

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- el formulario del Anexo III, indicando las condiciones de funcionamiento del ensayo
- qué aparato se eligió (prueba confirmatoria OCDE o depósito poroso)
- qué método se ha elegido: método de unidades acopladas o no
- qué aguas residuales: sintéticas o domésticas. En caso de que sean aguas residuales domésticas, fecha y lugar de la muestra
- qué inóculo, con fecha y lugar de la muestra
- una descripción del método analítico si se realizaron análisis específicos
- gráfico de la eliminación de DQO o COD en función del tiempo, incluyendo el período de rodaje y de evaluación
- recuperación analítica de la sustancia en estudio en forma de DQO o COD en la solución madre
- si se realizaron análisis específicos, gráfico del porcentaje de la eliminación de la sustancia de la fase acuosa en función del tiempo (período de rodaje y de evaluación)
- la media de eliminación de COD, DQO o de la sustancia y la desviación estándar se calculan a partir de los resultados del período de evaluación, es decir, cuando hay una eliminación constante de material del ensayo o un período de funcionamiento constante
- gráfico de la concentración de lodo activado en función del tiempo
- cualquier observación sobre el lodo activado (exceso de lodo desechado, presencia de aglomeraciones,  $FeCl_3$ , ...)
- concentración de la sustancia utilizada en el ensayo
- cualquier resultado sobre análisis realizados en el lodo
- toda la información y todos los resultados experimentales sobre la sustancia en estudio y la sustancia de referencia, si se utilizó alguna
- causas científicas de cualquier cambio de procedimiento.

### 3.2. Interpretación de los resultados

Una baja eliminación de la sustancia de estudio en la fase acuosa puede deberse a una inhibición de los microorganismos por parte de la sustancia. Esto puede asimismo ponerse de manifiesto a través de una desintegración y pérdida de lodo, produciendo un sobrenadante turbio, y a través de una reducción de la eficiencia en la eliminación de DQO (o COD) de la planta piloto.

La absorción físico-química puede desempeñar a veces un papel. Los análisis realizados en el lodo tras una adecuada desorción pueden revelar diferencias entre la acción biológica de la molécula y la absorción físico-química.

Son necesarias pruebas adicionales si se quiere establecer una distinción entre biodegradación (o biodegradación parcial) y absorción.

Esto puede hacerse de varias maneras, pero la más conveniente es usar el sobrenadante como inóculo en un ensayo de grupo base (una prueba respirométrica preferentemente).

Si se observan eliminaciones elevadas de COD o DQO, entonces ello es debido a la biodegradación, mientras que, en el caso de eliminaciones reducidas, la biodegradación no se puede distinguir de la eliminación, p. ej., si un compuesto soluble da muestras de una absorción constante del 98 % y la proporción de excedente de fango retirado es del 10 % diario, una eliminación de hasta el 40 % es posible; con una proporción de excedente de lodo retirado del 30 %, la eliminación debida a la absorción y a la retirada con excedente de lodo puede llegar a ser del 65 % (referencia 4).

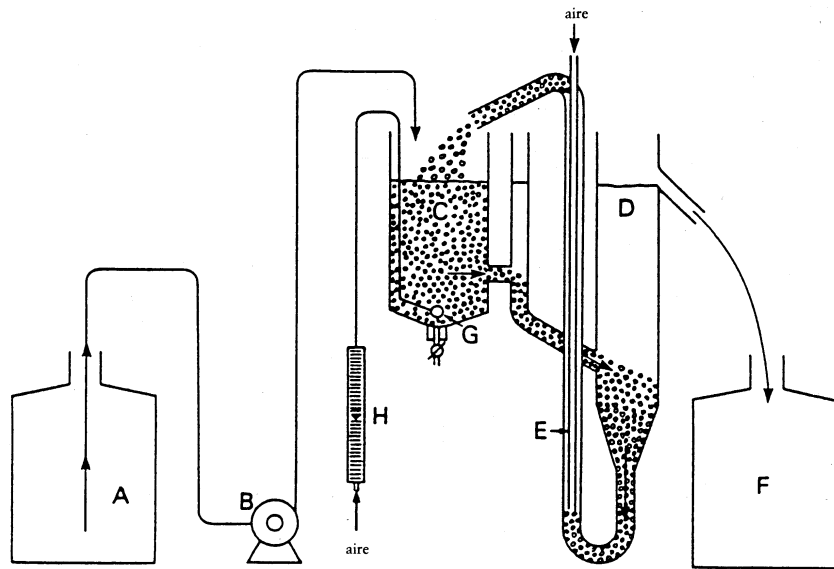
Cuando se utilicen análisis específicos, se debe prestar atención a la relación entre la estructura de la sustancia y el análisis específico empleado. En este caso, el fenómeno observado no puede ser interpretado como una mineralización de la sustancia.

### 4. REFERENCIAS

- (1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 303 A*. Decisión del Consejo C(81) 30 final.
- (2) Anexo V C 9 Prueba de degradación — Demanda de oxígeno químico. Directiva 84/449/CEE de la Comisión (*Diario Oficial de las Comunidades Europeas* n° L 251 de 19. 9. 1984).
- (3) Painter, H. A. y King, E. F., *WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability*. Technical Report TR70. June 1978, Water Research Center Reino Unido.
- (4) Wierich, P. and Gerike, P., — «The Fate of Soluble, Recalcitrant, and Adsorbing Compounds in Activated Sludge Plants» — *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol 5, n° 2. June 1981, p. 161a, 171.
- (5) Directivas 82/242/CEE y 82/243/CEE del Consejo (*Diario Oficial de las Comunidades Europeas* n° L 109 de 22. 4. 1982), corrigiendo las Directivas 73/404/CEE y 73/405/CEE: Biodegradabilidad de los detergentes (*Diario Oficial de las Comunidades Europeas* n° L 347 de 17. 12. 1973).
- (6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreissertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fesenius-Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980) 406-408.

Anexo 1

Figura 1



A = recipiente de almacenaje  
B = mecanismo de administración  
C = cámara de aireación  
D = recipiente de sedimentación

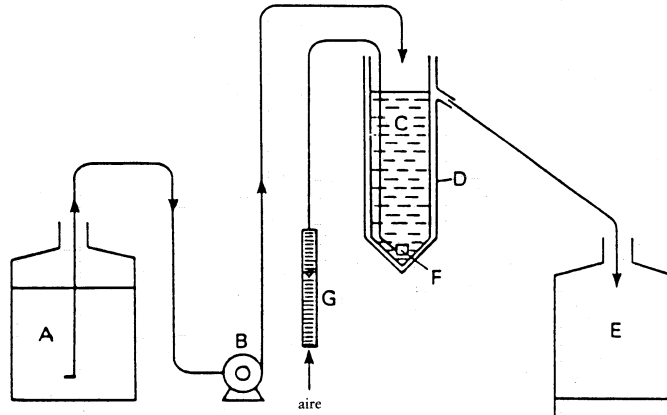
E = bomba de aire  
F = recipiente para recoger la sustancia  
G = aireador  
H = contador de corriente de aire (opcional).



Anexo 2

Figura 1

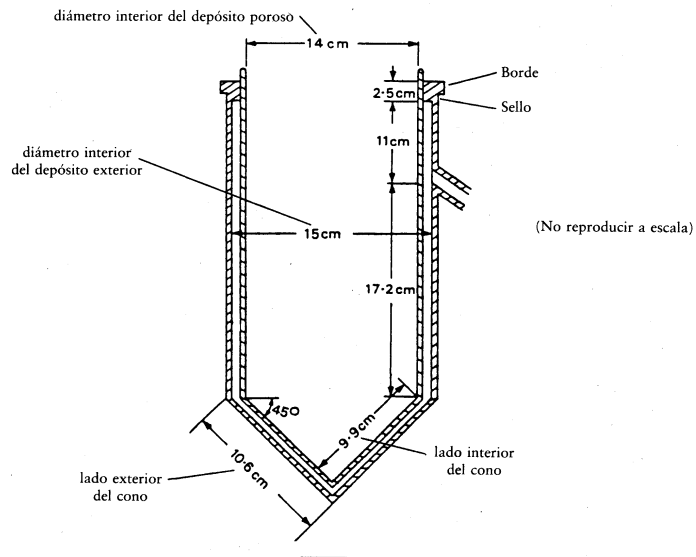
Equipo utilizado para valorar la biodegradabilidad



- A = recipiente de almacenaje
- B = bomba de administración
- C = recipiente de aireación poroso
- D = recipiente impermeable exterior
- E = recipiente para recoger el efluente
- F = aireador con piedra difusora
- G = contador de corriente (opcional).

Figura 2

Detalles del recipiente de aireación con depósito poroso de tres litros



Anexo 3

Condiciones de funcionamiento del ensayo de simulación con lodo activado

Márquese la respuesta en cada grupo

*Aparato*

confirmatorio OCDE  
depósito poroso


*Método de funcionamiento*

unidad sencilla  
unidades acopladas  
unidades no acopladas


*Transinoculación*

ninguna  
lodo activado  
sobrenadante


*Tiempo medio de retención*

3 horas  
6 horas


*Alimento de base*

aguas residuales domésticas  
aguas residuales sintéticas


*Inóculo*

efluente secundario  
compuesto  
lodo activado


*Adición del material de ensayo*

desde el principio  
incremento gradual  
tras la formación del lodo


*Análisis*

específico  
DQO  
COD




## C. 11

### BIODEGRADACIÓN

#### LODO ACTIVADO: PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA RESPIRACIÓN

#### 1. MÉTODO

##### 1.1. Introducción

El método descrito en este Anexo sirve para evaluar el efecto que la sustancia objeto de ensayo tiene sobre los microorganismos, midiendo la tasa de respiración en unas condiciones determinadas y en presencia de concentraciones diferentes de la misma.

El propósito de este método consiste en establecer un método de investigación rápido por el que se puedan identificar las sustancias que afectan de manera adversa a las plantas de tratamiento microbiano aeróbico, así como indicar las concentraciones no inhibitorias apropiadas de las sustancias objeto de ensayo que vayan a ser utilizadas en las pruebas de biodegradabilidad.

Una prueba preliminar puede realizarse antes de la prueba definitiva. Esta nos facilitará información acerca del rango de concentraciones que deben utilizarse en la prueba final.

Al proyectar la prueba se incluyen dos muestras control sin la sustancia objeto de ensayo, una al principio y otra al final de la serie de pruebas. Cada lote de lodo activado debe ser revisado utilizando una sustancia de referencia.

Este método es más fácilmente aplicable a sustancias que, debido a su solubilidad en agua y a su baja volatilidad, es probable que permanezcan en el agua.

Para sustancias con solubilidad limitada en el medio de prueba, puede que no sea posible la determinación del valor  $CE_{50}$ .

Cuando la sustancia de prueba es propensa a provocar la fosforilación oxidativa, los resultados basados en la disminución de oxígeno pueden conducir a conclusiones erróneas.

Para realizar el ensayo conviene disponer de la siguiente información:

- solubilidad en agua
- presión de vapor
- fórmula estructural
- pureza de la sustancia objeto del ensayo.

##### *Recomendación:*

El lodo activado puede contener organismos potencialmente patógenos; manéjese con cuidado.

##### 1.2. Definiciones y unidades

La tasa de respiración es el consumo de oxígeno que tiene lugar en el lodo activado en condiciones aerobias por los microorganismos procedentes de aguas residuales; se expresa generalmente en mg O<sub>2</sub> por mg de lodo en una hora.

Para poder calcular el efecto inhibitorio de una sustancia de prueba a una determinada concentración, la tasa de respiración se expresa como porcentaje de la media de las tasas de respiración de las dos muestras control.

$$\left(1 - \frac{2R_s}{R_{C1} + R_{C2}}\right) \times 100 = \text{porcentaje de inhibición}$$

donde:

$R_s$  = consumo de oxígeno de la sustancia de prueba a la concentración utilizada en el ensayo

$R_{C1}$  = consumo de oxígeno de la muestra control 1

$R_{C2}$  = consumo de oxígeno de la muestra control 2.

En este método el valor  $CE_{50}$  expresa la concentración de la sustancia de prueba en la que la tasa de respiración es el 50% de la obtenida en la muestra control, en las condiciones descritas en el método de ensayo.

1.3. Sustancias de referencia

Como sustancia de referencia, se recomienda utilizar 3,5-diclorofenol, conocido inhibidor de la respiración, efectuando una prueba para determinar el valor de  $CE_{50}$  en cada lote de lodo activado, a fin de comprobar que la sensibilidad del lodo no es anormal.

1.4. Principio del método

La tasa de respiración de un lodo activado alimentado con una cantidad estándar de agua residual sintética, se determina después de un tiempo de contacto de 30 minutos, o de tres horas, o de ambos. La tasa de respiración del mismo lodo activado se mide también en presencia de varias concentraciones de la sustancia de prueba y en condiciones idénticas. El efecto inhibitorio de la sustancia de prueba, a una determinada concentración, se expresa como porcentaje de la media de las tasas de respiración de dos muestras control. El valor de  $CE_{50}$  se calcula mediante determinaciones realizadas a diferentes concentraciones.

1.5. Criterios de calidad

Los resultados de la prueba son válidos si:

- las tasas de respiración de las muestras de control difieren una de la otra en menos de 15 %;
- el valor de  $CE_{50}$  (30 minutos y/o tres horas) del 3,5-diclorofenol está dentro de los límites aceptados de 5 a 30 mg/l.

1.6. Descripción del método

1.6.1. Reactivos

1.6.1.1. Soluciones de la sustancia de prueba

Las soluciones de la sustancia objeto del ensayo se preparan en el momento de comenzar el estudio, usando una solución madre. Para esta solución, es apropiada una concentración de 0,5 gr/l, si se sigue el procedimiento recomendado más abajo.

1.6.1.2. Solución de la sustancia de control

Puede prepararse por ejemplo una solución de 3,5-diclorofenol disolviendo 0,5 g de 3,5-diclorofenol en 10 ml de NaOH, 1 M, diluyendo esta mezcla con agua destilada hasta un volumen de 30 ml aproximadamente, añadiendo a continuación y a la vez que se agita  $H_2SO_4$  0,5 M hasta el punto de precipitación incipiente, para lo que se requieren 8 ml aproximadamente de  $H_2SO_4$  0,5 M, y finalmente diluyendo la mezcla con agua destilada hasta obtener un litro de solución. El pH de esta solución deberá estar entre 7 y 8.

1.6.1.3. Aguas residuales sintéticas

El agua residual sintética para alimentación de los lodos se obtiene disolviendo las siguientes cantidades de sustancias en un litro de agua:

- 16 g de peptona
- 11 g de extracto de carne
- 3 g de urea
- 0,7 g de NaCl
- 0,4 g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
- 0,2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 2,8 g de  $K_2HPO_4$ .

*Nota 1:* Estas aguas residuales sintéticas están 100 veces más concentradas que las descritas en el Informe Técnico de la OCDE, «Método propuesto para la determinación de la biodegradabilidad de los tensoactivos utilizados en los detergentes sintéticos» del 11 de junio de 1976; además se les añade fosfato bipotásico.

*Nota 2:* Si el medio así preparado no va a utilizarse inmediatamente, deberá conservarse en la oscuridad y a una temperatura de 0 a 4° C, durante un período que no exceda de una semana y en condiciones que no provoquen cambio alguno en su composición. También puede esterilizarse antes de su conservación, o bien añadir los extractos de peptona y carne poco antes de efectuar la prueba. Antes de utilizar la solución, deberá mezclarse a fondo y regular su pH.

1.6.2. Aparato de medida

El dibujo exacto no es crítico. Sin embargo, no debe quedar espacio en la cabeza y la muestra debe encajar herméticamente en el cuello del frasco de medida.

Se necesita un equipamiento normal de laboratorio y, especialmente, lo siguiente:

- aparato de medida
- dispositivo de aireación
- electrodo de pH y equipo de medida
- electrodo de  $O_2$ .

#### 1.6.3. Preparación del inóculo

El inóculo microbiano para esta prueba proviene del lodo activado procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales predominantemente domésticas.

Si es necesario, al volver al laboratorio, pueden eliminarse las partículas gruesas o grumos dejando sedimentar un poco, por ejemplo durante 15 minutos, y decantando la capa superior de sólidos más finos para su uso. También puede mezclarse el lodo con un mezclador durante algunos segundos.

Si se piensa que puede hallarse presente material inhibitor, deberá lavarse el lodo con agua corriente o con una solución isotónica. Después de centrifugar se decanta el sobrenadante (Este procedimiento se repite tres veces).

Seguidamente, se pesa y se seca una pequeña cantidad de lodo lavado. A partir de estos resultados, se puede calcular la cantidad de lodo húmedo que debe ser suspendida en agua para obtener un lodo activado con un rango de concentración de sólidos en suspensión de 2 a 4 gr/L. Este nivel supone una concentración entre 0,8 y 1,6 gr/l en el medio de prueba, si se sigue el procedimiento recomendado más adelante.

Si no pudiera utilizarse el lodo el mismo día en que se ha recogido, se añadirán 50 ml de aguas residuales sintéticas a cada litro de lodo activado que haya sido preparado como se describe anteriormente; esta mezcla se airea durante la noche a una temperatura de  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ , y se mantiene en estas condiciones durante el día, preparado para su utilización. Antes de utilizarlo, se comprueba el pH y, si es necesario, éste se ajusta hasta un valor de entre 6,0 y 8,0. El nivel de sólidos en suspensión se determina como se describe en el párrafo anterior.

Si en días posteriores (cuatro como máximo), es necesario utilizar el mismo lote de lodo, se le añaden 50 ml de aguas residuales sintéticas por litro de lodo al final de cada día de trabajo.

#### 1.6.4. Realización de la prueba

Duración/tiempo de contacto: 30 minutos y/o tres horas, tiempo durante el cual tiene lugar la aireación.

Agua: Agua potable (si es necesario, declorada).

Suministro de aire: Aire limpio, sin aceite. Caudal de aire de 0,5 a 1 litro/minuto.

Aparato de medida: Matraz de fondo plano, como por ejemplo, un frasco DBO (véase la figura 1).

Medidor de oxígeno: Electrodo de oxígeno adecuado, con un registrador.

Solución nutritiva: Aguas residuales sintéticas (véase más arriba).

Sustancia de prueba: La solución de prueba se prepara en el momento de comenzar la prueba.

Sustancia de referencia: Por ejemplo, 3,5-diclorofenol (tres concentraciones como mínimo).

Muestra de control: Muestra inoculada sin sustancia de prueba.

Temperatura:  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ .

A continuación se sugiere un procedimiento experimental, que puede seguirse para ambas sustancias, la de prueba y la de referencia, y para un período de contacto de tres horas:

Se utilizan varios recipientes (por ejemplo, vasos de precipitado de 1 litro).

Se usarán como mínimo cinco concentraciones, distanciadas por un factor constante que, preferiblemente, no exceda de 3,2.

A tiempo «O», se mezclan 16 ml de cultivo de aguas residuales sintéticas con agua, hasta obtener 300 ml, a los que se añaden 200 ml de inóculo microbiano, y la mezcla total (500 ml) se vierte en el primer recipiente (primera muestra de control,  $C_1$ ). Los recipientes de la prueba deberán airearse continuamente para asegurar que el  $\text{O}_2$  disuelto no se hace menor de 2,5 mg/l y que, justo antes de la medida de la tasa de respiración, la concentración de  $\text{O}_2$  deberá ser de unos 6,5 mg/l.

A los 15 minutos (15 minutos es un intervalo arbitrario, aunque conveniente), se repite el procedimiento anterior, con la diferencia de que, antes de añadir agua hasta llegar a 300 ml e inóculo microbiano hasta obtener un volumen de 500 ml, se añaden 100 ml de la solución madre de sustancia de prueba a los 16 ml de aguas residuales sintéticas. Seguidamente, esta mezcla se vierte en un segundo recipiente y se airea como se ha expuesto anteriormente. Este proceso se repite a intervalos de 15 minutos con diferentes volúmenes de solución madre de sustancia de prueba, para obtener una serie de recipientes que contengan concentraciones diferentes de la sustancia de prueba. Finalmente, se prepara una segunda muestra de control ( $C_2$ ).

Después de tres horas se mide el pH y se vierte bien mezclado el contenido del primer recipiente en el aparato de medida, en el que se mide la tasa de respiración durante un período de hasta 10 minutos.

Esta determinación se repite a intervalos de 15 minutos con el contenido de cada recipiente, de tal manera que el tiempo de contacto de cada recipiente sea de tres horas.

La sustancia de referencia se prueba en cada lote de inóculo microbiano siguiendo el mismo procedimiento.

Cuando vayan a tomarse las medidas después de 30 minutos de contacto, se necesitará un régimen diferente (por ejemplo, más de un medidor de oxígeno).

Cuando sea necesario medir el consumo químico de oxígeno, se preparan más recipientes que contengan la sustancia de prueba, el medio nutriente de aguas residuales sintéticas y agua, pero no lodo activado.

El consumo de oxígeno se mide y se registra después de un tiempo de aireación de 30 minutos y/o de tres horas (tiempo de contacto).

## 2. DATOS Y EVALUACIÓN

La tasa de respiración se calcula a partir del trazado del registrador en  $\text{mg O}_2/\text{l.h}$ , con valores aproximados de entre 6,5  $\text{mg O}_2/\text{l}$  y 2,5  $\text{mg O}_2/\text{l}$ , o cuando la tasa de respiración sea baja, durante un período de 10 minutos. La parte de la curva de respiración sobre la que se mide la tasa de respiración debe ser lineal.

Cuando las tasas de respiración de las dos muestras de control difieran en más del 15 por ciento o el valor de  $\text{CE}_{50}$  (30 minutos y/o tres horas) de la sustancia de referencia no quede dentro de la gama aceptada (de 5 a 30  $\text{mg/l}$  para el 3,5-diclorofenol), la prueba no será válida y deberá repetirse.

El porcentaje de inhibición se calcula para cada concentración de prueba como se ha descrito anteriormente, y se representa gráficamente en función de la concentración en un papel logarítmico normal (o logaritmo-probabilidad), para obtener el valor de  $\text{CE}_{50}$ .

Los límites de confianza del 95% de los valores de  $\text{CE}_{50}$  se pueden determinar usando procedimientos establecidos.

## 3. INFORMES

### 3.1. Informe de la prueba

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- sustancia de prueba: datos de identificación química
- sistema de prueba: fuente, concentración y cualquier tratamiento previo del lodo activado
- condiciones de la prueba:
  - pH de la mezcla de reacción antes de la medición de la respiración
  - temperatura de prueba
  - duración de la prueba
  - sustancia de referencia y su valor medido de  $\text{CE}_{50}$
  - absorción abiótica de oxígeno (si la hubiere)
- resultados:
  - todos los datos medidos
  - curva de inhibición y método para calcular el valor de  $\text{CE}_{50}$
  - valor de  $\text{CE}_{50}$  y, si es posible, límites de confianza del 95%,  $\text{CE}_{20}$  y  $\text{CE}_{80}$ .
  - todas las observaciones y cualquier desviación de este método de prueba que pueda haber influido sobre el resultado.

### 3.2. Interpretación de los datos

El valor de  $\text{CE}_{50}$  se considerará solamente como indicación de los probables efectos tóxicos de la sustancia de prueba sobre los microorganismos de aguas residuales o de depuración de lodo activado, si se tiene en cuenta que las complejas interacciones que ocurren en el medio ambiente no pueden ser simuladas con precisión de una prueba de laboratorio. Además, las sustancias de prueba que pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre la oxidación amónica pueden producir también curvas de inhibición atípicas. En razón de esto, dichas curvas deberán interpretarse con cautela.

4. REFERENCIAS

- (1) International Standard ISO 8192-1986.
- (2) Broecker, B., and Zahn, R., *Water Research* 11, 165 (1977).
- (3) Brown, D., Hitz, H. R., and Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 245 (1981).
- (4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No. 103*, also described by:
- (5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 80 (1976).
- (6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 247 (1977).
- (7) OCDE, Paris, 1981, *Directriz para pruebas 209*, Decisión del Consejo C(81) 30 final.

## C. 12

### BIODEGRADACIÓN

#### PRUEBA LASC MODIFICADA

#### 1. MÉTODO

##### 1.1. Introducción

El objetivo del método es la evaluación del potencial de biodegradabilidad última o total de sustancias orgánicas hidrosolubles y no volátiles, cuando se exponen a concentraciones relativamente altas de microorganismos durante un largo período de tiempo. Se mantiene durante este período la viabilidad de los microorganismos añadiendo diariamente una alimentación de aguas residuales decantadas. Para las necesidades del fin de semana, pueden almacenarse las aguas residuales a 4 ° C. Pueden emplearse como alternativa las aguas residuales sintéticas de la prueba de confirmación OCDE.

Puede producirse una absorción fisicoquímica sobre los sólidos en suspensión, y este hecho deberá tomarse en cuenta al interpretar los resultados (véase 3.2).

Debido al largo período de retención de la fase líquida (36 horas) y a la adición intermitente de nutrientes, la prueba no simula las condiciones reinantes en una planta depuradora de aguas residuales. Los resultados obtenidos con diversas sustancias de prueba indican que la prueba tiene un elevado potencial de biodegradación.

Las condiciones que la prueba establece son muy favorables a la selección y/o adaptación de microorganismos capaces de degradar el compuesto de prueba (El procedimiento puede utilizarse también para obtener inóculos aclimatados destinados a emplearse en otras pruebas).

En este método se emplea la medida de la concentración del carbono orgánico disuelto para evaluar la biodegradabilidad total de las sustancias de prueba. Resulta preferible determinar el COD por acidificación y purgado más que por la diferencia de  $C_{\text{total}} - C_{\text{inorgánico}}$ .

El empleo simultáneo de un método analítico específico puede permitir también evaluar la degradación primaria de la sustancia (desaparición de la estructura química madre).

El método sólo es aplicable a las sustancias orgánicas de prueba que, a la concentración empleada en la prueba,

- sean solubles en agua, (como mínimo, 20 mg de carbono orgánico disuelto/L)
- posean una presión de vapor despreciable
- no posean efecto inhibitor sobre las bacterias
- no se absorban significativamente dentro del sistema de prueba
- no escapen de la solución de prueba por formación de espumas.

Deberá determinarse el contenido de carbono orgánico del material de prueba.

Para interpretar los resultados obtenidos, será útil la información sobre las proporciones relativas de los principales componentes de la sustancia de prueba, particularmente en los casos para los que los resultados sean bajos o marginales.

Para la interpretación de resultados bajos y para la selección de una concentración de prueba idónea podrá ser útil la información sobre la toxicidad de la sustancia de prueba para los microorganismos.

##### 1.2. Definiciones de unidades

$C_T$  = concentración del compuesto de prueba como carbono orgánico presente o añadido a las aguas residuales sedimentadas al comienzo del período de aireación (mg/l).

$C_t$  = concentración del carbono orgánico disuelto, encontrada en el líquido sobrenadante de la prueba al término del período de aireación (mg/l)

$C_c$  = concentración del carbono orgánico disuelto, encontrada en el líquido sobrenadante del control al término del período de aireación (mg/l).

En este método, la biodegradación se define como la desaparición del carbono orgánico. La biodegradación puede expresarse como:

1. La eliminación porcentual  $D_{ad}$  de la cantidad de sustancia añadida diariamente:

$$D_{ad} = \frac{C_T - (C_t - C_e)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

$D_{ad}$  = degradación/adición diaria.

2. La eliminación porcentual  $D_{sid}$  de la cantidad de sustancia presente al inicio de cada día:

$$D_{sid} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{e(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2 a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_e)}{2C_T + (C_t - C_e)} \times 100 \quad [2 b)]$$

$D_{sid}$  = degradación/sustancia al inicio del día.

Donde los índices  $i$  y  $(i + 1)$  se refieren al día de la medición. Se recomienda la ecuación [2 a)] si el COD efluente varía de día a día, mientras que la ecuación [2 b)] puede emplearse cuando el COD efluente permanezca relativamente constante de un día para otro.

### 1.3. Sustancias de referencia

En algunos casos, al investigar una sustancia nueva, serán útiles las sustancias de referencia; sin embargo, no se recomienda en el método ninguna sustancia de referencia específica.

Se proporcionan los datos de diversos compuestos evaluados en pruebas efectuadas en varios laboratorios (véase Anexo 1). En principio esto puede ser llevado a cabo periódicamente como calibración del método y para comparar los resultados obtenidos cuando se emplea un método distinto.

### 1.4. Principio del método de la prueba

Se coloca en una unidad de lodo activado semicontinuo (LASC) lodo activado procedente de una planta depuradora de aguas residuales. Se añaden el compuesto de prueba y aguas residuales domésticas decantadas, aireándose la mezcla durante 23 horas. Se interrumpe entonces la aireación, permitiéndose que el lodo se deposite por sedimentación y retirándose el líquido sobrenadante.

Se mezcla a continuación el lodo que permanece en la cámara de aireación con una cantidad igual del compuesto de prueba y de aguas residuales, repitiéndose el ciclo.

La biodegradación se determina por el contenido en carbono orgánico disuelto del líquido sobrenadante. Se compara dicho valor con el obtenido en un tubo de control en el que se han introducido sólo aguas residuales decantadas.

Cuando se utiliza un método analítico específico, pueden medirse los cambios en la concentración de la molécula madre debidos a la biodegradación (biodegradabilidad primaria).

### 1.5. Criterios de calidad

No ha sido bien establecida aún la reproducibilidad de este método basado en la eliminación del carbono orgánico disuelto (Cuando se considera la biodegradación primaria, se obtienen datos muy precisos para las sustancias degradadas en gran medida).

La sensibilidad del método viene determinada en gran parte por la variabilidad del control y, en menor grado, por la precisión de la determinación del carbono orgánico disuelto y por el contenido del compuesto de prueba en el líquido al comienzo de cada ciclo.

### 1.6. Descripción del procedimiento de la prueba

#### 1.6.1. Preparativos

Se reúne un número suficiente de unidades limpias de aireación (también puede usarse alternativamente la unidad original de prueba LASC de 1,5 l) y de tubos de entrada de aire (figura 1) para cada sustancia de prueba y para los controles. El aire comprimido suministrado a las unidades de prueba, que se purifica pasándolo por un filtro de lana de algodón, debe hallarse exento de carbono orgánico y presaturado con agua, a fin de reducir las pérdidas por evaporación.

Se toma una muestra de líquido mixto, que contenga de 1 a 4 g de sólidos en suspensión por litro de una central depuradora de lodo activado en la que se depuren sobre todo aguas residuales domésticas. Para cada unidad de aireación se requieren aproximadamente 150 ml de líquido mixto.

Se preparan en agua destilada soluciones madre de la sustancia de prueba; la concentración exigida normalmente es de 400 mg/l como carbono orgánico, lo que supone una concentración del compuesto de prueba de 20 mg/l de carbono al inicio de cada ciclo de aireación, si no tiene lugar una biodegradación.

Pueden emplearse concentraciones más altas si la toxicidad frente a los microorganismos lo permite.

Se mide el contenido en carbono orgánico de las soluciones madre.

#### 1.6.2. *Condiciones de la prueba*

La prueba deberá llevarse a cabo a 20 a 25° C.

Se utiliza una concentración elevada de microorganismos aerobios (de 1 a 4 g/l de sólidos en suspensión), y el período efectivo de retención es de 36 horas.

La materia carbonada existente en las aguas residuales que sirven de alimentación resulta oxidada en gran medida, normalmente al cabo de 8 horas tras el inicio de cada ciclo de aireación. A continuación, el lodo respira endógenamente durante el resto del período de aireación, siendo entonces el compuesto de prueba el único sustrato disponible, a menos que éste resulte también rápidamente metabolizado. Estos factores, junto con el de la reinoculación diaria de la solución de prueba cuando se utilizan como medio aguas residuales domésticas, ofrecen condiciones muy favorables para que se produzcan la aclimatación y un alto grado de biodegradación.

#### 1.6.3. *Ejecución de la prueba*

Se toma una muestra de líquido mixto de una estación de depuración de lodo activado predominantemente de origen doméstico, o bien de un laboratorio, y se mantiene en condiciones aerobias hasta emplearla en el laboratorio. Se llena cada unidad de aireación, y la unidad de control, con 150 ml (si se utiliza la unidad original de prueba LASC, deben multiplicarse los volúmenes dados por 10) de líquido mixto, y se da inicio a la aireación. Transcurridas 23 horas, se interrumpe la aireación y se permite que el lodo sedimente durante 45 minutos. Se abre sucesivamente la espita de cada recipiente, y se retiran de cada uno 100 ml del líquido sobrenadante. Se toma, inmediatamente antes de su uso, una muestra de aguas residuales domésticas decantadas y se añaden 100 ml al lodo que permanece en cada unidad de aireación. Se vuelve a comenzar la aireación. En esta fase no se añaden sustancias de prueba, y las unidades se alimentan diariamente con aguas residuales domésticas sólo hasta que se obtenga un líquido sobrenadante transparente después de la decantación. El tiempo necesario para ello es por lo general de 2 semanas, transcurridas las cuales el carbono orgánico disuelto contenido en el líquido sobrenadante al término de cada ciclo de aireación se acerca a un valor constante.

Al término de este período, se mezclan los diferentes lodos decantados, y se añaden a cada unidad 50 mL del lodo compuesto resultante.

Se añaden 95 ml de aguas residuales decantadas y 5 ml de agua a las unidades control; por su parte, a las unidades de ensayo se añaden 95 ml de aguas residuales decantadas y 5 ml de la solución madre (400 mg/l) del compuesto en estudio. Se reinicia la aireación y se mantiene durante 23 horas. Se deja entonces que el lodo decante durante 45 minutos, recogiéndose a continuación el líquido sobrenadante y analizándose el mismo, a fin de establecer su contenido en carbono orgánico disuelto.

Se repite diariamente durante toda la duración de la prueba el procedimiento mencionado de llenado y recogida.

Antes de la sedimentación, puede resultar necesario limpiar las paredes de las unidades para impedir que se acumulen sólidos por encima del nivel de líquido. Se utiliza para cada unidad un raspador o un cepillo individual, a fin de impedir que se produzca una contaminación cruzada.

Idealmente, el carbono orgánico disuelto en los líquidos sobrenadantes se determinará diariamente, aunque puede permitirse una frecuencia menor de análisis. Antes de efectuar el análisis, se filtran los líquidos a través de filtros de membrana de 0,45 µm lavados o se centrifugan los mismos. Los filtros de membrana son adecuados si es seguro que ni liberan carbono ni absorben sustancia en la fase de filtración. La temperatura de la muestra no debe superar los 40 °C mientras se halle dentro de la centrífuga.

La duración de la prueba para compuestos con poca o ninguna degradación es indeterminada, pero la experiencia sugiere que generalmente debería alcanzar al menos 12 semanas, sin superar las 26.

## 2. DATOS Y EVALUACIÓN

Se representan en un diagrama frente al tiempo, los valores del carbono orgánico disuelto en los líquidos sobrenadantes de las unidades de prueba y de las unidades de control.

Según se va produciendo la biodegradación, el nivel encontrado en la muestra se aproximará al nivel del control. Una vez que la diferencia entre los dos niveles resulta constante para tres medidas consecutivas, se efectúa el número de medidas adicionales que sea suficiente para permitir el tratamiento estadístico de los datos, y se calcula con ellos la biodegradación porcentual del compuesto de prueba ( $D_{ad}$  o  $D_{sid}$ , véase 1.2).



### 3. INFORME

#### 3.1. Informe de la prueba

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

- toda la información sobre el tipo de aguas residuales, el tipo de unidad empleado y los resultados experimentales relativos a la sustancia probada, la sustancia de referencia (si se usa), y el control
- la temperatura
- la curva de eliminación, con descripción y método de cálculo (véase 1.2)
- la fecha y el emplazamiento donde se tomó la muestra del lodo activado y de las aguas residuales, el estado de adaptación, concentración, etc.
- razones científicas para efectuar cualquier modificación del procedimiento de la prueba
- firma y fecha.

#### 3.2. Interpretación de los resultados

Dado que la sustancia que deberá probarse con este método no será fácilmente biodegradable, toda eliminación del COD debida exclusivamente a la biodegradación será normalmente gradual, extendiéndose durante días o semanas, excepto en los casos en los que la aclimatación sea brusca, como indica una desaparición abrupta que tenga lugar tras algunas semanas.

Sin embargo, la absorción fisicoquímica puede jugar en ocasiones un papel importante; esto se apreciará cuando se produzca desde el principio una eliminación completa o parcial del COD añadido. Lo que sucede a continuación depende de factores tales como los grados de absorción y la concentración de sólidos en suspensión en la descarga del efluente. Generalmente, la diferencia entre las concentraciones del COD en los líquidos de control y en los líquidos sobrenadantes de la prueba se incrementa gradualmente a partir de un valor inicial bajo, permaneciendo a continuación con el nuevo valor durante el resto del experimento a menos que tenga lugar la aclimatación.

Si debe llevarse a cabo una distinción entre la biodegradación (o la biodegradación parcial) y la absorción, son necesarias otras pruebas. Estas pueden efectuarse de diversas maneras, pero la más convincente consiste en utilizar el líquido sobrenadante, o el lodo, como inóculo para una prueba de grupo base (preferiblemente una prueba respirométrica).

Las sustancias de prueba que produzcan una eliminación alta y no adsorptiva del COD en esta prueba deberán considerarse como potencialmente biodegradables. La eliminación parcial y no adsorptiva indica que el producto químico experimenta al menos algo de biodegradación.

Las eliminaciones bajas o nulas del COD pueden ser debidas a que la sustancia de prueba tiene efecto inhibitorio sobre los microorganismos, y esto puede quedar de manifiesto también por lisis y pérdida de lodo, produciéndose sobrenadantes turbios. En este caso, deberá repetirse la prueba empleando una concentración menor de la sustancia de prueba.

El empleo de un método analítico específico, o de una sustancia de prueba marcada con  $^{14}\text{C}$  puede proporcionar una mayor sensibilidad. En el caso del compuesto de prueba marcado con  $^{14}\text{C}$ , la recuperación de  $^{14}\text{CO}_2$  confirmará que ha tenido lugar la biodegradación.

Cuando los resultados se expresen también en términos de biodegradación primaria, deberá explicarse también, si ello es posible, el cambio en la estructura química que produce la pérdida de respuesta de la sustancia inicial de prueba.

Deberá indicarse la validación del método analítico junto con la respuesta encontrada con el medio del control.

### 4. REFERENCIAS

- (1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 302 A*, Decisión del Consejo C(81) 30 final.

Anexo 1

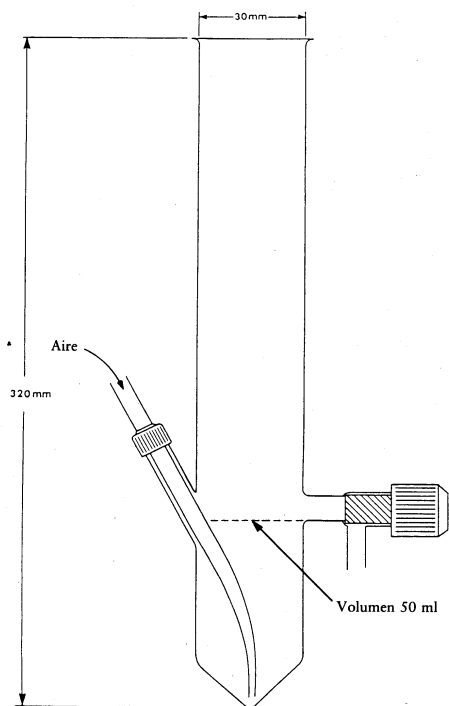
Prueba LASC: Ejemplo de resultados

Sustancia	$C_T$ (mg/l)	$C_i - C_c$ (mg/l)	Porcentaje de biodegradación ( $D_{99}$ )	Duración del ensayo (días)
4-acetil aminobenceno sulfonato	17,2	2,0	85,0	40
Tetra propilen benceno sulfonato	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenil	16,9	0,8	95,3	40
Dietil glicol	16,5	0,2	98,8	40
Anilina	16,9	1,7	95,9	40
Tetra ciclopentano carboxilato	17,9	3,2	81,1	120

Anexo 2

Ejemplo del aparato de ensayo

Figura 1



## C.13. BIOCONCENTRACIÓN: ENSAYO DINÁMICO CON PECES

### 1. MÉTODO

El presente método de bioconcentración reproduce las directrices de la OCDE TG 305 (1996).

#### 1.1 INTRODUCCIÓN

El presente método describe un procedimiento para caracterizar el potencial de bioconcentración de algunas sustancias en peces en condiciones dinámicas. Son preferibles los regímenes de ensayos dinámicos, pero los regímenes semiestáticos son también aceptables en la medida en que se satisfagan los criterios de validez.

El método da toda la información necesaria para la ejecución del ensayo pero deja libertad suficiente para la adaptación del diseño experimental a las condiciones específicas de cada laboratorio y para variar las características de las sustancias de ensayo. Conviene especialmente a los productos orgánicos estables cuyos valores de  $\log P_{ow}$  están entre 1,5 y 6,0 (1) pero también es aplicable a las sustancias superlipofílicas ( $\log P_{ow} > 6,0$ ). Para estas últimas, el valor estimado del factor de bioconcentración (FBC), a veces denominado  $K_B$ , será probablemente superior al valor del factor de bioconcentración en estado de equilibrio ( $FBC_{ss}$ ) que se puede esperar en un experimento de laboratorio. Pueden calcularse valores estimados del factor de bioconcentración de los productos orgánicos cuyos valores de  $\log P_{ow}$  llegan hasta alrededor de 9,0 con ayuda de la ecuación de Bintein et al. (2). El potencial de bioconcentración se caracteriza por algunos parámetros, como la constante de la velocidad de absorción ( $k_1$ ), la constante de la velocidad de depuración ( $k_2$ ) y el  $FBC_{ss}$ .

Puede facilitarse el análisis de las muestras de agua y de peces con ayuda de sustancias de ensayo radiomarcadas, que pueden también servir para definir si se deben identificar y cuantificar las sustancias degradadas. Si se miden los residuos radiactivos totales (por ejemplo, por combustión o disolución de los tejidos), el FBC se basará en el compuesto de origen, todos los metabolitos retenidos y el carbono asimilado. El FBC basado en los residuos radiactivos totales puede, entonces, no ser directamente comparable a un FBC derivado de un análisis químico específico exclusivamente del compuesto de origen.

Se podrán aplicar procedimientos de limpieza en los estudios radiomarcados para determinar el FBC sobre la base del compuesto de origen; los principales metabolitos se determinarán si se considera necesario. Es posible también combinar un estudio del metabolismo de los peces con un estudio de bioconcentración por análisis e identificación de los residuos en los tejidos orgánicos y *órganos*.

#### 1.2 DEFINICIONES Y UNIDADES

**La bioconcentración / bioacumulación** es el aumento de la concentración de la sustancia de ensayo en el interior o en la superficie de un organismo (en tejidos específicos de éste) en relación con la concentración de esta sustancia en el medio ambiente.

**El factor de bioconcentración** (FBC o  $K_B$ ) en cualquier momento durante la fase de absorción de este ensayo de acumulación es la concentración de la sustancia de ensayo en el pez, o en tejidos determinados de éste,  $C_f$ , expresada en  $\mu\text{g/g}$  (ppm) dividida por la concentración de la sustancia en el medio ambiente ( $C_w$ , expresada en  $\mu\text{g/ml}$  (ppm)).

**El factor de bioconcentración en estado de equilibrio** ( $FBC_{ss}$  o  $K_B$ ) no cambia notablemente durante un plazo de tiempo prolongado, al ser constante la concentración de la sustancia de ensayo en el medio ambiente durante este mismo período.

**Una meseta o estado de equilibrio**, en la representación gráfica de la concentración de sustancia de ensayo en el pez ( $C_f$ ) en función del tiempo, se alcanza cuando la curva se hace paralela al eje del tiempo y tres análisis sucesivos de  $C_f$  realizados con muestras tomadas a intervalos de, al menos, dos días presentan una diferencia máxima del  $\pm 20\%$  entre sí, y no hay diferencias significativas entre los tres períodos de muestreo. Cuando se analizan muestras puestas conjuntamente, es necesario proceder al menos a cuatro análisis sucesivos. Si las sustancias de ensayo son absorbidas con lentitud, se optará preferiblemente por intervalos semanales.

**Los factores de bioconcentración** calculados directamente a partir de las constantes cinéticas ( $k_1/ k_2$ ) se llaman factores de concentración cinéticos,  $FBC_K$ .

**El coeficiente de reparto octanol-agua** ( $P_{ow}$ ) es la relación entre la solubilidad de una sustancia en n-octanol y en agua, en equilibrio (método A.8); también se denomina  $K_{ow}$ . El logaritmo de  $P_{ow}$  indica el potencial de bioconcentración de una sustancia por los organismos acuáticos.

**La fase de exposición o de absorción** es el tiempo durante el cual se exponen los peces a la sustancia de ensayo.

**La constante de velocidad de absorción** ( $k_1$ ) es el valor numérico que define la velocidad de aumento de la concentración de la sustancia de ensayo en los peces del ensayo (o en tejidos específicos de estos) cuando se expone a esta sustancia ( $k_1$  se expresa en  $días^{-1}$ ).

**La fase de post-exposición o de depuración (pérdida)** es el tiempo, tras la transferencia de los peces de un medio que contiene la sustancia de ensayo a un medio libre de ésta, durante el cual se estudia la depuración (o pérdida neta) de la sustancia a partir de los peces del ensayo (o de los tejidos específicos).

**La constante de velocidad de depuración (pérdida)** ( $k_2$ ) es el valor numérico que define la velocidad de disminución de la concentración de la sustancia de ensayo en los peces del ensayo (o en tejidos específicos) tras su transferencia de un medio que contiene la sustancia de ensayo a un medio que está libre de ella ( $k_2$  se expresa en  $días^{-1}$ ).

### 1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo se divide en dos fases: la de exposición (absorción) y la de post-exposición (depuración). Durante la fase de absorción, se exponen grupos distintos de peces de una sola especie a al menos dos concentraciones de la sustancia de ensayo. Luego se transfieren a un medio libre de esta sustancia, para la fase de depuración. Esta última es siempre necesaria, excepto cuando la absorción de la sustancia durante la fase de absorción es poco importante (por ejemplo, si el FBC es inferior a 10). La concentración de la sustancia de ensayo en los peces (o tejidos específicos) se mide durante las dos fases del ensayo. Además de las dos concentraciones de ensayo, se mantiene un grupo testigo de peces en condiciones idénticas, salvo que no se exponen a la sustancia de ensayo. Esto sirve para relacionar los posibles efectos nocivos observados en el ensayo de bioconcentración con un grupo testigo correspondiente, y deducir las concentraciones de fondo de la sustancia de ensayo.

La fase de absorción dura 28 días salvo si se demuestra que el equilibrio se alcanza antes. Puede preverse la duración de la fase de absorción y el tiempo necesario para la obtención del estado de equilibrio gracias a la ecuación del Anexo 3. El período de depuración comienza entonces con la transferencia de los peces a otro recipiente limpio que contiene el mismo medio, pero esta vez sin la sustancia de ensayo. Cuando sea posible, se calculará el factor de bioconcentración preferiblemente como *relación entre* ( $FBC_{ss}$ ) de la concentración en los peces ( $C_p$ ) y en el agua ( $C_w$ ) en el estado de equilibrio aparente y también como factor de bioconcentración cinético,  $FBC_K$ , que es la *relación entre* las constantes de velocidad de absorción ( $k_1$ ) y de depuración ( $k_2$ ), suponiendo una cinética de primer orden. Si es evidente que no se sigue una cinética de primer orden, deberán aplicarse modelos más complejos (Anexo 5).

Si no se llega a un estado de equilibrio en el plazo de 28 días, la fase de absorción se prolongará hasta alcanzar este estado de equilibrio, o durante 60 días si esto supone un plazo menor; luego comenzará la fase de depuración.

La constante de la velocidad de absorción, la constante de la velocidad de depuración (pérdida) (o las constantes, cuando entren en juego modelos más complejos), el factor de bioconcentración y, si es posible, los *intervalos* de confianza de cada uno de estos parámetros, se calculan a partir del modelo que describa mejor las concentraciones medidas de la sustancia de ensayo en los peces y en el agua.

El FBC se expresa en función del peso total húmedo de los peces. Sin embargo, para algunos estudios pueden utilizarse tejidos u órganos específicos (p. ej., músculos, hígado) si los peces son suficientemente grandes o si es posible separar las partes comestibles (filetes) y no comestibles (vísceras). Como hay una clara relación entre el potencial de bioconcentración y la lipofilia de numerosas sustancias orgánicas, también hay una relación correspondiente entre el contenido en lípidos de los peces del ensayo y las bioconcentraciones observadas de estas sustancias. Así pues, para reducir esta fuente de variabilidad en los resultados de los ensayos relativos a las sustancias con fuerte lipofilia (es decir, con  $\log P_{ow} > 3$ ), la bioconcentración debe expresarse en función del contenido lipídico, además del peso corporal total.

El contenido lipídico se establecerá, si es posible, con los mismos materiales biológicos que se utilicen para determinar la concentración de la sustancia de ensayo.

#### 1.4 INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Antes de emprender el ensayo de bioconcentración, deberán reunirse los datos siguientes respecto a la sustancia de ensayo:

- a) solubilidad en el agua
- b) coeficiente de reparto octanol-agua  $P_{ow}$  (denominado también  $K_{ow}$ , determinado por un método de CLAR en A.8)
- c) hidrólisis
- d) características de fototransformación en el agua bajo irradiación solar natural o artificial y en las condiciones de irradiación del ensayo de bioconcentración (3)
- e) tensión superficial (para las sustancias cuyo  $\log P_{ow}$  no pueda determinarse)
- f) presión de vapor
- g) biodegradabilidad «fácil» (en su caso)

Será necesario también conocer la toxicidad relativa a la especie de peces utilizada en el ensayo, preferiblemente la CL50 asintótica (es decir, independiente del tiempo). Es indispensable disponer de un método analítico correcto, de una exactitud, de una precisión y de una sensibilidad conocidas para la cuantificación de la sustancia de ensayo en las soluciones de ensayo y en el material biológico, así como de datos precisos sobre la preparación y la conservación de las muestras. Es necesario también conocer el límite de detección analítica de la sustancia de ensayo tanto en el agua como en los tejidos de los peces. Si se utiliza una sustancia de ensayo marcada con  $^{14}\text{C}$ , deberá conocerse el porcentaje de radiactividad asociada a las impurezas.

#### 1.5 CONDICIONES DE VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que un ensayo sea válido, deberán darse las condiciones siguientes:

- la variación de temperatura será inferior a  $\pm 2^\circ\text{C}$ ;
- la concentración de oxígeno disuelto no caerá por debajo del 60 % del nivel de saturación;
- la concentración de la sustancia de ensayo en los *recipientes o armarios* se mantendrá en la banda del  $\pm 20$  % de la media de los valores medidos durante la fase de absorción;
- la mortalidad y otros efectos adversos o enfermedades tanto entre los peces testigo como entre los tratados serán inferiores al 10 % al final del ensayo; cuando el ensayo se prolongue a lo largo de varias semanas o meses, la mortalidad y los otros efectos adversos en los dos conjuntos de peces deberán ser inferiores al 5 % al mes y no exceder del 30 % en total.

#### 1.6 COMPUESTOS DE REFERENCIA

La utilización de compuestos de referencia con un potencial de bioconcentración conocido podrá ayudar al control del procedimiento experimental, en caso necesario. No se puede aún, sin embargo, recomendar ninguna sustancia específica.

#### 1.7. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

##### 1.7.1 **Equipo**

Se tendrá cuidado de evitar los materiales que puedan presentar fenómenos de disolución, sorción o lixiviación o tener algún efecto adverso sobre los peces, y esto en todas las partes del equipo. Se utilizarán tanques normales rectangulares o cilíndricos, de materiales químicamente inertes y de una capacidad adaptada a la tasa de carga. Se reducirá al mínimo el uso de tubos de plástico flexible. Serán preferibles los tubos de teflón (R), acero inoxidable o vidrio. La experiencia pone de manifiesto que para las sustancias que presentan fuertes

coeficientes de adsorción, como los piretroides sintéticos por ejemplo, pudiera ser necesario el vidrio silanizado. Será necesario, en estos casos, deshacerse de los equipos una vez usados.

### 1.7.2 Agua

Se utiliza generalmente para el ensayo un agua natural procedente de una fuente no contaminada y de calidad uniforme. El agua de dilución debe ser tal que permita la supervivencia de la especie de peces elegida, durante los períodos de aclimatación y de ensayo, sin que aparezcan ningún comportamiento ni aspecto anormales. Idealmente, se debería demostrar que las especies sometidas al ensayo pueden sobrevivir, crecer y reproducirse en el agua de dilución (p. ej., mediante cría en laboratorio o un estudio de toxicidad sobre un ciclo biológico). El agua se caracterizará al menos por su pH, dureza, materia sólida total, carbono orgánico total y también, preferentemente, su contenido en amoníaco y en nitratos, su alcalinidad y, para las especies marinas, su salinidad. Se conocen perfectamente los parámetros importantes para el bienestar óptimo de los peces, pero el Anexo 1 indica las concentraciones máximas recomendadas de una serie de parámetros relativos al agua de ensayo, dulce y salada.

Durante toda la duración de un ensayo, el agua tendrá calidad constante. El pH se mantendrá entre 6,0 y 8,5, pero durante un ensayo dado permanecerá dentro de una gama de  $\pm 0,5$  unidades de pH. Para garantizar que el agua de dilución no influye indebidamente en los resultados del estudio (por ejemplo, por complejación de la sustancia de ensayo) ni afecta negativamente al comportamiento de las poblaciones de peces, se tomarán regularmente muestras para análisis. Cuando se sepa que un agua de dilución es de calidad relativamente constante, convendrá proceder, por ejemplo cada tres meses, a la determinación de los metales pesados (p. ej., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), aniones y cationes principales (p. ej., Ca, Mg, Na, K, Cl, SO<sub>4</sub>), plaguicidas (p. ej., organofosforados totales y organoclorados totales), carbono orgánico total y sólidos en suspensión. Si se demuestra que la calidad del agua es constante al menos durante un año, estos análisis podrán ser menos frecuentes y sus intervalos más espaciados (p. ej., cada seis meses).

El contenido en partículas naturales así como el carbono orgánico total (COT) del agua de dilución será lo más bajo posible para evitar la adsorción de la sustancia de ensayo en la materia orgánica, lo que podría reducir su biodisponibilidad (4). El valor máximo admisible es de 5 mg/l para las partículas (materia seca que no atraviesa un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ ) y 2 mg/l para el carbono orgánico total (véase el Anexo 1). En caso necesario, el agua se filtrará antes de usarse. La aportación de los peces (excretas) y de los residuos alimentarios al contenido del agua en carbono orgánico deberá ser lo más baja posible. A lo largo del ensayo, la concentración de carbono orgánico en el recipiente del ensayo no deberá sobrepasar en más de 10 mg/l ( $\pm 20\%$ ) la del carbono orgánico procedente de la sustancia de ensayo y, en su caso, del agente de disolución.

### 1.7.3 Soluciones de ensayo

Se prepara una solución madre de la sustancia de ensayo, a una concentración adecuada. La solución madre será preparada preferiblemente por simple mezcla o agitación de la sustancia de ensayo en el agua de dilución. No se recomienda la utilización de disolventes o de dispersantes (agentes de disolución); se puede recurrir a ellos, sin embargo, en algunos casos para obtener una solución madre de la concentración necesaria. Los disolventes que pueden utilizarse son el etanol, el metanol, el éter monometílico de etilenglicol, el éter dimetílico de etilenglicol, la dimetilformamida y el trietilenglicol. Los dispersantes utilizables son Cremaphor RH40, Tween 80, metilcelulosa al 0,01 % y HCO-40. Se tomarán precauciones en caso de utilización de agentes fácilmente biodegradables, ya que estos pueden causar problemas de crecimiento bacteriano en los ensayos dinámicos. La sustancia de ensayo puede ir radiomarcada y deberá ser del nivel más alto de pureza (p. ej., preferiblemente  $> 98\%$ ).

Para los ensayos dinámicos, un equipo aportará y diluirá continuamente la solución madre de la sustancia de ensayo (p. ej., bomba dosificadora, diluyente proporcional, sistema saturador) para conseguir las concentraciones de ensayo en los recipientes. Será preferible prever al menos cinco volúmenes de sustitución al día para cada recipiente de ensayo. Se preferirá el método dinámico, pero en caso de imposibilidad (p. ej., cuando los organismos del ensayo sufran efectos adversos) podrá aplicarse una técnica semiestática si siguen cumpliéndose los criterios de validez. Los regímenes de flujo de las soluciones madre y del agua de dilución se controlarán 48 horas antes del ensayo y luego al menos diariamente durante éste. Este control incluirá la determinación del flujo en cada recipiente de ensayo y garantizará que dicho flujo no varía en más del 20 % dentro de cada recipiente ni entre recipientes distintos.

### 1.7.4 Selección de las especies

Entre los criterios importantes de selección de las especies figuran el que sean de fácil disponibilidad, que puedan obtenerse de los tamaños adecuados y que puedan mantenerse satisfactoriamente en el laboratorio. Otros criterios de selección de las especies de peces son su importancia recreativa, comercial o ecológica, así como una sensibilidad comparable, haber producido buenos resultados anteriormente, etc.

En el Anexo 2 figura una lista de especies recomendadas para los ensayos. Pueden utilizarse otras especies pero es posible entonces tener que adaptar el procedimiento de ensayo para obtener condiciones experimentales convenientes. En tal caso, se expondrá la motivación de la elección de las especies y el método experimental elegido.

#### 1.7.5 **Mantenimiento de los peces**

Es necesario aclimatar la población de peces durante dos semanas al menos en agua a la temperatura del ensayo y aportar una cantidad de comida suficiente y del mismo tipo que se vaya a utilizar durante el ensayo.

Después de un período de *climatización* de 48 horas, se registra la mortalidad y se aplican los criterios siguientes:

- mortalidad superior al 10 % de la población en siete días: se rechaza el lote entero;
- mortalidad entre el 5 y el 10 % de la población en siete días: se prolonga la aclimatación durante siete días más ;
- mortalidad inferior al 5 % de la población en siete días: se acepta el lote; si la mortalidad sobrepasa el 5 % durante los siete días siguientes, se rechaza el lote entero.

Hay que asegurarse de que los peces utilizados para los ensayos no presentan enfermedades ni anomalías observables. Se descartan todos los peces enfermos. Los peces no deben recibir tratamiento contra ninguna enfermedad durante las dos semanas que preceden al ensayo ni durante éste.

### 1.8. REALIZACIÓN DEL ENSAYO

#### 1.8.1 **Ensayo preliminar**

Puede ser útil proceder a una experimentación preliminar para optimizar las condiciones de realización del ensayo definitivo, como, por ejemplo, la selección de las concentraciones de la sustancia de ensayo o la duración de las fases de absorción y de depuración.

#### 1.8.2 **Condiciones de exposición**

##### 1.8.2.1 *Duración de la fase de absorción*

Se puede prever la duración de la fase de absorción basándose en la experiencia práctica (p. ej., a partir de un estudio previo o de un producto químico que tenga propiedades similares de acumulación) o a partir de algunas relaciones empíricas fundadas en el conocimiento de la solubilidad en el agua o del coeficiente de reparto octanol / agua de la sustancia de ensayo (véase el Anexo 3).

La fase de absorción durará 28 días salvo si puede demostrarse que se alcanza antes el equilibrio. Si no se llega al estado de equilibrio en el plazo de 28 días, se prolongará la fase de absorción y se procederá a otras mediciones hasta conseguir el estado de equilibrio, o durante 60 días si esto supone un plazo menor.

##### 1.8.2.2 *Duración de la fase de depuración*

La mitad de la duración de la fase de absorción es generalmente suficiente para que se produzca una reducción conveniente (p. ej., 95 %) de la carga corporal de la sustancia de ensayo (véanse las explicaciones del cálculo en el Anexo 3). Si el tiempo necesario para llegar a una pérdida del 95% es excesivamente largo, sobrepasando por ejemplo dos veces la duración normal de la fase de absorción (es decir, más de 56 días), se podrá utilizar un período más corto (hasta que la concentración de la sustancia de ensayo sea inferior al 10 % de la concentración en el estado de equilibrio). Sin embargo, para las sustancias con propiedades de absorción y depuración más complejas que el modelo de peces con un único compartimento, que da una cinética de primer orden, se aplicarán fases de depuración más largas para determinar las constantes de la velocidad de pérdida. Sin embargo, este plazo de tiempo puede regirse por el período durante el cual la concentración de la sustancia de ensayo en los peces permanece por encima del límite de detección analítico.

### 1.8.2.3 *Número de peces del ensayo*

El número de peces por concentración del ensayo debe elegirse de modo que, como mínimo, se disponga de cuatro peces por muestra en cada muestreo. Si se desea una estadística más fina, deberá aumentar el número de peces por muestra.

Si se utilizan peces adultos, hay que indicar si son machos o hembras o si se utilizan los dos sexos en el experimento. En este último caso, antes de empezar la exposición, será necesario comprobar que no son significativas las diferencias de contenido lipídico entre sexos; podrá ser necesario reunir todos los machos y todas las hembras.

En todos los ensayos se elegirán peces de peso similar, de modo que el peso del más pequeño no sea inferior a dos tercios del peso del mayor. Pertenecerán a la misma clase de edad y procederán de la misma fuente. Dado que, al parecer, el peso y la edad de un pez tienen a veces efectos notables sobre los valores de FBC (1), estos datos se registrarán con precisión. Se recomienda pesar una submuestra de la población de peces antes del ensayo, para calcular el peso medio.

### 1.8.2.4 *Carga*

Se utiliza una relación elevada agua/peces con el fin de minimizar la reducción de  $C_w$  debida a la *introducción* de los peces al principio del ensayo, y también para evitar el descenso de la concentración de oxígeno disuelto. Es importante que la tasa de carga sea adaptada a la especie utilizada para el ensayo. De todos modos, se recomienda una tasa de carga de 0,1-1,0 g de peces (peso húmedo) por litro de agua al día. Se pueden realizar cargas de tasa elevada si se demuestra que la concentración requerida de sustancia de ensayo puede mantenerse en la banda del  $\pm 20\%$ , y que la concentración de oxígeno disuelto no cae por debajo del 60 % del nivel de saturación.

Se tendrá en cuenta el hábitat normal de la especie de peces al elegir la tasa de carga. Los peces bentónicos, por ejemplo, pueden necesitar un acuario que tenga más superficie de fondo que las especies pelágicas, para un mismo volumen de agua.

### 1.8.2.5 *Alimentación*

Durante los períodos de aclimatación y de ensayo, se alimentará a los peces con una dieta conveniente que tenga un contenido conocido en lípidos y proteínas totales, en cantidades suficientes para mantenerlos en buena salud y conservar el peso corporal. Se alimentará a los peces diariamente durante los períodos de aclimatación y de ensayo en la proporción de alrededor del 1 ó 2 % del peso corporal cada día; se mantiene así en la mayoría de las especies una concentración lipídica de un nivel relativamente constante durante el ensayo. La cantidad de comida deberá volver a calcularse una vez por semana, por ejemplo, con el fin de mantener constantes el peso corporal y el contenido lipídico. Para este cálculo, el peso de los peces de cada recinto de ensayo se evaluará a partir del peso de los peces muestreados últimamente en ese recinto. No hay que pesar los peces que permanecen en el recinto.

La comida no consumida y los excrementos son evacuados de los recintos de ensayo mediante sifón cada día poco después de la alimentación (30 minutos a una hora). Los *recipientes* se tendrán lo más limpios posible a lo largo del ensayo de modo que la concentración de materia orgánica permanezca al nivel más bajo posible, puesto que la presencia de carbono orgánico puede limitar la biodisponibilidad de la sustancia de ensayo. (1)

Como muchos alimentos son derivados de harinas de pescado, se analizarán para determinar su contenido en sustancia de ensayo. Es conveniente también analizar el contenido de estos alimentos en plaguicidas y metales pesados.

### 1.8.2.6 *Iluminación y temperatura*

El período de iluminación es generalmente de 12 a 16 horas y la temperatura ( $\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ ) corresponderá a la especie utilizada (véase el Anexo 2). Se definirán claramente el tipo y las características de la iluminación. Será necesario prestar atención a la posible fototransformación de la sustancia de ensayo en las condiciones de irradiación del estudio. Se utilizará un alumbrado adecuado que no exponga a los peces a fotoproductos no naturales. En algunos casos, puede ser conveniente utilizar un filtro para eliminar los rayos UV por debajo de 290 nm.



#### 1.8.2.7 *Concentraciones del ensayo*

Se exponen los peces en condiciones dinámicas uaa dos concentraciones al menos de la sustancia de ensayo en agua. Normalmente, la concentración más alta de la sustancia de ensayo será de cerca del 1 % de su CL50 aguda asintótica, y al menos 10 veces superior a su límite de detección en el agua por el método de análisis elegido.

La concentración más alta del ensayo puede establecerse también dividiendo la CL50 a 96 horas por una relación adecuada aguda/crónica (las relaciones adecuadas de algunos productos químicos pueden ir de 3 a 100). Si es posible, la otra u otras concentraciones deben elegirse de modo que la diferencia con la antes citada alcance un factor de diez. En caso de imposibilidad debido al criterio del 1% de la CL50 y del límite analítico, podrá utilizarse un factor inferior a diez o se pensará en el uso de una sustancia radiomarcada con <sup>14</sup>C. Ninguna concentración podrá superar la solubilidad en *agua* de la sustancia de ensayo.

Cuando se utilice un agente de disolución, su concentración no deberá sobrepasar 0,1 ml/l y deberá ser idéntica en todos los recipientes del ensayo. Debe conocerse su contribución, junto con la de la sustancia de ensayo, al contenido global de carbono orgánico en el agua del ensayo. Sin embargo, se hará todo lo posible para evitar recurrir a este tipo de materiales.

#### 1.8.2.8 *Controles*

Se utilizará un control (testigo) del agua de dilución o, en su caso, un control con el agente de disolución, además de la serie de ensayo, en la medida en que se haya establecido que el agente no tiene ningún efecto sobre los peces. n caso contrario, se establecerán ambos controles.

### 1.8.3 **Frecuencia de las medidas de la calidad del agua**

Durante el ensayo se medirán en todos los recipientes el oxígeno disuelto, el COT, el pH y la temperatura. La dureza total, y la salinidad eventualmente, se medirán en los controles y en un recipiente que contenga la concentración más alta. Por lo menos, el oxígeno disuelto y eventualmente la salinidad se medirán tres veces - al principio, hacia el medio y al final del período de absorción - y una vez por semana durante el período de depuración. El COT se medirá al principio del ensayo (24 y 48 horas antes del comienzo de la fase de absorción), antes de la adición de los peces y al menos una vez por semana durante los períodos de absorción y de depuración. La temperatura se medirá diariamente, el pH al principio y al final de cada período y la dureza una vez en cada ensayo. La temperatura se medirá preferiblemente de forma continua en un recipiente al menos.

### 1.8.4 **Muestreo y análisis de los peces y del agua**

#### 1.8.4.1 *Calendario de muestreo de los peces y del agua*

Se tomará agua de los *recipientes* de ensayo para determinar la concentración de la sustancia de ensayo antes de la *introducción* de los peces y durante las fases de absorción y de depuración. Por lo menos, el agua se tomará al mismo tiempo que los peces y antes de darles de comer. Durante la fase de absorción, se determinarán las concentraciones de sustancia de ensayo para comprobar que satisfacen los criterios de validez.

Se muestrearán los peces en cinco ocasiones al menos durante la fase de absorción y en cuatro ocasiones al menos durante la fase de depuración. Como a veces es difícil calcular una estimación razonablemente precisa del FBC a partir de este número de muestras, en particular cuando hay una cinética de depuración distinta de la simple de primer orden, puede ser recomendable muestrear con mayor frecuencia en los dos períodos (véase el Anexo 4). Las muestras suplementarias se conservarán y analizarán solamente si los resultados de la primera serie de análisis se revelan insuficientes para el cálculo del FBC con la precisión requerida.

En el Anexo 4 se encuentra un ejemplo de calendario de muestreo aceptable. Pueden establecerse otros calendarios fácilmente sobre la base de otros valores supuestos del  $P_{ow}$  para calcular el tiempo de exposición que corresponde a una absorción del 95 %.

Se prosigue el muestreo durante la fase de absorción hasta el establecimiento de un estado de equilibrio o durante 28 días, si esto supone un plazo menor. Si no se llega a un estado de equilibrio en 28 días, el muestreo continúa hasta la obtención de un estado de equilibrio o durante 60 días, si esto supone un plazo menor. Antes de empezar la fase de depuración, se trasladan los peces a los tanques limpios.

#### 1.8.4.2 *Muestreo y preparación de las muestras*

Se toman las muestras de agua destinadas a los análisis, por ejemplo mediante sifonado a través de un tubo inerte desde un punto central del recinto de ensayo. Puesto que parece que no siempre se puede separar ni por centrifugación ni por filtración la fracción no biodisponible de la sustancia de ensayo de la que es biodisponible (en particular en el caso de los productos químicos superlipofílicos, es decir, que tienen un  $\log P_{ow} > 5$ ) (1) (5), las muestras pueden no someterse a estos tratamientos.

En su lugar, será necesario procurar que los tanques se mantengan lo más limpios posible y que el contenido en carbono orgánico total se mida a lo largo de las fases de absorción y de depuración.

Se toma un número conveniente de peces (normalmente cuatro como mínimo) de cada *recipiente* de ensayo en cada momento de muestreo. Los peces tomados se lavan rápidamente con agua, se secan con material absorbente, y se sacrifican instantáneamente de la manera más adecuada e incruenta posible, y luego se pesan.

Es preferible analizar los peces y el agua inmediatamente después del muestreo para evitar toda degradación u otras pérdidas y para calcular aproximadamente las tasas de absorción y de depuración mientras el ensayo continúa. El análisis inmediato evita también retrasos en la determinación del momento en que se alcanza una meseta.

A falta de un análisis inmediato, las muestras se conservan según un método conveniente. Antes del principio del estudio, se reunirá información sobre el método de conservación adecuado de la sustancia de ensayo correspondiente como, por ejemplo, congelación, mantenimiento a 4°C, duración de la conservación, extracción, etc.

#### 1.8.4.3 *Calidad del método analítico*

Como la totalidad del procedimiento se regula principalmente por la exactitud, la precisión y la sensibilidad del método analítico utilizado para la sustancia de ensayo, es necesario controlar experimentalmente que la precisión y la reproducibilidad del análisis químico, así como la recuperación de la sustancia de ensayo tanto en el agua como en los peces son satisfactorias en el método particular. Ha de comprobarse también que la sustancia de ensayo no es detectable en el agua de dilución utilizada.

En caso necesario, los valores de  $C_w$  y  $C_f$  derivados de los ensayos se corregirán a la luz de los valores de recuperación y de fondo de los controles. Las muestras de peces y de agua se manejan permanentemente para minimizar las contaminaciones y las pérdidas (derivadas, p. ej., de la adsorción por el equipo de muestreo).

#### 1.8.4.4 *Análisis de los peces muestreados*

Si se utilizan para el ensayo materiales radiomarcados, se puede analizar el marcado radiactivo total (es decir, compuestos de origen y metabolitos) o se pueden purificar las muestras de modo que sea posible analizar separadamente los compuestos de origen. Por otro lado, los principales metabolitos pueden caracterizarse en el estado de equilibrio o al final de la fase de absorción, si esto supone un plazo menor. Si el FBC en términos de residuos radiomarcados totales es  $\geq 1000 \%$ , puede ser bueno (y, para algunas categorías de productos químicos como los plaguicidas, muy recomendable), identificar y cuantificar los productos de degradación que representen  $\geq 10 \%$  de los residuos totales en los tejidos de los peces en el estado de equilibrio. Si estos productos que representan  $\geq 10 \%$  de los residuos totales radiomarcados en los tejidos de peces se identifican y cuantifican, se recomienda entonces identificarlos y cuantificarlos también en el agua del ensayo.

La concentración de la sustancia de ensayo debería generalmente determinarse en cada pez pesado aparte. Si eso no es posible, se podrán poner conjuntamente las muestras en cada muestreo, pero esta mezcla limita los procedimientos estadísticos que pueden aplicarse a los datos. Si se desean un procedimiento y una potencia estadísticos específicos, convendrá entonces *utilizar* en el ensayo un número adecuado de peces para conciliar el procedimiento de mezcla con la precisión estadística deseada. (6) (7).

El FBC se expresará en función del peso húmedo total y también, en caso de sustancias muy lipofílicas, en función del contenido lipídico. El contenido lipídico de los peces se determina si es posible en cada muestreo. Se utilizarán métodos adaptados para determinar el contenido en lípidos (Ref. 8 y 2 del Anexo 3). Se puede recomendar la técnica de extracción por cloroformo/metanol como método normal (9). Los diversos métodos no dan valores idénticos (10), por lo que es importante precisar bien el método utilizado. El análisis de los lípidos se hará, si es posible, con el mismo extracto que el, destinado al análisis de la sustancia de ensayo, puesto que los lípidos deben a menudo retirarse del extracto antes de que éste se pueda analizar por cromatografía. El contenido lipídico de los

peces (en mg/kg de peso húmedo) al final del *experimento* no debería separarse de la del principio en más del  $\pm 25$  %. El porcentaje en sólidos de los tejidos también se indicará para permitir la conversión de la concentración lipídica de peso húmedo a la de peso seco.

## 2. DATOS

### 2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

La curva de absorción de la sustancia de ensayo se obtiene representando su concentración en los peces (o tejidos específicos) durante la fase de absorción en función del tiempo, con una escala aritmética. Si la curva alcanza una meseta, es decir, adopta aproximadamente una disposición asintótica al eje del tiempo, se calculará del siguiente modo el  $FBC_{ss}$  en el estado de equilibrio:

$$\frac{C_f \text{ en estado de equilibrio (media)}}{C_w \text{ en estado de equilibrio (media)}}$$

Cuando no se llega a ningún estado de equilibrio, es posible calcular un  $FBC_{ss}$  de una precisión suficiente para la evaluación de los riesgos a partir de un "estado de equilibrio" al 80 % ( $1,6/k_2$ ) o 95 % ( $3,0/k_2$ ) del equilibrio.

También se determina el factor de concentración ( $FBC_K$ ) como la relación de  $k_1/k_2$ , las dos constantes cinéticas de primer orden. La constante de la velocidad de depuración ( $k_2$ ) se determina generalmente a partir de la curva de depuración (es decir, representación de la disminución de la concentración de la sustancia de ensayo en los peces en función del tiempo). La constante de la velocidad de absorción ( $k_1$ ) se calcula entonces en función de  $k_2$  y de un valor de  $C_f$  derivado de la curva de absorción (véase también el Anexo 5). El método de elección para obtener  $FBC_K$  y las constantes de velocidad  $k_1$  y  $k_2$  es recurrir a métodos informáticos de estimación de parámetros no lineales (11). Alternativamente, se pueden utilizar métodos gráficos para calcular  $k_1$  y  $k_2$ . Si la curva de depuración es evidentemente de orden distinto del primero, entonces convendrá utilizar modelos más complejos (véanse referencias en el Anexo 3) y buscar el consejo de un bioestadístico. entonces convendrá utilizar modelos más complejos (véanse referencias en el Anexo 3) y buscar el consejo de un bioestadístico.

### 2.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se interpretarán con precaución cuando las concentraciones medidas de las soluciones de ensayo se encuentren a niveles cercanos al límite de detección del método de análisis.

La claridad de definición de las curvas de absorción y de pérdida indican la buena calidad de los datos de bioconcentración. La variación de las constantes de absorción /depuración entre las dos concentraciones de ensayo debería ser inferior al 20%. Las diferencias notables observadas en las velocidades de absorción/depuración entre las dos concentraciones de ensayo se registrarán y explicarán si es posible. En general, el límite de confianza del FBC se acerca al  $\pm 20$  % en los estudios bien diseñados.

## 3. INFORME

El informe del ensayo debe incluir la siguiente información:

### 3.1. SUSTANCIA DE ENSAYO:

- naturaleza física y, en su caso, propiedades físico-químicas:
- datos de identificación química (incluido el contenido en carbono orgánico, si procede);
- en caso de marcado radiactivo, posición precisa de los átomos marcados y porcentaje de radiactividad asociada a las impurezas.

### 3.2 ESPECIES UTILIZADAS

- Denominación científica, estirpe, fuente, eventuales tratamientos previos, aclimatación, edad, *rango* de tamaños, etc.

### 3.3 CONDICIONES DEL ENSAYO:

- procedimiento seguido (p. ej., dinámico o semiestático);
- tipo y características del alumbrado utilizado y períodos de iluminación;
- diseño del ensayo (p. ej., número y tamaño de los *recipientes* de ensayo, régimen de sustitución de los volúmenes de agua, número de grupos y de peces por grupo, número de concentraciones de ensayo, duración de las fases de absorción y depuración, frecuencia de los muestreos de peces y de agua;
- método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (se indicarán el agente de disolución, su concentración y su contribución al contenido en carbono orgánico del agua del ensayo, en su caso);
- las concentraciones de ensayo nominales, las medias de los valores medidos y sus desviaciones típicas en los recipientes de ensayo y su método de obtención;
- fuente del agua de dilución, descripción de los eventuales tratamientos previos, resultados de las posibles demostraciones de la aptitud de los peces utilizados para vivir en esta agua y características de ésta: pH, dureza, temperatura, concentración en oxígeno disuelto, niveles de cloro residual (si se mide) carbono orgánico total, sólidos en suspensión, salinidad del medio de ensayo (en su caso) y todas las demás medidas realizadas;
- calidad del agua en los recipientes de ensayo, pH, dureza, COT, temperatura y concentración en oxígeno disuelto;
- información precisa sobre la alimentación (p. ej., tipo de comida, fuente, composición - al menos contenido en lípidos y proteínas si es posible, cantidad dada y frecuencia);
- información sobre el tratamiento de las muestras de peces y de agua, incluidos datos de preparación, almacenamiento, extracción y procedimientos (y precisión) del análisis de la sustancia de ensayo y del contenido en lípidos (si se mide).

### 3.4 RESULTADOS:

- resultados de los eventuales estudios preliminares efectuados;
- mortalidad de los peces de control y de los peces de cada recinto de ensayo y todos los comportamientos anormales observados;
- contenido lipídico de los peces (si se determina con motivo del ensayo)
- curvas (con todos los datos medidos) que muestren la absorción y la depuración de las sustancias de ensayo en los peces, el tiempo de acceso al estado de equilibrio;
- $C_f$  y  $C_w$  (con desviación típica y gama, en su caso) en el momento de cada muestreo ( $C_f$  expresado en  $\mu\text{g/g}$  de peso húmedo (ppm) de todo el animal o de algunos de sus tejidos, p. ej. lípidos, y  $C_w$  en  $\mu\text{g/ml}$  (ppm). Valores de  $C_w$  de la serie de control (indicar también la concentración de fondo);
- factor de bioconcentración en el estado de equilibrio ( $FBC_{ss}$ ) o factor de concentración cinético ( $FBC_k$ ) y, en su caso, límites de confianza del 95% de las constantes de la velocidad de absorción y de depuración (pérdida) todo expresado respecto al cuerpo entero y al contenido total en lípidos, si se mide, del animal (o de sus tejidos especificados), límites de confianza y desviación típica (si se dispone de ella), métodos de cálculo / análisis de los datos para cada concentración de sustancia de ensayo utilizada;
- cuando se utilicen sustancias radiomarcadas, podrá exponerse la acumulación de todos los metabolitos detectados si es necesario;

- toda observación inusual relativa el ensayo, toda divergencia respecto a estos procedimientos y toda la información pertinente.

Minimizar los resultados "no detectado al límite de detección" mediante la aplicación de un método de ensayo preliminar y el diseño experimental, puesto que estos resultados son inutilizables para los cálculos de las constantes de velocidad.

#### 4. REFERENCIAS

- 1) **Connell D.W.** (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **102**, pp 117-156.
- 2) **Bintin S., Devillers J. and Karcher W.** (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol / water partition coefficient. *SAR and QSAR in Environmental Research*, **1**, 29-390.
- 3) **OECD, París** (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. *Environmental Health and Safety guidance document series on Testing and Assessment of Chemicals*. No. 3.
- 4) **Kristensen P.** (1991) Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. *Water Quality Institute, Denmark*.
- 5) **US EPA 822-R-94-002** (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.
- 6) **US FDA, (Food and Drug Administration)** Revision. *Plaguicide analytical manual*, **1**, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.
- 7) **US EPA** (1974). Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in *Analysis of Plaguicide Residues in Human and Environmental Samples*, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.
- 8) **Compaan H.** (1980) en *The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation'* Ch. 2.3, Part II. *Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands*.
- 9) **Gardner et al.,** (1995) *Limn. & Oceanogr.* **30**, 1099-1105.
- 10) **Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J.** (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Envir. Toxicol. Chem.* **10**, pp 1431-1436.
- 11) **CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring test programme,** 1984-1985. Final Report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.
- 12) **ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988)** Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs

ANEXO 1

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS ACEPTABLES DEL AGUA DE DILUCIÓN

	SUBSTANCIA	LÍMITE DE CONCENTRACIÓN
1	<i>Materia en suspensión</i>	5 mg/l
2	Carbono orgánico total	2 mg/l
3	Amoníaco no ionizado	1 µg/l
4	Cloro residual	10 µg/l
5	Plaguicidas organofosforados totales	50 ng/l
6	Plaguicidas organoclorados totales más policlorobifenilos	50 ng/l
7	Cloro orgánico total	25 ng/l
8	Aluminio	1 µg/l
9	Arsénico	1 µg/l
10	Cromo	1 µg/l
11	Cobalto	1 µg/l
12	Cobre	1 µg/l
13	Hierro	1 µg/l
14	Plomo	1 µg/l
15	Níquel	1 µg/l
16	Cinc	1 µg/l
17	Cadmio	100 ng/l
18	Mercurio	100 ng/l
19	Plata	100 ng/l

## ANEXO 2

### ESPECIES DE PECES RECOMENDADAS PARA LOS ENSAYOS

	Especies recomendadas	Gamas de temperaturas recomendadas para los ensayos (°C)	Longitud total recomendada de los animales utilizados (cm)
1	<b>Danio rerio</b> <sup>(1)</sup> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) pez cebra	20 - 25	3,0 ± 0,5
2	<b>Pimephales promelas</b> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) pez cabeza gorda	20 - 25	5,0 ± 2,0
3	<b>Cyprinus carpio</b> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) carpa común	20 - 25	5,0 ± 3,0
4	<b>Oryzias latipes</b> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck y Schlegel) medaka	20 - 25	4,0 ± 1,0
5	<b>Poecilia reticulata</b> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) guppy	20 - 25	3,0 ± 1,0
6	<b>Lepomis macrochirus</b> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) agallas azules	20 - 25	5,0 ± 2,0
7	<b>Oncorhynchus mykiss</b> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) trucha arco-iris	13 - 17	8,0 ± 4,0
8	<b>Gasterosteus aculeatus</b> (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) espinoso	18 - 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Real Society of London, Series B, vol. 252, p 231

Se han utilizado distintas especies marinas y de estuarios en algunos países como, por ejemplo:

*Leiostomus xanthurus*

*Cyprinodon variegatus*

*Menidia beryllina*

*Cymatogaster aggregata*

*Parophrys vetulus*

*Leptocottus armatus*

*Gasterosteus aculeatus*

*Dicentrarchus labrax*

*Alburnus alburnus*

### **APROVISIONAMIENTO**

Los peces de agua dulce enumerados en el cuadro anterior son fáciles de criar o están fácilmente disponibles a lo largo del año, mientras que la disponibilidad de las especies marinas o de estuario se limita en parte a los países correspondientes. Pueden reproducirse y desarrollarse en explotaciones piscícolas o en laboratorio, en condiciones donde las enfermedades y los parásitos están bajo control; los animales utilizados serán, pues, sanos y de origen conocido. Estos peces se encuentran en muchas partes del mundo.



### ANEXO 3

#### PREVISIÓN DE LA DURACIÓN DE LAS FASES DE ABSORCIÓN Y DE DEPURACIÓN

##### 1. Previsión de la duración de la fase de absorción

Antes de realizar el ensayo, podrá obtenerse una estimación de  $k_2$  y, en consecuencia, un porcentaje del tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio, a partir de relaciones empíricas entre  $k_2$  y el coeficiente de reparto n-octanol/agua ( $P_{ow}$ ) o  $k_2$  y la solubilidad en el agua (s).

Se puede estimar  $k_2$  (días<sup>-1</sup>), por ejemplo a partir de la relación empírica siguiente (1):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \log_{10} (P_{ow}) + 1,47 \quad (r^2=0,95) \quad \text{[ ecuación 1 ]}$$

Para las otras relaciones, ver Ref. (2).

Si el coeficiente de reparto ( $P_{ow}$ ) es desconocido, se procederá a una estimación (3) a partir de la solubilidad de la sustancia en el agua según:

$$\log_{10} (P_{ow}) = 0,862 \log_{10} (s) + 0,710 \quad (r^2= 0,994) \quad \text{[ ecuación 2 ]}$$

donde s = solubilidad (moles/l): (n=36)

Estas relaciones sólo se aplican a los productos químicos cuyos valores de  $\log P_{ow}$  se sitúan entre 2 y 6,5 (4).

El tiempo necesario para alcanzar un determinado porcentaje del estado de equilibrio puede obtenerse, aplicando la estimación de  $k_2$ , de la ecuación cinética general que describe la absorción y la depuración (cinética de primer orden):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

o, si  $C_w$  es constante:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[ ecuación 3 ]}$$

Cuando se acerca el estado de equilibrio ( $t \rightarrow \infty$ ), la ecuación 3 puede reducirse (5) (6) a:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad \text{o} \quad C_f / C_w = k_1 / k_2 = \text{FBC}$$

La relación  $k_1 / k_2 \cdot C_w$  se acerca entonces a la concentración en el pez en el "estado de equilibrio" ( $C_{f,s}$ ).

La ecuación 3 puede así transcribirse:

$$C_f = C_{f,s} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{o} \quad \frac{C_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{[ ecuación 4 ]}$$

El tiempo necesario para alcanzar un determinado porcentaje del estado de equilibrio puede preverse aplicando la ecuación 4, cuando  $k_2$  se estima con ayuda de las ecuaciones 1 ó 2.

A título indicativo, la duración óptima estadísticamente de la fase de absorción que permite obtener datos estadísticamente aceptables (FBC<sub>k</sub>) es el período necesario para que la curva del logaritmo de la concentración de la sustancia de ensayo en el pez, representado frente al tiempo lineal, llegue a su punto medio, o  $1,6/k_2$ , o un 80 % del estado de equilibrio, pero sin sobrepasar  $3,0/k_2$  o un 95 % del estado de equilibrio (7).

El tiempo para llegar al 80 % del estado de equilibrio es (ecuación 4):

$$0.80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{o} \quad t_{80} = \frac{1.6}{k_2} \quad \text{[ ecuación 5 ]}$$

Del mismo modo, para un 95 % del estado de equilibrio:  $t_{95} = \frac{3.0}{k_2}$  [ ecuación 6 ]

Por ejemplo, la duración de la fase de absorción (abs.) de una sustancia de ensayo que tenga un  $\log P_{ow} = 4$  sería (con las ecuaciones 1, 5 y 6):

$$\log_{10} k_2 = -0.414 \cdot (4) + 1.47 \quad k_2 = 0.652 \text{ días}^{-1}$$

$$\text{abs. (80 \%)} = 1.6/0.652, \text{ es decir, 2,45 días (59 horas)}$$

$$\text{o} \quad \text{abs. (95 \%)} = 3.0/0.652, \text{ es decir, 4,60 días (110 horas)}$$

Del mismo modo, para una sustancia de ensayo con  $s = 10^{-5}$  mol/l ( $\log (s) = -5.0$ ), la duración de la absorción sería (ecuaciones 1, 2, 5 y 6):

$$\log_{10} (P_{ow}) = -0.862 (-5.0) + 0.710 = 5.02$$

$$\log_{10} K_2 = -0.414 (5.02) + 1.47$$

$$k_2 = 0.246 \text{ días}^{-1}$$

$$\text{abs. (80 \%)} = 1.6/0.246, \text{ es decir, 6,5 días (156 horas)}$$

$$\text{o} \quad \text{abs. (95 \%)} = 3.0/0.246, \text{ es decir, 12,2 días (293 horas)}$$

Se utiliza, como alternativa, la expresión:

$$t_{eq} = 6.54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55.31 \text{ (horas)}$$

para calcular el tiempo de llegada al estado de equilibrio efectivo (4).

## 2. Previsión de la duración de la fase de depuración

Se podrá también prever el tiempo necesario para que la carga corporal se reduzca a un determinado porcentaje de la concentración inicial gracias a la ecuación general que describe la absorción y la depuración (cinética de primer orden) (1) (8).

Para la fase de depuración,  $C_w$  se supone nulo. La ecuación puede reducirse a:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \quad \text{o} \quad C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

donde  $C_{f,o}$  es la concentración al principio del período de depuración. Se llegará a una depuración del 50 % en el tiempo ( $t_{50}$ ):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{o} \quad t_{50} = \frac{0.693}{k_2}$$

Del mismo modo, el 95 % de depuración se alcanzará en el tiempo:

$$t_{95} = \frac{3.0}{k_2}$$

Si se utiliza el 80 % de la absorción para el primer período ( $1,6/k_2$ ) y el 95 % de pérdida en la fase de depuración ( $3,0/k_2$ ), entonces la fase de depuración será aproximadamente el doble de la depuración de la fase de absorción.

Es importante, sin embargo, tener en cuenta que estas estimaciones se basan en la hipótesis de que los esquemas de absorción y de depuración siguen una cinética de primer orden. Si es evidente que no se cumple esta condición, deberán emplearse modelos más complejos (p. ej., Ref. (1)).

### **BIBLIOGRAFÍA (del Anexo 3)**

- 1) **Spacie A.** and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. and Chem.* **1**, pp 309-320.
- 2) **Kristensen P.** (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF 's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.
- 3) **Chiou C.T.** and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. *Environ. Sci. Technol.* **16** (1), pp 4-10.
- 4) **Hawker D.W.** and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* **22** (6), pp 701-707.
- 5) **Branson D.R.,** Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) *Transactions of the American Fisheries Society*, 104 (4), pp 785-792.
- 6) **Ernst W.** (1985) Accumulation in Aquatic Organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 pp 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.
- 7) **Reilly P.M.,** Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, *Can. J Chem. Eng.* **55**, pp 614-622.
- 8) **Könemann H.** and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. *Chemosphere*, **9**, pp 3-19.

**ANEXO 4**

**EJEMPLOS TEÓRICOS DE CALENDARIOS DE MUESTREO**

**PARA LOS ENSAYOS DE BIOCONCENTRACIÓN DE SUSTANCIAS CON  $\log P_{ow} = 4$**

Muestreos de peces	Calendario de muestreo		Número de muestras de agua	Número de peces por muestra
	Frecuencia mínima requerida (días)	Muestreos suplementarios		
<b>Fase de absorción</b>	- 1 0		2* 2	<b>añadir 45-80 peces</b>
1 <sup>a</sup>	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2 <sup>a</sup>	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3 <sup>a</sup>	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4 <sup>a</sup>	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5 <sup>a</sup>	4,7		2	6
<b>Fase de depuración</b>				<b>Trasladar los peces a agua libre del producto de ensayo</b>
6 <sup>a</sup>	5,0	5,3		4 (4)
7 <sup>a</sup>	5,9	7,0		4 (4)
8 <sup>a</sup>	9,3	11,2		4 (4)
9 <sup>a</sup>	14,0	17,5		6 (4)

\*Tomar el agua después de transferir 3 "volúmenes de recintos" al menos.

Los valores entre paréntesis son los números de muestras (agua, peces) que se toman si se procede a un muestreo suplementario.

Nota: La estimación antes del ensayo de  $k_2$  para un  $\log P_{ow}$  de 4,0 es de  $0,652 \text{ días}^{-1}$ . La duración total de la experiencia se fija en:

$3 \times \text{abs.} = 3 \times 4,6 \text{ días}$ , o sea 14 días. Remitirse al Anexo 3 para el cálculo de "abs."

## ANEXO 5

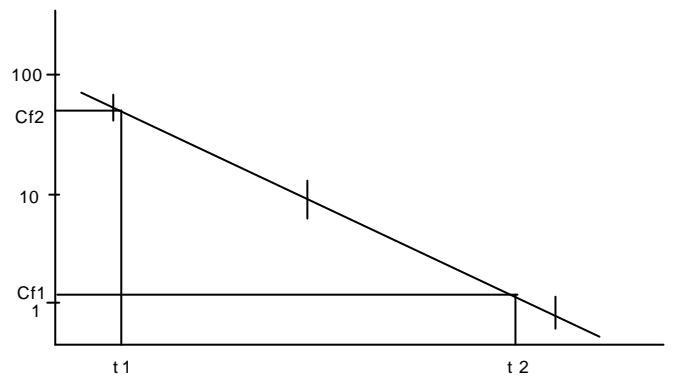
### DISCRIMINACIÓN DE LOS MODELOS

Se supone que la mayoría de los datos de bioconcentración se describen "razonablemente" bien con un modelo simple de dos compartimentos/dos parámetros, según indica la curva rectilínea que une aproximadamente los puntos de las concentraciones medidas en los peces durante la fase de depuración, cuando se representan sobre papel semilogarítmico. (Cuando estos puntos no pueden unirse con una recta, conviene recurrir a modelos más complejos; ver, p. ej., Spacie and Hamelink, Ref. 1 en el Anexo 3).

### MÉTODO GRÁFICO DE DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE LA VELOCIDAD DE DEPURACIÓN (PÉRDIDA) $k_2$

Llevar sobre papel semilogarítmico la concentración de la sustancia de ensayo encontrada en cada muestra de peces, frente al tiempo de muestreo. La pendiente de esta recta es  $k_2$ .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Atención: las divergencias en relación con esta línea recta pueden indicar un régimen de depuración más complejo que una cinética de primer orden. Puede aplicarse un método gráfico para solucionar los tipos de depuración que se desvían de la cinética de primer orden.

### MÉTODO GRÁFICO DE DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE LA VELOCIDAD DE ABSORCIÓN $k_1$

Dada  $k_2$ , se calcula  $k_1$  del siguiente modo:

$$k_1 = \frac{c_f k_2}{c_w x (1 - e^{-k_2 t})} \quad [ \text{ecuación 1} ]$$

Se lee el valor de  $C_f$  en el punto medio de la curva de absorción suavizada obtenida con los datos cuando se representa la concentración logarítmica frente al tiempo (en escala aritmética).

**MÉTODO DE CÁLCULO INFORMÁTICO DE LAS CONSTANTES DE LAS VELOCIDADES DE ABSORCIÓN Y DE DEPURACIÓN (PÉRDIDA)**

Para obtener el factor de bioconcentración y las constantes de velocidad  $k_1$  y  $k_2$  se utilizarán preferiblemente métodos informáticos de estimación de parámetros no lineales. Estos programas establecen los valores de  $k_1$  y de  $k_2$  en función de un conjunto de datos secuenciales de concentración en el tiempo y del modelo:

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[ ecuación 2 ]}$$

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x (e^{-k_2 (t - t_e)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_e \quad \text{[ ecuación 3 ]}$$

donde  $t_c$  = tiempo al final de la fase de absorción.

Este proceso desemboca en una estimación de la desviación típica para  $k_1$  y  $k_2$ .

Puesto que  $k_2$  puede estimarse en la mayoría de los casos a partir de la curva de depuración con una precisión relativamente grande, y puesto que existe una fuerte correlación entre los dos parámetros  $k_1$  y  $k_2$  si se estiman simultáneamente, puede ser deseable calcular en primer lugar  $k_2$  a partir de los datos de depuración solamente, y luego calcular  $k_1$  a partir de los datos de absorción con ayuda de una regresión no lineal.

## C.14. ENSAYO DE CRECIMIENTO EN PECES JUVENILES

### 1. MÉTODO

El presente método de ensayo de toxicidad para el crecimiento reproduce las directrices del documento OCDE TG 215 (2000).

#### 1.1 INTRODUCCIÓN

El presente ensayo tiene por objeto determinar los efectos de la exposición prolongada a sustancias químicas sobre el crecimiento de peces juveniles y se funda en un método elaborado y sometido a un estudio interlaboratorios (1)(2) en la Unión Europea para valorar los efectos de las sustancias químicas en el crecimiento de juveniles de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en condiciones dinámicas. Pueden emplearse otras especies de peces bien estudiadas. Por ejemplo, se dispone de una cierta experiencia en ensayos de crecimiento con el pez cebra (*Danio rerio*)<sup>1</sup> (3)(4) y el medaka (*Oryzias latipes*) (5)(6)(7).

Véase también la parte C de la Introducción General.

#### 1.2 DEFINICIONES

**Concentración mínima con efecto observado (LOEC):** concentración más baja de sustancia de ensayo con la que se observa un efecto significativo (para  $p < 0,05$ ) en comparación con el control. Además, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC han de provocar un efecto nocivo superior o igual al que se observa con dicha concentración.

**Concentración (máxima) sin efecto observado (NOEC):** concentración de ensayo inmediatamente inferior a la LOEC.

**CE<sub>x</sub>:** en el presente método de ensayo, concentración de sustancia de ensayo que produce una variación del x % en la tasa de crecimiento de los peces respecto a los controles.

**Tasa de carga:** peso húmedo de peces por unidad de volumen de agua.

**Densidad de población:** número de peces por unidad de volumen de agua.

**Tasa de crecimiento específico de cada pez:** tasa de crecimiento de un pez respecto a su peso inicial.

**Tasa de crecimiento específico medio por recipiente:** tasa de crecimiento medio de la población de un recipiente a una concentración determinada.

**Tasa de crecimiento pseudoespecífico:** tasa de crecimiento individual respecto al peso inicial medio de la población del recipiente.

---

<sup>1</sup> Meyer, A., Bierman, C.H. y Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

### 1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Después de haberlos pesado, se colocan peces juveniles en fase de crecimiento exponencial en recipientes de ensayo y se exponen a una gama de concentraciones subletales de la sustancia de ensayo disuelta en agua, preferiblemente en condiciones dinámicas (flujo continuo) o, de no ser posible, en condiciones semiestáticas adecuadas (renovación discontinua). La duración del ensayo es de 28 días. Se proporciona alimento a los peces todos los días. La ración alimentaria se determina en función del peso inicial de los peces y puede volverse a calcular transcurridos 14 días. Al final del ensayo, se vuelven a pesar los peces. Se analizan los efectos sobre la tasa de crecimiento mediante un modelo de regresión con el fin de estimar la concentración que produciría una variación del x % de dicha tasa, es decir,  $CE_x$  ( $CE_{10}$ ,  $CE_{20}$  o  $CE_{30}$ , por ejemplo). También pueden compararse los datos con los valores de los controles para determinar la concentración mínima con efecto observado (LOEC) y, de ahí, la concentración (máxima) sin efecto observado (NOEC).

### 1.4 INFORMACIÓN RELATIVA A LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Debe disponerse de los resultados de un ensayo de toxicidad aguda (véase el método C.1) efectuado preferiblemente con la especie objeto del presente ensayo y conocerse la solubilidad en el agua y la presión de vapor de la sustancia de ensayo. Para calcular la cantidad de sustancia en las soluciones de ensayo debe aplicarse un método analítico fiable, cuyo límite de detección y precisión sean conocidos y figuren en el informe.

La información útil para establecer las condiciones de ensayo incluye la fórmula estructural de la sustancia de ensayo, su pureza, estabilidad en el agua y a la luz, pKa,  $P_{ow}$  y los resultados de un ensayo de biodegradabilidad fácil (véase el método C.4).

### 1.5 VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido deben darse las condiciones siguientes:

- la mortalidad en los controles no ha de superar el 10 % al final del ensayo;
- el peso medio de los peces de los controles debe haber aumentado lo suficiente para poder detectar la variación mínima de la tasa de crecimiento que se considere significativa. Un ensayo interlaboratorios (2) ha puesto de manifiesto que, en el caso de la trucha arco iris, al cabo de 28 días el peso medio de los peces de los controles ha de haberse incrementado al menos en la mitad (50 %) de su peso medio inicial. Por ejemplo, si el peso inicial es de 1 g/pez (= 100 %), el peso final tras 28 días ha de ser  $\geq 1,5$  g/pez ( $\geq 150$  %);
- la concentración de oxígeno disuelto ha de ser, al menos, del 60 % del valor de saturación en el aire a lo largo de todo el ensayo;
- en ningún momento del ensayo la temperatura del agua debe variar en más de  $\pm 1$  °C entre los recipientes de ensayo y debe mantenerse en un intervalo de 2 °C dentro de las gamas establecidas para la especie sometida a ensayo (Anexo 1).



## 1.6 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

### 1.6.1 **Equipo**

Se empleará el equipo común de laboratorio y, en particular:

- a) pHmetro y medidor de oxígeno;
- b) equipo para determinar la dureza y alcalinidad del agua;
- c) dispositivo adecuado de regulación de la temperatura, preferiblemente continua;
- d) recipientes de material químicamente inerte y de capacidad adecuada a la carga y la densidad de población recomendadas (véase el apartado 1.8.5 y el Anexo 1);
- e) balanza suficientemente precisa (precisión de  $\pm 0,5$  %).

### 1.6.2 **Agua**

Puede utilizarse para el ensayo toda agua en la que la especie sometida a ensayo muestre una tasa de crecimiento y supervivencia a largo plazo adecuadas. La calidad ha de ser constante a todo lo largo del ensayo. El pH debe hallarse entre 6,5 y 8,5, si bien a lo largo de un mismo ensayo debe permanecer en un intervalo de  $\pm 0,5$  unidades. Se recomienda una dureza superior a 140 mg/l ( $\text{CaCO}_3$ ). Deben tomarse periódicamente muestras para análisis con el fin de cerciorarse de que el agua de dilución no interfiere en los resultados del ensayo (por ejemplo, por complejación de la sustancia de ensayo). Cuando se sepa que un agua de dilución es de calidad relativamente constante, conviene proceder, por ejemplo, cada tres meses, a la determinación de los metales pesados (por ejemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), aniones y cationes principales (por ejemplo, Ca, Mg, Na, K, Cl,  $\text{SO}_4$ ), plaguicidas (por ejemplo, organofosforados totales y organoclorados totales), carbono orgánico total y sólidos en suspensión. Si se demuestra que la calidad del agua es constante al menos durante un año, los análisis pueden ser menos frecuentes y espaciarse más (por ejemplo, cada seis meses). En el Anexo 2 se recogen algunas características químicas de un agua de dilución aceptable.

### 1.6.3 **Soluciones de ensayo**

Las soluciones de ensayo a las concentraciones elegidas se preparan por dilución de la solución madre.

La solución madre se prepara preferiblemente por simple mezcla o agitación mecánica de la sustancia de ensayo en el agua de dilución (por ejemplo, mediante un agitador o ultrasonidos). Pueden emplearse columnas de saturación (columnas de solubilidad) para lograr la concentración adecuada de solución madre.

En algunos casos pueden ser necesario usar disolventes o dispersantes (agentes de disolución) para obtener una solución madre a la concentración deseada. Puede entonces utilizarse como disolvente acetona, etanol, metanol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida o trietilenglicol, y como dispersante Cremophor RH40, Tween 80, metilcelulosa al 0,01 % o HCO-40. Deben tomarse precauciones si se emplean agentes fácilmente biodegradables (como la acetona) y/o muy volátiles, pues éstos pueden dar lugar a una proliferación bacteriana en los ensayos dinámicos. Si se emplea un agente de disolución, no debe actuar de forma significativa sobre el crecimiento de los peces ni producir efectos nocivos visibles en los juveniles, lo cual ha de demostrarse en un lote de control que solo contenga disolvente.

Para los ensayos dinámicos se requiere un sistema que aporte y diluya continuamente la solución madre de la sustancia de ensayo (por ejemplo, bomba dosificadora, diluyente proporcional o sistema saturador) para distribuir una serie de concentraciones en los recipientes de ensayo. Los regímenes de flujo de las soluciones madre y del agua de dilución deben supervisarse con regularidad, preferiblemente todos los días, y no debería variar en más del 10 % a lo largo del ensayo. Con arreglo a un ensayo interlaboratorios (2), en el caso de la trucha arco iris se considera adecuado un régimen de renovación del agua durante el ensayo equivalente a 6 litros/g de pez/día (véase el apartado 1.8.2.2).

En el caso de los ensayos semiestáticos, la frecuencia de renovación del medio dependerá de la estabilidad de la sustancia de ensayo, si bien se recomienda renovarlo todos los días. Si los ensayos preliminares de estabilidad (véase el apartado 1.4) ponen de manifiesto que la concentración de la sustancia de ensayo no es estable (es decir, queda fuera del intervalo del 80 al 120 % de la concentración nominal o cae por debajo del 80 % de la concentración medida al inicio) entre dos renovaciones, debe plantearse la realización de un ensayo dinámico.

#### 1.6.4 **Selección de la especie**

Se recomienda realizar el ensayo con la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), pues es la especie que más se ha empleado en el ensayo interlaboratorios (1)(2). También es posible emplear otras especies bien estudiadas, aunque podría ser entonces necesario adaptar el procedimiento para que las condiciones de ensayo sean adecuadas. Por ejemplo, se dispone asimismo de experiencia con el pez cebra (*Danio rerio*) (3)(4) y el medaka (*Oryzias latipes*) (5)(6)(7). En tal caso, deben justificarse la elección de la especie y el método experimental.

#### 1.6.5 **Preparación de los peces**

Se seleccionan los peces de ensayo de una misma población, y preferentemente de un mismo desove, que se haya mantenido al menos dos semanas antes del ensayo en condiciones de calidad del agua e iluminación similares a las del ensayo. Debe proporcionárseles una ración alimentaria diaria del 2 % de su peso corporal como mínimo y preferiblemente del 4 % mientras duren la preparación y el ensayo.

Transcurridas 48 h en esas condiciones, se registra la mortalidad y se aplican los criterios siguientes:

- si la mortalidad es superior al 10 % de la población en siete días, se rechaza todo el lote;
- si la mortalidad se halla entre el 5 y el 10 % de la población, se prolonga otros siete días el período de aclimatación; si durante este segundo período la mortalidad supera el 5 %, se rechaza todo el lote;
- si la mortalidad es inferior al 5 % de la población en siete días, se acepta el lote.

Los peces no deben recibir tratamiento terapéutico alguno durante el ensayo ni en las dos semanas anteriores al mismo.

## 1.7 DISEÑO DEL ENSAYO

Se entenderá por "diseño del ensayo" la selección del número de concentraciones de ensayo y el intervalo entre las mismas, el número de recipientes por concentración y el número de peces por recipiente. Lo más idóneo es diseñar el ensayo con arreglo a:

- a) el objetivo del estudio;
- b) el método de análisis estadístico que vaya a emplearse;
- c) la disponibilidad y el coste de los recursos experimentales.

En la medida de lo posible, el enunciado del objetivo debe especificar la potencia estadística necesaria para detectar una diferencia determinada (por ejemplo, de tasa de crecimiento) o la precisión con la que ha de proporcionarse la  $CE_x$  (por ejemplo,  $x = 10, 20$  ó  $30$  y preferiblemente no por debajo de  $10$ ) para poder hacer una estimación. Sin ello no puede darse una indicación precisa de la escala del estudio.

Es importante ser consciente de que un diseño idóneo (que saca mayor partido de los recursos) para un método de análisis estadístico no lo es necesariamente para otro. Así pues, el diseño recomendado para la estimación de una LOEC/NOEC no será el mismo que se recomiende para un análisis por regresión.

En la mayoría de los casos, es preferible el análisis de regresión al análisis de la varianza, por los motivos que exponen Stephan y Rogers (8). Sin embargo, si no se encuentra un modelo de regresión adecuado ( $r^2 < 0,9$ ), debe recurrirse a la NOEC/LOEC.

### 1.7.1 Diseño para el análisis por regresión

Los aspectos importantes para el diseño de un ensayo que vaya a analizarse por regresión son los siguientes:

- a) Las concentraciones empleada deben incluir la concentración con efecto ( $CE_{10,20,30}$ , etc.) y la gama de concentraciones que abarque, el rango en que el efecto producido por la sustancia de ensayo de interés. La precisión con la que puede estimarse la concentración con efecto será mayor si dicha concentración se halla en el medio de la gama de concentraciones empleada en el ensayo. Para seleccionar las concentraciones de ensayo adecuadas puede resultar útil un ensayo previo de determinación de gama.
- b) Para que la modelización estadística sea satisfactoria, el ensayo debe incluir al menos un recipiente de control y otros cinco recipientes con distintas concentraciones. En su caso, si se emplea un agente de disolución, debe realizarse, además de las series tratadas con la sustancia de ensayo, un control con agente de disolución a la concentración de ensayo más elevada (véanse los apartados 1.8.3 y 1.8.4).
- c) Puede emplearse una serie geométrica o logarítmica apropiada (9) (véase el anexo 3). Es preferible un espaciado logarítmico entre las concentraciones de ensayo.
- d) Si se dispone de más de seis recipientes, los que sobrepasen dicha cantidad se emplearán como recipientes en paralelo o se distribuirán en la gama de concentraciones para reducir el espaciado entre éstas. Ambas opciones son igualmente válidas.

## 1.7.2 **Diseño para la estimación de la NOEC/LOEC mediante análisis de la varianza (ANOVA)**

Conviene disponer de varios recipientes en paralelo para cada concentración y realizar el análisis estadístico por recipiente (10). Sin recipientes en paralelo no puede tenerse en cuenta la variabilidad entre recipientes además de la que existe entre los peces. No obstante, la experiencia ha puesto de manifiesto (11) que en el caso estudiado la variabilidad entre recipientes era muy escasa en relación con la variabilidad dentro de un mismo recipiente (es decir, entre los peces). Así pues, una opción relativamente aceptable consiste en efectuar el análisis estadístico a escala individual con cada pez.

Normalmente se emplea una serie geométrica de al menos cinco concentraciones de sustancia de ensayo, espaciadas por un factor que no supere 3,2.

Por lo general, si se realizan ensayos con recipientes en paralelo, el número de recipientes de control en paralelo y, por tanto, el número de peces ha de ser el doble del empleado con cada concentración de ensayo, que debe ser constante (12)(13)(14). De no usarse recipientes en paralelo, el número de peces del grupo de control ha de ser igual al empleado en cada concentración de ensayo.

Si el análisis de la varianza se realiza en los recipientes y no a nivel individual [lo cual requeriría marcar todos los peces o utilizar las tasas de crecimiento pseudoespecífico (véase el apartado 2.1.2)], se necesita una cantidad suficiente de recipientes en paralelo para poder determinar la desviación estándar de los recipientes con la misma concentración, lo cual significa que el error del análisis de la varianza tendrá al menos 5 grados de libertad (10). Si sólo se emplean recipientes en paralelo para los controles, se corre el riesgo de que la variabilidad del error esté sesgada, pues podría aumentar con el valor medio de la tasa de crecimiento en cuestión. Dado que es probable que la tasa de crecimiento disminuya cuando aumente la concentración, se tendería a sobrestimar la variabilidad.

## 1.8 **PROCEDIMIENTO**

### 1.8.1 **Selección y pesaje de los peces**

Es importante que el peso de los peces varíe lo menos posible al inicio del ensayo. En el Anexo I figuran las gamas de peso apropiadas en cada una de las especies recomendadas para el ensayo. Conviene que, al principio del ensayo, la gama de pesos de todo el lote de peces utilizados se mantenga en un intervalo de  $\pm 10\%$  de la media aritmética y, en cualquier caso, no supere el 25 %. Se recomienda pesar una submuestra de peces antes del ensayo para calcular el peso medio.

No se proporciona alimento alguno a los peces durante las 24 h anteriores al inicio del ensayo. A continuación, se toman los peces al azar. Se emplea un anestésico general [por ejemplo, una solución acuosa de 100 mg/l de metanosulfonato de triclaína (MS 222) neutralizada mediante adición de dos partes de bicarbonato sódico por parte de MS 222] para pesar cada sujeto en húmedo (secado con material absorbente) con la precisión indicada en el Anexo 1. Se apartan los peces cuyo peso se halla en el intervalo deseado y se reparten al azar entre los recipientes de ensayo. Se registra el peso húmedo total de los peces de cada recipiente. Tanto el uso de anestésico como la manipulación (incluido el secado y pesaje) pueden afectar y herir a los peces juveniles, sobre todo si se trata de especies de pequeño tamaño. Por ello, deben manipularse los animales objeto del ensayo con la mayor precaución para evitar cualquier agresión.

Se vuelven a pesar los peces el 28º día de ensayo (véase el apartado 1.8.6). No obstante, si se considera necesario ajustar la ración alimentaria, pueden pesarse los peces el 14º día de ensayo (véase el apartado 1.8.2.3). Para valorar las variaciones de tamaño de los peces y, de ahí, ajustar la ración alimentaria, también puede emplearse otro método como el fotográfico.

## 1.8.2 **Condiciones de exposición**

### 1.8.2.1 *Duración*

La duración del ensayo es  $\geq 28$  días.

### 1.8.2.2 *Tasa de carga y densidad de población*

Es importante que la tasa de carga y la densidad sean apropiadas para la especie de ensayo empleada (véase el Anexo 1). La tensión que genera a los peces una densidad de población demasiado elevada produce una disminución de la tasa de crecimiento y posiblemente la enfermedad. Por el contrario, si la densidad es demasiado baja, puede dar lugar a un comportamiento territorial, lo cual también puede afectar al crecimiento. En cualquier caso, la tasa de carga debe ser suficientemente baja para poder mantener sin aireación una concentración mínima de oxígeno disuelto del 60 % del valor de saturación en el aire. Un ensayo interlaboratorios (2) ha puesto de manifiesto que, en el caso de la trucha arco iris, resulta aceptable una tasa de carga de 16 truchas de 3 a 5 g en un volumen de 40 litros. Se recomienda una frecuencia de renovación del agua durante el ensayo de 6 litros/g de pez/día.

### 1.8.2.3 *Alimentación*

Debe proporcionarse a los peces una dieta suficiente y adecuada (Anexo 1) para permitir una tasa de crecimiento aceptable, al tiempo que se evita la proliferación bacteriana y la turbidez del agua. En el caso de la trucha arco iris, esas condiciones deberían conseguirse con una ración diaria del 4% de su peso corporal (2)(15)(16)(17). La ración diaria puede dividirse en dos partes iguales y administrarse en dos veces, con un mínimo de 5 h de intervalo. La ración es función del peso inicial total de los peces de cada recipiente de ensayo. Si los peces se pesan otra vez el 14º día de ensayo, se vuelve a calcular la ración. La alimentación debe suprimirse durante las 24 h anteriores al pesaje.

Todos los días debe limpiarse cuidadosamente por succión el fondo de los recipientes de ensayo para eliminar los alimentos que no se hayan consumido y la materia fecal.

### 1.8.2.4 *Iluminación y temperatura*

El fotoperíodo y la temperatura del agua han de ser adecuados para la especie utilizada (Anexo 1).

## 1.8.3 **Concentraciones de ensayo**

Normalmente se necesitan cinco concentraciones de sustancia de ensayo, sea cual sea el diseño del mismo (véase el apartado 1.7.2). Para seleccionar las concentraciones apropiadas es útil conocer previamente la toxicidad de la sustancia de ensayo (por ejemplo, gracias a un ensayo de toxicidad aguda o un estudio de determinación de gamas). El empleo de menos de cinco concentraciones debe justificarse. Las sustancias no deben someterse a ensayo en concentraciones superiores a su límite de solubilidad en el agua.

Si se emplea un agente de disolución para facilitar la preparación de la solución madre, su concentración final ha de ser preferiblemente la misma en todos los recipientes de ensayo y no debe superar 0,1 ml/l (véase el apartado 1.6.3). No obstante, debe evitarse en la medida de lo posible el empleo de tales agentes.

#### 1.8.4 **Controles**

El número de recipientes de control con agua de dilución dependerá del diseño del ensayo (véanse los apartados 1.7-1.7.2). Si se emplea un agente de disolución, se realizará la misma cantidad de controles con agua de dilución que con agente de disolución.

#### 1.8.5 **Frecuencia de los análisis y mediciones**

Las concentraciones de la sustancia de ensayo deben determinarse periódicamente durante el mismo (véase más adelante).

En los ensayos dinámicos, debe comprobarse periódicamente, a ser posible todos los días, los flujos de diluyente y de solución madre de sustancia tóxica. Dichos flujos no deberían variar en más del 10 % a lo largo del ensayo. Cuando la concentración de la sustancia deba permanecer entre el  $\pm 20\%$  de la concentración nominal (es decir, en el intervalo del 80 al 120 %; véanse los apartados 1.6.2 y 1.6.3), se recomienda analizar, como mínimo, la concentración de ensayo más baja y la más alta al principio del ensayo y, a continuación, una vez por semana. En los ensayos en que no quepa esperar que la concentración de sustancia de ensayo permanezca en un intervalo de  $\pm 20\%$  de la concentración nominal (con arreglo a los datos de estabilidad de la sustancia), es preciso analizar todas las concentraciones de ensayo, pero según el mismo régimen.

En los ensayos semiestáticos (con renovación) en que la concentración de la sustancia debe permanecer entre el  $\pm 20\%$  de la concentración nominal, se recomienda analizar, como mínimo, la concentración de ensayo más baja y la más alta en cuanto se preparen y justo antes de renovar el medio al principio del estudio y, a continuación, una vez por semana. En los ensayos en que no quepa esperar que la concentración de sustancia de ensayo permanezca en un intervalo de  $\pm 20\%$  de la concentración nominal, es preciso analizar todas las concentraciones de ensayo según el mismo régimen que el empleado con las sustancias más estables.

Se recomienda basar los resultados en las concentraciones medidas. No obstante, si los datos disponibles muestran que la concentración de la sustancia de ensayo en la solución se ha mantenido debidamente a lo largo de todo el ensayo en un intervalo de  $\pm 20\%$  de la concentración nominal o de la concentración medida al inicio, los resultados pueden fundarse en las concentraciones nominales o en las medidas.

En algunos casos puede estar indicado filtrar (por ejemplo con un filtro de poros de 0,45  $\mu\text{m}$ ) o centrifugar las muestras. Aunque la centrifugación es el método recomendado, si el medio de ensayo no se absorbe en los filtros, también puede emplearse la filtración.

Durante el ensayo debe medirse en todos los recipientes de ensayo el oxígeno disuelto, el pH y la temperatura. En los controles y en un uno de los recipientes con la concentración más alta se medirá la dureza total, la alcalinidad y la salinidad, si procede. El oxígeno disuelto y la salinidad, cuando proceda, se miden como mínimo tres veces: al principio, a la mitad y al final del ensayo. En los ensayos semiestáticos se recomienda medir el oxígeno disuelto más a menudo, preferiblemente antes y después de cada renovación del agua o al menos una vez por semana. El pH ha de medirse al principio y al final de cada período de renovación del agua en los ensayos semiestáticos y al menos una vez por semana en los dinámicos. La dureza y la alcalinidad se miden una vez en cada ensayo. La temperatura debería someterse a control continuo al menos en un recipiente de ensayo.

### 1.8.6 Observaciones

Peso: al final del ensayo deben pesarse en húmedo (secados con material absorbente) todos los peces vivos, en grupos por recipiente de ensayo o individualmente. Es preferible pesar los animales por recipiente, pues el pesaje individual requiere marcar todos los peces. Si se determina la tasa de crecimiento específico de cada pez (pesaje individual), se optará por una técnica de marcado que no perturbe a los animales (en lugar del criomarcado puede emplearse, por ejemplo, hilo fino de pescar de colores).

Deben examinarse los peces todos los días durante el ensayo y registrarse toda anomalía externa (hemorragias, despigmentación, etc.) y todo comportamiento anómalo. Se tomará nota de todas las muertes y se retirarán los peces muertos lo antes posible. Éstos no se sustituirán, ya que la tasa de carga y la densidad de población son suficientemente elevadas para evitar que la variación del número de peces en un recipiente afecte al crecimiento. Sin embargo, deberá adaptarse la ración alimentaria.

## 2. RESULTADOS E INFORME

### 2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Es aconsejable que participe un estadístico tanto en el diseño como en el análisis del ensayo, pues el presente método da cabida a variaciones considerables en el procedimiento experimental, por ejemplo, en cuanto al número de recipientes y de concentraciones de ensayo, el número de peces, etc.. Debido a las diversas posibilidades en el diseño del ensayo, no se proporcionan aquí directrices concretas sobre los métodos estadísticos.

No es preciso calcular la tasa de crecimiento en los recipientes de ensayo en los que la mortalidad es superior al 10 %, si bien debe indicarse la tasa de mortalidad a todas las concentraciones de ensayo.

Con independencia del método empleado para analizar los datos, el concepto central es la tasa de crecimiento específico "r" entre el momento  $t_1$  y el momento  $t_2$ , que puede definirse de varias formas según si los peces se han marcado individualmente o no o si se necesita una media por recipiente.

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

donde,

$r_1$  = tasa de crecimiento específico de cada pez

$r_2$  = tasa de crecimiento específico medio por recipiente

$r_3$  = tasa de crecimiento pseudoespecífico

$w_1, w_2$  = peso de un pez determinado en los momentos  $t_1$  y  $t_2$ , respectivamente

$\log_e w_1$  = logaritmo del peso de un pez determinado al inicio del período de estudio

$\log_e w_2$  = logaritmo del peso de un pez determinado al final del período de estudio

$\overline{\log_e w_1}$  = media de los logaritmos de los valores  $w_1$  de los peces del recipiente al inicio del período de estudio

$\overline{\log_e w_2}$  = media de los logaritmos de los valores  $w_2$  de los peces del recipiente al final del período de estudio

$t_1, t_2$  = tiempo (días) inicial y fin del período de estudio

$r_1, r_2$  y  $r_3$  pueden calcularse para el período comprendido entre el día 0 y el día 28 y, si procede (es decir, si se han realizado mediciones el día 14), para los períodos entre los días 0 y 14, y 14 y 28.

### 2.1.1 **Análisis de los resultados por regresión (modelización concentración-respuesta)**

Este método de análisis establece una relación matemática adecuada entre la tasa de crecimiento específico y la concentración, lo cual permite calcular la " $CE_x$ ", es decir, todo valor de CE necesario. Con este método no es preciso calcular " $r$ " para cada pez ( $r_1$ ) y el análisis puede basarse entonces en el valor medio de " $r$ " para el recipiente ( $r_2$ ). Es preferible este último método y, además, resulta más adecuado si se utilizan especies más pequeñas.

Con el fin de estudiar la relación concentración-respuesta, debe hacerse una representación gráfica de las tasas de crecimiento específico medio por recipiente ( $r_2$ ) en función de la concentración.

Para expresar la relación entre  $r_2$  y la concentración, debe elegirse un modelo adecuado y justificarse la elección mediante un razonamiento pertinente.

Si el número de peces que sobreviven varía de un recipiente a otro, debe ponderarse el proceso de ajuste del modelo para tener en cuenta el tamaño desigual de los grupos.

El método de ajuste del modelo debe permitir estimar, por ejemplo, la  $CE_{20}$  y deducir su dispersión (error típico o intervalo de confianza). El gráfico del modelo ajustado debe figurar junto a los datos para poder valorar la adecuación del ajuste del modelo (8)(18)(19)(20).



### 2.1.2 **Análisis de los resultados para calcular la LOEC**

Si en el ensayo se han utilizado series en paralelo para todas las concentraciones, la estimación de la LOEC podría basarse en el análisis de la varianza (ANOVA) de la tasa de crecimiento específico medio de cada recipiente (véase el apartado 2.1), seguido de un método adecuado [por ejemplo, el de Dunnett o de Williams (12)(13)(14)(21)] para comparar la media "r" a cada concentración con la media "r" de los controles con el fin de determinar la concentración mínima a la que dicha diferencia es significativa para  $p = 0,05$ . Si las hipótesis necesarias relativas a los métodos paramétricos no se cumplen - distribución no normal (p. ej., prueba de Shapiro-Wilk) o varianza heterogénea (prueba de Bartlett) -, deberá estudiarse la posibilidad de transformar los datos para homogeneizar las varianzas antes de efectuar el análisis de la varianza o el análisis ponderado de la varianza.

Si en el ensayo no se han utilizado series en paralelo para todas las concentraciones, el análisis de la varianza basado en los recipientes resultará insensible o imposible. En ese caso, puede considerarse aceptable basar el análisis de la varianza en la tasa de crecimiento pseudoespecífico  $r_3$  de cada pez.

A continuación puede compararse la media  $r_3$  para cada concentración de ensayo con la media  $r_3$  de los controles, tras lo cual puede determinarse la LOEC como anteriormente. Debe admitirse que este método no tiene cuenta en absoluto de la variabilidad entre recipientes, al margen de la imputable a la variabilidad entre los peces. Sin embargo, la experiencia ha puesto de manifiesto (8) que la variabilidad entre recipientes es muy escasa en relación con la variabilidad dentro de un mismo recipiente (es decir, entre los peces). Si el análisis no incluye los datos relativos a cada pez, deberá indicarse el método de identificación de los valores atípicos y justificarse su utilización.

## 2.2 **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Los resultados deben interpretarse con prudencia si las concentraciones medidas de las sustancias tóxicas en las soluciones de ensayo se aproximan a los límites de detección del método de análisis o, en los ensayos semiestáticos, si la concentración de sustancia de ensayo disminuye entre el momento en que se prepara la solución y el momento previo a la renovación.

## 2.3 **INFORME DEL ENSAYO**

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

### 2.3.1 **Sustancia de ensayo:**

- naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- identificación química, incluida la pureza y el método de análisis cuantitativo de la sustancia de ensayo, si procede.

### 2.3.2 **Especie sometida a ensayo:**

- denominación científica;
- cepa, tamaño, proveedor, tratamientos previos, etc.

### 2.3.3 **Condiciones de ensayo:**

- método empleado (por ejemplo, semiestático/renovación o dinámico, carga, densidad de población, etc.);
- diseño del ensayo (por ejemplo, número de recipientes de ensayo, de concentraciones de ensayo y de recipientes en paralelo, número de peces por recipiente);
- método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (en su caso, se especificarán el agente de disolución empleado y su concentración);
- concentraciones nominales de ensayo, medias de los valores determinados analíticamente en los recipientes de ensayo, desviaciones estándar de éstos, método de obtención y datos que muestren que las mediciones se refieren a las concentraciones de la sustancia de ensayo en disolución verdadera;
- características del agua de dilución: pH, dureza, alcalinidad, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, contenido de cloro residual (si se ha medido), carbono orgánico total, sólidos en suspensión, salinidad del medio de ensayo (si se ha medido) y cualquier otra medición realizada;
- calidad del agua en los recipientes de ensayo: pH, dureza, temperatura y concentración de oxígeno disuelto;
- información detallada de la alimentación (p. ej., tipo de alimento o alimentos, procedencia, cantidad proporcionada y frecuencia).

### 2.3.4 **Resultados:**

- datos que demuestren que los controles cumplen los criterios de validez relativos a la supervivencia y datos de la mortalidad observada en todas las concentraciones de ensayo;
- técnicas de análisis estadístico aplicadas, estadísticas basadas en las series en paralelo o en los peces, tratamiento de los datos y justificación de los métodos empleados;
- cuadros que recojan el peso individual y medio de los peces los días 0, 14 (si se han pesado) y 28, valores de las medias por recipiente o tasas de crecimiento pseudoespecífico (si procede) correspondientes a los períodos de 0 a 28 días o, en su caso, 0 a 14 y 14 a 28;
- resultados del análisis estadístico (análisis de regresión o análisis de la varianza), preferiblemente en forma de cuadro y de gráfico, LOEC ( $p = 0,05$ ) y NOEC o  $CE_x$  con sus errores típicos, si es posible;
- incidencia de toda reacción anómala de los peces y de todo efecto visible producido por la sustancia de ensayo.

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.
- (2) Ashley S., Mallett M.J. y Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
- (3) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. *Chemosphere*, **14**, pp 1855-1870.
- (4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. y Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. *Ecotox. Environ. Safety*, **21**, pp 157-164.
- (5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japón.
- (6) Holcombe , G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. y Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Conta. Toxicol.* **28**, pp 287-297.
- (7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. y Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.
- (8) Stephan C.E. y Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891*, R C Bahner y D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Filadelfia, pp 328-338.
- (9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.
- (10) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.
- (11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 diciembre de 1991.
- (12) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, *J. Amer. Statist. Assoc.*, **50**, pp 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, **20**, pp 482-491.
- (14) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* **27**, pp 103-117.
- (15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. *Aquaculture* **120**, 123-133.

- (16) Quinton, J. C. y Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 37, 33-41.
- (17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in *Textbook of Fish Health*. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, Nueva Jersey, E.E.U.U. 288 P.
- (18) Bruce, R.D. y Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data . *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.
- (19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. y McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.
- (20) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.
- (21) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, pp 510-531.

ANEXO 1

ESPECIES DE PECES RECOMENDADAS Y CONDICIONES ADECUADAS PARA EL ENSAYO

Espece	Gama de temperatura recomendada (°C)	Fotoperíodo (horas)	Gama recomendada de peso inicial de los peces (g)	Precisión exigida de la medición	Tasa de carga (g/l)	Densidad de población (por litro)	Alimentación	Duración del ensayo (días)
<b>Espece recomendada:</b>								
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Trucha arco iris	12,5 – 16,0	12 – 16	1 – 5	100 mg	1,2 – 2,0	4	Especialidad alimentaria seca para crías de salmónidos	≥ 28
<b>Otras especies bien documentadas:</b>								
<i>Danio rerio</i> Danio cebra	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	1 mg	0,2 – 1,0	5 – 10	Alimento vivo ( <i>Brachionus</i> <i>Artemia</i> )	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> Medaka	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	1 mg	0,2 – 1,0	5 – 20	Alimento vivo ( <i>Brachionus</i> <i>Artemia</i> )	≥ 28

**ANEXO 2**

**ALGUNAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UN AGUA DE DILUCIÓN ACEPTABLE**

<b>SUSTANCIA</b>	<b>CONCENTRACIONES</b>
Materia en suspensión	< 20 mg/l
Carbono orgánico total	< 2 mg/l
Amoniacó no ionizado	< 1 µg/l
Cloro residual	< 10 µg/l
Plaguicidas organofosforados totales	< 50 ng/l
Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados	< 50 ng/l
Cloro orgánico total	< 25 ng/l

**ANEXO 3**

**SERIES LOGARÍTMICAS DE CONCENTRACIONES VÁLIDAS PARA UN ENSAYO DE TOXICIDAD (9)**

Columna (Número de concentraciones entre 100 y 10, o entre 10 y 1)*						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

\* Puede seleccionarse una serie de cinco (o más) concentraciones sucesivas en una columna. Los puntos medios entre las concentraciones de la columna (x) se encuentran en la columna (2x + 1). Los valores recogidos pueden representar concentraciones expresadas como porcentaje en volumen o en peso (mg/l o µg/l). Los valores pueden multiplicarse o dividirse por la potencia de 10 adecuada. Puede emplearse la 1ª columna si el grado de toxicidad es muy incierto.

## C.15. ENSAYO DE TOXICIDAD A CORTO PLAZO EN EMBRIONES DE PEZ Y ALEVINES

### 1. MÉTODO

El presente método de ensayo de toxicidad a corto plazo reproduce las directrices del documento OCDE TG 212 (1998).

#### 1.1 INTRODUCCIÓN

El presente ensayo de toxicidad a corto plazo en embriones de pez y alevines abarca la exposición del animal desde la fase de huevo recién fecundado hasta el final de la fase de alevín. No se proporciona alimento alguno a embriones y alevines durante el ensayo, que debe, por tanto, concluir cuando los alevines sigan nutriéndose de la vesícula vitelina.

El presente ensayo tiene por objeto determinar los efectos letales y, en menor medida, subletales de sustancias químicas en fases concretas de la vida de las especies sometidas al mismo. Proporciona información útil, pues puede: a) constituir un nexo entre los ensayos letales y subletales, b) servir de ensayo de detección de cara a un ensayo completo en las primeras fases de la vida o a los ensayos de toxicidad crónica y c) emplearse para estudiar especies en relación con las cuales las técnicas de cría no estén suficientemente avanzadas para abarcar el período de transición de la alimentación endógena a la exógena.

Cabe señalar que los ensayos que abarcan todas las fases de la vida de los peces son los únicos que suelen permitir una estimación precisa de la toxicidad crónica de las sustancias químicas en estos animales y que, si se limita la exposición de manera que no cubra una u otra fase de la vida, puede perderse sensibilidad y, por tanto, subestimarse la toxicidad crónica. Por consiguiente, el ensayo en embriones y alevines resultará menos sensible que un ensayo completo en las primeras fases de la vida, sobre todo si se trata de sustancias muy lipófilas ( $\log P_{ow} > 4$ ) o sustancias que posean una forma de actuación tóxica particular. Cabe esperar, no obstante, que la diferencia de sensibilidad entre los dos ensayos sea menor con las sustancias de acción narcótica no específica (1).

Hasta la publicación del presente ensayo, el ensayo con embriones y alevines se ha llevado a cabo principalmente con el pez de agua dulce *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (teleósteos, ciprínidos - nombre común: danio cebra); de ahí que en el anexo 1 figuren indicaciones detalladas para la realización del mismo con esa especie, si bien pueden emplearse otras con las que se disponga de experiencia (Cuadro 1).

#### 1.2 DEFINICIONES

**Concentración mínima con efecto observado (LOEC):** concentración más baja de sustancia de ensayo con la que se observa un efecto significativo (para  $p < 0,05$ ) en comparación con el control. Además, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC han de provocar un efecto nocivo superior o igual al que se observa con dicha concentración.

**Concentración (máxima) sin efecto observado (NOEC):** concentración de ensayo inmediatamente inferior a la LOEC.



### 1.3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

Se exponen los embriones de pez y los alevines a una gama de concentraciones de la sustancia de ensayo disuelta en agua. El protocolo permite elegir entre un procedimiento semiestático o dinámico, según la naturaleza de la sustancia de ensayo. El ensayo comienza cuando se colocan los huevos fecundados en los recipientes de ensayo y finaliza justo antes de que la vesícula vitelina de cualquiera de las larvas de cualquiera de los recipientes sea reabsorbida por completo o antes de que los animales del lote de control empiecen a morir de inanición. Los efectos letales y subletales se evalúan y comparan con los valores del control con el fin de determinar la concentración mínima con efecto observado y, de ahí, la concentración máxima sin efecto observado. Los efectos también pueden analizarse mediante un modelo de regresión a fin de calcular la concentración que provocaría un porcentaje de efecto determinado (CL/CE<sub>x</sub>, donde x es un porcentaje de efecto definido).

### 1.4 INFORMACIÓN RELATIVA A LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Debe disponerse de los resultados de un ensayo de toxicidad aguda (véase el método C.1) efectuado preferiblemente con la especie objeto del presente ensayo, ya que pueden resultar útiles para seleccionar una gama apropiada de concentraciones para el ensayo en las primeras fases de la vida. Debe conocerse la solubilidad en el agua (incluida la solubilidad en el agua del ensayo) y la presión de vapor de la sustancia de ensayo. Para calcular la cantidad de sustancia en las soluciones de ensayo debe aplicarse un método analítico fiable, cuyo límite de detección y precisión sean conocidos y figuren en el informe.

La información útil para establecer las condiciones de ensayo incluye la fórmula estructural de la sustancia de ensayo, su pureza, estabilidad a la luz, estabilidad en las condiciones de ensayo, pK<sub>a</sub>, P<sub>ow</sub> y los resultados de un ensayo de biodegradabilidad fácil (véase el método C.4).

### 1.5 VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido deben darse las condiciones siguientes:

- la tasa global de supervivencia de los huevos fecundados en los lotes de control y, en su caso, en los recipientes que solo contengan disolvente ha de ser superior o igual a los límites establecidos en los anexos 2 y 3;
- la concentración de oxígeno disuelto ha de situarse entre el 60 y el 100% del valor de saturación en el aire a lo largo del ensayo;
- en ningún momento del ensayo la temperatura del agua debe variar en más de  $\pm 1,5$  °C entre los recipientes de ensayo ni entre dos días sucesivos y debe mantenerse en las gamas establecidas para la especie sometida a ensayo (anexos 2 y 3).

### 1.6 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

#### 1.6.1 Recipientes de ensayo

Puede emplearse cualquier recipiente de cristal u otro material inerte químicamente, de dimensiones suficientes para que se cumplan los criterios de carga (véase el apartado 1.7.1.2). Se recomienda colocar los recipientes al azar en la zona donde se lleve a cabo el ensayo. Si en el laboratorio hay efectos sistemáticos que pueden paliarse mediante el agrupamiento, es preferible colocar los recipientes según un esquema de agrupamiento aleatorizado (velando por que todos los tratamientos se apliquen en todos los grupos) que según un esquema completamente aleatorizado. En caso de que se agrupen los recipientes, debe tenerse presente en el análisis posterior de los datos. Los recipientes de ensayo han de protegerse de toda perturbación indeseada.

#### 1.6.2 Selección de la especie de peces

Las especies de peces recomendadas figuran en el cuadro 1A, aunque es posible emplear otras (cuadro 1B), si bien puede ser entonces necesario adaptar el procedimiento para que las condiciones de ensayo sean adecuadas. En tal caso, deben justificarse la elección de la especie y el método experimental.

#### 1.6.3 Manipulación de los peces reproductores

Las directrices de ensayo 210 de la OCDE<sup>1</sup> y las referencias (2)(3)(4)(5)(6) de la bibliografía recogen indicaciones detalladas sobre la manipulación de peces reproductores en condiciones satisfactorias.

#### 1.6.4 Manipulación de los embriones y las larvas

Los embriones y larvas pueden colocarse en recipientes provistos de paredes o extremos de malla dentro del recipiente principal para permitir el flujo de la solución de ensayo. Puede provocarse un flujo no turbulento a través de los pequeños recipientes suspendiéndolos de un brazo que los desplace en sentido vertical, pero de manera que los organismos permanezcan siempre sumergidos. Puede emplearse, asimismo, un sistema de sifón. Los huevos fecundados de salmónidos pueden depositarse en rejillas o mallas con aperturas de dimensiones suficientes para que las larvas pasen a través después de la eclosión. En los ensayos semiestáticos con renovación diaria y completa del medio, conviene utilizar pipetas Pasteur para la toma de embriones y larvas (véase el apartado 1.6.6).

Si se utilizan cubetas, rejillas o mallas para mantener los huevos en el recipiente principal de ensayo, deben retirarse después de la eclosión de las larvas<sup>1</sup>, pero deben conservarse las mallas que impidan que los peces se escapen. Si es necesario trasladar las larvas, no deben exponerse al aire ni emplearse redes para sacar a los peces de los recipientes que contengan los huevos (con algunas especies menos frágiles, como la carpa, estas precauciones pueden resultar superfluas). El momento de dicho traslado varía según la especie y no siempre es necesario. En los ensayos semiestáticos, pueden emplearse vasos de laboratorio o recipientes poco profundos y provistos, en su caso, de una rejilla a escasa distancia del fondo. Si el volumen de esos recipientes es suficiente para que se cumplan los requisitos de carga (véase el apartado 1.7.1.2), no es preciso trasladar los embriones o larvas.

#### 1.6.5 Agua

Puede utilizarse para el ensayo toda agua que se ajuste a las características químicas de un agua de dilución aceptable enumeradas en el anexo 4 y en la que la especie sometida a ensayo muestre una tasa de supervivencia en el lote de control al menos igual que la recogida en los anexos 2 y 3. Su calidad ha de ser constante a todo lo largo del ensayo. La variación del pH debe permanecer en un intervalo de  $\pm 0,5$  unidades. Deben tomarse muestras periódicamente para análisis con el fin de cerciorarse de que el agua de dilución no interfiere en los resultados del ensayo (por ejemplo, por complejación de la sustancia de ensayo) ni altera el comportamiento de los peces reproductores. Cuando se sepa que un agua de dilución es de calidad relativamente constante, conviene proceder, por ejemplo, cada tres meses, a la determinación de los metales pesados (por ejemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), aniones y cationes principales (por ejemplo, Ca, Mg, Na, K, Cl, SO<sub>4</sub>), plaguicidas (por ejemplo, organofosforados totales y organoclorados totales), carbono orgánico total y sólidos en suspensión. Si se demuestra que la calidad del agua es constante al menos durante un año, los análisis pueden ser menos frecuentes y espaciarse más (por ejemplo, cada seis meses).

---

<sup>1</sup> OCDE, París, 1992, Directrices de ensayo 210, "Ensayo de toxicidad en las primeras fases de la vida en peces".

## 1.6.6 Soluciones de ensayo

Las soluciones de ensayo a las concentraciones elegidas se preparan por dilución de la solución madre.

La solución madre se prepara preferiblemente por simple mezcla o agitación mecánica de la sustancia de ensayo en el agua de dilución (por ejemplo, mediante un agitador o ultrasonidos). Pueden emplearse columnas de saturación (columnas de solubilidad) para lograr la concentración adecuada de solución madre. Debe evitarse, en la medida de lo posible, el uso de disolventes o dispersantes (agentes de disolución); sin embargo, en algunos casos pueden ser necesarios para obtener una solución madre a la concentración deseada. Puede entonces utilizarse como disolvente acetona, etanol, metanol, dimetilformamida o trietilenglicol, y como dispersante Cremophor RH40, Tween 80, metilcelulosa al 0,01 % o HCO-40. Deben tomarse precauciones si se emplean agentes fácilmente biodegradables (como la acetona) y/o muy volátiles, pues éstos pueden dar lugar a una proliferación bacteriana en los ensayos dinámicos. Si se emplea un agente de disolución, no debe actuar de forma significativa sobre la supervivencia ni producir efectos nocivos visibles en las primeras fases de la vida, lo cual ha de demostrarse en un lote de control que solo contenga disolvente. No obstante, debe hacerse todo lo posible por evitar el uso de dichas sustancias.

En el caso de los ensayos semiestáticos, pueden aplicarse dos métodos distintos de renovación: o bien se preparan sustancias de ensayo nuevas en recipientes limpios y se transfieren cuidadosamente los huevos y larvas supervivientes en un pequeño volumen de la solución antigua, evitando exponerlos al aire, o bien se dejan los organismos sometidos a ensayo en su recipiente y se cambian al menos las tres cuartas partes del agua de ensayo. La frecuencia de renovación del medio dependerá de la estabilidad de la sustancia de ensayo, si bien se recomienda renovarlo todos los días. Si los ensayos preliminares de estabilidad (véase el apartado 1.4) ponen de manifiesto que la concentración de la sustancia de ensayo no es estable (es decir, queda fuera del intervalo del 80 al 120 % de la concentración nominal o cae por debajo del 80 % de la concentración medida al inicio) entre dos renovaciones, debe plantearse la realización de un ensayo dinámico. En cualquier caso, debe velarse por evitar toda agresión a las larvas durante la renovación del agua.

Para los ensayos dinámicos se requiere un sistema que aporte y diluya continuamente la solución madre de la sustancia de ensayo (por ejemplo, bomba dosificadora, diluyente proporcional o sistema saturador) para distribuir una serie de concentraciones en los recipientes de ensayo. Los regímenes de flujo de las soluciones madre y del agua de dilución deben supervisarse con regularidad, preferiblemente todos los días, y no debería variar en más del 10% a lo largo del ensayo. Se considera adecuado un régimen de flujo equivalente al menos a cinco veces el volumen del recipiente de ensayo cada 24 horas (2).

## 1.7 PROCEDIMIENTO

Se ha publicado información útil sobre la realización de los ensayos de toxicidad en embriones de pez y alevines. La bibliografía del presente texto recoge algunos ejemplos (7)(8)(9) de tales publicaciones.

### 1.7.1 Condiciones de exposición

#### 1.7.1.1 Duración

Conviene iniciar el ensayo en los 30 minutos siguientes a la fecundación de los huevos. Los embriones se sumergen en la solución de ensayo antes o después (pero lo antes posible) de que comience la fase de división del blastodisco y, en cualquier caso, antes de que empiece la fase de gástrula. Si los huevos proceden de un proveedor comercial, puede resultar imposible iniciar el ensayo inmediatamente después de la fecundación. Dado que un retraso en el inicio del ensayo puede afectar seriamente a la sensibilidad del mismo, debería iniciarse en las 8 horas siguientes a la fecundación. Puesto que no se proporciona alimento a las larvas durante el período de exposición, el ensayo debe finalizar justo antes de que se haya reabsorbido por completo la vesícula vitelina de una cualquiera de las larvas de cualquiera de los recipientes de ensayo o antes de que haya muertes por inanición en los lotes de control. La duración del ensayo dependerá de la especie utilizada. Los anexos 2 y 3 recogen recomendaciones al respecto.

#### 1.7.1.2 *Carga*

El número de huevos fecundados al principio del ensayo ha de ser suficiente para responder a las necesidades estadísticas. Se reparten al azar entre los distintos tratamientos y se coloca un mínimo de 30 huevos fecundados, repartidos equitativamente (o lo más equitativamente posible, ya que con algunas especies es difícil obtener lotes iguales) entre, al menos, tres recipientes de ensayo en paralelo por cada concentración. La tasa de carga (biomasa por volumen de ensayo de solución) debe ser suficientemente baja para poder mantener sin aireación una concentración mínima de oxígeno disuelto del 60% del valor de saturación en el aire. En los ensayos dinámicos, se recomienda una tasa de carga que no supere 0,5 g/l en 24 horas ni 5 g/l de solución en cualquier momento (2).

#### 1.7.1.3 *Iluminación y temperatura*

El fotoperíodo y la temperatura del agua han de ser adecuados para la especie utilizada (anexos 2 y 3). Para vigilar la temperatura, puede ser conveniente emplear un recipiente de ensayo adicional.

#### 1.7.2 **Concentraciones de ensayo**

Normalmente se necesitan cinco concentraciones de sustancia de ensayo espaciadas por un factor constante que no supere 3,2. Para seleccionar la gama de concentraciones de ensayo debe tenerse presente la curva CL<sub>50</sub>/período de exposición del estudio de toxicidad aguda. En algunos casos puede estar indicado utilizar menos de cinco concentraciones, por ejemplo, en los ensayos límite, y un intervalo más pequeño entre concentraciones. El empleo de menos de cinco concentraciones debe justificarse. No es preciso someter a ensayo concentraciones superiores a la CL<sub>50</sub> tras 96 horas, o a 100 mg/l, si ésta concentración es inferior a dicha CL<sub>50</sub>. Las sustancias no deben someterse a ensayo en concentraciones superiores a su límite de solubilidad en el agua de ensayo.

Si se emplea un agente de disolución para facilitar la preparación de las soluciones de ensayo (véase el apartado 1.6.6), su concentración final ha de ser la misma en todos los recipientes de ensayo y no debe superar 0,1 ml/l.

#### 1.7.3 **Controles**

Paralelamente a las series tratadas con la sustancia de ensayo, debe hacerse un lote de control con agua de dilución (en tantos ejemplares como sea necesario) y, si procede, otro control con agente de disolución (en tantos ejemplares como sea necesario).

#### 1.7.4 **Frecuencia de los análisis y medidas**

Las concentraciones de la sustancia de ensayo deben determinarse periódicamente durante el mismo.

En los ensayos semiestáticos en que la concentración de la sustancia debe permanecer entre el  $\pm 20\%$  de la concentración nominal (es decir, en el intervalo del 80 al 120 %; véanse los apartados 1.4 y 1.6.6), se recomienda analizar, como mínimo, la concentración de ensayo más baja y la más alta en cuanto se preparen y justo antes de renovar el medio, al menos en tres ocasiones regularmente espaciadas a lo largo del ensayo (los análisis deben practicarse en muestras de la misma solución, tomadas justo después de su preparación y en el momento de la renovación).

En los ensayos en que no quepa esperar que la concentración de sustancia de ensayo permanezca en un intervalo de  $\pm 20\%$  de la concentración nominal (con arreglo a los datos de estabilidad de la sustancia), es preciso analizar todas las concentraciones de ensayo cuando se acaben de preparar y en el momento de la renovación, pero según el mismo régimen, es decir, al menos tres veces regularmente espaciadas a lo largo del ensayo. Es suficiente con determinar las concentraciones de la sustancia de ensayo antes de la renovación del medio en un solo recipiente por concentración. Las determinaciones no han de espaciarse más de siete días. Se recomienda basar los resultados en las concentraciones medidas. No obstante, si los datos disponibles muestran que la concentración de la sustancia de ensayo en la solución se ha mantenido debidamente a lo largo de todo el ensayo en un intervalo de  $\pm 20\%$  de la concentración nominal o de la concentración medida al inicio, los resultados pueden fundarse en éstas.

En los ensayos dinámicos, conviene aplicar un régimen de muestreo similar al descrito para los ensayos semiestáticos (si bien en este caso no cabe hacer determinaciones antes de renovar las soluciones). No obstante, si el ensayo dura más de siete días, puede ser oportuno incrementar el número de tomas de muestras durante la primera semana (por ejemplo, tres series de medidas) para cerciorarse de que las concentraciones de ensayo permanecen estables.

En algunos casos puede estar indicado filtrar (por ejemplo con un filtro de poros de 0,45 µm) o centrifugar las muestras, pero, como ni la filtración ni la centrifugación permiten siempre separar la fracción no biodisponible de la sustancia de ensayo de su fracción biodisponible, no es indispensable efectuarlas.

Durante el ensayo debe medirse en todos los recipientes de ensayo el oxígeno disuelto, el pH y la temperatura. En los controles y en un uno de los recipientes con la concentración más alta se medirá la dureza total y la salinidad, si procede. El oxígeno disuelto y la salinidad, cuando proceda, se miden como mínimo tres veces: al principio, a la mitad y al final del ensayo. En los ensayos semiestáticos se recomienda medir el oxígeno disuelto más a menudo, preferiblemente antes y después de cada renovación del agua o al menos una vez por semana. El pH ha de medirse al principio y al final de cada período de renovación del agua en los ensayos semiestáticos y al menos una vez por semana en los dinámicos. La dureza se mide una vez en cada ensayo. La temperatura debería medirse todos los días y lo ideal sería un control continuo al menos en un recipiente de ensayo.

## 1.7.5 **Observaciones**

### 1.7.5.1 *Fase de desarrollo embrionario*

Al principio de la exposición a la sustancia de ensayo debe comprobarse con tanta precisión como sea posible la fase embrionaria (gástrula) en una muestra representativa de huevos debidamente conservados y limpiados. Puede asimismo consultarse la bibliografía, que recoge descripciones e ilustraciones de las fases embrionarias (2)(5)(10)(11).

### 1.7.5.2 *Eclosión y supervivencia*

Al menos una vez al día deben observarse y contarse las eclosiones y los supervivientes. Puede ser conveniente efectuar observaciones más frecuentes al principio del ensayo (por ejemplo, cada 30 minutos durante las tres primeras horas), pues en algunos casos el tiempo de supervivencia puede ser más significativo que solo el número de muertes (por ejemplo, si se producen efectos tóxicos agudos). Las larvas y embriones muertos deben retirarse en cuanto se localicen, ya que pueden descomponerse rápidamente. Dicha retirada ha de hacerse con sumo cuidado para no tocar ni dañar físicamente los huevos y larvas adyacentes, pues son extremadamente delicados y sensibles. Los criterios para considerar que un organismo está muerto varían según la fase del desarrollo:

- **huevos:** sobre todo en la fase más temprana, disminución acusada de translucidez y cambio de la coloración debido a la coagulación y/o precipitación de proteínas, que les da un aspecto blanco opaco;
- **embriones:** ausencia de movimientos corporales y/o ausencia de latido cardíaco y/o decoloración opaca en las especies cuyos embriones son translúcidos normalmente;
- **larvas:** inmovilidad y/o ausencia de movimiento respiratorio y/o ausencia de latido cardíaco y/o coloración blanca opaca del sistema nervioso central y/o ausencia de reacción a los estímulos mecánicos.

#### 1.7.5.3 *Aspecto anómalo*

El número de larvas que presenten anomalías corporales y/o pigmentarias, así como la fase de reabsorción de la vesícula vitelina deben registrarse a intervalos adecuados con arreglo a la duración del ensayo y la naturaleza de la anomalía observada. Cabe señalar que la aparición de larvas y embriones anómalos ocurre en condiciones normales y que su proporción puede alcanzar varias unidades por ciento en los controles de algunas especies. Los animales que presenten anomalías sólo deben retirarse de los recipientes de ensayo cuando estén muertos.

#### 1.7.5.4 *Comportamiento anómalo*

Las anomalías como la hiperventilación, natación descoordinada o inactividad atípica deben registrarse a intervalos adecuados según la duración del ensayo. Pese a ser difíciles de cuantificar, esos efectos pueden contribuir a interpretar los datos de mortalidad proporcionando información sobre el modo de actuación tóxica de la sustancia.

#### 1.7.5.5 *Longitud*

Se recomienda medir la longitud de cada sujeto al final del ensayo utilizando la longitud estándar, la longitud a la horquilla o la longitud total. Si se observa una descomposición de la aleta caudal o un desgaste de las aletas, debe emplearse la longitud estándar. Por lo general, en un ensayo realizado correctamente, el coeficiente de variación de la longitud entre los distintos recipientes de los controles ha de ser  $\leq 20\%$ .

#### 1.7.5.6 *Peso*

Puede pesarse cada sujeto al final del ensayo; el peso seco (24 horas a 60 °C) es preferible al peso húmedo (secados con material absorbente). Por lo general, en un ensayo realizado correctamente, el coeficiente de variación del peso entre los distintos recipientes de los controles ha de ser  $\leq 20\%$ .

Gracias a las observaciones anteriores, se obtienen algunos o todos los datos siguientes para el análisis estadístico:

- mortalidad acumulativa;
- número de larvas sanas al final del ensayo;
- momento en que empieza y acaba la eclosión (90 % de eclosiones en cada recipiente en paralelo);
- número de larvas que eclosionan cada día;
- longitud (y peso) de los animales supervivientes al final del ensayo;
- número de larvas con deformidades o aspecto anómalo;
- número de larvas que presenten un comportamiento anómalo.

## 2. RESULTADOS E INFORME

### 2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Es aconsejable que participe un estadístico tanto en el diseño como en el análisis del ensayo, pues el presente método da cabida a variaciones considerables en el procedimiento experimental, por ejemplo, en cuanto al número de recipientes y de concentraciones de ensayo, número inicial de huevos fecundados y parámetros medidos. Debido a las diversas posibilidades en el diseño del ensayo, no se proporcionan aquí directrices concretas sobre los métodos estadísticos.

Si tienen que calcularse la LOEC y la NOEC, será preciso analizar las variaciones en cada serie en paralelo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) o las tablas de contingencia. El método de Dunnett puede resultar útil para realizar comparaciones múltiples entre los resultados obtenidos con cada concentración y los de los controles (12)(13). Las referencias (14) y (15) de la bibliografía recogen otros ejemplos útiles. Debe calcularse y registrarse la magnitud del efecto detectable mediante el análisis de la varianza u otros métodos (es decir, la potencia del ensayo). Cabe señalar que no todas las observaciones relacionadas en el apartado 1.7.5.6 se prestan al tratamiento estadístico por análisis de la varianza. Así, por ejemplo, la mortalidad acumulativa y el número de larvas sanas al final del ensayo pueden analizarse por métodos de probit.

Si procede calcular la CL y la  $CE_x$ , una o varias curvas adecuadas, como puede ser la curva logística, deben ajustarse a los resultados pertinentes mediante un método estadístico como el de los mínimos cuadrados o los mínimos cuadrados no lineales. Las curvas deben parametrarse de manera que puedan estimarse directamente la CL y la  $CE_x$  que interese y su error estándar. Así se facilitará en gran medida el cálculo de los límites de confianza en torno a la CL y la  $CE_x$ . Salvo que haya razones de peso para preferir otros niveles de confianza, se seleccionarán límites del 95 % en ambas direcciones. Es preferible que el método de ajuste permita evaluar la significación de la falta de ajuste. Pueden emplearse métodos gráficos para ajustar las curvas. Todas las observaciones enumeradas en el apartado 1.7.5.6 se prestan al análisis de regresión.

### 2.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados deben interpretarse con prudencia cuando las concentraciones medidas de las sustancias tóxicas en las soluciones de ensayo se aproximen a los límites de detección del método de análisis. Asimismo, los resultados relativos a concentraciones superiores a la solubilidad de la sustancia en el agua han de interpretarse con precaución.

### 2.3 INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

#### 2.3.1 Sustancia de ensayo:

- naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- identificación química, incluida la pureza y el método de análisis cuantitativo de la sustancia de ensayo, si procede.

#### 2.3.2 Especie sometida a ensayo:

- denominación científica, variedad, número de peces parentales (es decir, número de hembras empleadas para obtener la cantidad de huevos necesarios para el ensayo), fuente y método de recogida de los huevos fecundados y manipulaciones posteriores.

### 2.3.3

#### **Condiciones de ensayo:**

- método empleado (por ejemplo, semiestático o dinámico, tiempo transcurrido entre la fecundación y el inicio del ensayo, carga, etc.);
- fotoperíodo(s);
- diseño del ensayo (por ejemplo, número de recipientes de ensayo y número de recipientes en paralelo, número de embriones por recipiente en paralelo);
- método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (en su caso, se especificarán el agente de disolución empleado y su concentración);
- concentraciones nominales de ensayo, valores medidos en los recipientes de ensayo, medias y desviaciones estándar de éstos y método de obtención; si la sustancia de ensayo es soluble en el agua a concentraciones inferiores a las de ensayo, debe demostrarse que las mediciones se refieren a las concentraciones de la sustancia de ensayo en disolución;
- características del agua de dilución: pH, dureza, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, contenido de cloro residual (si se ha medido), carbono orgánico total, sólidos en suspensión, salinidad del medio de ensayo (si se ha medido) y cualquier otra medición realizada;
- calidad del agua en los recipientes de ensayo: pH, dureza, temperatura y concentración de oxígeno disuelto.

### 2.3.4

#### **Resultados:**

- resultados de los posibles estudios preliminares relativos a la estabilidad de la sustancia de ensayo;
- datos que demuestren que los controles cumplen la norma general de aceptabilidad en materia de supervivencia de la especie sometida a ensayo (anexos 2 y 3);
- datos de la mortalidad y la supervivencia en las fases de embrión y de larva y tasas globales de mortalidad y supervivencia;
- días transcurridos hasta la eclosión y número de eclosiones;
- longitud (y peso);
- incidencia y descripción de las anomalías morfológicas, en su caso;
- incidencia y descripción de los efectos sobre el comportamiento, en su caso;
- análisis estadístico y tratamiento de los datos;
- en el caso de los ensayos sometidos al análisis de la varianza, la concentración mínima con efecto observado (LOEC) para  $p = 0,05$  y la concentración máxima sin efecto observado (NOEC) para cada respuesta evaluada, así como una descripción de los métodos estadísticos empleados y una indicación de la magnitud del efecto que puede detectarse;
- en el caso de los ensayos analizados mediante técnicas de regresión, la CL,  $CE_x$  e intervalos de confianza, y un gráfico del modelo ajustado que se haya utilizado para su cálculo;
- justificación de toda desviación respecto al presente método de ensayo.



**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, pp 60. Junio de 1990.
- (2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.
- (3) Brauhn J.L. y Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p.54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W.A. y Jones B.R. (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, 121-173.
- (6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp 328-330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. y Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp 61-71.
- (8) Birge J.W., Black J.A. y Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp 807-821.
- (9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. y Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, 129-145.
- (10) Kirchen R.V. y W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.
- (11) Kirchen R.V. y W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, Carolina del Norte. 36 pp.
- (12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482-491.
- (14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. y Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Filadelfia.
- (15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. y Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp 321-334.
- (16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, Diciembre de 1992, pp 81.

- (17) Dave G. y Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, **21**, 126-134.
- (18) Meyer A., Bierman C.H. y Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology - an invitation to the comparative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, **252**: 231-236.
- (19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. y Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety **32**, 19-28.
- (20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dic. 1991, EPA, Duluth.
- (21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dic. 1991, EPA, Duluth.
- (22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. y Marcus M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. **10**, 1189-1203.
- (23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, capítulo 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.
- (24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.
- (25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar y D.J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, pp 1-58.

**CUADRO 1A: ESPECIES DE PECES RECOMENDADAS PARA EL ENSAYO**

<b>AGUA DULCE</b>
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Trucha arco iris (9)(16)
<i>Danio rerio</i> Danio cebra (7)(17)(18)
<i>Cyprinus caprio</i> Carpa común (8)(19)
<i>Oryzias latipes</i> Medaka (20)(21)
<i>Pimephales promelas</i> Piscardo (8)(22)

**CUADRO 1B: EJEMPLOS DE OTRAS ESPECIES BIEN DOCUMENTADAS QUE TAMBIÉN HAN SIDO UTILIZADAS**

<b>AGUA DULCE</b>	<b>AGUA SALADA</b>
<i>Carassius auratus</i> Carpa dorada (8)	<i>Menidia peninsulae</i> Pejerrey del Atlántico Occidental (23)(24)(25)
<i>Lepomis macrochirus</i> Pez sol de agallas azules (8)	<i>Clupea harengus</i> Arenque (24)(25)
	<i>Gadus morhua</i> Bacalao (24)(25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> Petota (23)(24)(25)

**ANEXO 1**  
**DIRECTRICES SOBRE LA REALIZACIÓN DE UN ENSAYO DE TOXICIDAD EN EMBRIONES Y ALEVINES DE DANIO CEBRA (*Brachydanio rerio*)**

**INTRODUCCIÓN**

El danio cebra es originario de la costa de Coromandel en la India donde vive en ríos de corriente rápida. Es una especie común de acuario, que pertenece a la familia de las carpas. La información relativa a los métodos de cría y los cuidados que requieren figuran en los manuales de referencia sobre peces tropicales. Laale ha estudiado su biología y su empleo en la investigación relacionada con la pesca (1).

Este pez rara vez supera los 45 mm de longitud. Su cuerpo cilíndrico posee entre 7 y 9 rayas horizontales de color azul oscuro y plateado, que se prolongan hasta las aletas caudal y anal. El dorso es verde aceituna. Los machos son más estrechos que las hembras, y éstas son más plateadas y presentan un abdomen más distendido, en particular antes del desove.

Los peces adultos soportan grandes variaciones de temperatura, pH y dureza. Sin embargo, para obtener peces sanos que produzcan huevos de buena calidad debe mantenerse en condiciones óptimas.

Durante el desove, el macho persigue a la hembra y le da golpes con la cabeza. Los huevos son fecundados apenas expulsados. Los huevos, que son transparentes y no adherentes, caen al fondo donde pueden ser ingeridos por los padres. La luz influye en el desove. Si la luz de la mañana es suficiente, los peces suelen desovar en las horas siguientes al amanecer.

Una hembra puede realizar desoves de varios centenares de huevos a intervalos de una semana.

**ESTADO DE LOS PECES PARENTALES, REPRODUCCIÓN Y PRIMERAS FASES DE LA VIDA**

Se selecciona un número adecuado de peces sanos y se mantienen en un agua apropiada (véase el anexo 4, por ejemplo) al menos durante dos semanas antes de la fecha prevista para el desove. Los peces han de reproducirse al menos una vez antes de producir los huevos que vayan a emplearse en el ensayo. La densidad en este período no debe superar 1 gramo de peces por litro. La renovación regular del agua y la utilización de sistemas de purificación pueden lugar a densidades mayores. La temperatura en los acuarios debe mantenerse a  $25 \pm 2$  °C y debe proporcionarse a los peces un régimen alimentario variado, que puede consistir, por ejemplo, en alimentos deshidratados adecuados que se encuentran en el comercio, Artemia vivos recién eclosionados, quironómidos, Dafnia o gusanos blancos (Enquitréidos).

A continuación se recogen dos métodos con los que se han obtenido en la práctica camadas suficientes de huevos fecundados sanos de cara a la realización de un ensayo:

- i. Se colocan 8 hembras y 16 machos en un acuario con 50 litros de agua de dilución y protegido de la luz directa. Debe evitarse en la mayor medida posible perturbarlos al menos durante 48 horas. En la tarde del día anterior al inicio del ensayo se coloca en el fondo del acuario un soporte para el desove, formado por un bastidor (de plexiglas u otro material adecuado) de 5 a 7 cm de alto, con una red de malla gruesa (2-5 mm) en la parte superior y una red de malla fina (10-30  $\mu$ m) en la parte inferior. Se atan a la malla gruesa del soporte varios "árboles de desove", consistentes en una cuerda de nailon sin retorcer. Se deja a los peces 12 horas en la oscuridad y, a continuación, se enciende una luz tenue para que empiece el desove. Entre 2 y 4 horas después de éste, se retira el soporte y se recogen los huevos. El soporte impide que los peces ingieran los huevos, al tiempo que facilita la recogida de éstos. Los peces deben haber desovado al menos una vez antes de recoger los huevos que vayan a emplearse en el ensayo.

- ii. Se mantienen de cinco a diez peces machos y hembras en acuarios individuales durante un mínimo de dos semanas antes de la fecha prevista para el desove. Entre 5 y 10 días después, el abdomen de las hembras se distiende y sus papilas genitales se hacen visibles. Los machos no tienen papilas. El desove se lleva a cabo en recipientes provistos de un falso fondo de malla (véase más arriba). El recipiente se llena con agua de dilución hasta una altura de 5 a 10 cm por encima de la malla. Se colocan una hembra y dos machos en el recipiente la víspera de la fecha prevista para el desove. Se aumenta progresivamente la temperatura del agua hasta un grado por encima de la temperatura de aclimatación. Se apaga la luz y se evita en la mayor medida posible toda perturbación a los peces. Por la mañana, se enciende una luz tenue para que empiece el desove. Entre 2 y 4 horas más tarde, se retiran los peces y se recogen los huevos. Si se necesitan más huevos de los que puede poner una hembra, pueden disponerse en paralelo los acuarios que sean necesarios. Si se registra la capacidad de reproducción de cada hembra antes del ensayo (volumen de la camada y calidad de los huevos), podrán seleccionarse para éste las que tengan mayor capacidad reproductora.

Los huevos se trasladan a los recipientes de ensayo en tubos de vidrio, de diámetro interno superior o igual a 4 mm y provistos de una pera de succión. El trasvase de huevos debe realizarse con la menor cantidad de agua posible. Los huevos pesan más que el agua y caen fuera del tubo. Debe evitarse que los huevos (y las larvas) estén en contacto con el aire. Se practica un examen microscópico de una o varias muestras del lote o lotes para cerciorarse de que no hay anomalías en las primeras fases del desarrollo. No está permitido desinfectar los huevos.

La tasa de mortalidad de los huevos más elevada se da durante las 24 horas siguientes a la fecundación. A menudo se observa durante ese período una tasa de mortalidad del 5 al 40 %. La degeneración de los huevos se debe a una fertilización fallida o a problemas en el desarrollo. Al parecer, la calidad de los huevos depende de la hembra, ya que algunas producen siempre huevos de buena calidad, mientras que otras no lo consiguen nunca. Además, el ritmo de desarrollo y de eclosión varía de una camada a otra. La tasa de supervivencia de los huevos correctamente fecundados y de las larvas suele ser elevada, por lo general superior al 90 %. A 25 °C, los huevos eclosionan entre 3 y 5 días después de la fecundación y la vesícula vitelina se reabsorbe unos 13 días después de ésta.

Hisaoka y Battle han estudiado a fondo el desarrollo embrionario (2). La transparencia de los huevos y de las larvas eclosionadas permite seguir el desarrollo de los peces y detectar la presencia de malformaciones. Unas 4 horas después del desove ya pueden distinguirse los huevos fecundados de los no fecundados (3). Para ello, se colocan los huevos y las larvas en recipientes de ensayo pequeños y se estudian al microscopio.

Las condiciones de ensayo aplicables a las primeras fases de la vida figuran en el anexo 2. Los valores óptimos de pH y dureza del agua de dilución son 7,8 y 250 mg CaCO<sub>3</sub>/l, respectivamente.

### **CÁLCULOS Y ESTADÍSTICAS**

Se propone un procedimiento en dos etapas. En primer lugar, se hace un análisis estadístico de los datos relativos a la mortalidad, las anomalías en el desarrollo y el momento de la eclosión. A continuación, se hace una evaluación estadística de la longitud corporal de los peces con las concentraciones a las que no se haya observado ningún efecto adverso sobre esos tres parámetros. Se recomienda proceder así porque las sustancias tóxicas pueden matar selectivamente a los peces más pequeños, retrasar el momento de la eclosión e inducir malformaciones macroscópicas, lo cual puede sesgar las mediciones de longitud. Además de ello, la cantidad de peces por medir con cada tratamiento será más o menos la misma, lo cual garantiza la validez del análisis estadístico del ensayo.

### DETERMINACIÓN DE LA CL<sub>50</sub> Y LA CE<sub>50</sub>

Se calcula el porcentaje de huevos y larvas supervivientes y se corrige en función de la mortalidad en los controles mediante la fórmula de Abbott (4):

$$P=100-\left(\frac{C-P'}{C}\cdot x100\right)$$

donde

P = porcentaje de supervivientes corregido

P' = porcentaje de supervivientes observado en la concentración de ensayo

C = porcentaje de supervivientes en los controles

Si es posible, la CL<sub>50</sub> se determina por un método apropiado al final del ensayo.

Si se desea incluir las anomalías morfológicas en el tratamiento estadístico de la CE<sub>50</sub>, pueden encontrarse indicaciones al respecto en el artículo de Stephan (5).

### ESTIMACIÓN DE LA LOEC Y LA NOEC

Uno de los objetivos del ensayo con huevos y alevines es comparar los lotes sometidos a concentraciones positivas con los controles para determinar la LOEC, para lo cual habrá que emplear métodos de comparaciones múltiples (6)(7)(8)(9)(10).

### BIBLIOGRAFÍA

- (1) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. **10**, 121-173.
- (2) Hisaoka K.K. y Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., **102**, pp 311.
- (3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, **2**, pp 173-181.
- (4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3ª ed., Cambridge University Press, Gran Bretaña, pp 1-333.
- (5) Stephan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster y W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp 69-81.
- (6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., **50**, pp 1096-1121.
- (7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, **20**, 482-491.
- (8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, **27**, pp 103-117.
- (9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics **28**, pp 519-531.
- (10) Sokal R.R. y Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

ANEXO 2

CONDICIONES Y DURACIÓN DEL ENSAYO, Y CRITERIOS DE SUPERVIVENCIA PARA LAS ESPECIES RECOMENDADAS

ESPECIE	TEMP. (°C)	SALINIDAD (0/00)	FOTO- PERÍODO (h)	DURACIÓN DE LAS FASES (días)		DURACIÓN HABITUAL DEL ENSAYO	SUPERVIVENCIA EN LOS CONTROLES (% MÍNIMO)	
				Embrión	Alevín		Tasa de eclosiones satisfactoria s	Tras la eclosión
<b>AGUA DULCE</b>								
<i>Brachydanio rerio</i> Danio cebra	25 ± 1	–	12 – 16	3 – 5	8 – 10	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 5 días después de la eclosión (8-10 días)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Trucha arco iris	10 ± 1 <sup>(1)</sup> 12 ± 1 <sup>(2)</sup>	–	0 <sup>(a)</sup>	30 – 35	25 – 30	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 20 días después de la eclosión (50-55 días)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Carpa común	21 – 25	–	12 – 16	5	> 4	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 4 días después de la eclosión (8-9 días)	80	75
<i>Oryzias latipes</i> Medaka	24 ± 1 <sup>(1)</sup> 23 ± 1 <sup>(2)</sup>	–	12 – 16	8 – 11	4 – 8	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 5 días después de la eclosión (13-16 días)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> Piscardo	25 ± 2	–	16	4 – 5	5	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 4 días después de la eclosión (8-9 días)	60	70

(1) Para los embriones      (2) Para las larvas

(a) Embriones y larvas en la oscuridad hasta una semana después de la eclosión, salvo durante las observaciones. Después, luz tenue hasta el final del ensayo.

**ANEXO 3**

**CONDICIONES Y DURACIÓN DEL ENSAYO, Y CRITERIOS DE SUPERVIVENCIA PARA OTRAS ESPECIES BIEN DOCUMENTADAS**

ESPECIE	TEMP. (°C)	SALINIDAD (0/00)	FOTOPERÍODO (h)	DURACIÓN DE LAS FASES (días)		DURACIÓN HABITUAL DEL ENSAYO CON EMBRIONES Y ALEVINES	SUPERVIVENCIA EN LOS CONTROLES (% MÍNIMO)	
				Embrión	Alevín		Tasa de eclosiones satisfactorias	Tras la eclosión
<b>AGUA DULCE</b>								
<i>Carassius auratus</i> Carpa dorada	24 ± 1	-	-	3 - 4	> 4	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 4 días después de la eclosión (7 días)	-	80
<i>Leopomis macrochirus</i> Pez sol de agallas azules	21 ± 1	-	16	3	> 4	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 4 días después de la eclosión (7 días)	-	75
<b>AGUA SALADA</b>								
<i>Menidia peninsulae</i> Pejerrey del Atlántico Occidental	22 - 25	15 - 22	12	1.5	10	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 5 días después de la eclosión (6-7 días)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Arenque	10 ± 1	8 - 15	12	20 - 25	3 - 5	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 3 días después de la eclosión (23-27 días)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Bacalao	5 ± 1	5 - 30	12	14 - 16	3 - 5	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 3 días después de la eclosión (18 días)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i> Petota	25 ± 1	15 - 30	12	-	-	Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 4-7 días después de la eclosión (28 días)	> 75	80



**ANEXO 4**

**ALGUNAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UN AGUA DE DILUCIÓN ACEPTABLE**

<b>SUSTANCIA</b>	<b>CONCENTRACIONES</b>
Materia en partículas	< 20 mg/l
Carbono orgánico total	< 2 mg/l
Amoniaco no ionizado	< 1 µg/l
Cloro residual	< 10 µg/l
Plaguicidas organofosforados totales	< 50 ng/l
Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados	< 50 ng/l
Cloro orgánico total	< 25 ng/l

## C.16. ENSAYO DE TOXICIDAD ORAL AGUDA EN ABEJAS

### 1. MÉTODO

El presente ensayo de toxicidad aguda reproduce las directrices del documento OCDE TG 213 (1998).

#### 1.1 INTRODUCCIÓN

El presente ensayo de toxicidad consiste en un método de laboratorio diseñado para determinar la toxicidad oral aguda de los productos fitosanitarios y otros productos químicos en abejas obreras adultas.

Para determinar y evaluar las características tóxicas de una sustancia puede ser preciso estudiar la toxicidad oral aguda en abejas, por ejemplo, cuando es probable que éstas queden expuestas a un producto químico determinado. El ensayo de toxicidad oral aguda se realiza para determinar la toxicidad inherente de los plaguicidas y otras sustancias para las abejas. Sus resultados se emplean para saber si es necesario profundizar en la evaluación. En particular, el método puede emplearse en programas de evaluación del peligro de los plaguicidas para las abejas, basados en una progresión secuencial desde los ensayos de toxicidad en laboratorio hasta los experimentos de semicampo y de campo (1). Los plaguicidas pueden someterse a ensayo en forma de principios activos (p.a.) o de productos formulados.

Debe emplearse un tóxico de referencia para comprobar la sensibilidad de las abejas y la precisión del procedimiento de ensayo.

#### 1.2 DEFINICIONES

**Toxicidad oral aguda:** efectos nocivos que se manifiestan durante un período máximo de 96 h tras la administración oral de una dosis única de la sustancia de ensayo.

**Dosis:** cantidad de sustancia de ensayo consumida. Se expresa en peso de la sustancia por animal de ensayo ( $\mu\text{g}/\text{abeja}$ ). Dado que la alimentación es colectiva, no puede calcularse la dosis real por abeja, pero puede hacerse una estimación de la dosis media (sustancia de ensayo consumida en su totalidad/número de abejas en una jaula).

**DL<sub>50</sub> (dosis letal media) oral:** dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia que puede provocar la muerte del 50 % de los animales a los que se haya administrado por vía oral. La DL<sub>50</sub> se expresa en  $\mu\text{g}$  de sustancia de ensayo por abeja. En el caso de los plaguicidas, la sustancia de ensayo puede ser un principio activo (p.a.) o un producto formulado que contenga uno o varios principios activos.

**Mortalidad:** número de animales muertos, es decir, completamente inmóviles.

#### 1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se expone a las abejas obreras adultas (*Apis mellifera*) a una gama de dosis de la sustancia de ensayo dispersada en una solución de sacarosa. A continuación, se alimenta a las abejas de la misma forma, pero sin sustancia de ensayo. Se registra la mortalidad todos los días, al menos durante 48 h, y se compara con las cifras del control. Si la tasa de mortalidad aumenta entre las 24 y las 48 h y la mortalidad del control permanece a un nivel aceptable, es decir,  $\leq 10\%$ , está indicado prolongar el ensayo hasta un máximo de 96 h. Se analizan los resultados para calcular la DL<sub>50</sub> a las 24 y a las 48 h y, en caso de que se haya prolongado el estudio, a las 72 y a las 96 h.

#### 1.4 VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido han de darse las condiciones siguientes:

- la mortalidad media del total de los controles no ha de superar el 10 % al final del ensayo;
- la DL<sub>50</sub> del tóxico de referencia debe ajustarse a la gama especificada.

## 1.5 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

### 1.5.1 **Recolección de las abejas**

Deben emplearse ejemplares adultos jóvenes de abejas obreras de la misma raza, edad, alimentación, etc. Las abejas han de proceder de colonias sanas y bien alimentadas, a ser posible sin enfermedades y con reina, y con antecedentes y estado fisiológico conocidos. Pueden recolectarse la mañana del día en que vaya a realizarse el ensayo, o la víspera por la tarde y mantenerse en condiciones de ensayo hasta el día siguiente. Pueden emplearse abejas procedentes de cuadros sin cría, pero debe evitarse la recolección a principios de la primavera o finales del otoño, pues en esas épocas las abejas modifican su fisiología. Si es preciso realizar el ensayo en esas épocas, las abejas pueden colocarse en una incubadora y criarse durante una semana con pan de abejas (polen tomado del panal) y solución de sacarosa. Si se utilizan abejas tratadas con productos químicos como antibióticos, anti-varroa, etc., antes de iniciar el ensayo de toxicidad habrá que esperar cuatro semanas desde el final del último tratamiento.

### 1.5.2 **Alojamiento y alimentación**

Se emplean jaulas fáciles de limpiar, bien ventiladas, de cualquier material apropiado, como acero inoxidable, tela metálica, plástico, madera desechable, etc. y de tamaño apropiado, es decir, suficientemente espaciaosas para el número de abejas. Es preferible colocar grupos de diez abejas en cada jaula.

Las abejas se mantienen en la oscuridad en un cuarto de experimentación a  $25 \pm 2$  °C. Debe registrarse a lo largo del ensayo la humedad relativa, que será por lo general del 50-70 %. Tanto el manejo como el tratamiento y las observaciones pueden realizarse con luz (del día). Se alimenta a las abejas con solución acuosa de sacarosa con una concentración final de 500 g/l (50 % p/v). Tras las dosis de ensayo, se alimenta *ad libitum*. El sistema de alimentación debe permitir registrar la ingesta de cada jaula (véase el apartado 1.6.3.1). Puede emplearse un tubo de vidrio de unos 50 mm de largo por 10 mm de ancho, con un extremo abierto de unos 2 mm de diámetro.

### 1.5.3 **Preparación de las abejas**

Se asignan las abejas de forma aleatoria a las jaulas, que se colocan, también de forma aleatoria, en el cuarto de experimentación.

Conviene suprimir la alimentación de las abejas 2 h antes de iniciar el ensayo. Se recomienda esta práctica con el fin de que el contenido intestinal de todos los animales sea el mismo cuando comience el ensayo. Deben retirarse las abejas moribundas y sustituirse por otras sanas antes de empezar el ensayo.

### 1.5.4 **Preparación de las dosis**

Si la sustancia de ensayo puede mezclarse con el agua, se añade directamente a una solución de sacarosa al 50 %. Si se trata de productos de calidad técnica o de sustancias escasamente solubles en agua, pueden emplearse disolventes orgánicos, emulgentes o dispersantes poco tóxicos para las abejas (p.ej. acetona, dimetilformamida o dimetilsulfóxido). La concentración del excipiente dependerá de la solubilidad de la sustancia de ensayo y ha de ser la misma para todas las concentraciones que se empleen en el ensayo. Por lo general, resulta adecuada una concentración de excipiente del 1 %, que no debe sobrepasarse.

Se preparan soluciones de control adecuadas, lo cual significa que, cuando se utilice un disolvente o dispersante para solubilizar la sustancia de ensayo, han de emplearse dos grupos de control distintos: una solución acuosa y una solución de sacarosa con el disolvente o excipiente a la concentración empleada en las dosis de ensayo.

## 1.6 PROCEDIMIENTO

### 1.6.1 Grupos de ensayo y controles

El número de dosis y pruebas en paralelo han de ser suficientes desde el punto de vista estadístico para poder determinar la  $DL_{50}$  con un límite de confianza del 95 %. Suele ser necesaria una serie geométrica de cinco dosis con un factor que no sobrepase el 2,2 y que incluya la gama de la  $DL_{50}$ . No obstante, el factor de dilución y el número de concentraciones han de determinarse con arreglo a la pendiente de la curva de toxicidad (dosis/mortalidad) y al método estadístico que se haya elegido para analizar los resultados. Las concentraciones apropiadas para el tratamiento pueden establecerse tras un experimento de determinación de gamas.

Con cada concentración de ensayo deben tratarse al menos tres grupos en paralelo, de diez abejas cada uno. Además de la serie de ensayo, deben efectuarse al menos tres lotes de control, de diez abejas cada uno. También deben efectuarse lotes de control para los disolventes/excipientes que se utilicen (véase el apartado 1.5.4).

### 1.6.2 Tóxico de referencia

Debe incluirse un tóxico de referencia en la serie de ensayo. Se utilizarán al menos tres dosis que abarquen la  $DL_{50}$  prevista. Para cada dosis de ensayo se emplearán al menos tres jaulas en paralelo, con diez abejas cada una. El tóxico de referencia idóneo es el dimetoato, cuya  $DL_{50}$ -24 h tras administración oral es del orden de 0,10-0,35  $\mu\text{g}$  p.a./abeja (2). También pueden emplearse otros tóxicos si se dispone de datos suficientes para comprobar que la relación dosis/respuesta es la esperada (p.ej. paratión).

### 1.6.3 Exposición

#### 1.6.3.1 Administración de las dosis

Debe administrarse a cada grupo de abejas 100-200  $\mu\text{l}$  de solución acuosa de sacarosa al 50 % con la sustancia de ensayo a la concentración adecuada. Si la sustancia es poco soluble, poco tóxica o su concentración en la formulación es escasa, ha de administrarse un volumen mayor, pues se necesita una mayor cantidad de sustancia en la solución de sacarosa. Se controla la cantidad de alimento tratado que consume cada grupo. Una vez consumido el alimento (por lo general tras 3-4 h), se retira el comedero de la jaula y se sustituye por otro con solución de sacarosa únicamente, que se proporciona *ad libitum*. El rechazo de la dosis de ensayo de algunos productos a concentraciones superiores puede dar lugar a un consumo escaso o nulo de alimento. Tras un máximo de 6 h, el alimento tratado que no haya sido consumido se sustituye por solución de sacarosa sola. Se calcula el consumo de alimento tratado (p.ej., midiendo el volumen/peso del alimento tratado que haya sobrado).

#### 1.6.3.2 Duración

Conviene que el ensayo dure hasta 48 h después de la sustitución de la solución de ensayo por la de sacarosa sola. Si la mortalidad sigue aumentando en más del 10 % tras las primeras 24 h, debe prolongarse el ensayo hasta un máximo de 96 h, siempre y cuando la mortalidad del control no supere el 10 %.

### 1.6.4 Observaciones

Se registra la mortalidad a las 4 h, las 24 h y las 48 h del inicio del ensayo (es decir, de la administración de la dosis). Si es necesario prolongar el período de observación, se harán registros cada 24 h, hasta un máximo de 96 h, siempre y cuando la mortalidad del control no supere el 10 %.

Se calcula la cantidad de alimento consumido en cada grupo. Para saber si el alimento tratado es apetecible puede compararse el consumo de éste y el de alimento sin tratar, durante un período de 6 h. Debe registrarse todo comportamiento anormal observado durante el período de ensayo.

### 1.6.5 **Ensayo límite**

En algunos casos (por ejemplo, cuando se piense someter a ensayo una sustancia escasamente tóxica), puede realizarse un ensayo límite con 100 µg p.a./abeja para demostrar que la  $DL_{50}$  es superior a ese valor. Debe seguirse el mismo procedimiento, incluidos los tres grupos de ensayo en paralelo, con la dosis de ensayo, los controles pertinentes, el tóxico de referencia y para el cálculo de la cantidad de alimento tratado que se ha consumido. Si mueren abejas debe realizarse un estudio completo. Deben registrarse los efectos subletales, en caso de producirse (véase el apartado 1.6.4).

## 2. **RESULTADOS E INFORME**

### 2.1 **RESULTADOS**

Se resumen los resultados en un cuadro que recoja, para cada grupo tratado, grupo de control y grupo con el tóxico de referencia, el número de abejas empleadas, la mortalidad en cada una de las observaciones y el número de abejas que presenten alteraciones del comportamiento. Se analizan los datos relativos a la mortalidad con métodos estadísticos apropiados (p.ej. método de los probit, media móvil, probabilidad binomial) (3)(4). Se trazan las curvas de dosis-respuesta correspondientes a todas las observaciones recomendadas y se calculan las pendientes de las mismas y las dosis letales medias ( $DL_{50}$ ) con un límite de confianza del 95 %. La mortalidad de los controles puede corregirse mediante la corrección de Abbott (4)(5). Si el alimento tratado no se ha consumido en su totalidad, se calcula la cantidad de sustancia de ensayo consumida en cada grupo. La  $DL_{50}$  se expresa en µg de sustancia de ensayo por abeja.

### 2.2 **INFORME DEL ENSAYO**

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

#### 2.2.1 **Sustancia de ensayo:**

- naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes (estabilidad en el agua, presión de vapor, etc.);
- identificación química: fórmula estructural, pureza, etc. (en el caso de los plaguicidas, identidad y concentración del principio o principios activos).

#### 2.2.2 **Especie sometida a ensayo:**

- denominación científica, raza, edad aproximada (en semanas), método y fecha de recolección;
- información sobre las colonias de donde proceden las abejas de ensayo: estado de salud, enfermedades de los sujetos adultos, tratamientos previos, etc.

#### 2.2.3 **Condiciones de ensayo:**

- temperatura y humedad relativa en el cuarto de experimentación;
- condiciones de alojamiento, incluido el tipo, tamaño y material de las jaulas;
- método de preparación de la solución madre y de ensayo (en su caso, el disolvente y su concentración);
- diseño del ensayo, por ejemplo, número de concentraciones y concentraciones de ensayo, número de controles, etc.; para cada concentración de ensayo y control, número de jaulas utilizadas en paralelo y número de abejas por jaula;
- fecha del ensayo.

## 2.2.4

### **Resultados:**

- resultados del estudio previo de determinación de gamas, si procede;
- datos en bruto: mortalidad con cada dosis de ensayo en cada período de observación;
- gráfico de las curvas de dosis-respuesta al final del ensayo;
- valores de la  $DL_{50}$  con un límite de confianza del 95 % en cada período de observación recomendado, con la sustancia de ensayo y el tóxico de referencia;
- métodos estadísticos empleados para calcular la  $DL_{50}$ ;
- mortalidad en los controles;
- otros efectos biológicos observados o medidos en las abejas, como alteraciones del comportamiento (incluido el rechazo de la sustancia de ensayo), tasa de consumo del alimento tratado y sin tratar, etc.;
- toda desviación de los protocolos de ensayo aquí descritos y cualquier otra información de interés.

## 3.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151-165. Marzo de 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119-125.
- (3) Litchfield, J.T. y Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3ª ed., Cambridge, Londres y Nueva York.
- (5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, 265-267.

## C.17. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA POR CONTACTO EN ABEJAS

### 1. MÉTODO

El presente ensayo de toxicidad aguda reproduce las directrices del documento OCDE TG 214 (1998).

#### 1.1 INTRODUCCIÓN

El presente ensayo de toxicidad consiste en un método de laboratorio diseñado para determinar la toxicidad aguda por contacto de los productos fitosanitarios y otros productos químicos en abejas obreras adultas.

Para determinar y evaluar las características tóxicas de una sustancia puede ser preciso estudiar la toxicidad aguda por contacto en abejas, por ejemplo, cuando es probable que éstas queden expuestas a un producto químico determinado. El ensayo de toxicidad aguda por contacto se realiza para determinar la toxicidad inherente de los plaguicidas y otras sustancias para las abejas. Sus resultados se emplean para saber si es necesario profundizar en la evaluación. En particular, el método puede emplearse en programas de evaluación del peligro de los plaguicidas para las abejas, basados en una progresión secuencial desde los ensayos de toxicidad en laboratorio hasta los experimentos de semicampo y de campo (1). Los plaguicidas pueden someterse a ensayo en forma de principios activos (p.a.) o de productos formulados.

Debe emplearse un tóxico de referencia para comprobar la sensibilidad de las abejas y la precisión del procedimiento de ensayo.

#### 1.2 DEFINICIONES

**Toxicidad aguda por contacto:** efectos nocivos que se manifiestan durante un período máximo de 96 h tras la aplicación tópica de una dosis única de una sustancia.

**Dosis:** cantidad de sustancia de ensayo aplicada. Se expresa en peso de la sustancia por animal de ensayo ( $\mu\text{g}/\text{abeja}$ ).

**DL<sub>50</sub> (dosis letal media) por contacto:** dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia que puede provocar la muerte del 50 % de los animales a los que se haya aplicado. La DL<sub>50</sub> se expresa en  $\mu\text{g}$  de sustancia de ensayo por abeja. En el caso de los plaguicidas, la sustancia de ensayo puede ser un principio activo (p.a.) o un producto formulado que contenga uno o varios principios activos.

**Mortalidad:** número de animales muertos, es decir, completamente inmóviles.

#### 1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se expone a las abejas obreras adultas (*Apis mellifera*), por aplicación directa en el tórax (gotitas), a una gama de dosis de la sustancia de ensayo disuelta en un excipiente adecuado. El ensayo dura 48 h. Si la tasa de mortalidad aumenta entre las 24 y las 48 h y la mortalidad del control permanece a un nivel aceptable, es decir,  $\leq 10\%$ , está indicado prolongar el ensayo hasta un máximo de 96 h. Se registra la mortalidad todos los días y se compara con las cifras del control. Se analizan los resultados para calcular la DL<sub>50</sub> a las 24 y a las 48 h y, en caso de que se haya prolongado el estudio, a las 72 y a las 96 h.

#### 1.4 VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido han de darse las condiciones siguientes:

- la mortalidad media del total de los controles no ha de superar el 10 % al final del ensayo;
- la DL<sub>50</sub> del tóxico de referencia debe ajustarse a la gama especificada.

## 1.5 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

### 1.5.1 **Recolección de las abejas**

Deben emplearse ejemplares adultos jóvenes de abejas obreras de la misma raza, edad, alimentación, etc. Las abejas han de proceder de colonias sanas y bien alimentadas, a ser posible sin enfermedades y con reina, y con antecedentes y estado fisiológico conocidos. Pueden recolectarse la mañana del día en que vaya a realizarse el ensayo, o la víspera por la tarde y mantenerse en condiciones de ensayo hasta el día siguiente. Pueden emplearse abejas procedentes de cuadros sin cría, pero debe evitarse la recolección a principios de la primavera o finales del otoño, pues en esas épocas las abejas modifican su fisiología. Si es preciso realizar el ensayo en esas épocas, las abejas pueden colocarse en una incubadora y criarse durante una semana con “bee bread” (polen tomado del panal) y solución de sacarosa. Si se utilizan abejas tratadas con productos químicos como antibióticos, anti-varroa, etc., antes de iniciar el ensayo de toxicidad habrá que esperar cuatro semanas desde el final del último tratamiento.

### 1.5.2 **Alojamiento y alimentación**

Se emplean jaulas fáciles de limpiar, bien ventiladas, de cualquier material apropiado, como acero inoxidable, tela metálica, plástico, madera desechable, etc. y de tamaño apropiado, es decir, suficientemente espaciaosas para el número de abejas. Es preferible colocar grupos de diez abejas en cada jaula.

Las abejas se mantienen en la oscuridad en un cuarto de experimentación a  $25 \pm 2$  °C. Debe registrarse a lo largo del ensayo la humedad relativa, que será por lo general del 50-70 %. Tanto el manejo como el tratamiento y las observaciones pueden realizarse con luz (del día). Se alimenta a las abejas con solución acuosa de sacarosa con una concentración final de 500 g/l (50 % p/v). Ésta se proporciona *ad libitum* mientras dure el ensayo en un comedero de abejas, que puede ser un tubo de vidrio de unos 50 mm de largo por 10 mm de ancho, con un extremo abierto de unos 2 mm de diámetro.

### 1.5.3 **Preparación de las abejas**

Antes de aplicar la sustancia de ensayo, pueden anestesiarse las abejas con anhídrido carbónico o nitrógeno. Debe reducirse al mínimo la cantidad de anestésico aplicado y el tiempo de exposición. Se retiran las abejas moribundas y se sustituyen por otras sanas antes de empezar el ensayo.

### 1.5.4 **Preparación de las dosis**

La sustancia de ensayo se diluye en un excipiente, que puede ser un disolvente orgánico o una solución acuosa con un humectante. La acetona es el disolvente orgánico más conveniente, si bien pueden emplearse otros escasamente tóxicos para las abejas (p.ej. dimetilformamida o dimetilsulfóxido). Si se trata de formulados dispersados en agua o de sustancias orgánicas de gran polaridad insolubles en disolventes orgánicos, puede resultar más fácil aplicarlos en una solución débil de un humectante de una marca comercial (Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween, etc.).

Se preparan soluciones de control adecuadas, lo cual significa que, cuando se utilice un disolvente o dispersante para solubilizar la sustancia de ensayo, han de emplearse dos grupos de control distintos: uno con agua y otro con disolvente/dispersante.



## 1.6 PROCEDIMIENTO

### 1.6.1 Grupos de ensayo y controles

El número de dosis y pruebas en paralelo han de ser suficientes desde el punto de vista estadístico para poder determinar la  $DL_{50}$  con un límite de confianza del 95 %. Suele ser necesaria una serie geométrica de cinco dosis con un factor que no sobrepase el 2,2 y que incluya la gama de la  $DL_{50}$ . No obstante, el número de concentraciones ha de determinarse con arreglo a la pendiente de la curva de toxicidad (dosis/mortalidad) y al método estadístico que se haya elegido para analizar los resultados. Las concentraciones apropiadas para el tratamiento pueden establecerse tras un experimento de determinación de gamas.

Con cada concentración de ensayo deben tratarse al menos tres grupos en paralelo, de diez abejas cada uno.

Además de la serie de ensayo, deben efectuarse al menos tres lotes de control, de diez abejas cada uno. En su caso, deben hacerse tres lotes de control adicionales, de diez abejas cada uno, con el disolvente orgánico o humectante.

### 1.6.2 Tóxico de referencia

Debe incluirse un tóxico de referencia en la serie de ensayo. Se utilizarán al menos tres dosis que abarquen la  $DL_{50}$  prevista. Para cada dosis de ensayo se emplearán al menos tres jaulas en paralelo, con diez abejas cada una. El tóxico de referencia idóneo es el dimetoato, cuya  $DL_{50}$ -24 h por contacto es del orden de 0,10-0,35  $\mu\text{g}$  p.a./abeja (2). También pueden emplearse otros tóxicos si se dispone de datos suficientes para comprobar que la relación dosis/respuesta es la esperada (p.ej. paratión).

### 1.6.3 Exposición

#### 1.6.3.1 Administración de las dosis

Se hace una aplicación local a cada una de las abejas anestesiadas. Las abejas se asignan de forma aleatoria para las distintas dosis de ensayo y los controles. Con un microaplicador, se aplica a cada abeja en la cara dorsal del tórax 1  $\mu\text{l}$  de solución con sustancia de ensayo a la concentración adecuada. Si procede, pueden aplicarse otros volúmenes. Después de la aplicación, se colocan las abejas en las jaulas de ensayo y se les proporciona solución de sacarosa.

#### 1.6.3.2 Duración

Conviene que el ensayo dure 48 h. Si la mortalidad sigue aumentando en más del 10 % entre las 24 y las 48 h, debe prolongarse el ensayo hasta un máximo de 96 h, siempre y cuando la mortalidad del control no supere el 10 %.

### 1.6.4 Observaciones

Se registra la mortalidad a las 4 h, las 24 h y las 48 h de la administración de la dosis. Si es necesario prolongar el período de observación, se harán registros cada 24 h, hasta un máximo de 96 h, siempre y cuando la mortalidad del control no supere el 10 %.

Debe registrarse todo comportamiento anormal observado durante el período de ensayo.

### 1.6.5 Ensayo límite

En algunos casos (por ejemplo, cuando se piense someter a ensayo una sustancia escasamente tóxica), puede realizarse un ensayo límite con 100  $\mu\text{g}$  p.a./abeja para demostrar que la  $DL_{50}$  es superior a ese valor. Debe seguirse el mismo procedimiento, incluidos los tres grupos de ensayo en paralelo, con la dosis de ensayo, los controles pertinentes y el tóxico de referencia. Si mueren abejas debe realizarse un estudio completo. Deben registrarse los efectos subletales, en caso de producirse (véase el apartado 1.6.4).

## 2. RESULTADOS E INFORME

### 2.1 RESULTADOS

Se resumen los resultados en un cuadro que recoja, para cada grupo tratado, grupo de control y grupo con el tóxico de referencia, el número de abejas empleadas, la mortalidad en cada una de las observaciones y el número de abejas que presenten alteraciones del comportamiento. Se analizan los datos relativos a la mortalidad con métodos estadísticos apropiados (p.ej. método de los probit, media móvil, probabilidad binomial) (3)(4). Se trazan las curvas de dosis-respuesta correspondientes a todas las observaciones recomendadas (a las 24 h, 48 h y, en su caso, 72 h y 96 h) y se calculan las pendientes de las mismas y las dosis letales medias ( $DL_{50}$ ) con un límite de confianza del 95 %. La mortalidad de los controles puede corregirse mediante la corrección de Abbott (4)(5). La  $DL_{50}$  se expresa en  $\mu\text{g}$  de sustancia de ensayo por abeja.

### 2.2 INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

#### 2.2.1 Sustancia de ensayo:

- naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (estabilidad en el agua, presión de vapor, etc.);
- identificación química: fórmula estructural, pureza, etc. (en el caso de los plaguicidas, identidad y concentración del principio o principios activos).

#### 2.2.2 Especie sometida a ensayo:

- denominación científica, raza, edad aproximada (en semanas), método y fecha de recolección;
- información sobre las colonias de donde proceden las abejas de ensayo: estado de salud, enfermedades de los sujetos adultos, tratamientos previos, etc.

#### 2.2.3 Condiciones de ensayo:

- temperatura y humedad relativa en el cuarto de experimentación;
- condiciones de alojamiento, incluido el tipo, tamaño y material de las jaulas;
- método de administración de la sustancia de ensayo: disolvente, volumen de solución de ensayo, anestésicos empleados, etc.;
- diseño del ensayo, por ejemplo, número de concentraciones y concentraciones de ensayo, número de controles, etc.; para cada concentración de ensayo y control, número de jaulas utilizadas en paralelo y número de abejas por jaula;
- fecha del ensayo.

#### 2.2.4 Resultados:

- resultados del estudio previo de determinación de gamas, si procede;
- datos en bruto: mortalidad con cada concentración de ensayo en cada período de observación;
- gráfico de las curvas de dosis-respuesta al final del ensayo;
- valores de la  $DL_{50}$  con un límite de confianza del 95 % en cada período de observación recomendado, con la sustancia de ensayo y el tóxico de referencia;
- métodos estadísticos empleados para calcular la  $DL_{50}$ ;
- mortalidad en los controles;
- otros efectos biológicos observados o medidos en las abejas, así como cualquier reacción anormal;
- toda desviación de los protocolos de ensayo aquí descritos y cualquier otra información de interés.

3.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151-165. Marzo de 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) ,1981-1992. Journal of Apicultural Research 22 119-125.
- (3) Litchfield, J.T. y Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3ª ed., Cambridge, Londres y Nueva York.
- (5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, 265-267.

## C.18. ADSORCIÓN/DESORCIÓN SEGÚN UN MÉTODO DE EQUILIBRIO POR LOTES

### 1. MÉTODO

Este método reproduce las directrices de la OCDE TG 106, para la determinación de la adsorción / desorción en el suelo, según un método de equilibrio por lotes (2000).

#### 1.1 INTRODUCCIÓN

El método tiene en cuenta una prueba de anillo y un taller para la selección de suelo con vistas al desarrollo de una prueba de adsorción (1)(2)(3)(4), así como distintas directrices nacionales vigentes (5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

Los estudios de adsorción / desorción son útiles para proporcionar información esencial sobre la movilidad de las sustancias químicas y su distribución en los compartimentos edáfico, acuático y aéreo de la biosfera (12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21). Esta información puede ser utilizada en la predicción o estimación, por ejemplo, de la capacidad de una sustancia química para su degradación (22)(23), transformación y absorción por organismos (24), lixiviación a través del perfil edáfico (16)(18)(19)(21)(25)(26)(27)(28), volatilidad desde el suelo (21)(29)(30) o arrastre desde la tierra hasta las aguas naturales (18)(31)(32). Los datos de adsorción pueden utilizarse para establecer comparaciones y modelos (19)(33)(34)(35).

La distribución de una sustancia química entre las fases edáfica y acuosa es un proceso complejo que depende de diversos factores: la naturaleza química de la sustancia (12)(36)(37)(38)(39)(40), las características del suelo (4)(12)(13)(14)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48)(49) y factores climáticos tales como precipitaciones, temperatura, luz solar y viento. Así pues, los numerosos fenómenos y mecanismos implicados en el proceso de adsorción de una sustancia química por el suelo no pueden definirse completamente con un modelo simplificado de laboratorio como es el presente método. Sin embargo, esta tentativa, aunque no puede cubrir todos los casos ambientalmente posibles, proporciona información valiosa sobre la importancia ambiental de la adsorción de una sustancia química.

Véase también la introducción general.

#### 1.2 OBJETO

El objeto del método es estimar el comportamiento de adsorción / desorción de una sustancia en los suelos. Lo que se pretende es obtener un valor de sorción que pueda utilizarse para predecir el reparto en diversas condiciones ambientales; con este fin, se determinan los coeficientes de adsorción en el equilibrio de una sustancia química en diversos suelos en función de las características de éstos (por ejemplo, contenido de carbono orgánico, contenido de arcilla y textura del suelo, y pH). Hay que utilizar diversos tipos de suelo para cubrir lo más ampliamente posible las interacciones de una sustancia dada con suelos naturales.

En este método, la adsorción representa el proceso de enlace de una sustancia química a las superficies de los suelos; no se distingue entre diversos procesos de adsorción (adsorción física y química) y procesos tales como la degradación catalizada en superficie, la adsorción en la masa o las reacciones químicas. La adsorción que pueda darse en las partículas coloidales (diámetro < 0,2 µm) generadas por los suelos no se tiene en cuenta completamente.

Los parámetros del suelo que se consideran más importantes para la adsorción son los siguientes: contenido de carbono orgánico (3)(4)(12)(13)(14)(41)(43)(44)(45)(46)(47)(48); contenido de arcilla y textura del suelo (3)(4)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48) y pH para los compuestos ionizables (3)(4)(42). Otros parámetros del suelo que pueden influir en la adsorción / desorción de determinadas sustancias son la capacidad efectiva de intercambio catiónico (ECEC), el contenido de óxidos amorfos de hierro y aluminio, particularmente en caso de suelos volcánicos y tropicales (4), y la superficie específica (49).

La prueba se diseña para evaluar la adsorción de una sustancia química en distintos tipos de suelo con una amplia gama de contenido de carbono orgánico, contenido de arcilla y textura del suelo, y pH. Comprende tres etapas:

**Etapla 1:** Estudio preliminar para determinar:

- la proporción suelo / solución;
- el tiempo de equilibrio para la adsorción y la cantidad de sustancia problema adsorbida en el equilibrio;
- la adsorción de la sustancia problema en las superficies de los recipientes del ensayo y la estabilidad de dicha sustancia durante el período de prueba.

**Etapla 2:** Prueba de barrido: se estudia la adsorción en cinco tipos diversos de suelo mediante cinética de adsorción con una sola concentración y determinación del coeficiente de distribución  $K_d$  y  $K_{oc}$ .

**Etapla 3:** Determinación de las isothermas de adsorción de Freundlich para determinar la influencia de la concentración sobre el grado de adsorción en los suelos.

Estudio de la desorción mediante cinética de desorción / isothermas de desorción de Freundlich (Anexo 1).

1.3

DEFINICIONES Y UNIDADES

Símbolo	Definición	Unidades
$A_{t_i}$	adsorción porcentual al tiempo $t_i$	%
$A_{eq}$	adsorción porcentual en el equilibrio de adsorción	%
$m_s^{ads}(t_i)$	masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo al tiempo $t_i$	$\mu\text{g}$
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo durante el intervalo de tiempo $\Delta t_i$	$\mu\text{g}$
$m_s^{ads}(eq)$	masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción	$\mu\text{g}$
$m_0$	masa de la sustancia problema en el tubo de ensayo, al principio de la prueba de adsorción	$\mu\text{g}$
$m_m^{ads}(t_i)$	masa de la sustancia problema medida en una alícuota ( $v_a^A$ ) al tiempo $t_i$	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^{ads}(eq)$	masa de la sustancia en la solución en el equilibrio de adsorción	$\mu\text{g}$
$m_{soil}$	cantidad de la fase edáfica, expresada en masa seca de suelo	g
$C_{st}$	concentración en masa de la solución madre de la sustancia	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_0$	concentración inicial en masa de la solución problema en contacto con el suelo	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	concentración en masa de la sustancia en la fase acuosa al tiempo $t_i$ en que se realiza el análisis	$\mu\text{g cm}^{-3}$

$C_s^{ads} (eq)$	contenido de la sustancia adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{ads} (eq)$	concentración en masa de la sustancia en la fase acuosa en el equilibrio de adsorción	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$V_0$	volumen inicial de la fase acuosa en contacto con el suelo durante la prueba de adsorción	$\text{cm}^3$
$v_a^A$	volumen de la alícuota en que se mide la sustancia problema	$\text{cm}^3$
$K_d$	coeficiente de distribución de la adsorción	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_{oc}$	coeficiente de adsorción normalizado para tener en cuenta el carbono orgánico	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_{om}$	coeficiente de distribución normalizado para tener en cuenta la materia orgánica	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_F^{ads}$	coeficiente de adsorción de Freundlich	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$1/n$	exponente de Freundlich	
$D_{t_i}$	desorción porcentual al tiempo $t_i$	%
$D_{\Delta t_i}$	desorción porcentual en el intervalo de tiempo $\Delta t_i$	%
$K_{des}$	coeficiente de desorción aparente	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
$K_F^{des}$	coeficiente de desorción de Freundlich	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$m_{aq}^{des} (t_i)$	masa de la sustancia problema desorbida del suelo al tiempo $t_i$	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^{des} (\Delta t_i)$	masa de la sustancia problema desorbida del suelo durante el intervalo de tiempo $\Delta t_i$	$\mu\text{g}$
$m_m^{des} (eq)$	masa de la sustancia determinada analíticamente en la fase acuosa en el equilibrio de desorción	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^{des} (eq)$	masa total de la sustancia problema desorbida en el equilibrio de desorción	$\mu\text{g}$
$m_s^{des} (\Delta t_i)$	masa de la sustancia que permanece adsorbida en el suelo después del intervalo de tiempo $\Delta t_i$	$\mu\text{g}$
$m_{aq}^A$	masa de la sustancia que queda en solución después de alcanzado el equilibrio de adsorción debido a la sustitución incompleta del volumen	$\mu\text{g}$
$C_s^{des} (eq)$	contenido de la sustancia problema que permanece adsorbida en el suelo en el equilibrio de desorción	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{des} (eq)$	concentración en masa de la sustancia problema en la fase acuosa en el equilibrio de desorción	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$V_T$	volumen total de la fase acuosa en contacto con el suelo durante el experimento de cinética de desorción llevado a cabo con el método en serie	$\text{cm}^3$
$V_R$	volumen del sobrenadante retirado del tubo después de alcanzar el equilibrio de adsorción y sustituido por el mismo volumen de solución de $\text{CaCl}_2$ 0,01 M	$\text{cm}^3$
$v_a^D$	volumen de la alícuota tomada para el análisis a partir del tiempo (i), durante el experimento de cinética de desorción realizado con el método en serie	$\text{cm}^3$
$V_R^i$	volumen de la solución tomada del tubo (i) para la medida de la sustancia problema, en el experimento de cinética de desorción (método paralelo)	$\text{cm}^3$

$V_r^F$	volumen de la solución tomada del tubo para la medida de la sustancia problema, en el equilibrio de desorción	$\text{cm}^3$
MB	balance de masa	%
$m_E$	masa total de la sustancia problema extraída del suelo y de las paredes del recipiente del ensayo en dos pasos	$\mu\text{g}$
$V_{\text{rec}}$	volumen del sobrenadante recuperado después del equilibrio de adsorción	$\text{cm}^3$
$P_{ow}$	coeficiente de reparto octanol / agua	
pKa	constante de disociación	
$S_w$	hidrosolubilidad	$\text{g l}^{-1}$

#### 1.4 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

A las muestras de suelo de peso seco conocido que se han preequilibrado en  $\text{CaCl}_2$  0,01 M se añaden volúmenes conocidos de soluciones de concentración también conocida de la sustancia problema, no marcada ni radiomarcada, en  $\text{CaCl}_2$  0,01 M. La mezcla se agita durante un tiempo adecuado. Las suspensiones de suelo se separan entonces por centrifugación y, si se desea, por filtración, y se analiza la fase acuosa. La cantidad de sustancia problema adsorbida en la muestra de suelo se calcula como la diferencia entre la cantidad de sustancia problema inicialmente presente en la solución y la cantidad que permanece al final del experimento (método indirecto).

Como opción, la cantidad de sustancia problema adsorbida puede determinarse también directamente por análisis del suelo (método directo). Este procedimiento, que implica someter el suelo a extracción gradual con el solvente apropiado, se recomienda en caso de que no pueda determinarse exactamente la diferencia de concentración de la sustancia en la solución. Los siguientes son ejemplos de tales casos: adsorción de la sustancia problema en la superficie de los recipientes del ensayo, inestabilidad de la sustancia problema en la escala de tiempo del experimento, adsorción débil que dé solamente un pequeño cambio de concentración en la solución, y adsorción fuerte que deje una concentración tan baja que no pueda determinarse exactamente. Si se utiliza una sustancia radiomarcada, la extracción del suelo puede evitarse mediante análisis de la fase edáfica por combustión y recuento de centelleo líquido. Sin embargo, el recuento de centelleo líquido es una técnica inespecífica que no puede distinguir entre productos parentales y productos de transformación; por lo tanto, debe utilizarse solamente si la sustancia problema es estable durante la duración del estudio.

#### 1.5 INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

Los reactivos químicos deben ser de grado analítico. Se recomienda el uso de sustancias problema no marcadas de composición conocida y pureza preferiblemente del 95%, al menos, o de sustancias problema radiomarcadas de composición y radiopureza conocidas. En caso de marcadores de semivida breve, deben aplicarse correcciones para tener en cuenta su desintegración.

Antes de llevar a cabo una prueba de adsorción / desorción, debe disponerse de la siguiente información sobre la sustancia problema:

- hidrosolubilidad (A.6.);
- presión de vapor (A.4.) o constante de la ley de Henry;
- degradación abiótica: hidrólisis en función del pH (C.7.);
- coeficiente de reparto (A.8.);
- biodegradabilidad fácil (C.4.) o transformación aerobia y anaerobia en el suelo;
- pKa de las sustancias ionizables;
- fotoólisis directa en agua (es decir, espectro de absorción ultravioleta-visible en el agua, rendimiento cuántico) y fotodegradación en el suelo.

## 1.6 APLICABILIDAD DE LA PRUEBA

La prueba es aplicable a las sustancias químicas respecto a las cuales se dispone de un método analítico con la suficiente exactitud. Un parámetro importante que puede influir en la fiabilidad de los resultados, especialmente cuando se sigue el método indirecto, es la estabilidad de la sustancia problema en la escala de tiempo de la prueba. Así pues, es necesario comprobar la estabilidad en un estudio preliminar; si se observa alguna transformación en la escala de tiempo de la prueba, se recomienda que el estudio principal se realice analizando tanto la fase edáfica como la acuosa.

Pueden surgir dificultades en la realización de esta prueba con sustancias problema cuya hidrosolubilidad sea baja ( $S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$ ), así como con sustancias muy cargadas, debido al hecho de que la concentración en la fase acuosa no puede medirse analíticamente con la suficiente exactitud. En estos casos hay que tomar medidas adicionales. En las secciones pertinentes del presente método se dan indicaciones sobre cómo tratar estos problemas.

Al probar sustancias volátiles, debe tenerse cuidado para evitar pérdidas durante el estudio.

## 1.7 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

### 1.7.1 Instrumentos y reactivos químicos

Equipo normal de laboratorio, especialmente el siguiente:

- a) Tubos o recipientes para llevar a cabo los experimentos. Es importante que estos tubos o recipientes:
  - ajusten directamente en la centrifugadora para minimizar los errores de manipulación y transferencia;
  - estén hechos de un material inerte que minimice la adsorción de la sustancia problema en su superficie.
- b) Dispositivo de agitación: agitador rotatorio o equipo equivalente; el dispositivo de agitación debe mantener el suelo en suspensión durante la agitación.
- c) Centrifugadora: preferiblemente de alta velocidad con, por ejemplo, fuerzas de centrifugación  $> 3000 \text{ g}$ , con temperatura controlada, capaces de retirar de la solución acuosa partículas con un diámetro mayor de  $0,2 \mu\text{m}$ . Los recipientes deben estar cerrados durante la agitación y la centrifugación para evitar fenómenos de volatilidad y pérdidas de agua; para minimizar la adsorción sobre ellos, deben utilizarse tapones desactivados, tales como tapones de rosca con revestimiento de teflón.
- d) Opcional: dispositivo de filtración; filtros de  $0,2 \mu\text{m}$  de porosidad, estériles, de un solo uso. Debe tenerse especial cuidado en la selección del material del filtro, a fin de evitar cualquier pérdida de la sustancia problema sobre él; para las sustancias problema poco solubles no se recomienda usar material orgánico.
- e) Instrumentación analítica, adecuada para medir la concentración de la sustancia problema.
- f) Estufa de laboratorio, capaz de mantener una temperatura de  $103 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 1.7.2 Caracterización y selección de los suelos

Los suelos deben caracterizarse por tres parámetros considerados en gran parte responsables de la capacidad de adsorción: carbono orgánico, contenido de arcilla y textura de suelo, y pH. Como ya se ha mencionado (véase la sección "Objeto"), la adsorción / desorción de ciertas sustancias puede verse afectada por otras propiedades fisicoquímicas del suelo, que deben considerarse en tales casos.



Los métodos utilizados para la caracterización de suelo son muy importantes y pueden tener una influencia significativa en los resultados. Por lo tanto, se recomienda que se mida el pH del suelo en una solución de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M (que es la solución utilizada en la prueba de adsorción / desorción) según el método correspondiente de la ISO (por ejemplo ISO-10390-1). También se recomienda que las otras propiedades pertinentes del suelo se determinen según métodos normalizados (Manual de análisis de suelo de la ISO “Handbook of Soil Analysis”); esto permite que el análisis de los datos de sorción se base en parámetros del suelo normalizados en conjunto. En la sección “Bibliografía” (50-52) se da información sobre métodos normalizados existentes de análisis y caracterización del suelo. Para el calibrado de los métodos de prueba del suelo, se recomienda el uso de suelos de referencia.

En el cuadro 1 se da información sobre la selección de suelos para los experimentos de adsorción / desorción. Los siete suelos seleccionados cubren los tipos de suelo de las zonas geográficas templadas. En caso de sustancias problema ionizables, los suelos seleccionados deben cubrir una gama amplia de pH, para poder evaluar la adsorción de la sustancia en sus formas ionizada y no ionizada. En la sección 1.9, “Realización de la prueba”, figuran orientaciones sobre cuántos suelos diversos han de utilizarse en las diversas fases de la prueba.

Si se prefieren otros tipos de suelo, deben caracterizarse por los mismos parámetros y ser similares a los descritos en el cuadro 1 en cuanto a la variación de sus propiedades, incluso aunque no se ajusten exactamente a los criterios.

**Cuadro 1: Información sobre la selección de muestras de suelo para los estudios de adsorción / desorción**

Tipo de suelo	Gama de pH (en CaCl <sub>2</sub> 0,01 M)	Contenido de carbono orgánico (%)	Contenido de arcilla (%)	Textura del suelo*
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65 - 80	arcilla
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20 - 40	franco-arcilloso
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 - 25	franco-limoso
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 - 30	franco
5	< 4,0 - 6,0 <sup>§</sup>	< 0,5 - 1,5 <sup>‡</sup>	< 10 - 15 <sup>§</sup>	franco-arenoso
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 <sup>‡</sup>	40 - 65	franco-arcilloso / arcilla
7	< 4,5	> 10	< 10	arena / franco-arenoso

\* Según el sistema de la FAO y EEUU (85).

§ Las variables respectivas deben mostrar preferentemente valores dentro de la gama considerada. Si, no obstante, hay dificultades para encontrar material de suelo adecuado, se aceptarán valores por debajo del mínimo indicado.

‡ Los suelos con menos del 0,3 % de carbono orgánico pueden perturbar la correlación entre el contenido orgánico y la adsorción. Así pues, se recomienda el uso de suelos con un contenido mínimo de carbono orgánico del 0,3 %.

### 1.7.3 Recogida y conservación de muestras de suelo

#### 1.7.3.1 Recogida

No se recomienda ninguna técnica o herramienta de muestreo específica; la técnica de muestreo depende del propósito del estudio (53)(54)(55)(56)(57)(58).

Deben considerarse los siguientes elementos:

- Es necesario tener información detallada sobre las circunstancias del yacimiento, incluyendo la situación, cubierta vegetal, tratamientos con plaguicidas y fertilizantes, adiciones biológicas o contaminación

accidental. Deben seguirse las recomendaciones de la norma de la ISO sobre muestreo del suelo (ISO 10381-6) en cuanto a la descripción del sitio de muestreo.

- b) Hay que definir el sitio de muestreo por sus coordenadas UTM (proyección universal transversal de Mercator / cero geodésico horizontal europeo) o geográficas; así se puede volver a recoger en el futuro un suelo particular o definir el suelo bajo diversos sistemas de clasificación utilizados en países diferentes. Solamente debe recogerse el horizonte A hasta una profundidad máxima de 20 cm. Especialmente en el caso del suelo n. 7, si hay un horizonte  $O_h$  presente como parte del suelo, debe incluirse en el muestreo.

Las muestras de suelo deben transportarse utilizando recipientes y bajo condiciones de temperatura que garanticen que no se alteran perceptiblemente las propiedades iniciales del suelo.

#### 1.7.3.2 *Conservación*

Se prefiere el uso de suelos tomados recientemente del yacimiento. Solamente si esto no es posible, el suelo puede conservarse a temperatura ambiente y secado al aire. No se recomienda ningún límite de tiempo de conservación, pero los suelos almacenados durante más de tres años deben volver a analizarse en cuanto a su contenido de carbono orgánico, pH y capacidad de intercambio catiónico, antes de que se utilicen.

#### 1.7.3.3 *Manipulación y preparación de las muestras de suelo para la prueba*

Los suelos se secan al aire a temperatura ambiente (preferiblemente entre 20 y 25 °C). La desagregación debe llevarse a cabo con la fuerza mínima, de modo que la textura original del suelo cambie lo menos posible. Los suelos se tamizan a un tamaño de partícula  $\leq 2$  mm; deben seguirse las recomendaciones de la norma de la ISO sobre muestreo de suelo (ISO 10381-6) en cuanto al proceso de tamizado. Se recomienda una homogeneización cuidadosa, ya que aumenta la reproducibilidad de los resultados. El índice de humedad de cada suelo se determina en tres alícuotas mediante calentamiento a 105 °C hasta que no haya ningún cambio significativo en el peso (aproximadamente 12 h). Para todos los cálculos, la masa del suelo hace referencia a la masa seca en estufa, es decir, el peso del suelo corregido para descontar el índice de humedad.

#### 1.7.4 **Preparación de la sustancia problema para su aplicación al suelo**

La sustancia problema se disuelve en una solución de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M en agua destilada o desionizada; la solución de  $\text{CaCl}_2$  se utiliza como fase solvente acuosa para mejorar la centrifugación y minimizar el intercambio catiónico. La concentración de la solución madre debe ser preferiblemente tres órdenes de magnitud más alta que el límite de detección del método analítico utilizado. Este umbral garantiza la exactitud de las medidas en cuanto a la metodología seguida en este método; además, la concentración de la solución madre debe estar por debajo de la hidrosolubilidad de la sustancia problema.

La solución madre debe prepararse de preferencia justo antes de la aplicación a las muestras de suelo y debe guardarse cerrada en la oscuridad a 4 °C. El tiempo de conservación depende de la estabilidad de la sustancia problema y de su concentración en la solución.

Solamente en el caso de las sustancias poco solubles ( $S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$ ), puede ser necesario añadir un agente de solubilización apropiado cuando sea difícil disolver la sustancia problema. Este agente de solubilización: a) debe ser miscible con agua, como el metanol o el acetonitrilo; b) su concentración no debe exceder del 1 % del volumen total de la solución madre y debe constituir menos de ese límite en la solución de la sustancia problema que se vaya a poner en contacto con el suelo (preferentemente menos del 0,1 %); y (c) no debe ser un agente tensoactivo ni experimentar reacciones solvolíticas con la sustancia problema. El uso de un agente de solubilización debe constar y justificarse en el informe sobre los datos.

Otra opción para sustancias poco solubles es añadir al sistema de prueba sustancia problema ya disuelta: esta sustancia se disuelve en un solvente orgánico, del cual se añade una alícuota al sistema de suelo y solución de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M en agua destilada o desionizada. El contenido del solvente orgánico en la fase acuosa debe mantenerse lo más bajo posible, normalmente sin exceder del 0,1 %. La utilización de un solvente orgánico puede adolecer de irreproducibilidad del volumen. Así pues, puede introducirse un error adicional ya que la concentración de sustancia problema y de cosolvente no será la misma en todas las pruebas.

## 1.8 REQUISITOS PREVIOS PARA LLEVAR A CABO LA PRUEBA DE ADSORCIÓN / DESORCIÓN

### 1.8.1 **Método analítico**

Entre los parámetros clave que pueden influir en la exactitud de las medidas de sorción se incluyen la exactitud del método analítico en el análisis de las fases tanto de solución como adsorbida, la estabilidad y la pureza de la sustancia problema, el logro del equilibrio de sorción, la magnitud del cambio de concentración de la solución, la proporción suelo / solución y los cambios en la estructura del suelo durante el proceso de equilibrado (35) (59-62). En el Anexo 2 figuran algunos ejemplos donde se tratan estos problemas de exactitud.

Debe comprobarse la fiabilidad del método analítico utilizado en la gama de concentración que pueda darse durante la prueba. El experimentador debe ser libre para elaborar un método apropiado con la exactitud, la precisión, la reproducibilidad, los límites de detección y la recuperación apropiados. A continuación se dan orientaciones sobre cómo llevar a cabo tal prueba.

Un volumen apropiado de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, por ejemplo  $100 \text{ cm}^3$ , se agita durante 4 h con un peso determinado de suelo, por ejemplo 20 g, de alta capacidad de adsorción, es decir, con un alto contenido de carbono orgánico y de arcilla; estos pesos y volúmenes pueden variar dependiendo de las necesidades analíticas, pero una proporción suelo / solución de 1:5 es un punto de partida conveniente. Se centrifuga la mezcla y puede filtrarse la fase acuosa. Se añade a ésta cierto volumen de la solución madre de sustancia problema para alcanzar una concentración nominal dentro de la gama de concentración que pueda darse durante la prueba. Este volumen no debe exceder del 10% del volumen final de la fase acuosa, para cambiar lo menos posible la naturaleza de la solución de preequilibrado. Se analiza la solución.

Debe realizarse una prueba en blanco con el sistema suelo + solución de  $\text{CaCl}_2$  (sin la sustancia problema), para comprobar la presencia de artefactos en el método analítico y de efectos de matriz causados por el suelo.

Entre los métodos analíticos que pueden utilizarse para las medidas de sorción se incluyen la cromatografía gas-líquido (CGL), la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), la espectrometría (por ejemplo, cromatografía gaseosa / espectrometría de masas, CLAR / espectrometría de masas) y el recuento de centelleo líquido (para sustancias radiomarcadas). Sea cual sea el método analítico utilizado, se considera conveniente si la recuperación está entre el 90% y el 110% del valor nominal. Para permitir la detección y la evaluación después de que haya tenido lugar el reparto, los límites de detección del método analítico deben estar al menos dos órdenes de magnitud por debajo de la concentración nominal.

Las características y los límites de detección del método analítico disponible para llevar a cabo los estudios de adsorción desempeñan un papel importante en la definición de las condiciones de prueba y de la realización de todo el experimento. Este método sigue una vía experimental general y proporciona recomendaciones y orientaciones sobre soluciones alternativas cuando el método analítico y las instalaciones de laboratorio impongan limitaciones.

1.8.2 Selección de las proporciones óptimas suelo / solución

La selección de proporciones apropiadas suelo / solución para los estudios de sorción depende del coeficiente de distribución  $K_d$  y del grado relativo de adsorción deseado. El cambio de concentración de la sustancia en la solución determina la exactitud estadística de la medida basada en la forma de la ecuación de adsorción y el límite de la metodología analítica, respecto a la detección de la concentración de la sustancia química en la solución. Por lo tanto, en la práctica general es útil partir de algunas proporciones fijadas, para las cuales el porcentaje adsorbido sea de más del 20 %, y preferiblemente > 50 % (62), mientras que debe tenerse cuidado para mantener bastante alta la concentración de sustancia problema en la fase acuosa a fin de poder medirla con exactitud. Esto es particularmente importante en caso de altos porcentajes de adsorción.

Un planteamiento conveniente de la selección de las proporciones adecuadas suelo / agua se basa en una estimación del valor de  $K_d$  por estudios preliminares o por técnicas aceptadas de estimación (Anexo 3). La selección de una proporción adecuada puede entonces basarse en la gráfica de la proporción suelo / solución frente a  $K_d$  con porcentajes fijos de adsorción (fig.1). En esta gráfica se asume que la ecuación de adsorción es lineal<sup>1</sup>. La relación aplicable se obtiene reordenando la ecuación (4) de  $K_d$  en la forma de la ecuación (1):

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left( \frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \tag{1}$$

o en su forma logarítmica suponiendo que  $R = m_{soil}/V_0$  y  $A_{eq}\%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$  :

$$\log R = - \log K_d + \log \left[ \frac{(A_{eq}\%/100)}{(1-A_{eq}\%/100)} \right] \tag{2}$$

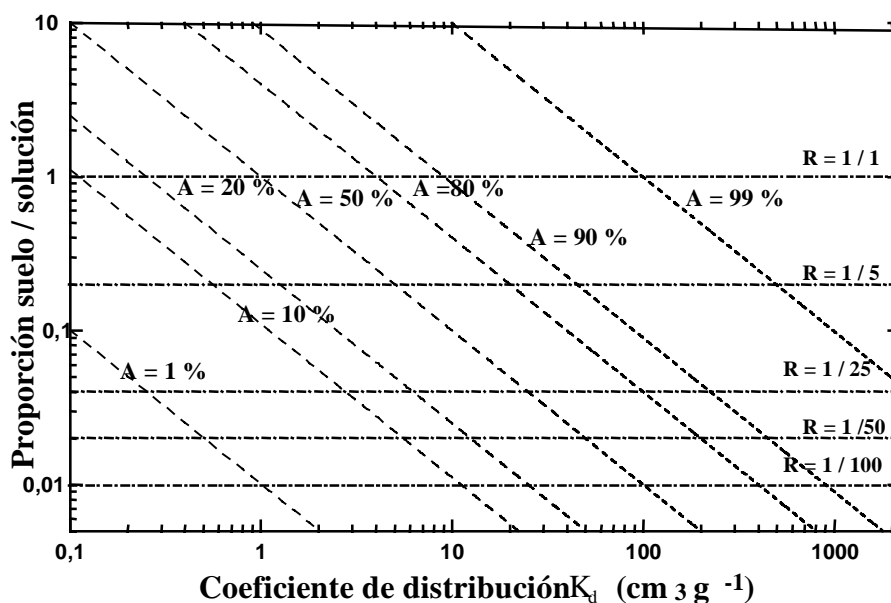


Fig. 1 Relación entre las proporciones suelo / solución y  $K_d$  con diversos porcentajes de adsorción de la sustancia problema

<sup>1</sup>  $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$

La fig. 1 muestra las proporciones suelo / solución necesarias en función de  $K_d$  para diversos niveles de adsorción. Por ejemplo, con una proporción suelo / solución de 1:5 y un  $K_d$  de 20, habrá aproximadamente un 80% de adsorción. Para obtener una adsorción del 50 % con el mismo  $K_d$ , debe utilizarse una proporción de 1:25. Este planteamiento de la selección de las proporciones suelo / solución adecuadas da al investigador la flexibilidad suficiente para satisfacer sus necesidades experimentales.

Los casos que son más difíciles de tratar son aquéllos en que la sustancia química se adsorbe mucho o muy poco. En los casos en que se dé adsorción baja, se recomienda una proporción suelo / solución de 1:1, aunque con algunos tipos de suelo muy orgánico pueden ser necesarias proporciones más pequeñas para obtener una mezcla fluida. Debe tenerse cuidado con la metodología analítica para medir pequeños cambios en la concentración de la solución; si no, la medida de la adsorción será inexacta. Por otra parte, en caso de coeficientes de distribución  $K_d$  muy altos, puede llegarse hasta una proporción suelo / solución de 1:100 para dejar una cantidad significativa de sustancia química en la solución. Sin embargo, debe tenerse cuidado para asegurar una buena mezcla, y dejarse tiempo suficiente para que el sistema se equilibre. Un planteamiento alternativo es predecir el valor de  $K_d$  aplicando técnicas de estimación basadas, por ejemplo, en los valores de  $P_{ow}$  (Anexo 3). Esto podría ser útil especialmente para las sustancias químicas poco adsorbidas / polares con  $P_{ow} < 20$  y para las sustancias lipofílicas / de alta sorción con  $P_{ow} > 10^4$ .

## 1.9 REALIZACIÓN DE LA PRUEBA

### 1.9.1 Condiciones de la prueba

Todos los experimentos se hacen a temperatura ambiente y, si es posible, a una temperatura constante situada entre 20 °C y 25 °C.

Las condiciones de la centrifugación permitirán eliminar de la solución las partículas de más de 0,2  $\mu\text{m}$ . Este valor corresponde a la partícula más pequeña que se considera partícula sólida, y es el límite entre partículas sólidas y coloidales. En el Anexo 4 figuran orientaciones sobre cómo determinar las condiciones de la centrifugación.

Si el equipo de centrifugación no puede garantizar la eliminación de las partículas de más de 0,2  $\mu\text{m}$ , puede utilizarse una combinación de centrifugación y de filtración con filtros de 0,2  $\mu\text{m}$ . Estos filtros deben hacerse de un material inerte conveniente para evitar cualquier pérdida de la sustancia problema en ellos. En todo caso, debe demostrarse que no se produce durante la filtración ninguna pérdida de sustancia problema.

### 1.9.2 Etapa 1 - Estudio preliminar

La finalidad de llevar a cabo un estudio preliminar figura ya en la sección “Objeto”. Con el experimento sugerido más adelante se dan orientaciones sobre la realización de tal prueba.

#### 1.9.2.1 Selección de las proporciones óptimas suelo / solución

Se utilizan dos tipos de suelo y tres proporciones suelo / solución (seis experimentos). Un tipo de suelo tendrá alto contenido de carbono orgánico y bajo contenido de arcilla; el otro, bajo contenido de carbono orgánico y alto contenido de arcilla. Se sugieren las siguientes proporciones:

- 50 g de suelo y 50  $\text{cm}^3$  de solución acuosa de la sustancia problema (proporción 1/1);
- 10 g de suelo y 50  $\text{cm}^3$  de solución acuosa de la sustancia problema (proporción 1/5);
- 2 g de suelo y 50  $\text{cm}^3$  de solución acuosa de la sustancia problema (proporción 1/25).

La cantidad mínima de suelo con la cual puede llevarse a cabo el experimento depende de las instalaciones del laboratorio y de las características de los métodos analíticos utilizados. Sin embargo, se recomienda utilizar por lo menos 1 g, y preferiblemente 2 g, para obtener resultados fiables en la prueba.

Una muestra de control con solamente la sustancia problema en solución de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M (sin suelo) se somete precisamente al mismo tratamiento que los sistemas de prueba, para comprobar la estabilidad de la sustancia problema en solución de  $\text{CaCl}_2$  y su posible adsorción a las superficies de los recipientes del ensayo.

Una muestra en blanco por suelo con la misma cantidad de suelo y el volumen total de  $50 \text{ cm}^3$  de solución de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ M}$  (sin sustancia problema) se somete al mismo procedimiento de prueba, con el fin de servir de contraste durante el análisis para detectar sustancias de interferencia o suelos contaminados.

Todos los experimentos, incluidos los controles y los blancos, deben llevarse a cabo al menos por duplicado. El número total de muestras que deben prepararse para el estudio puede calcularse en función de la metodología seguida.

Los métodos para el estudio preliminar y el estudio principal son generalmente los mismos; se mencionan las excepciones en su caso.

Las muestras de suelo secadas al aire se equilibran agitándolas con un volumen mínimo de  $45 \text{ cm}^3$  de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ M}$  durante una noche (12 h) antes del día del experimento. Después se añade cierto volumen de la solución madre de sustancia problema para ajustar el volumen final a  $50 \text{ cm}^3$ . Este volumen añadido de la solución madre: a) no debe exceder del 10% del volumen final de  $50 \text{ cm}^3$  de la fase acuosa para cambiar lo menos posible la naturaleza de la solución de preequilibrado; y b) debe suponer preferiblemente una concentración inicial de la sustancia problema en contacto con el suelo ( $C_0$ ) por lo menos dos órdenes de magnitud más alta que el límite de detección del método analítico; este umbral garantiza la posibilidad de llevar a cabo medidas exactas incluso en caso de adsorción fuerte ( $> 90\%$ ) y de determinar más tarde las isothermas de adsorción. También se recomienda que, a ser posible, la concentración inicial de sustancia ( $C_0$ ) no supere la mitad de su límite de solubilidad.

Se da más abajo un ejemplo de cómo calcular la concentración de la solución madre ( $C_{st}$ ). Se supone un límite de detección de  $0,01 \mu\text{g cm}^{-3}$  y una adsorción del 90%; así pues, la concentración inicial de la sustancia problema en contacto con el suelo debe ser preferiblemente  $1 \mu\text{g cm}^{-3}$  (dos órdenes de magnitud más alta que el límite de detección). Suponiendo que se añade el volumen recomendado máximo de la solución madre (es decir,  $5 \text{ cm}^3$ ) a  $45 \text{ cm}^3$  de solución de equilibrado de  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ M}$  (= el 10% de la solución madre hasta un volumen total de  $50 \text{ cm}^3$  de fase acuosa), la concentración de la solución madre debe ser  $10 \mu\text{g cm}^{-3}$ , que es tres órdenes de magnitud más alta que el límite de detección del método analítico.

El pH de la fase acuosa debe medirse antes y después del contacto con el suelo, puesto que desempeña un papel importante en todo el proceso de adsorción, especialmente en caso de sustancias ionizables.

Se agita la mezcla hasta que se alcance el equilibrio de adsorción. El tiempo de equilibrado de los suelos es muy variable, dependiendo de la sustancia química y del suelo; generalmente es suficiente un período de 24 h (77). En el estudio preliminar pueden recogerse muestras secuencialmente durante un período de 48 h desde la mezcla (por ejemplo, a las 4, 8, 24, 48 h). Sin embargo, los tiempos de análisis deben considerarse con flexibilidad para tener en cuenta el horario de trabajo del laboratorio.

Hay dos opciones para el análisis de la sustancia problema en la solución acuosa: a) el método paralelo y b) el método en serie. Debe insistirse en que, aunque el método paralelo sea experimentalmente más pesado, el tratamiento matemático de los resultados es más simple (Anexo 5). Sin embargo, la elección de la metodología seguida corresponde al experimentador, que habrá de considerar las instalaciones y los recursos disponibles del laboratorio.

**a) Método paralelo:** se preparan tantas muestras con la misma proporción de suelo / solución como intervalos de tiempo a que se desee estudiar la cinética de adsorción. Después de la centrifugación y, en su caso, filtración, la fase acuosa del primer tubo se recupera lo más completamente posible y se analiza después de, por ejemplo, 4 h, la del segundo tubo después de 8 h, la del tercero después de 24, etc.

**b) Método en serie:** se prepara solamente una muestra por duplicado de cada proporción suelo / solución. A los intervalos de tiempo definidos se centrifuga la mezcla para separar las fases. Se determina inmediatamente la sustancia problema en una pequeña alícuota de la fase acuosa; el experimento continúa con la mezcla original. Si se aplica la filtración después de la centrifugación, el laboratorio debe tener instalaciones para realizar la filtración de pequeñas alícuotas acuosas. Se recomienda que el volumen total de las alícuotas tomadas no exceda del 1% del volumen total de la solución, para no cambiar mucho la proporción suelo / solución ni disminuir la masa de soluto disponible para la adsorción durante la prueba.

La adsorción porcentual  $A_{t_i}$  se calcula a cada tiempo ( $t_i$ ) en función de la concentración inicial nominal y de la concentración medida a ese tiempo de muestreo ( $t_i$ ), corregido para tener en cuenta el valor del blanco. Se realizan las gráficas de  $A_{t_i}$  frente al tiempo (fig. 1 del Anexo 5) para estimar la llegada a la meseta de equilibrio<sup>2</sup>. También se calcula el valor de  $K_d$  en el equilibrio. Tomando como base este valor de  $K_d$ , a partir de la fig. 1 se seleccionan proporciones adecuadas suelo / solución, de modo que la adsorción porcentual alcance más del 20% y, preferiblemente, >50% (61). Todas las ecuaciones y principios de gráficas aplicables figuran en la sección de “Datos e informes” y en el Anexo 5.

#### 1.9.2.2 *Determinación del tiempo de equilibrado de adsorción y de la cantidad de sustancia problema adsorbida en el equilibrio*

Como ya se ha mencionado, las gráficas de  $A_{t_i}$  o  $C_{aq}^{ads}$  frente al tiempo permiten la estimación del logro del equilibrio de adsorción y de la cantidad de sustancia problema adsorbida en el equilibrio. Las fig. 1 y 2 del Anexo 5 muestran ejemplos de tales gráficas. El tiempo de equilibrado es el que necesita el sistema para alcanzar una meseta.

Si, con un suelo determinado, no se llega a ninguna meseta sino que hay un aumento constante, puede deberse a la complicación por factores tales como la biodegradación o la difusión lenta. La biodegradación puede comprobarse repitiendo el experimento con una muestra esterilizada del suelo. Si no se logra ninguna meseta incluso en este caso, el experimentador debe realizar estudios específicos para buscar otros fenómenos que pudieran darse; puede hacerse con modificaciones apropiadas de las condiciones del experimento (temperatura, tiempos de agitación, proporciones suelo / solución). Corresponde al experimentador decidir si continúa con el procedimiento de prueba a pesar de que posiblemente no se llegue a lograr el equilibrio.

#### 1.9.2.3 *Adsorción en la superficie del recipiente del ensayo y estabilidad de la sustancia problema*

Analizando las muestras de control puede obtenerse información sobre la adsorción de la sustancia problema en la superficie de los recipientes del ensayo, así como sobre su estabilidad. Si se observa una disminución superior al error típico del método analítico, puede haber fenómenos de degradación abiótica o adsorción en la superficie del recipiente del ensayo. Puede conseguirse distinguir entre estos dos fenómenos lavando a fondo las paredes del recipiente con un volumen conocido de un solvente apropiado y determinando la sustancia problema en la solución de lavado. Si no se observa ninguna adsorción en la superficie de los recipientes del ensayo, la disminución confirma la inestabilidad abiótica de la sustancia problema. Si se encuentra adsorción, es necesario cambiar el material de los recipientes del ensayo. Sin embargo, los datos sobre la adsorción en la superficie de los recipientes del ensayo obtenidos de este experimento no pueden extrapolarse directamente al experimento con suelo / solución. La presencia de suelo afecta a esta adsorción.

Puede obtenerse información adicional sobre la estabilidad de la sustancia problema mediante la determinación del balance de masa parental a lo largo del tiempo. Esto significa que se determina la sustancia problema en la fase acuosa, en los extractos de suelo y en las paredes del recipiente del ensayo. La diferencia entre la masa de la sustancia problema añadida y la suma de las masas de la sustancia problema en la fase acuosa, extractos de suelo y paredes de los recipientes del ensayo es igual a la masa degradada, volatilizada o no extraída. Para llevar a cabo una determinación del balance de masa, debe haberse alcanzado el equilibrio de adsorción en el tiempo que dure el experimento.

---

<sup>2</sup> También pueden utilizarse gráficas de la concentración de la sustancia problema en la fase acuosa ( $C_{aq}^{ads}$ ) frente al tiempo para estimar la llegada a la meseta de equilibrio (véase la fig. 2 del Anexo 5).

El balance de masa se lleva a cabo en ambos suelos y con una proporción suelo / solución por suelo que dé una disminución por encima del 20% (preferiblemente > 50%) en el equilibrio. Cuando se termine el experimento de selección de la proporción con el análisis de la última muestra de la fase acuosa después de 48 h, las fases se separan por centrifugación y, si se desea, filtración. Se recupera lo más posible de la fase acuosa, y se añade al suelo un solvente de extracción conveniente (coeficiente de extracción de por lo menos el 95%) para extraer la sustancia problema. Se recomienda hacer por lo menos dos extracciones sucesivas. Se determina la cantidad de sustancia problema presente en los extractos de recipientes del ensayo y del suelo, y se calcula el balance de masa (ecuación 10, "Datos e informes"). Si es inferior al 90%, se considera que la sustancia problema es inestable en la escala de tiempo de la prueba. Sin embargo, los estudios podían aún continuar, teniendo en cuenta la inestabilidad de la sustancia problema; en este caso se recomienda analizar ambas fases en el estudio principal.

#### 1.9.2.4 Etapa 2 - Cinética de adsorción con una concentración de la sustancia problema

Se utilizan cinco suelos, seleccionados a partir del cuadro 1. Es conveniente la inclusión entre estos cinco suelos de algunos o de todos los suelos utilizados en el estudio preliminar, si procede. En tal caso, la etapa 2 no tiene que repetirse con los suelos utilizados en el estudio preliminar.

El tiempo de equilibrado, la proporción suelo / solución, el peso de la muestra de suelo, el volumen de la fase acuosa en contacto con el suelo y la concentración de la sustancia problema en la solución se seleccionan basándose en los resultados del estudio preliminar. Es mejor hacer el análisis aproximadamente después de un tiempo del contacto de 2, 4, 6, 8 (quizás también 10) y 24 h; el tiempo de agitación puede ampliarse a un máximo de 48 h en caso de que una sustancia requiera un tiempo más largo de equilibrado según los resultados de la selección de la proporción. Sin embargo, los tiempos de análisis pueden considerarse con flexibilidad.

Se hace cada experimento (un suelo y una solución) al menos por duplicado para poder estimar la varianza de los resultados. En cada experimento se lleva a cabo una prueba en blanco, con suelo y solución de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, sin sustancia problema, y con un peso y un volumen, respectivamente, idénticos a los del experimento. Se somete al mismo procedimiento de prueba una muestra de control con solamente la sustancia problema en solución de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M (sin suelo) como precaución frente a fenómenos inesperados.

La adsorción porcentual se calcula a cada tiempo  $A_{t_1}$  o intervalo de tiempo  $A_{\Delta t_1}$  (según sea necesario) y se representa gráficamente frente al tiempo. También se calcula el coeficiente de distribución  $K_d$  en el equilibrio, así como el coeficiente de adsorción normalizado para tener en cuenta el carbono orgánico  $K_{OC}$  (con sustancias orgánicas no polares).

#### Resultados de la prueba de cinética de adsorción

El valor lineal de  $K_d$  es generalmente exacto para describir el comportamiento respecto a la sorción en el suelo (35)(78) y refleja la movilidad inherente de las sustancias químicas en el suelo. Por ejemplo, en general, las sustancias con  $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  se consideran cualitativamente móviles. Del mismo modo, MacCall *et al.* han elaborado un sistema de clasificación de la movilidad basado en valores de  $K_{OC}$  (16). Además, hay sistemas de clasificación de la lixiviación basados en la relación entre  $K_{OC}$  y  $DT-50^3$  (32)(79).

También, según estudios de análisis de error (61), los valores de  $K_d$  inferiores a  $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  no pueden estimarse exactamente a partir de una disminución de la concentración en la fase acuosa, incluso cuando se aplica la proporción más favorable suelo / solución (desde el punto de vista de la exactitud), es decir, 1:1. En este caso se recomienda el análisis de ambas fases, suelo y solución.

---

<sup>3</sup> DT – 50: tiempo necesario para la degradación del 50 % de la sustancia problema



En cuanto a las observaciones mencionadas, se recomienda que el estudio del comportamiento de la adsorción de una sustancia química en el suelo y de su movilidad potencial continúe mediante la determinación de las isotermas de adsorción de Freundlich para los sistemas de los cuales sea posible una determinación exacta de  $K_d$  con el protocolo experimental seguido en este método de ensayo. La determinación exacta es posible si el valor que resulta de multiplicar  $K_d$  por la proporción suelo / solución es  $> 0,3$ , cuando las medidas se basan en la disminución de la concentración de la fase acuosa (método indirecto), o bien  $> 0,1$ , cuando se analizan ambas fases (método directo) (61).

#### 1.9.2.5 *Etapa 3 - Isotermas de adsorción y cinética de desorción / isotermas de desorción*

##### 1.9.2.5.1 Isotermas de adsorción

Se utilizan cinco concentraciones de sustancia problema que cubran preferiblemente dos órdenes de magnitud; en la selección de estas concentraciones deben tenerse en cuenta la hidrosolubilidad y las concentraciones acuosas resultantes en el equilibrio. Debe mantenerse la misma proporción suelo / solución por suelo a lo largo del estudio. La prueba de adsorción se lleva a cabo según lo descrito anteriormente, con la única diferencia de que la fase acuosa se analiza solamente una vez, al tiempo necesario para alcanzar el equilibrio según lo determinado antes en la etapa 2. Se determinan las concentraciones de equilibrio en la solución y se calcula la cantidad adsorbida a partir de la disminución de la sustancia problema en la solución o con el método directo. La masa adsorbida por unidad de masa del suelo se representa gráficamente en función de la concentración de la sustancia problema en el equilibrio (véase "Datos e informes").

##### Resultados del experimento de isotermas de adsorción

Entre los modelos matemáticos de adsorción propuestos hasta ahora, el de las isotermas de Freundlich es el utilizado más frecuentemente para describir procesos de adsorción. En las referencias (41)(45)(80)(81)(82) se proporciona información más detallada sobre la interpretación e importancia de los modelos de adsorción.

**Nota:** Debe indicarse que es posible comparar los valores de  $K_F$  (coeficiente de adsorción de Freundlich) de diferentes sustancias solamente si estos valores de  $K_F$  se expresan en las mismas unidades (83).

##### 1.9.2.5.2 Cinética de desorción

El propósito de este experimento es investigar si una sustancia química se adsorbe reversible o irreversiblemente a un suelo. Esta información es importante, puesto que el proceso de desorción también desempeña un papel destacado en el comportamiento de las sustancias en el suelo de campo. Por otra parte, los datos de desorción son útiles para la modelización por ordenador de la lixiviación y la simulación del arrastre de sustancias disueltas. Si se desea hacer un estudio de desorción, se recomienda que el estudio descrito a continuación se lleve a cabo con cada sistema para el cual haya sido posible una determinación exacta de  $K_d$  en el experimento anterior de cinética de adsorción.

Análogamente al estudio de cinética de adsorción, hay dos opciones para proceder con el experimento de cinética de desorción: a) el método paralelo y b) el método en serie. La selección de la metodología seguida corresponde al experimentador, que tendrá en cuenta las instalaciones y los recursos del laboratorio.

a) Método paralelo: de cada suelo seleccionado para realizar el estudio de desorción se preparan tantas muestras con la misma proporción suelo / solución como intervalos de tiempo a que se desee estudiar la cinética de desorción. Es preferible utilizar los mismos intervalos de tiempo que en el experimento de cinética de adsorción; sin embargo, el tiempo total puede ampliarse según sea necesario para que el sistema alcance el equilibrio de desorción. En cada experimento (un suelo, una solución) se lleva a cabo una prueba en blanco, con suelo y solución de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M, sin la sustancia problema, y con un peso y un volumen, respectivamente, idénticos a los del experimento. Como muestra de control, la sustancia problema en solución de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M (sin suelo) se somete al mismo procedimiento de prueba. Todas las mezclas del suelo con la solución se agitan hasta que se alcance el equilibrio de adsorción (según lo determinado antes en la etapa 2). Entonces, las fases se separan por centrifugación y las fases acuosas se retiran en la mayor proporción posible. El volumen de solución retirado se sustituye con un volumen igual de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M sin sustancia problema y las nuevas mezclas se agitan otra vez. La fase acuosa del primer tubo se recupera lo más completamente posible y se analiza después de, por ejemplo, 2 h, la del segundo tubo después de 4 h, la del tercero después de 6 h, etc., hasta que se alcance el equilibrio de desorción.

b) Método en serie: después del experimento de cinética de adsorción, se centrifuga la mezcla y se retira lo más posible la fase acuosa. El volumen de solución retirado se sustituye con un volumen igual de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M sin sustancia problema. La nueva mezcla se agita hasta que se alcance el equilibrio de desorción. Durante este periodo, a intervalos de tiempo definidos, se centrifuga la mezcla para separar las fases. En una pequeña alícuota de la fase acuosa se determina inmediatamente la sustancia problema; el experimento continúa después con la mezcla original. El volumen de cada alícuota debe ser menos del 1% del volumen total. Se añade a la mezcla la misma cantidad de solución de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M para mantener la proporción suelo / solución, y continúa la agitación hasta el siguiente intervalo.

La desorción porcentual se calcula a cada tiempo ( $D_{t_1}$ ) o intervalo de tiempo ( $D_{\Delta t_1}$ ) (según las necesidades del estudio) y se representa frente al tiempo. También se calcula el coeficiente de desorción  $K_{des}$  en el equilibrio. Todas las ecuaciones aplicables figuran en la sección “Datos e informes” y en el Anexo 5.

#### Resultados del experimento de cinética de desorción

Las gráficas comunes de la desorción ( $D_{t_1}$ ) y la adsorción  $A_{t_1}$  porcentuales frente al tiempo permiten valorar la reversibilidad del proceso de adsorción. Si el equilibrio de desorción se logra incluso dentro del doble del tiempo de equilibrio de adsorción, y la desorción total es de más del 75% de la cantidad adsorbida, se considera que la adsorción es reversible.

#### 1.9.2.5.3 Isotermas de desorción

Las isotermas de desorción de Freundlich se determinan con los suelos utilizados en el experimento de las isotermas de adsorción. La prueba de desorción se lleva a cabo según lo descrito en la sección “Cinética de desorción”, con la única diferencia de que la fase acuosa se analiza solamente una vez, en el equilibrio de desorción. Se calcula la cantidad de sustancia problema desorbida. El contenido de sustancia problema que permanece adsorbida al suelo en el equilibrio de desorción se representa en función de la concentración de equilibrio de la sustancia problema en la solución (véase la sección “Datos e informes” y el Anexo 5).

## 2. DATOS E INFORMES

Los datos analíticos se presentan en forma de cuadro (véase el Anexo 6). Se dan las medidas y las medias calculadas. Se proporcionan las representaciones gráficas de las isotermas de adsorción. Se hacen los cálculos según lo descrito más adelante.

Para la prueba, se considera que el peso de  $1 \text{ cm}^3$  de solución acuosa es 1 g. La proporción suelo / solución puede expresarse en unidades de peso / peso o de peso / volumen con la misma cifra.

La adsorción ( $A_{t_i}$ ) se define como el porcentaje de sustancia adsorbida en el suelo en relación con la cantidad presente al principio de la prueba, en las condiciones de prueba. Si la sustancia problema es estable y no se adsorbe significativamente a la pared del recipiente,  $A_{t_i}$  se calcula a cada tiempo  $t_i$ , según la ecuación:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (3)$$

donde:

$A_{t_i}$  = adsorción porcentual al tiempo  $t_i$  (%);

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$  = masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo al tiempo  $t_i$  ( $\mu\text{g}$ );

$m_0$  = masa de la sustancia problema en el tubo de ensayo, al principio de la prueba ( $\mu\text{g}$ ).

En el Anexo 5 figura información detallada sobre el cálculo de la adsorción porcentual  $A_{t_i}$  con los métodos paralelo y en serie.

El coeficiente de distribución  $K_d$  es la proporción entre el contenido de sustancia en la fase edáfica y la concentración en masa de la sustancia en la solución acuosa, en las condiciones de prueba, cuando se alcanza el equilibrio de adsorción.

$$K_d = \frac{C_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (4)$$

donde:

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$  = contenido en la sustancia adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción ( $\mu\text{g g}^{-1}$ );

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = concentración en masa de la sustancia en la fase acuosa en el equilibrio de adsorción ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ );  
esta concentración se determina analíticamente teniendo en cuenta los valores obtenidos en las pruebas en blanco;

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$  = masa de la sustancia adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción ( $\mu\text{g}$ );

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = masa de la sustancia en la solución en el equilibrio de adsorción ( $\mu\text{g}$ );

$m_{\text{soil}}$  = cantidad de la fase edáfica, expresada en masa seca de suelo (g);

$V_0$  = volumen inicial de la fase acuosa en contacto con el suelo ( $\text{cm}^3$ ).

La relación entre  $A_{\text{eq}}$  y  $K_d$  se da en la siguiente ecuación:

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (5)$$

donde:

$A_{eq}$  = adsorción porcentual en el equilibrio de adsorción, %.

El coeficiente de adsorción normalizado para tener en cuenta el carbono orgánico  $K_{oc}$  relaciona el coeficiente de distribución  $K_d$  con el contenido de carbono orgánico de la muestra de suelo:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (6)$$

donde:

$\%oc$  = porcentaje de carbono orgánico en la muestra de suelo ( $\text{g g}^{-1}$ ).

El coeficiente  $K_{oc}$  representa un solo valor que caracteriza el reparto principalmente de las sustancias orgánicas no polares entre el carbono orgánico del suelo o sedimento y el agua. La adsorción de estas sustancias está correlacionada con el contenido orgánico del sólido de sorción (7); así pues, los valores de  $K_{oc}$  dependen de las características específicas de las fracciones húmicas que difieren considerablemente en su capacidad de sorción, debido a diferencias de origen, génesis, etc.

### 2.1.1 **Isotermas de adsorción**

La ecuación de las isotermas de adsorción de Freundlich relaciona la cantidad de sustancia problema adsorbida con la concentración de sustancia problema en la solución en el equilibrio (ecuación 8).

Los datos se tratan como en la sección "Adsorción" y, de cada tubo de ensayo, se calcula el contenido de sustancia problema adsorbida en el suelo después de la prueba de adsorción ( $C_s^{ads}(eq)$ ), en otras partes expresado como  $x/m$ ). Se acepta que se ha logrado el equilibrio y que  $C_s^{ads}(eq)$  representa el valor de equilibrio:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (7)$$

La ecuación de adsorción de Freundlich es la siguiente (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (8)$$

o, en forma lineal:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

donde:

$K_F^{ads}$  = coeficiente de adsorción de Freundlich; su dimensión es  $cm^3 g^{-1}$  sólo si  $1/n = 1$ ; en los demás casos, se introduce la pendiente  $1/n$  en la dimensión de  $K_F^{ads}$  ( $\mu g^{1-1/n} (cm^3)^{1/n} g^{-1}$ );

$n$  = constante de regresión;  $1/n$  generalmente oscila entre 0,7 y 1,0, indicando que los datos de sorción suelen ser ligeramente no lineales.

Se representan gráficamente las ecuaciones (8) y (9) y se calculan los valores de  $K_F^{ads}$  y  $1/n$  por análisis de regresión utilizando la ecuación 9. También se calcula el coeficiente de correlación  $r^2$  de la ecuación logarítmica. En la fig. 2 se da un ejemplo de tales representaciones.

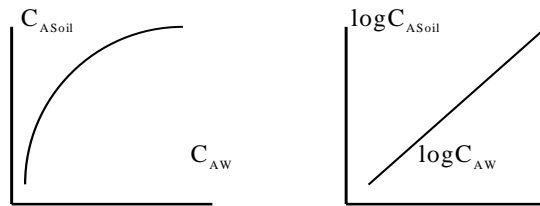


Fig. 2. Representación de la adsorción de Freundlich, normal y linealizada

### 2.1.2

#### Balance de masa

El balance de masa (MB) se define como el porcentaje de sustancia que puede recuperarse analíticamente después de una prueba de adsorción respecto a la cantidad nominal de sustancia presente al principio de la prueba.

El tratamiento de los datos será diferente si el solvente es completamente miscible con agua. En caso de un solvente miscible con agua, el tratamiento de los datos descrito en la sección "Desorción" puede aplicarse para determinar la cantidad de sustancia recuperada por la extracción con el solvente. Si el solvente es menos miscible con agua, hay que hacer la determinación de la cantidad recuperada.

El balance de masa MB de la adsorción se calcula del siguiente modo; se supone que el término ( $m_E$ ) corresponde a la suma de las masas de la sustancia problema extraídas del suelo y de la superficie del recipiente del ensayo con un solvente orgánico:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \quad (\%) \quad (10)$$

donde:

MB = balance de masa (%);

$m_E$  = masa total de la sustancia problema extraída del suelo y de las paredes del recipiente del ensayo en dos fases ( $\mu g$ );

$C_0$  = concentración inicial en masa de la solución problema en contacto con el suelo ( $\mu g cm^{-3}$ );

$V_{rec}$  = volumen de sobrenadante recuperado después del equilibrio de adsorción ( $cm^{-3}$ ).

La desorción (D) se define como el porcentaje de sustancia problema que se desorbe, en relación con la cantidad de sustancia adsorbida previamente, en las condiciones de prueba:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (11)$$

donde:

$D_{t_i}$  = desorción porcentual a un tiempo  $t_i$  (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$  = masa de la sustancia problema desorbida del suelo a un tiempo  $t_i$  ( $\mu\text{g}$ );

$m_s^{ads}(eq)$  = masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción ( $\mu\text{g}$ ).

En el Anexo 5 figura información detallada sobre cómo calcular la desorción porcentual  $D_{t_i}$  con los métodos paralelo y en serie.

El coeficiente de desorción aparente ( $K_{des}$ ) es, en las condiciones de prueba, la proporción entre el contenido de sustancia que permanece en la fase edáfica y la concentración en masa de la sustancia desorbida en la solución acuosa, cuando se alcanza el equilibrio de desorción:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \cdot \frac{V_T}{m_{soil}} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (12)$$

donde:

$K_{des}$  = coeficiente de desorción ( $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ );

$m_{aq}^{des}(eq)$  = masa total de la sustancia problema desorbida del suelo en el equilibrio de desorción ( $\mu\text{g}$ );

$V_T$  = volumen total de la fase acuosa en contacto con el suelo durante la prueba de cinética de desorción ( $\text{cm}^3$ ).

En el Anexo 5, en la sección "Desorción", figuran directrices para calcular  $m_{aq}^{des}(eq)$ .

#### Observación

Si la prueba de adsorción precedente se ha llevado a cabo con el método paralelo, se considera que el volumen  $V_T$  de la ecuación (12) es igual a  $V_0$ .

#### **Isotermas de desorción**

La ecuación de isotermas de desorción de Freundlich relaciona el contenido de la sustancia problema que permanece adsorbida en el suelo con la concentración de la sustancia problema en la solución en el equilibrio de desorción (ecuación 16).

Para cada tubo de prueba, el contenido de sustancia que permanece adsorbida en el suelo en el equilibrio de desorción se calcula del siguiente modo:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$  se define como:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A (\mu g) \quad (14)$$

donde:

$C_s^{des}(eq)$  = contenido de la sustancia problema que permanece adsorbida en el suelo en el equilibrio de desorción ( $\mu g g^{-1}$ );

$m_m^{des}(eq)$  = masa de la sustancia determinada analíticamente en la fase acuosa en el equilibrio de desorción ( $\mu g$ );

$m_{aq}^A$  = masa de la sustancia problema que queda en solución después de alcanzado el equilibrio de adsorción debido a la sustitución incompleta del volumen ( $\mu g$ );

$m_{aq}^{des}(eq)$  = masa de la sustancia en la solución en el equilibrio de adsorción ( $\mu g$ );

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left( \frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

$V_r^F$  = volumen de solución tomada del tubo para la medida de la sustancia problema, en el equilibrio de desorción, ( $cm^3$ );

$V_R$  = volumen del sobrenadante retirado del tubo después de alcanzar el equilibrio de adsorción y sustituido por el mismo volumen de solución de  $CaCl_2$  0,01 M, ( $cm^3$ ).

A continuación se muestra la ecuación de desorción de Freundlich:

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g g^{-1}) \quad (16)$$

o, en forma lineal:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

donde:

$K_F^{des}$  = coeficiente de desorción de Freundlich;

$n$  = constante de regresión;

$C_{aq}^{des}(eq)$  = concentración en masa en la sustancia en la fase acuosa en el equilibrio de desorción ( $\mu g cm^{-3}$ ).

Las ecuaciones (16) y (17) pueden representarse gráficamente y el valor de  $K_F^{des}$  y el de  $1/n$  se calculan por análisis de regresión utilizando la ecuación 17.

Observación:

Si el exponente  $1/n$  de adsorción o desorción de Freundlich es igual a 1, la constante de enlace de adsorción o desorción de Freundlich ( $K_F^{ads}$  y  $K_F^{des}$ ) será respectivamente igual a la constante de equilibrio de adsorción o desorción ( $K_d$  y  $K_{des}$ ), y las gráficas de  $C_S$  frente a  $C_{aq}$  serán lineales. Si los exponentes no son iguales a 1, las gráficas de  $C_S$  frente a  $C_{aq}$  no serán lineales y las constantes de adsorción y desorción variarán a lo largo de las isothermas.

2.2.2 **INFORME DE LA PRUEBA**

El informe de la prueba debe incluir la siguiente información:

- identificación completa de las muestras de suelo utilizadas, incluyendo:
  - referencia geográfica del sitio (latitud, longitud);
  - fecha del muestreo;
  - tipo de uso (por ejemplo, suelo agrícola, bosque, etc.);
  - profundidad del muestreo;
  - contenido de arena / limo / arcilla;
  - valores de pH (en  $\text{CaCl}_2$  0,01 M);
  - contenido de carbono orgánico;
  - contenido de materia orgánica;
  - contenido de nitrógeno;
  - proporción C/N;
  - capacidad de intercambio catiónico (mmol / kg);
  - toda la información relativa a la recogida y conservación de las muestras de suelo;
  - en su caso, toda información pertinente para la interpretación de la adsorción - desorción de la sustancia problema;
  - referencia de los métodos utilizados para la determinación de cada parámetro.
- información sobre la sustancia problema según el caso;
- temperatura de los experimentos;
- condiciones de centrifugación;
- procedimiento analítico utilizado para analizar la sustancia problema;
- justificación del uso eventual de agentes de solubilización para la preparación de la solución madre de la sustancia problema;
- explicación de las correcciones hechas en los cálculos, en su caso;
- datos según las fichas (Anexo 6) y representaciones gráficas;
- toda la información y observaciones útiles para la interpretación de los resultados de la prueba.



**BIBLIOGRAFÍA**

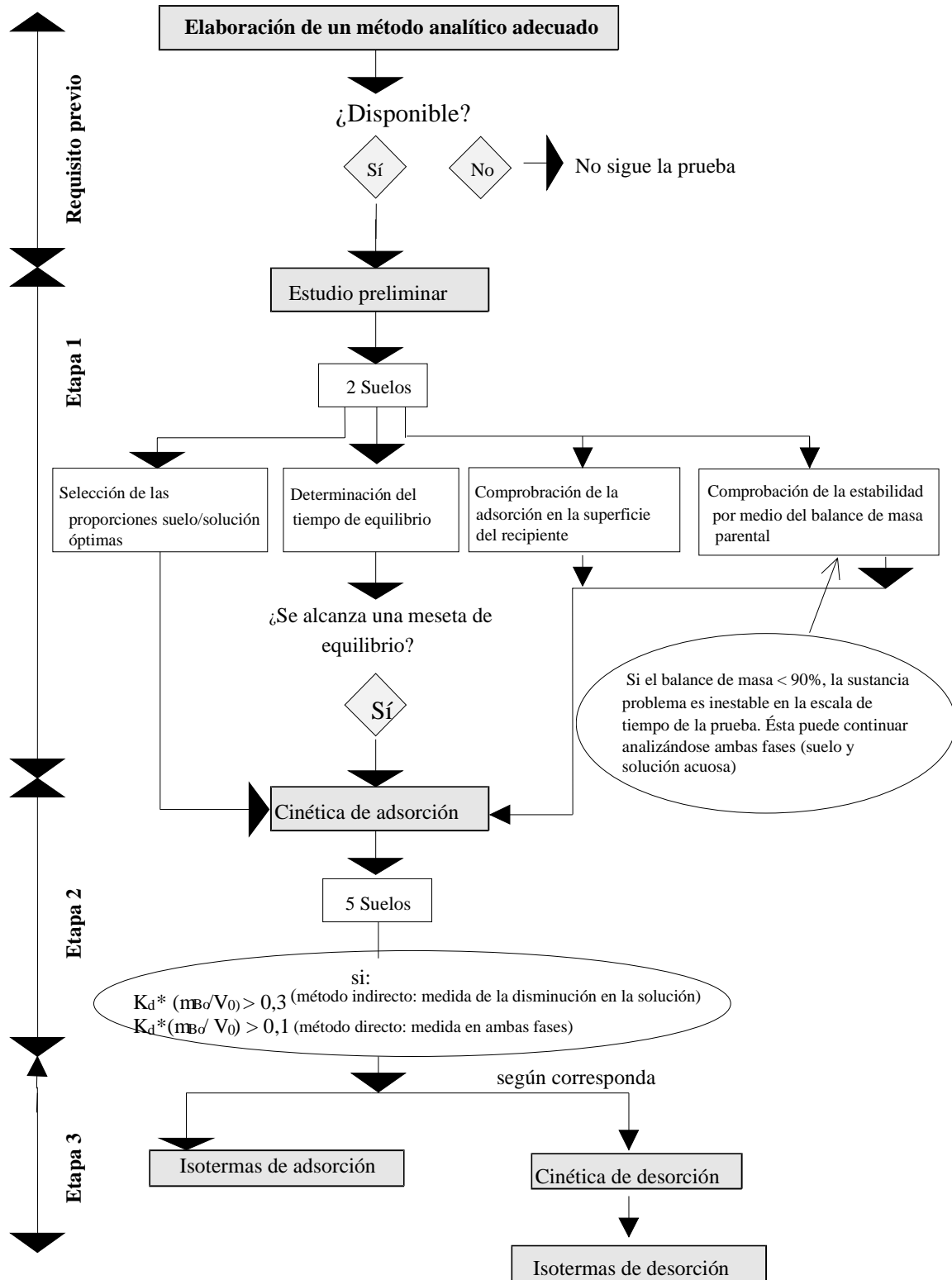
1. Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.
2. Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.
3. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
4. OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).
5. US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.
6. US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
7. ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant ( $K_{oc}$ ) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
9. Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
10. Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
11. BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
12. Calvet R., (1989), "Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils", in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
13. Calvet R., (1980) "Adsorption-Desorption Phenomena" in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.
14. Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), "The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 31-44.
15. van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), "An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media". Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), 29-35.
16. McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), "Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis", in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
17. Lambert S.M., Porter P.E., and Schiefferrstein R.H., (1965), "Movement and sorption of chemicals applied to the soil". Weeds, 13, 185-190.
18. Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) "Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils". J.Agric.Food Chem., 18, 524-528.
19. Russell M.H., (1995), "Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil" in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
20. Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), "Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides", IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, 901-932.

21. Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), "Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.
22. Furninge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), "Persistence of herbicides in soil". J. Sci. Fd Agric., 18, 269-273.
23. Burkhard N., and Guth J.A., (1981), "Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, 45-52.
24. Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). "Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides". Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, 961-971.
25. Osgerby J.M., (1973), "Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, 247-258.
26. Guth J.A., (1972), "Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 143-154.
27. Hamaker J.W., (1975), "The interpretation of soil leaching experiments", in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.
28. Helling C.S., (1971), "Pesticide mobility in soils". Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, 732-210.
29. Hamaker J.W., (1972), "Diffusion and volatilization" in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49-143.
30. Burkhard N. and Guth J.A., (1981), "Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system". Pestic. Sci. 12, 37-44.
31. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
32. Gustafson D.I., (1989), "Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), 339-357.
33. Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). "Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils". J. of Soil Sci., 28, 340-350.
34. Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), "Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils". Pest. Sci., 11, 389-395.
35. Green R.E., and Karickhoff S.W., (1990), "Sorpton estimates for modeling", in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp.80-101,
36. Lambert S.M., (1967), "Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, 572-576.
37. Hance R.J., (1969), "An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils". J. Agri. Food Chem., 17, 667-668.
38. Briggs G.G. (1969), "Molecular structure of herbicides and their sorption by soils". Nature, 223, 1288.
39. Briggs G.G. (1981). "Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor". J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.
40. Sabljic A., (1984), "Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology". J. Agric. Food Chem., 32, 243-246.
41. Bailey G.W., and White J.L., (1970), "Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil". Residue Rev., 32, 29-92.
42. Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), "Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate". Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32:222-234.
43. Karickhoff S.W., (1981) "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere 10, 833-846.
44. Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), "Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners". Environ. Toxicol. Safety 21, 1-17.
45. Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). "Adsorption in organic chemicals" in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.
46. Deli J., and Warren G.F., 1971, "Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils". Weed Sci. 19:67-69.

47. Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), "Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils". *Weed Science*, Vol. 23, 454-457.
48. Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) "Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations" in *Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies*, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.
49. Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), "Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase", CREAMS, in *A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems*, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
50. ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
51. Scheffer F., and Schachtschabel, *Lehrbuch der Bodenkunde*, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.
52. Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. "Methods of Soil Analysis", Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.
53. ISO/ DIS 10381-1 Soil Quality -- Sampling -- Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
54. ISO/DIS 10381-2 Soil Quality -- Sampling -- Part 2: Guidance on sampling techniques.
55. ISO/DIS 10381-3 Soil Quality -- Sampling -- Part 3: Guidance on safety of sampling.
56. ISO/DIS 10381-4 Soil Quality -- Sampling -- Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
57. ISO/DIS 10381-5 Soil Quality -- Sampling -- Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
58. ISO 10381-6, 1993: Soil Quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
59. Green R.E., and Yamane V.K., (1970) "Precision in pesticide adsorption measurements". *Soil Sci. Am. Proc.*, 34, 353-354.
60. Grover R., and Hance R.J. (1970), "Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine". *Soil Sci.*, 109-138.
61. Boesten, J.J.T.I, "Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system". *Pest. Sci.* 1990, 30, 31-41.
62. Boesten, J.J.T.I. " Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106" *Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects*, Brussels, 26-29 April 1994.
63. Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), " Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique". *Weed Res.* 21, 227-231.
64. Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), "Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments". *J. Environ.Qual.*, 10(3), 382-386.
65. Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), "Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water". *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), 227-231.
66. Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), "Sorption of organic substances by soils and sediments". *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), 297-312.
67. Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), "Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons". *Chemosphere*, 16(1), 109-116.
68. Lyman W.J. , Reehl W.F. and Rosenblatt D.H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds*. American Chemical Society, Washington DC.
69. Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). "Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota" in *Aquatic Toxicology* (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.
70. Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), "A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds". *Science*, Vol. 206, 831-832.

71. Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), "Sorption of *p*-Naphthol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption". *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 38-42.
72. Karickhoff S.W., (1981), "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". *Chemosphere*, Vol. 10(8), 833-846.
73. Moreale A., van Bladel R., (1981), "Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité - réactivité. *Revue de l'Agric.*, 34 (4), 319-322.
74. Müller M., Kördel W. (1996), "Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil". *Chemosphere*, 32(12), 2493-2504.
75. Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), "HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - results of a ring test". *Chemosphere* 30 (7), 1373-1384.
76. Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), "HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - comparison of different stationary phases. *Chemosphere* 27 (12), 2341-2352.
77. Hance, R.J., (1967), "The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides". *Weed Research*, Vol. 7, pp. 29-36.
78. Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), "The retention processes: mechanisms" in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
79. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
80. Giles C.H., (1970), "Interpretation and use of sorption isotherms" in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, 14-32.
81. Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D. (1960), "Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils". *J. Chem. Soc.*, 3973-93.
82. Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), "Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption". *Ann. Agron.* 31: 239-251.
83. Bedbur E., (1996), "Anomalies in the Freundlich equation", *Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment*, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.
84. Guth, J.A., (1985), "Adsorption/desorption", in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1-3, Canterbury, UK.
85. Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).

**ANEXO 1**  
**Esquema de la prueba**



ANEXO 2

INFLUENCIA DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO ANALÍTICO Y DEL CAMBIO DE CONCENTRACIÓN SOBRE LA EXACTITUD DE LOS RESULTADOS DE LA ADSORCIÓN

A partir del cuadro siguiente (84), se ve que, cuando la diferencia entre la masa inicial ( $m_0 = 110 \mu\text{g}$ ) y la masa en el equilibrio ( $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = 100 \mu\text{g}$ ) de la sustancia problema en la solución es muy pequeña, un error del 5% en la medida de la concentración en el equilibrio origina un error del 50% en el cálculo de la masa de la sustancia adsorbida en el suelo ( $m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ ) y del 52,4% en el cálculo de  $K_d$ .

Cantidad de suelo  $m_{\text{soil}} = 10 \text{ g}$   
 Volumen de solución  $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ( $\mu\text{g}$ )	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	R	$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ * ( $\mu\text{g}$ )	$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ * ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	$R_{\dagger}$	$K_d^*$	$R_{\dagger}$
$m_0 = 110 \mu\text{g or}$ $C_0 = 1.100 \mu\text{g / cm}^3$	<b>PARA A = 9%</b>							
	100	1,000	valor verd.	10	1,00	valor verd.	1	
	101	1,010	1%	9	0,90	10%	0,891	10,9%
	105	1,050	5%	5	0,50	50%	0,476	52,4%
	109	1,090	9%	1	0,10	90%	0,092	90,8%
$m_0 = 110 \mu\text{g or}$ $C_0 = 1.100 \mu\text{g / cm}^3$	<b>PARA A = 55%</b>							
	50,0	0,500	valor verd.	60,0	6,00	valor verd.	12,00	
	50,5	0,505	1%	59,5	5,95	0,8%	11,78	1,8%
	52,5	0,525	5%	57,5	5,75	4,0%	10,95	8,8%
	55,0	0,550	10%	55,0	5,50	8,3%	10,00	16,7%
$m_0 = 110 \mu\text{g or}$ $C_0 = 1.100 \mu\text{g / cm}^3$	<b>PARA A = 99%</b>							
	1,100	0,011	valor verd.	108,9	10,89	valor verd.	990	
	1,111	0,01111	1%	108,889	10,8889	0,01%	980	1,0%
	1,155	0,01155	5%	108,845	10,8845	0,05%	942	4,8%
	1,21	0,0121	10%	108,790	10,8790	0,10%	899	9,2%

$$* m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), \quad C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{soil}}}, \quad K_d = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{soil}}}$$

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$  = masa de la sustancia problema en la fase edáfica en el equilibrio,  $\mu\text{g}$ ;

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = masa de la sustancia problema en la fase acuosa en el equilibrio,  $\mu\text{g}$ ;

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$  = contenido de la sustancia problema en la fase edáfica en el equilibrio,  $\mu\text{g g}^{-1}$ ;

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$  = concentración en masa de la sustancia problema en la fase acuosa en el equilibrio,  $\mu\text{g cm}^{-3}$ ;

R = error analítico en la determinación de  $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ;

$R^{\ddagger}$  = error calculado debido al error analítico R.

### ANEXO 3

#### TÉCNICAS DE ESTIMACIÓN DE $K_d$

1. Las técnicas de estimación permiten dar un valor de  $K_d$  a partir de correlaciones observadas con, por ejemplo, valores de  $P_{ow}$  (12)(39)(63-68), datos de hidrosolubilidad (12)(19)(21)(39)(68-73), o datos de polaridad obtenidos por aplicación de CLAR en fase inversa (74-76). Como se muestra en los cuadros 1 y 2, a partir de estas ecuaciones se calcula  $K_{oc}$  o  $K_{om}$  y después, indirectamente, se obtiene  $K_d$  con las ecuaciones:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1.724} \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1})$$

2. Estas correlaciones se basan en dos suposiciones: 1) la materia orgánica del suelo es el factor que más influye en la adsorción de una sustancia; y 2) las interacciones implicadas son principalmente no polares. En consecuencia, estas correlaciones: 1) no son aplicables a las sustancias polares (o sólo lo son de forma limitada), y (2) no son aplicables a los casos en que el contenido de materia orgánica del suelo es muy pequeño (12). Por otra parte, aunque se han encontrado correlaciones satisfactorias entre  $P_{ow}$  y adsorción (19), no puede decirse lo mismo de la relación entre hidrosolubilidad y grado de adsorción (19)(21); en este sentido, los estudios son muy contradictorios.

3. En los cuadros 1 y 2 se dan ejemplos de correlaciones del coeficiente de adsorción con el coeficiente de reparto octanol-agua y con la hidrosolubilidad, respectivamente.

**Cuadro 1.** Ejemplos de correlaciones entre el coeficiente de distribución de la adsorción y el coeficiente de reparto octanol-agua; pueden verse más ejemplos en (12) (68).

Sustancias	Correlaciones	Autores
Ureas sustituidas	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Aromáticas cloradas	$\log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)
Diversos plaguicidas	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl y Mingelgrin (1984) (66)
Hidrocarburos aromáticos	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles y Mantoura (1987) (67)

**Cuadro 2.** Ejemplos de correlaciones entre el coeficiente de distribución de la adsorción y la hidrosolubilidad ; pueden verse más ejemplos en (68) (69).

Compuestos	Correlaciones	Autores
Diversos plaguicidas	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Sustancias cloradas aromáticas, alifáticas	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
$\alpha$ -naftol	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (71)
Sustancias aromáticas alifáticas, cíclicas	$\log K_{oc} = - 1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 (\text{mp}-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Diversos compuestos	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)



## ANEXO 4

### CÁLCULOS PARA DEFINIR LAS CONDICIONES DE LA CENTRIFUGACIÓN

1. El tiempo de centrifugación viene dado por la siguiente fórmula, suponiendo partículas esféricas:

$$t = \frac{9}{2} \left[ \frac{\eta}{\omega^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln \left( \frac{R_b}{R_t} \right) \quad (1)$$

Con fines de simplificación, todos los parámetros se dan en unidades ajenas al SI (g, cm).

donde:

- $\omega$  = velocidad de giro ( $=2 \pi \text{ rpm}/60$ ),  $\text{rad s}^{-1}$ ;
- rpm = revoluciones por minuto;
- $\eta$  = viscosidad de la solución,  $\text{g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;
- $r_p$  = radio de las partículas, cm;
- $\rho_s$  = densidad del suelo,  $\text{g cm}^{-3}$ ;
- $\rho_{aq}$  = densidad de la solución,  $\text{g cm}^{-3}$ ;
- $R_t$  = distancia desde el centro del rotor de centrifugación hasta el nivel de la solución en el tubo de centrífuga, cm;
- $R_b$  = distancia desde el centro del rotor de centrifugación hasta el fondo del tubo de centrífuga, cm;
- $R_b - R_t$  = longitud de la mezcla suelo / solución en el tubo de centrífuga, cm.

En la práctica general, se utiliza un tiempo doble del calculado para conseguir una separación completa.

2. La ecuación (1) puede simplificarse más si consideramos que la viscosidad ( $\eta$ ) y la densidad ( $\rho_{aq}$ ) de la solución son iguales a la viscosidad y la densidad del agua a 25 °C; por tanto,  $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\rho_{aq} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ .

Entonces, el tiempo de centrifugación se obtiene con la ecuación (2):

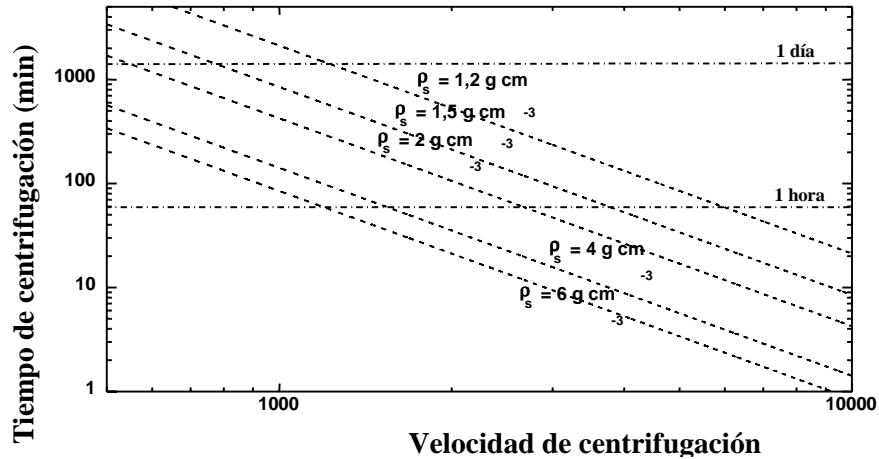
$$t = \frac{3,7}{(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

3. En la ecuación (2) se ve que hay dos parámetros importantes para definir las condiciones de la centrifugación, es decir, el tiempo (t) y la velocidad (rpm) necesarios para conseguir la separación de las partículas de un tamaño determinado (en nuestro caso, de 0,1  $\mu\text{m}$  de radio): 1) la densidad del suelo y 2) la altura de la mezcla en el tubo de centrífuga ( $R_b - R_t$ ), es decir, la distancia que recorre una partícula de suelo desde el nivel superior de la solución hasta el fondo del tubo; evidentemente, con un volumen determinado, la altura de la mezcla en el tubo dependerá del cuadrado del radio del tubo.

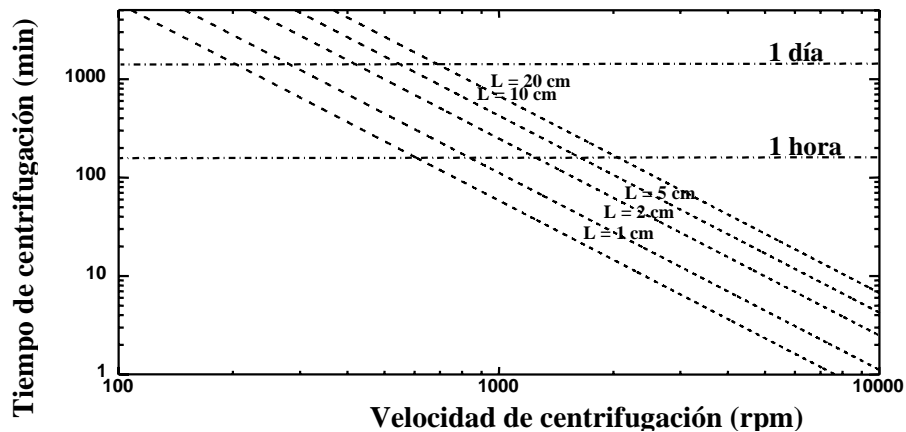
4. La fig. 1 presenta las variaciones del tiempo de centrifugación (t) frente a la velocidad de centrifugación (rpm) con diferentes densidades de suelo ( $\rho_s$ ) (fig.1a) y diferentes alturas de la mezcla en los tubos de centrífuga (fig.2a). En la fig.1a queda de manifiesto la influencia de la densidad del suelo; por ejemplo, con una centrifugación clásica de 3000 rpm el tiempo de centrifugación es de aprox. 240 min para una densidad de suelo de 1,2  $\text{g cm}^{-3}$ , mientras que es de sólo 50 min para 2,0  $\text{g cm}^{-3}$ . Análogamente, según la fig.1b, con una centrifugación clásica de 3000 rpm el tiempo de centrifugación es de aprox. 50 min para una altura de la mezcla de 10 cm y de sólo 7 min para una altura de 1 cm. No obstante, es importante encontrar la relación óptima entre la centrifugación que requiera la menor altura posible y una manipulación fácil para el experimentador al separar las fases tras la centrifugación.

5. Por otra parte, al definir las condiciones experimentales para la separación de las fases suelo / solución, es importante considerar la posible existencia de una tercera “pseudo-fase”, los coloides. Estas partículas, de tamaño inferior a  $0,2 \mu\text{m}$ , pueden afectar considerablemente a todo el mecanismo de la adsorción de una sustancia en una suspensión de suelo. Cuando se realiza la centrifugación según se describe anteriormente, los coloides se quedan en la fase acuosa y se someten a análisis junto con la fase acuosa, con lo que se pierde la información sobre su influencia.

Si el laboratorio donde se realiza la prueba tiene equipos de ultracentrifugación o ultrafiltración, es posible estudiar con mayor profundidad la adsorción / desorción de una sustancia en el suelo, con información sobre la adsorción de la sustancia en los coloides. En este caso, para separar las tres fases (suelo, coloides, solución) debe realizarse una ultracentrifugación a 60.000 rpm/min o una ultrafiltración con una porosidad de 100.000 Dalton. También hay que modificar en consonancia el protocolo del ensayo, a fin de determinar la sustancia en las tres fases.



**Fig. 1a.** Variaciones del tiempo de centrifugación ( $t$ ) frente a la velocidad de centrifugación (rpm) con diferentes densidades de suelo ( $\rho_s$ ).  $R_t = 10 \text{ cm}$ ,  $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$ ,  $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

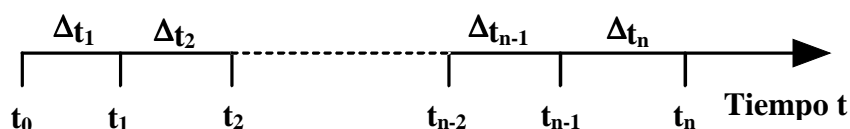


**Fig. 1b.** Variaciones del tiempo de centrifugación ( $t$ ) frente a la velocidad de centrifugación (rpm) con diferentes alturas de la mezcla en el tubo de centrifuga ( $R_b - R_t = L$ ;  $R_t = 10 \text{ cm}$ ,  $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $\rho_s = 2,0 \text{ g cm}^{-3}$ .

## ANEXO 5

### CÁLCULO DE LA ADSORCIÓN A (%) Y DE LA DESORCIÓN D (%)

El esquema temporal del procedimiento es el siguiente:



A efectos de los cálculos, se supone que la sustancia problema es estable y no se adsorbe de forma importante a las paredes del recipiente.

#### ADSORCIÓN A (A%)

##### a) Método paralelo

La adsorción porcentual se calcula con cada tubo de ensayo (i) a cada tiempo ( $t_i$ ), según la ecuación:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (1)^4$$

Los términos de esta ecuación pueden calcularse de la forma siguiente:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (3)$$

donde:

$A_{t_i}$  = adsorción porcentual (%) al tiempo  $t_i$ ;

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$  = masa de la sustancia problema en el suelo al tiempo  $t_i$  en que se realiza el análisis ( $\mu\text{g}$ );

$m_0$  = masa de la sustancia problema en el tubo de ensayo, al inicio de la prueba ( $\mu\text{g}$ );

$C_0$  = concentración inicial en masa de la solución problema en contacto con el suelo ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ );

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$  = concentración en masa de la sustancia en la fase acuosa al tiempo  $t_i$  en que se realiza el análisis ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ); esta concentración se determina analíticamente teniendo en cuenta los valores obtenidos en la prueba en blanco.

$V_0$  = volumen inicial de la solución problema en contacto con el suelo ( $\text{cm}^3$ ).

Los valores de la adsorción porcentual  $A_{t_i}$  o  $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$  se representan gráficamente frente al tiempo y se determina el tiempo al que se alcanza el equilibrio de sorción. En las fig. 1 y 2 se recogen ejemplos de tales gráficas.

<sup>4</sup> Ecuación aplicable a los métodos tanto directo como indirecto. Las demás ecuaciones son aplicables sólo al método indirecto.

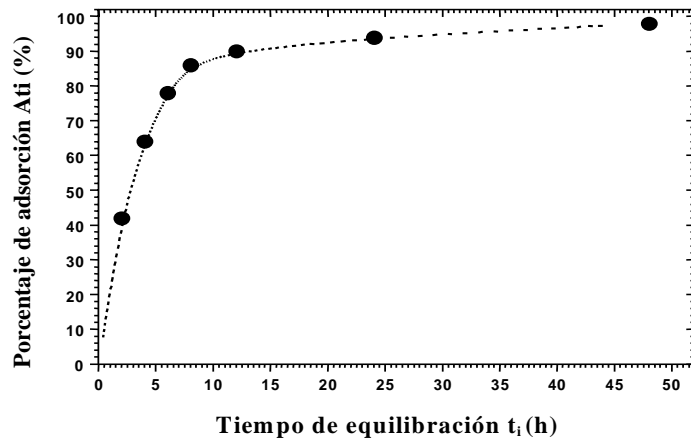


Fig. 1. Gráfica de equilibrio de adsorción

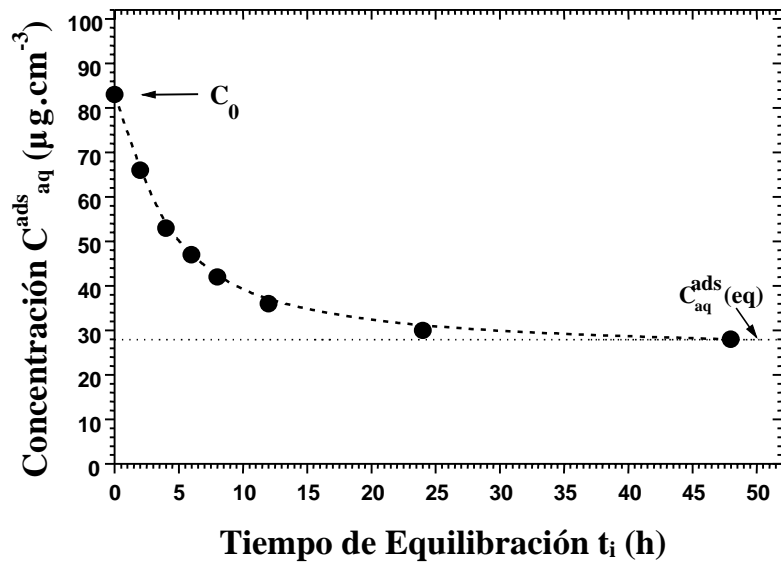


Fig.2. Concentración en masa de la sustancia problema en la fase acuosa ( $C_{aq}$ ) frente al tiempo.

**b) Método en serie**

Las siguientes ecuaciones tienen en cuenta que el procedimiento de adsorción se sigue con mediciones de la sustancia problema en pequeñas alícuotas de la fase acuosa a intervalos de tiempo especificados.

- Durante cada intervalo de tiempo, la cantidad de sustancia adsorbida en el suelo se calcula de la manera siguiente

- para el primer intervalo de tiempo  $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left( \frac{V_0}{v_a} \right) \quad (4)$$

- para el segundo intervalo de tiempo  $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left( \frac{V_0}{v_a} \right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left( \frac{V_0 - v_a^A}{v_a} \right) \quad (5)$$

- para el tercer intervalo de tiempo  $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left( \frac{V_0 - v_a^A}{v_a} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left( \frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a} \right) \quad (6)$$

- para el enésimo intervalo de tiempo  $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left( \frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left( \frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a} \right) \quad (7)$$

- El porcentaje de adsorción a cada intervalo de tiempo,  $A_{\Delta t_i}$ , se calcula con la siguiente ecuación:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (8)^5$$

mientras que el porcentaje de adsorción ( $A_{t_i}$ ) al tiempo  $t_i$  viene dado por la ecuación:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (9)^5$$

---

<sup>5</sup> Ecuaciones aplicables a los métodos tanto directo como indirecto. Las demás ecuaciones son aplicables sólo al método indirecto.

Los valores de la adsorción  $A_{t_i}$  o  $A_{\Delta t_i}$  (según las necesidades del estudio) se representan gráficamente frente al tiempo y se determina el tiempo al que se alcanza el equilibrio de sorción.

- Al tiempo de equilibrado  $t_{eq}$ :

- la masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo es:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)^5$$

- la masa de la sustancia problema en la solución es:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)^5$$

- y la adsorción porcentual en el equilibrio es:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (12)^5$$

Los parámetros usados en estas ecuaciones se definen de la forma siguiente:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), \dots, m_s^{ads}(\Delta t_n)$  = masa de la sustancia adsorbida en el suelo durante los intervalos de tiempo  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  respectivamente ( $\mu g$ );

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), \dots, m_m^{ads}(t_n)$  = masa de la sustancia medida en una alícuota  $v_a^A$  a los tiempos  $t_1, t_2, \dots, t_n$  respectivamente ( $\mu g$ );

$m_s^{ads}(eq)$  = masa de la sustancia adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción ( $\mu g$ );

$m_{aq}^{ads}(eq)$  = masa de la sustancia en la solución en el equilibrio de adsorción ( $\mu g$ );

$v_a^A$  = volumen de la alícuota donde se mide la sustancia problema ( $cm^3$ );

$A_{\Delta t_i}$  = adsorción porcentual correspondiente al intervalo de tiempo  $\Delta t_i$  (%);

$A_{eq}$  = adsorción porcentual en el equilibrio de adsorción (%).

### DESORCIÓN D (%)

El tiempo  $t_0$  al que se inicia el experimento de cinética de desorción se considera que es el momento en que el volumen recuperado máximo de la solución de sustancia problema (después de alcanzarse el equilibrio de adsorción) es sustituido por un volumen igual de solución de  $CaCl_2$  0,01 M.

### a) Método paralelo

A un tiempo  $t_i$ , la masa de la sustancia problema se mide en la fase acuosa tomada del tubo  $i$  ( $V_r^i$ ), y la masa desorbida se calcula con arreglo a la siguiente ecuación:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left( \frac{V_0}{V_r^i} \right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

En el equilibrio de desorción  $t_i=t_{eq}$ , por lo que  $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$ .

La masa de la sustancia problema desorbida durante un intervalo de tiempo ( $\Delta t_i$ ) se da en la ecuación:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

La desorción porcentual se calcula:

- a un tiempo  $t_i$  a partir de la ecuación:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (15)$$

- y durante un intervalo de tiempo ( $\Delta t_i$ ) a partir de la ecuación:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (16)$$

donde:

$D_{t_i}$  = desorción porcentual al tiempo  $t_i$  (%);

$D_{\Delta t_i}$  = desorción porcentual correspondiente al intervalo de tiempo  $\Delta t_i$  (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$  = masa de la sustancia problema desorbida al tiempo  $t_i$  ( $\mu\text{g}$ );

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$  = masa de la sustancia problema desorbida durante el intervalo de tiempo  $\Delta t_i$  ( $\mu\text{g}$ );

$m_m^{des}(t_i)$  = masa de la sustancia problema medida analíticamente al tiempo  $t_i$  en un volumen de solución  $V_r^i$ , que se toma para el análisis ( $\mu\text{g}$ );

$m_{aq}^A$  = masa de la sustancia problema que queda en solución una vez alcanzado el equilibrio de adsorción debido a la sustitución incompleta del volumen ( $\mu\text{g}$ );

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads} (eq) \cdot \left( \frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads} (eq)$  = masa de la sustancia problema en la solución en el equilibrio de adsorción ( $\mu g$ );

$V_R$  = volumen de sobrenadante retirado del tubo después de que se haya alcanzado el equilibrio de adsorción y sustituido por el mismo volumen de una solución de  $CaCl_2$  0,01 M ( $cm^3$ );

$V_T^i$  = volumen de solución tomado del tubo (i) para la medida de la sustancia problema, en el experimento de cinética de desorción, ( $cm^3$ ).

Los valores de desorción  $D_{t_i}$  o  $D_{\Delta t_i}$  (según las necesidades del estudio) se representan frente al tiempo y se determina el tiempo al que se alcanza el equilibrio de desorción.

### b) Método en serie

Las siguientes ecuaciones tienen en cuenta que el procedimiento de adsorción presentado se ha seguido con mediciones de la sustancia problema en pequeñas alícuotas ( $v_a^A$ ) de la fase acuosa (método en serie en "Realización de la prueba" 1.9.). Se supone que: a) el volumen de sobrenadante retirado del tubo tras el experimento de cinética de adsorción se ha sustituido con el mismo volumen de solución de  $CaCl_2$  0,01 M ( $V_R$ ) y b) el volumen total de fase acuosa en contacto con el suelo ( $V_T$ ) durante el experimento de cinética de desorción se mantiene constante y viene dado por la ecuación:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A (i) \quad (18)$$

Al tiempo  $t_i$ :

- La masa de la sustancia problema se mide en una pequeña alícuota ( $v_a^D$ ) y la masa desorbida se calcula con arreglo a la siguiente ecuación:

$$m_{aq}^{des} (t_i) = m_m^{des} (t_i) \cdot \left( \frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left( \frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \quad (19)$$

- Al equilibrio de desorción  $t_i = t_{eq}$ , por lo que  $m_{aq}^{des} (t_i) = m_{aq}^{des} (eq)$ .
- La desorción porcentual  $D_{t_i}$  se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des} (t_i)}{m_s^{ads} (eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (20)$$



Al intervalo de tiempo ( $\Delta t_i$ ):

- Durante cada intervalo de tiempo, la cantidad de sustancia desorbida se calcula de la forma siguiente:

— para el primer intervalo de tiempo  $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left( \frac{V_T}{v_a} \right) - m_{aq}^A \quad y \quad m_s^{des}(t_1) = m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— para el segundo intervalo de tiempo  $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left( \frac{V_T}{v_a} \right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left( \frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) - m_{aq}^A \cdot \left( \frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) \quad y$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[ m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2) \right] \quad (22)$$

— para el enésimo intervalo de tiempo  $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[ m_m^{des}(t_n) \cdot \left( \frac{V_T}{v_a} \right) - m_{aq}^A \cdot \left( \frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left( \frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \right]$$

$$y \quad m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Finalmente, la desorción porcentual a cada intervalo de tiempo,  $D_{\Delta t_i}$ , se calcula con la siguiente ecuación:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (24)$$

mientras que la desorción porcentual  $D_{t_i}$  al tiempo  $t_i$  viene dada por la ecuación:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (25)$$

definiéndose los parámetros utilizados de la forma siguiente:

$m_s^{des}(\Delta t_1), m_s^{des}(\Delta t_2), \dots, m_s^{des}(\Delta t_n)$  = masa de la sustancia que permanece adsorbida en el suelo tras los intervalos de tiempo  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  respectivamente ( $\mu g$ );

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1), m_{aq}^{des}(\Delta t_2), \dots, m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$  = masa de la sustancia problema desorbida durante los intervalos de tiempo  $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$  respectivamente ( $\mu g$ );

$m_m^{\text{des}}(t_1), m_m^{\text{des}}(t_2), \dots, m_m^{\text{des}}(t_n) =$  masa de la sustancia medida en una alícuota ( $v_a^D$ ) a los tiempos  $t_1, t_2, \dots, t_n$ , respectivamente ( $\mu\text{g}$ );

$V_T =$  volumen total de la fase acuosa en contacto con el suelo durante el experimento de cinética de desorción realizado con el método en serie ( $\text{cm}^3$ );

$m_{\text{aq}}^A =$  masa de la sustancia problema que queda en solución una vez alcanzado el equilibrio de adsorción debido a la sustitución incompleta del volumen ( $\mu\text{g}$ );

$$m_{\text{aq}}^A = \left( \frac{\left( V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) - V_R}{\left( V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

$V_R =$  volumen de sobrenadante retirado del tubo después de alcanzar el equilibrio de adsorción y sustituido por el mismo volumen de solución de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M ( $\text{cm}^3$ );

$v_a^D =$  volumen de la alícuota tomada del tubo para el análisis (i), durante el experimento de cinética de desorción realizado con el método en serie ( $\text{cm}^3$ );

$$v_a^D \leq 0.02 \cdot V_T \quad (27)$$

**ANEXO 6**

**ADSORCIÓN-DESORCIÓN EN SUELOS: FICHAS DE COMUNICACIÓN DE DATOS**

Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 °C, 12 h):.....%

Temperatura:.....°C

**Adecuación del método analítico**

Suelo pesado	g	
Suelo: masa seca	g	
Volumen sol. CaCl <sub>2</sub>	cm <sup>3</sup>	
Conc. final nominal sol.	µg cm <sup>-3</sup>	
Conc. final analítica sol.	µg cm <sup>-3</sup>	

Principio del método analítico utilizado:

Calibración del método analítico:



Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 °C, 12 h):.....%

Temperatura:.....°C

**Prueba de adsorción: blancos y control**

	<b>Símbolo</b>	<b>Unid.</b>	<b>Blanco</b>		<b>Blanco</b>		<b>Control</b>	
Nº tubo								
Suelo pesado	-	g					0	0
Cantidad de agua en el suelo pesado (calculada)		cm <sup>3</sup>					-	-
Volumen añadido de solución CaCl <sub>2</sub> 0,01 M		cm <sup>3</sup>						
Volumen añadido de la solución madre de sust. probl.		cm <sup>3</sup>	0	0				
Volumen total de fase acuosa (calculado)		cm <sup>3</sup>					-	-
Concentración inicial de la sustancia probl. en la fase acuosa		µg cm <sup>-3</sup>						
<b>Tras agitación y centrifugación</b>								
Concentración en la fase acuosa		µg cm <sup>-3</sup>						

Nota: Añádanse columnas en caso necesario.

Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 °C, 12 h):.....%

Temperatura:.....°C

**Balance de masa**

	<b>Símbolo</b>	<b>Unid.</b>				
Nº tubo						
Suelo pesado	-	g				
Suelo: masa seca	$m_{soil}$	g				
Volumen de agua en suelo pesado (calculado)	$V_{WS}$	ml				
Volumen sol. CaCl <sub>2</sub> 0,01 M para equilibrar el suelo		ml				
Volumen de solución madre		cm <sup>3</sup>				
Volumen total de fase acuosa en contacto con el suelo	$V_0$	cm <sup>3</sup>				
Concentración inicial solución probl.	$C_0$	µg cm <sup>-3</sup>				
Tiempo de equilibrado	-	h				
<b>Tras agitación y centrifugación</b>						
Concentr. sust. probl. fase acuosa en equilibrio adsorción, incluida corrección por blanco	$C_{aq}^{ads} (eq)$	µg cm <sup>-3</sup>				
Tiempo de equilibrado	$t_{eq}$	h				
<b>1ª dilución con solvente</b>						
Volumen retirado fase acuosa	$V_{rec}$	cm <sup>3</sup>				
Volumen añadido solvente	$\Delta V$	cm <sup>3</sup>				
<b>1ª extracción con solvente</b>						
Señal analizada en fase solvente	$S_{E1}$	var.				
Conc. sust. probl. en solvente	$C_{E1}$	µg cm <sup>-3</sup>				
Masa sustancia extraída del suelo y paredes recipiente	$m_{E1}$	µg				
<b>2ª dilución con solvente</b>						
Volumen retirado solvente	$\Delta V_s$	cm <sup>3</sup>				
Volumen añadido solvente	$\Delta V'$	cm <sup>3</sup>				
<b>2ª extracción con solvente</b>						
Señal analizada en fase solvente	$S_{E2}$	var.				
Conc. sust. probl. en solvente	$C_{E2}$	µg cm <sup>-3</sup>				
Masa sustancia extraída del suelo y paredes recipiente	$m_{E2}$	µg				
Total masa sust. probl. extraída en dos pasos	$m_E$					
Balance de masa	MB	%				

Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 °C, 12 h):.....%

Temperatura:.....°C

### Isotermas de adsorción

	Símbolo	Unid.								
Nº tubo										
Suelo pesado	-	g								
Suelo: masa seca	E	g								
Volumen de agua en suelo pesado (calculado)	$V_{ws}$	$cm^3$								
Volumen sol. $CaCl_2$ 0,01 M para equilibrar el suelo		$cm^3$								
Volumen de solución madre añadido		$cm^3$								
Volumen total de fase acuosa en contacto con suelo (calculado)	$V_0$	$cm^3$								
Concentración solución	$C_0$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Tiempo de equilibrado	-	h								
<b>Tras agitación y centrifugación</b>										
Concentr. sust. fase acuosa, incluida corrección por blanco	$C_{aq}^{ads}\ (eq)$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Temperatura		°C								
Masa adsorb. por unidad suelo	$C_s^{ads}\ (eq)$	$\mu g\ g^{-1}$								

Análisis de regresión:

valor de  $K_F^{ads}$  :

valor de  $1/n$ :

coeficiente de regresión  $r^2$ :

Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 °C, 12 h):..... %

Temperatura:.....°C

Metodología analítica seguida: Indirecta  Paralela  En serie

**Prueba de desorción**

	Símbolo	Unidades	Intervalo de tiempo	Intervalo de tiempo	Intervalo de tiempo	Intervalo de tiempo
Nº tubo de la fase de adsorción						
Masa de sustancia adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción	$m_s^{ads} (eq)$	µg				
Volumen retirado de fase acuosa, sustituido por CaCl <sub>2</sub> 0,01 M	$V_R$	cm <sup>3</sup>				
Volumen total de fase acuosa en contacto con suelo	PM $V_0$	cm <sup>3</sup>				
	SM $V_T$	cm <sup>3</sup>				
Masa sust. probl. que queda en solución una vez alcanzado el equilibrio de adsorción debido a sustitución incompleta del volumen	$m_{aq}^A$	µg				
<b>Cinética de desorción</b>						
Masa medida de sustancia desorbida del suelo al tiempo $t_i$	$m_m^{des} (t_i)$	µg				
Volumen de solución tomado del tubo (i) para medir la sustancia problema	PM $V_r^i$	cm <sup>3</sup>				
	SM $v_a^D$	cm <sup>3</sup>				
Masa de sustancia desorbida del suelo al tiempo $t_i$ (calculada)	$m_{aq}^{des} (t_i)$	µg				
Masa de sustancia desorbida del suelo durante el intervalo de tiempo $\Delta t_i$ (calculada)	$m_{aq}^{des} (\Delta t_i)$	µg				
<b>Desorción porcentual</b>						
Desorción al tiempo $t_i$	$D_{t_i}$	%				
Desorción al intervalo de tiempo $\Delta t_i$	$D_{\Delta t_i}$	%				
Coficiente de desorción aparente	$K_{des}$					

PM: Método paralelo  
SM: Método en serie



## C.19. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE ADSORCIÓN ( $K_{oc}$ ) EN SUELOS Y EN LODOS DE AGUAS RESIDUALES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

### 1. MÉTODO

El presente método de ensayo reproduce las directrices del documento TG121 de la OCDE (2000).

#### 1.1 INTRODUCCIÓN

El comportamiento que presentan los compuestos en cuanto a su adsorción en suelos o en lodos de aguas residuales puede describirse mediante ciertos parámetros, para cuya determinación experimental se puede aplicar el Método de Ensayo C18. Un parámetro importante es el coeficiente de adsorción, definido como la relación entre la concentración del compuesto en la muestra de suelo o lodo y la concentración del mismo en la fase acuosa, cuando la adsorción llega al equilibrio. El coeficiente de adsorción normalizado con respecto al contenido de carbono orgánico presente en el suelo,  $K_{oc}$ , constituye un útil indicador de la capacidad que presenta un producto químico para unirse a la materia orgánica de los suelos o los lodos de aguas residuales; este valor permite establecer comparaciones entre los diversos productos químicos. Se puede calcular este parámetro a través de correlaciones con la hidrosolubilidad y con el coeficiente de reparto n-octanol/ agua (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

El método experimental descrito en este ensayo hace uso de una técnica de CLAR para calcular el coeficiente de adsorción,  $K_{oc}$ , en suelos y lodos de aguas residuales (8). La fiabilidad de los valores así obtenidos es superior a la de los cálculos efectuados por QSAR (9). Como método de cálculo, no puede sustituir completamente a los experimentos de equilibrio de lotes contemplados en el Método de Ensayo C18. A pesar de ello, el  $K_{oc}$  calculado puede ser útil para escoger los parámetros de ensayo adecuados en los estudios de adsorción/desorción que siguen el Método de Ensayo C.18 calculando los valores  $K_d$  (coeficiente de distribución) o  $K_f$  (coeficiente de adsorción de Freundlich) según la ecuación 3 (véase el apartado 1.2).

#### 1.2 DEFINICIONES

**$K_d$** : Coeficiente de distribución, que se define como la relación existente entre las concentraciones en el equilibrio (C) de una sustancia problema disuelta en un sistema de dos fases: un adsorbente (suelo o lodo) + una fase acuosa; es un valor adimensional, cuando las concentraciones en ambas fases se expresan como peso/peso. Si la concentración del compuesto en la fase acuosa viene expresada como peso/volumen, las unidades de  $K_d$  son  $\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}$ .  $K_d$  puede variar en función de las propiedades del adsorbente.

$$K_d = \frac{C_{\text{suelo}}}{C_{\text{aq}}} \text{ o bien } \frac{C_{\text{lodo}}}{C_{\text{aq}}} \quad (1)$$

En esta ecuación:

$C_{\text{suelo}}$  = concentración de la sustancia problema en el suelo, una vez alcanzado el equilibrio ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )

$C_{\text{lodo}}$  = concentración de la sustancia problema en el lodo, una vez alcanzado el equilibrio ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )

$C_{\text{aq}}$  = concentración de la sustancia problema en la fase acuosa, una vez alcanzado el equilibrio ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

**$K_f$** : Coeficiente de adsorción de Freundlich, que se define como la concentración de la sustancia problema en el suelo o en el lodo de aguas residuales ( $x/m$ ) cuando la concentración en la fase acuosa, llegado el equilibrio,  $C_{aq}$ , toma el valor de uno; unidades:  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de adsorbente. El valor puede variar en función de las propiedades del adsorbente.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

En esta ecuación:

$x/m$  = cantidad de sustancia problema  $x$  ( $\mu\text{g}$ ) adsorbida por masa de adsorbente  $m$  ( $\text{g}$ ), en el equilibrio

$1/n$  = pendiente de la isoterma de adsorción de Freundlich

$C_{aq}$  = concentración de la sustancia problema en la fase acuosa, en el equilibrio ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

Cuando  $C_{aq} = 1$ ;  $\log K_f = \log \frac{x}{m}$

**$K_{oc}$** : Coeficiente de distribución ( $K_d$ ) o coeficiente de adsorción de Freundlich ( $K_f$ ) normalizado con respecto al contenido de carbono orgánico ( $f_{oc}$ ) de un adsorbente; en el caso particular de productos químicos no ionizados, resulta un indicador aproximado para conocer la magnitud de la adsorción de un compuesto y permite establecer comparaciones entre diversos productos químicos. Según sean las dimensiones de  $K_d$  y  $K_f$ ,  $K_{oc}$  puede ser adimensional o bien venir expresado en las unidades siguientes:  $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$  o  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  de materia orgánica.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \text{ (adimensional o } \text{ml} \cdot \text{g}^{-1}\text{) o bien } \frac{K_f}{f_{oc}} \text{ (}\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

La relación entre los coeficientes  $K_{oc}$  y  $K_d$  no siempre es lineal; así pues, la posible diferencia de los valores de  $K_{oc}$  entre uno y otro suelo es muy reducida, en comparación con la de los valores  $K_d$  o  $K_f$ . A partir del coeficiente de distribución másica ( $k'$ ), empleando un gráfico de calibración de  $\log k'$  frente a  $\log K_{oc}$  (registrado con los compuestos de referencia elegidos), se deduce el coeficiente de adsorción ( $K_{oc}$ ).

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

En esta ecuación:

$t_R$ : Tiempo de retención (en el cromatograma de CLAR) del compuesto problema o del compuesto de referencia (minutos)

$t_0$ : Tiempo de retención de la fase móvil en la columna de CLAR (minutos) (véase el apartado 1.8.2).

**$P_{ow}$** : Coeficiente de reparto octanol/agua, que se define como el cociente entre la concentración de la sustancia disuelta en *n*-octanol y la concentración de la misma disuelta en la fase acuosa; se trata de un valor adimensional..

$$P_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

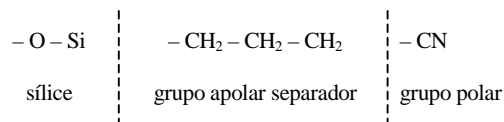
### 1.3 COMPUESTOS DE REFERENCIA

Es necesario conocer, antes de aplicar el método, cuál es la fórmula estructural del compuesto, así como su pureza y su constante de disociación (en caso pertinente). Resulta útil contar con datos adicionales tales como la solubilidad en agua y en disolventes orgánicos, el coeficiente de reparto octanol/agua y las características de hidrólisis.

A fin de establecer una correlación entre los datos de retención obtenidos mediante CLAR, relativos a la sustancia problema, y el coeficiente de adsorción de la misma,  $K_{oc}$ , se debe trazar un gráfico de calibración ( $\log K_{oc}$  frente a  $\log k'$ ). Se empleará un mínimo de seis puntos de referencia, al menos uno de ellos por encima y otro por debajo del valor previsto para la sustancia problema. La exactitud del método mejorará significativamente si se emplean compuestos de referencia que guarden una relación estructural con la sustancia problema. Si el analista no cuenta con este tipo de datos, deberá ser él quien elija los compuestos adecuados para la calibración. En tal caso, se optará por una serie más general de compuestos heterogéneos desde el punto de vista estructural. En el Anexo, figura una lista de compuestos y de valores de  $K_{oc}$  aplicables para los análisis de lodos de aguas residuales (cuadro 1) o de suelos (cuadro 3). La elección de otros compuestos para la calibración deberá ser justificada.

### 1.4 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se lleva a cabo una CLAR en columnas analíticas rellenas de una fase sólida de tipo cianopropilo, de las disponibles en el mercado, que contiene tanto grupos lipófilos como grupos polares. Se utiliza una fase estacionaria moderadamente polar basada en una matriz de sílice:



El principio del método de ensayo es similar al del Método de Ensayo A.8 (Coeficiente de reparto, Método de CLAR). Al ir atravesando la columna, junto con la fase móvil, la sustancia problema interacciona con la fase estacionaria. Como resultado del reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria, la sustancia problema experimenta una retención. La composición ambifílica de la fase estacionaria (partes polares y partes apolares) permite una interacción de los diversos grupos polares o apolares de cada molécula similar a la que tiene lugar en el caso de la materia orgánica en matrices tales como lodos de aguas residuales o suelos. Este hecho posibilita establecer una relación entre el tiempo de retención en la columna y el coeficiente de adsorción en la materia orgánica.

El pH ejerce una significativa influencia sobre la adsorción, particularmente en el caso de los compuestos polares. En el caso de suelos de cultivo o tanques de plantas de tratamiento de aguas residuales, el pH suele estar comprendido entre 5,5 y 7,5. Cuando se desea analizar compuestos ionizables, se debe llevar a cabo un ensayo con la forma ionizada y otro con la no ionizada, empleando las soluciones tampón adecuadas, aunque sólo en aquellos casos en que al menos el 10 % del compuesto analizado se disocia a un pH de entre 5,5 y 7,5.

Para la evaluación se utiliza exclusivamente la relación entre la retención en la columna de CLAR y el coeficiente de adsorción, de modo que no es preciso aplicar un método de análisis cuantitativo: tan sólo es necesario determinar el tiempo de retención. Si se dispone de una serie adecuada de compuestos de referencia y es posible aplicar las condiciones experimentales normales, el método constituye un modo rápido y eficaz para calcular el coeficiente de adsorción,  $K_{oc}$ .

## 1.5 APLICABILIDAD DEL ENSAYO

El método de CLAR es aplicable a aquellos productos químicos (marcados o no) para los cuales se disponga de un sistema de detección apropiado (por ejemplo, un espectrofotómetro, un detector de radiactividad) y que sean suficientemente estables durante todo el experimento. Puede resultar especialmente útil para analizar productos químicos cuyo estudio sea difícil mediante otros sistemas experimentales (compuestos volátiles; compuestos cuya solubilidad en agua no alcance una concentración que pueda determinarse desde el punto de vista analítico; compuestos con una elevada afinidad por la superficie de los sistemas de incubación). Se puede utilizar este método para analizar mezclas que originen al eluir bandas sin resolución. En este caso, se debe definir un margen de límites superior e inferior para los valores de  $\log K_{oc}$  correspondientes a los compuestos de la mezcla problema.

La presencia de impurezas puede dificultar a veces la interpretación de los resultados de la CLAR; no obstante, su importancia será de índole menor en la medida en que se cuente con análisis que permitan identificar con claridad la sustancia problema y distinguirla de las impurezas.

Se ha validado el uso del método para analizar las sustancias citadas en el cuadro 1 del Anexo; igualmente, el método ha sido aplicado al análisis de muchos otros productos químicos comprendidos en las siguientes familias químicas:

- aminas aromáticas (ejemplos: trifluralina, 4-cloroanilina, 3,5-dinitroanilina, 4-metilnilina, N-metilnilina, 1-naftilamina);
- ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos (ejemplos: benzoato de metilo, 3,5-dinitrobenzoato de etilo);
- hidrocarburos aromáticos (ejemplos: tolueno, xileno, etilbenceno, nitrobenzeno);
- ésteres de ácidos ariloxifenoxipropiónicos (ejemplos: metil diclofop, etil fenoxaprop, P-etil fenoxaprop);
- fungicidas con estructura de tipo imidazol o benzimidazol (ejemplos: carbendazima, fuberidazol, triazóxido);
- amidas de ácidos carboxílicos (ejemplos: 2-clorobenzamida, N,N-dimetilbenzamida, 3,5-dinitrobenzamida, N-metilbenzamida, 2-nitrobenzamida, 3-nitrobenzamida);
- hidrocarburos clorados (ejemplos: endosulfán, DDT, hexaclorobenceno, quintoceno, 1,2,3-triclorobenceno);
- insecticidas organofosforados (ejemplos: metil azinfos, disulfoton, fenamifos, isofenfos, pirazofos, sulprofos, triazofos);
- fenoles (ejemplos: fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 1-naftol);
- derivados de la fenilurea (ejemplos: isoproturon, monolinuron, pencicuron);
- colorantes (ejemplos: Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);
- hidrocarburos poliaromáticos (ejemplos: acenafteno, naftaleno);
- herbicidas con estructura de 1,3,5-triazina (ejemplos: prometrina, propazina, simazina, terbutrina);
- derivados de tipo triazol (ejemplos: tebuconazol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

No es aplicable el método a aquellas sustancias que den lugar a una reacción con el eluyente o con la fase estacionaria. Tampoco a aquellas sustancias que interaccionen con componentes inorgánicos de modo específico (por ejemplo, las que formen complejos en racimo con los minerales de las arcillas). Puede ocurrir que el método no sirva en el caso de tensioactivos, compuestos inorgánicos y ácidos y bases orgánicos moderados o fuertes. Es posible determinar valores de  $\log K_{oc}$  comprendidos entre 1,5 y 5,0. Para analizar compuestos ionizables, se debe emplear una fase móvil tamponada; no obstante, se tendrá cuidado de evitar que los componentes del tampón o la sustancia problema precipiten.

## 1.6 CRITERIOS DE CALIDAD

### 1.6.1 **Exactitud**

Normalmente, se puede calcular que el coeficiente de adsorción de una sustancia problema estará comprendido en el intervalo de  $\pm 0,5$  unidades logarítmicas del valor determinado por el método de equilibrio de lotes (véase el cuadro 1 del Anexo). Es posible lograr una mayor exactitud si los compuestos de referencia empleados guardan una relación estructural con la sustancia problema.

### 1.6.2 **Repetibilidad**

Se debe efectuar al menos un duplicado de cada determinación. Los valores de  $\log K_{oc}$  obtenidos a partir de cada medición deben encontrarse en un intervalo de 0,25 unidades logarítmicas.

### 1.6.3 **Reproducibilidad**

La experiencia hasta ahora adquirida en la aplicación del método confirma la validez del mismo. Un estudio del método de CLAR, en el que se utilizaron 48 sustancias (pesticidas en su mayoría) para las que se disponía de datos fiables respecto al  $K_{oc}$  en suelos, dio como resultado un coeficiente de correlación,  $R = 0,95$  (10) (11).

Con objeto de mejorar y validar el método, se llevó a cabo un ensayo comparativo en el que participaron 11 laboratorios (12). Los resultados están recogidos en el cuadro 2 del Anexo.

## 1.7 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

### 1.7.1 **Estimación preliminar del coeficiente de adsorción**

Tanto el coeficiente de reparto octanol/agua  $P_{ow}$  ( $= K_{ow}$ ) como, en cierta medida, la hidrosolubilidad pueden servir de indicadores del grado de adsorción, particularmente en el caso de compuestos no ionizados, de modo que pueden ser utilizados para prever la gama de valores. Existen numerosas correlaciones útiles publicadas, relativas a varios grupos de productos químicos (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

### 1.7.2 **Aparato**

Se debe disponer de un cromatógrafo de líquidos equipado con una bomba continua y un detector adecuado. Es conveniente utilizar una válvula de inyección junto con un bucle al efecto. Se emplearán resinas comerciales con grupos cianopropílicos enlazados covalentemente a un sustrato de sílice (por ejemplo, Hypersil y Zorbax CN). Se puede intercalar una precolumna del mismo material entre el sistema de inyección y la columna en la que se realiza el análisis. Puede existir una considerable variabilidad entre las columnas que procedan de diferentes proveedores, manifestada en su eficacia para lograr la separación. Se deberá lograr los siguientes coeficientes de distribución másica,  $k'$ , expuestos aquí como valores orientativos:  $\log k' > 0,0$  cuando  $\log K_{oc} = 3,0$  y  $\log k' > -0,4$  cuando  $\log K_{oc} = 2,0$ , al emplear como fase móvil una mezcla de metanol/agua (55 % / 45 %).

### 1.7.3 Fases móviles

Se han estudiado varias fases móviles; se recomienda utilizar las dos siguientes:

- metanol/agua (55/45 % v/v)
- metanol/tampón de citrato 0,01M (pH = 6,0), (55/45 % v/v)

Para preparar el disolvente de elución, se emplea una mezcla de metanol para CLAR y agua destilada o tampón de citrato. La mezcla se desgasifica antes de ser utilizada. Se efectuará una elución isocrática. En el caso de que las mezclas de metanol/agua no sean apropiadas, es posible investigar mezclas de otros disolventes con agua; ejemplos: etanol/agua o bien acetonitrilo/agua. En el caso de compuestos ionizables, se recomienda emplear una solución tampón a fin de estabilizar el pH. Se debe procurar evitar la precipitación de sales y el deterioro de la columna, situaciones posibles al utilizar algunas mezclas de fase orgánica + tampón.

No es posible incluir aditivos tales como reactivos tipo par iónico, ya que pueden alterar las características de adsorción de la fase estacionaria. Tales alteraciones de la fase estacionaria pueden ser irreversibles. Así pues, los experimentos en los que intervengan aditivos deben ser realizados en columnas independientes.

### 1.7.4 Solutos

Se utilizará la fase móvil para disolver tanto la sustancia problema como los compuestos de referencia.

## 1.8 REALIZACIÓN DEL ENSAYO

### 1.8.1 Condiciones de ensayo

Se registrará la temperatura a la que se realizan las mediciones. Es muy conveniente servirse de un compartimento termostatzado para la columna, para garantizar la constancia de las condiciones en que transcurre la calibración y las cromatografías para los cálculos o las mediciones de la sustancia problema.

### 1.8.2 Determinación del tiempo de retención de la fase móvil, $t_0$

Para determinar el tiempo de retención de la fase móvil,  $t_0$ , se pueden emplear dos métodos distintos (véase también el apartado 1.2).

#### 1.8.2.1 *Determinación del tiempo de retención de la fase móvil, $t_0$ , mediante una serie homóloga*

Se ha demostrado que este procedimiento da lugar a valores de  $t_0$  fiables y normalizados. Véase información detallada en el Método de ensayo A.8: Coeficiente de reparto (n-octanol/agua), Método de CLAR.

#### 1.8.2.2 *Determinación del tiempo de retención de la fase móvil, $t_0$ , utilizando compuestos inertes no retenidos por la columna*

Esta técnica consiste en inyectar soluciones de formamida, urea o nitrato de sodio. Se debe efectuar al menos un duplicado de cada medición.

### 1.8.3 **Determinación de los tiempos de retención, $t_R$**

Se elegirán compuestos de referencia conforme a lo descrito en el apartado 1.3. Se puede efectuar una inyección de los mismos a modo de patrón mixto para determinar sus tiempos de retención, siempre que se haya confirmado que no existan interferencias recíprocas que alteren estos valores. Periódicamente, al menos dos veces al día, se llevará a cabo una calibración, para tener en cuenta las potenciales variaciones imprevistas en cuanto a la eficacia de la columna. Una práctica muy adecuada consiste en efectuar las inyecciones de calibración tanto antes como después de inyectar la sustancia problema, al objeto de confirmar que no hayan variado los tiempos de retención. Se inyecta por separado cada sustancia problema, en cantidades tan reducidas como sea posible (para evitar una sobrecarga de la columna) y se procede a determinar sus tiempos de retención.

Para lograr una mayor fiabilidad de las mediciones, se realizará al menos un duplicado de cada determinación. Los valores de  $\log K_{oc}$  obtenidos a partir de cada medición deben encontrarse en un intervalo de 0,25 unidades logarítmicas.

### 1.8.4 **Evaluación**

A partir del tiempo de retención de la fase móvil,  $t_0$ , y de los tiempos de retención de los compuestos de referencia elegidos,  $t_R$ , se calculan los coeficientes de distribución másica,  $k'$ , aplicando la ecuación 4 (véase el apartado 1.2). A continuación, se traza un gráfico en el que se representan los datos relativos al valor  $\log k'$  de los compuestos de referencia frente a los respectivos valores  $\log K_{oc}$  procedentes de los experimentos de equilibrio de lotes, mostrados en los cuadros 1 y 3 del Anexo. Interpolando en este gráfico el valor  $\log k'$  correspondiente a cada sustancia problema, se obtiene entonces el respectivo valor  $\log K_{oc}$ . Si los resultados reales indican que el  $\log K_{oc}$  de la sustancia problema se sale del intervalo de calibración, se debe repetir el ensayo, empleando en este caso otros compuestos de referencia más apropiados.

## 2. **DATOS E INFORME**

El informe debe incluir la siguiente información:

- identidad y pureza de la sustancia problema y de los compuestos de referencia, así como valores de pKa en caso de que sea relevante;
- descripción del equipo y de las condiciones de trabajo, por ejemplo: tipo y dimensiones de la columna en la que se efectúa el análisis (y de la precolumna), medios de detección, fase móvil (proporción de los distintos componentes, pH), intervalo de temperaturas durante las mediciones;
- tiempo de retención de la fase móvil y método empleado para determinarlo;
- cantidades de la sustancia problema y de los compuestos de referencia introducidas en la columna;
- tiempos de retención de los compuestos de referencia utilizados para la calibración;
- representación gráfica y detalles relativos a la recta de regresión ajustada ( $\log k'$  frente a  $\log K_{oc}$ );
- datos sobre la retención media y valor  $\log K_{oc}$  calculado para el compuesto problema;
- cromatogramas.

3. **BIBLIOGRAFÍA**

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, Nueva York.
- (2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient ( $K_{oc}$ ) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.
- (3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.
- (4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, 227-231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, 297-312.
- (6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, 831-832.
- (7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, 833-846.
- (8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere , 35(1/2), 121-128.
- (9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), 2493-2504.
- (10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), 2341-2352.
- (11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, 285-304.
- (12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.



ANEXO

**Cuadro 1**

Comparación entre los valores de  $K_{oc}$ , observados en suelos y en lodos de aguas residuales, y los datos calculados aplicando el método de CLAR<sup>1,2</sup>

Compuesto	Nº CAS	log $K_{oc}$ (lodos)	log $K_{oc}$ – CLAR-	$\Delta$	log $K_{oc}$ (suelos)	log $K_{oc}$ – CLAR-	$\Delta$
Atrazina	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fention	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantreno	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoato de fenilo	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamida	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamida	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilida	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilina	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dicloroanilina	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

<sup>1</sup> W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121 - 128.

<sup>2</sup> W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107 – 119.

**Cuadro 2**

Resultados de un estudio comparativo, realizado en diferentes laboratorios para mejorar y validar el método de CLAR1 (11 laboratorios participantes)

Compuesto	Nº CAS	log $K_{oc}$ [OCDE 106]	$K_{oc}$	log $K_{oc}$
			[método de CLAR]	
Atrazina	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fention	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

<sup>1</sup> W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

**Cuadro 3**

**Compuestos de referencia recomendados para aplicar el método de CLAR  
conforme a los datos de adsorción a los suelos.**

Compuesto de referencia	Nº CAS	log K <sub>oc</sub> (valores promedio), equilibrio de lotes	nº de datos (K <sub>oc</sub> )	log. de la desviación estándar	fuelle
Acetanilida	103-84-4	1,25	4	0,48	a
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	a
2-Nitrobenzamida	610-15-1	1,45	3	0,90	b
N,N-dimetilbenzamida	611-74-5	1,52	2	0,45	a
4-Metilbenzamida	619-55-6	1,78	3	1,76	a
Benzoato de metilo	93-58-3	1,80	4	1,08	a
Atrazina	1912-24-9	1,81	3	1,08	c
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	c
3-Nitrobenzamida	645-09-0	1,95	3	1,31	b
Anilina	62-53-3	2,07	4	1,73	a
3,5-Dinitrobenzamida	121-81-3	2,31	3	1,27	b
Carbendazima	10605-21-7	2,35	3	1,37	c
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	c
Triazóxido	72459-58-6	2,44	3	1,66	c
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	c
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	c
Naftaleno	91-20-3	2,75	4	2,20	a
Endosulfán-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	c
Metiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	c
<i>Acid Yellow 219</i>	63405-85-6	3,16	4	2,83	a
1,2,3-Triclorobenceno	87-61-6	3,16	4	1,40	a
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	a
Fention	55-38-9	3,31	3	2,49	c
<i>Direct Red 81</i>	2610-11-9	3,43	4	2,68	a
Pirazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	c
α-Endosulfán	959-98-8	4,09	5	3,74	c
Metil diclofop	51338-27-3	4,20	3	3,77	c
Fenantreno	85-01-8	4,09	4	3,83	a
<i>Basic Blue 41</i> (mezcla)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	a
DDT	50-29-3	5,63	1	-	b

- /a/ W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).
- /b/ B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304.
- /c/ Datos facilitados por la industria.

## C.20 ENSAYO DE REPRODUCCIÓN EN *DAPHNIA MAGNA*

### 1. MÉTODO

El presente ensayo de toxicidad para la reproducción es copia de las directrices TG 211 de la OCDE (1998).

#### 1.1 INTRODUCCIÓN

La principal finalidad de este ensayo es evaluar el efecto de los productos químicos sobre el resultado reproductor de *Daphnia magna*.

#### 1.2 DEFINICIÓN Y UNIDADES

**Parentales:** hembras de Daphnia presentes al principio del ensayo y cuyo resultado reproductor constituye el objeto del presente estudio.

**Descendientes:** ejemplares de Daphnia jóvenes producidos por los parentales en el curso del ensayo.

**Concentración mínima con efecto observado (LOEC):** concentración de ensayo mínima a la cual se ha observado que la sustancia ejerce un efecto significativo sobre la reproducción y la mortalidad de los parentales (para  $p < 0,05$ ) en comparación con el control y dentro del período de exposición establecido. Además, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC deben ejercer un efecto nocivo igual o mayor que el observado a dicha concentración. Si no se cumplen estas dos condiciones, es preciso dar una explicación completa del modo en que se ha elegido la LOEC (y, por tanto, la NOEC).

**Concentración sin efecto observado (NOEC):** concentración de ensayo inmediatamente inferior a la LOEC que, en comparación con el control, no ejerce ningún efecto estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) dentro del período de exposición establecido.

**CE<sub>x</sub>:** concentración de la sustancia de ensayo disuelta en agua que produce una reducción del x por ciento en la reproducción de *Daphnia magna* dentro del período de exposición establecido.

**Tasa intrínseca de aumento:** medida del crecimiento de la población que integra el resultado reproductor y la mortalidad específica de la edad (20) (21) (22). En poblaciones en equilibrio estacionario es cero. En poblaciones en crecimiento es positiva, y negativa en las que disminuyen. Obviamente, toda tasa negativa es insostenible y conduce a la extinción.

**Límite de detección:** concentración mínima que puede detectarse, aunque no cuantificarse.

**Límite de determinación:** concentración mínima que puede medirse cuantitativamente.

**Mortalidad:** un animal se considera muerto cuando está inmóvil, es decir, cuando es incapaz de nadar o cuando no mueve los apéndices ni la región posterior del abdomen 15 segundos después de la agitación suave del recipiente de ensayo (si se usa otra definición, debe documentarse junto con la referencia correspondiente).

### 1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Las hembras jóvenes de *Daphnia* (los parentales), con una edad inferior a 24 horas al principio del ensayo, se exponen a la sustancia de ensayo añadida al agua a una gama de concentraciones. La duración del ensayo es de 21 días. Al final de éste se evalúa el número total de descendientes vivos producidos por cada parental vivo. Esto significa que se excluyen de los cálculos los organismos inmaduros producidos por adultos que han muerto durante el ensayo. El resultado reproductor de los parentales se puede expresar de otras formas (por ejemplo, como número de descendientes vivos producidos por animal y por día a partir del primero en que se observa descendencia), pero éstas deben documentarse además del número total de inmaduros producidos por parental vivo al final del ensayo. El resultado reproductor de los animales expuestos a la sustancia de ensayo se compara con el de los controles para determinar la concentración mínima con efecto observado (LOEC) y, por tanto, la concentración sin efecto observado (NOEC). Además, y en la medida de lo posible, los datos se analizan con ayuda de un modelo de regresión para estimar la concentración que provocaría una reducción del x % en el resultado reproductor ( $CE_{50}$ ,  $CE_{20}$  o  $CE_{10}$ ).

También hay que documentar la supervivencia de los parentales y el momento de la producción de la primera camada. Asimismo, pueden examinarse otros efectos vinculados con la sustancia sobre variables tales como el crecimiento (la longitud) y, posiblemente, la tasa intrínseca de aumento.

### 1.4 INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Es preciso disponer de resultados de un ensayo de toxicidad aguda (véase la Parte I del Método C.2) realizado con *Daphnia magna*. El resultado puede ser útil para seleccionar un intervalo adecuado de concentraciones en los ensayos de reproducción. Deben conocerse la solubilidad en agua y la presión de vapor de la sustancia de ensayo, así como contar con un método analítico fiable para cuantificar la sustancia en las soluciones de ensayo con la eficiencia de recuperación y el límite de determinación establecidos.

Otros datos de la sustancia de ensayo potencialmente útiles para establecer las condiciones de ensayo son la fórmula estructural, la pureza de la sustancia, la estabilidad a la luz, la estabilidad en las condiciones del ensayo, los valores de  $pK_a$  y  $P_{ow}$  y los resultados del ensayo de biodegradabilidad fácil (véase el Método C.4).

### 1.5 VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido, los controles deben cumplir los siguientes criterios de comportamiento:

- la mortalidad de los parentales (hembras de *Daphnia*) no debe ser superior al 20 % al final del ensayo;
- el número medio de descendientes vivos producidos por cada parental superviviente al final del ensayo ha de ser  $\geq 60$ .

### 1.6 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

#### 1.6.1 **Equipo**

Los recipientes de ensayo y demás instrumentos que hayan de entrar en contacto con las soluciones de ensayo serán íntegramente de vidrio o de otro material químicamente inerte. Los recipientes de ensayo serán normalmente matraces de vidrio.

Además harán falta algunos de los siguientes instrumentos o todos ellos:

- aparato para medir el oxígeno (con microelectrodo o cualquier otro equipo que sea conveniente para medir el oxígeno disuelto en muestras de pequeño volumen);
- aparato adecuado para el control de la temperatura;
- pHmetro;
- aparato para determinar la dureza del agua;
- aparato para determinar la concentración total de carbono orgánico (COT) del agua o la demanda química de oxígeno (DQO);

— aparato adecuado para controlar el régimen de iluminación y medir la intensidad luminosa.

### 1.6.2 Organismo de ensayo

La especie usada en el ensayo es *Daphnia magna* Straus. También pueden usarse otras especies de *Daphnia* siempre que reúnan los criterios de validez apropiados (el criterio de validez relativo al resultado reproductor de los controles debe ser relevante para la especie elegida). Si se usan otras especies de *Daphnia*, es preciso identificarlas con claridad y justificar su uso.

Preferiblemente, el clon debe identificarse genotípicamente. Las investigaciones realizadas (1) han demostrado que el comportamiento reproductor del clon A (procedente del IRCHA en Francia) (3) cumple siempre el criterio de validez de una media de  $\geq 60$  descendientes por parental que sobrevive cuando se cultiva en las condiciones descritas en este método. No obstante, son aceptables otros clones siempre que se demuestre que el cultivo de *Daphnia* cumple los criterios de validez del ensayo.

Al principio del ensayo, los animales tendrán una edad inferior a 24 horas y no deben ser prole de primera camada. Han de proceder de una estirpe saludable (es decir, sin signos de agresión, tales como mortalidad elevada, presencia de machos y efipios, retraso de la producción de la primera camada, animales decolorados, etc.). Los animales de la estirpe deben mantenerse en condiciones de cultivo (luz, temperatura, medio, nutrición y animales por unidad de volumen) similares a las usadas en el ensayo. Cuando el medio de cultivo que vaya a usarse en el ensayo sea distinto del usado en el cultivo sistemático de *Daphnia*, es recomendable prever un período de aclimatación anterior al ensayo, por lo general de 3 semanas de duración (es decir, una generación), para evitar el estrés en los parentales.

### 1.6.3 Medio de ensayo

Es recomendable usar en este ensayo un medio definido completamente. Con ello se evita el uso de aditivos (tales como algas marinas, extracto de suelo, etc.) difíciles de caracterizar y aumentan en consecuencia las oportunidades de normalización entre laboratorios. Se ha observado que los medios Elendt M4 (4) y M7 (véase el anexo 1) son adecuados para este propósito. No obstante, son aceptables medios distintos (por ejemplo, (5) (6)), siempre que se demuestre que el comportamiento del cultivo de *Daphnia* cumple los criterios de validez del ensayo.

Si se usan medios con aditivos sin definir, éstos deben especificarse con claridad, y en el informe del ensayo hay que aportar información sobre su composición, en particular el contenido en carbono, pues podría contribuir a la dieta suministrada. Es recomendable determinar en la preparación madre del aditivo orgánico el carbono orgánico total (COT), la demanda química de oxígeno (DQO) o las dos cosas, así como hacer una estimación de la contribución resultante al COT y a la DQO en el medio de ensayo. Conviene que la concentración de COT en el medio (antes de incorporar las algas) sea inferior a 2 mg/l (7).

Si se ensayan sustancias que contengan metales, es importante tener en cuenta que las propiedades del medio de ensayo (por ejemplo, dureza, capacidad quelante) pueden afectar a la toxicidad de dichas sustancias. Por ello es deseable usar un medio totalmente definido. Sin embargo, en este momento, los únicos medios completamente definidos adecuados para el cultivo prolongado de *Daphnia magna* que se conocen son los Elendt M4 y M7. Ambos contienen el agente quelante EDTA. La práctica ha demostrado (2) que la 'toxicidad aparente' del cadmio es generalmente inferior cuando el ensayo de reproducción se hace en medios M4 o M7 que cuando se hace en medios exentos de EDTA. Por tanto, M4 y M7 no son recomendables para ensayar sustancias con metales, y deben evitarse asimismo en estos casos otros medios que contengan agentes quelantes conocidos. En el caso de sustancias que contengan metales, puede ser aconsejable usar otros medios como, por ejemplo, agua dulce dura reconstituida según ASTM (7), que no contiene EDTA, enriquecida con extracto de algas marinas (8). Esta combinación de agua dulce dura reconstituida según ASTM y extracto de algas marinas es también apropiada para el cultivo prolongado y los ensayos con *Daphnia magna* (2), aun cuando ejerce una ligera acción quelante debida al componente orgánico del extracto de algas marinas.

Al principio del ensayo y durante éste, la concentración de oxígeno disuelto debe ser superior a 3 mg/l. El pH debe estar comprendido entre 6 y 9, y normalmente no debe oscilar en más de 1,5 unidades en ninguno de los ensayos. Se recomienda utilizar una dureza superior a 140 mg/l (expresada como CaCO<sub>3</sub>). Los ensayos realizados con valores iguales o superiores a éste han demostrado un comportamiento reproductor compatible con los criterios de validez (9) (10).

#### 1.6.4 **Soluciones de ensayo**

Las soluciones de ensayo de las concentraciones elegidas se preparan por dilución de una solución de reserva. A ser posible, estas soluciones madre deben prepararse disolviendo la sustancia en medio de ensayo.

En algunos casos puede ser necesario usar disolventes o dispersantes orgánicos para obtener una solución madre de concentración adecuada, aunque es preciso evitar en la medida de lo posible el uso de esta clase de materiales. Son ejemplos de disolventes adecuados la acetona, el etanol, el metanol, la dimetilformamida y el trietilenglicol. Son dispersantes adecuados el Cremophor RH40, la metilcelulosa al 0,01 % y el HCO-40. En cualquier caso, la cantidad de sustancia de ensayo contenida en las soluciones de ensayo no debe sobrepasar el límite de solubilidad en el medio de ensayo.

Los disolventes se usan para obtener una solución madre que pueda dosificarse con exactitud en agua. A la concentración de disolvente recomendada en el medio de ensayo final ( $\leq 0,1$  ml/l), los disolventes indicados en el párrafo anterior no son tóxicos y no aumentan la solubilidad en agua de la sustancia.

Los dispersantes pueden facilitar la dosificación exacta y la dispersión. A la concentración recomendada en el medio de ensayo final ( $\leq 0,1$  ml/l), los dispersantes indicados en el párrafo anterior no son tóxicos y no aumentan la solubilidad en agua de la sustancia.

#### 1.7 DISEÑO DEL ENSAYO

Hay que asignar los tratamientos a los recipientes de ensayo y realizar todas las manipulaciones posteriores de dichos recipientes de forma aleatoria. De otro modo podría introducirse un sesgo susceptible de ser interpretado como efecto de una concentración. En particular, si las unidades experimentales se manipulan en orden de tratamiento o de concentración, determinados efectos vinculados con el tiempo, como la fatiga u otros errores del operador, podrían ejercer un efecto más acusado a concentraciones más elevadas. Además, si hay alguna probabilidad de que los resultados se vean afectados por una condición inicial o ambiental del ensayo, como la posición en el laboratorio, hay que pensar en la conveniencia de practicar agrupamientos.

#### 1.8 PROCEDIMIENTO

##### 1.8.1 **Condiciones de exposición**

###### 1.8.1.1 *Duración*

La duración del ensayo es de 21 días.

###### 1.8.1.2 *Carga*

Los parentales se mantienen separados, uno por recipiente de ensayo, con un volumen de 50 a 100 ml de medio en cada recipiente.

En ocasiones hay que emplear un volumen mayor para satisfacer los requisitos del método analítico usado para determinar la concentración de la sustancia de ensayo, aunque también se permite acumular los recipientes en paralelo para el análisis químico. Si se usan volúmenes superiores a 100 ml, puede ser necesario aumentar la ración administrada a *Dafnia* para garantizar una disponibilidad suficiente de nutrientes y para cumplir con los criterios de validez. En ensayos dinámicos pueden considerarse, por razones técnicas, otros diseños (por ejemplo, cuatro grupos de 10 animales en un volumen de ensayo mayor); en cualquier caso, es preciso documentar cualquier modificación del diseño.

#### 1.8.1.3 *Número de animales*

En ensayos semiestáticos, se mantienen por separado al menos 10 animales a cada concentración de ensayo y al menos 10 animales en la serie de control.

En ensayos dinámicos, se ha demostrado (1) que es adecuado repartir 40 animales en cuatro grupos de 10 a cada concentración de ensayo. Puede usarse un número inferior de organismos de ensayo, y se recomienda un mínimo de 20 animales por concentración repartidos en dos o más recipientes en paralelo de igual número de animales (por ejemplo, cuatro recipientes en paralelo con cinco dafnidos cada uno). Obsérvese que en los ensayos en los cuales se mantengan los animales en grupos, si los parentales mueren, no será posible expresar el resultado reproductor como número total de descendientes vivos producidos por parental vivo al final del ensayo. En tal caso, el resultado reproductor debe expresarse como 'número total de descendientes vivos producidos por parental presente al principio del ensayo'.

#### 1.8.1.4 *Alimentación*

En ensayos semiestáticos, la alimentación debe ser preferiblemente diaria; en cualquier caso, tendrá una frecuencia mínima de tres veces por semana (es decir, en correspondencia con los cambios de medio). Deben documentarse las desviaciones con respecto a esta pauta (por ejemplo, ensayos dinámicos).

Durante el ensayo, la dieta de los parentales estará formada preferiblemente por algas vivas de una o varias de las siguientes especies: *Chlorella* sp, *Selenastrum capricornutum* (ahora *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) y *Scenedesmus subspicatus*. La dieta suministrada se basará en la cantidad de carbono orgánico (C) proporcionado a cada parental. Las investigaciones realizadas (12) han demostrado que, en el caso de *Daphnia magna*, son suficientes raciones comprendidas entre 0,1 y 0,2 mg C/Dafnia/día para alcanzar el número de descendientes necesarios para cumplir los criterios de validez. La ración puede administrarse a una tasa constante durante todo el período de ensayo o, si se prefiere, a una tasa inferior al principio que se va incrementando en función del crecimiento de los parentales. No obstante, en este caso, las raciones deben permanecer en todo momento dentro del intervalo recomendado de 0,1 a 0,2 mg C/Dafnia/día.

Si es preciso recurrir a parámetros indirectos, como el número de células de algas o la absorbancia luminosa, para determinar la ración adecuada (por razones de comodidad, pues medir el contenido de carbono requiere mucho tiempo), cada laboratorio debe crear su propio nomograma para la medición indirecta del contenido de carbono del cultivo de algas (véanse algunos consejos sobre construcción de nomogramas en el anexo 2). Los nomogramas deben revisarse al menos una vez al año, y con mayor frecuencia si cambian las condiciones de los cultivos de algas. Se ha observado que la absorbancia luminosa proporciona una indicación del contenido de carbono mejor que el número de células (13).

Para reducir al mínimo el volumen de medio de cultivo de algas trasvasado a los recipientes de ensayo, la suspensión de algas administrada a *Daphnia* como alimento debe ser concentrada. Las algas pueden concentrarse mediante centrifugación seguida de resuspensión en agua destilada, agua desionizada o medio de cultivo de *Daphnia*.

#### 1.8.1.5 *Iluminación*

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

#### 1.8.1.6 *Temperatura*

La temperatura del medio de ensayo debe encontrarse en el intervalo 18-22 °C. No obstante, en un mismo ensayo, la temperatura no debe variar, a ser posible, más de 2 °C dentro de estos límites (por ejemplo, 18-20, 19-21 o 20-22 °C). Puede ser conveniente utilizar un recipiente de ensayo adicional con el fin de vigilar la temperatura.

#### 1.8.1.7 *Aireación*

Los recipientes de ensayo no recibirán aireación durante el ensayo.



### 1.8.2 Concentraciones de ensayo

Normalmente se prepararán al menos cinco concentraciones de ensayo en una serie geométrica con un factor de separación preferiblemente no superior a 3,2; también hay que usar un número apropiado de recipientes en paralelo con cada concentración de ensayo (véase el apartado 1.8.1.3). Si se usan menos de cinco concentraciones, hay que justificarlo. Las sustancias no deben someterse a ensayo en concentraciones superiores a su límite de solubilidad en el medio de ensayo.

Al determinar la gama de concentraciones, debe tenerse en cuenta lo siguiente:

- i. Si el objetivo es determinar los valores LOEC y NOEC, la concentración de ensayo mínima ha de ser lo suficientemente baja para que la fecundidad a esa concentración no sea significativamente inferior a la del control. En caso contrario, será necesario repetir el ensayo a una concentración mínima menor.
- ii. Si el objetivo es determinar los valores LOEC y NOEC, la concentración de ensayo máxima ha de ser lo suficientemente alta para que la fecundidad a esa concentración sea significativamente inferior a la del control. En caso contrario, será necesario repetir el ensayo a una concentración máxima mayor.
- iii. Si se estima el valor de  $CE_x$  para los efectos sobre la reproducción, es aconsejable usar concentraciones suficientes para definir dicho valor con un nivel de confianza adecuado. Si se estima la  $CE_{50}$  para los efectos sobre la reproducción, es aconsejable que la concentración de ensayo máxima sea superior a dicha  $CE_{50}$ . De otro modo, aunque seguiría siendo posible estimar el  $CE_{50}$ , el intervalo de confianza sería muy grande y no se podría evaluar satisfactoriamente la idoneidad del modelo ajustado.
- iv. A ser posible, la gama de concentraciones de ensayo no debe incluir ninguna concentración que ejerza un efecto estadísticamente significativo sobre la supervivencia de adultos, puesto que esto cambiaría la naturaleza del ensayo, que de simple ensayo de reproducción se transformaría en un ensayo de reproducción y mortalidad, que exige un análisis estadístico mucho más complejo.

El conocimiento previo de la toxicidad de la sustancia de ensayo (derivado, por ejemplo, de estudios de toxicidad aguda y de determinación de gama) ayudará a elegir las concentraciones de ensayo adecuadas.

Si se usa un disolvente o un dispersante para facilitar la preparación de las soluciones de ensayo (véase el apartado 1.6.4), su concentración final en los recipientes de ensayo no sobrepasará el valor de 0,1 ml/l, y será igual en todos los recipientes.

### 1.8.3 Controles

Además de la serie de ensayo, debe realizarse una serie de control con el medio de ensayo y, si procede, otra que contenga el disolvente o el dispersante. En este caso, la concentración de disolvente o dispersante ha de ser igual a la usada en los recipientes que contienen la sustancia de ensayo. Hay que emplear el número adecuado de recipientes en paralelo (véase el apartado 1.8.1.3).

Por lo general, en un ensayo bien ejecutado, el coeficiente de variación con respecto al número medio de supervivientes vivos producido por cada parental de control debe ser  $\leq 25\%$ ; este valor debe documentarse para diseños de ensayo en los que se usen animales mantenidos por separado.

### 1.8.4 Renovación del medio de ensayo

La frecuencia de renovación del medio depende de la estabilidad de la sustancia de ensayo, pero debe ser al menos de tres veces por semana. Si de los ensayos de estabilidad preliminares (véase el apartado 1.4) se deduce que la concentración de la sustancia de ensayo no es estable (es decir, si está fuera del intervalo comprendido entre el 80 y el 120 % del valor nominal o si cae por debajo del 80 % de la concentración inicial medida) a lo largo del período de renovación máximo (3 días), hay que considerar la renovación más frecuente del medio o la realización de un ensayo dinámico.

Al renovar el medio en ensayos semidinámicos, se prepara una segunda serie de recipientes de ensayo y los parentales se transfieren a éstos con ayuda, por ejemplo, de una pipeta de vidrio de diámetro adecuado. El volumen de medio transferido con los ejemplares de *Daphnia* debe reducirse al mínimo.

#### 1.8.5 **Observaciones**

Los resultados de las observaciones hechas durante el ensayo deben consignarse en fichas de datos (véanse ejemplos en los anexos 3 y 4). Si hacen falta otras mediciones (véanse los apartados 1.3 y 1.8.8), puede ser necesario realizar más observaciones.

#### 1.8.6 **Descendientes**

Preferiblemente, los descendientes producidos por cada parental se retirarán y contarán a diario desde el nacimiento de la primera camada para evitar que consuman el alimento destinado al adulto. A los efectos de este método, sólo es necesario contar el número de descendientes vivos, aunque debe registrarse la presencia de huevos abortados o de descendientes muertos.

#### 1.8.7 **Mortalidad**

La mortalidad de los parentales se registrará preferiblemente a diario y al menos en las mismas ocasiones en que se cuenten los descendientes.

#### 1.8.8 **Otras variables**

Aunque este método se ha diseñado principalmente para evaluar los efectos sobre la reproducción, quizá sea posible cuantificar otros efectos en medida suficiente para admitir el análisis estadístico. Las determinaciones relativas al crecimiento son muy interesantes, pues aportan información sobre posibles efectos subletales que pueden resultar más útiles que la simple determinación relativa a la reproducción; es recomendable proporcionar la determinación relativa a los parentales (la longitud del cuerpo sin contar la espina anal) al término del ensayo. Otras variables que podrían medirse o calcularse son el tiempo transcurrido hasta la producción de la primera camada (y de las siguientes), el número y el tamaño de las camadas por animal, el número de camadas abortadas, la presencia de machos o efipios y la tasa intrínseca de aumento de la población.

#### 1.8.9 **Frecuencia de los análisis y mediciones**

La concentración de oxígeno, la temperatura, la dureza y el pH deben medirse al menos una vez a la semana en los medios nuevo y antiguo, en los controles y a la concentración máxima de la sustancia de ensayo.

Durante el ensayo, las concentraciones de la sustancia analizada deben determinarse a intervalos regulares.

En ensayos semiestáticos en los que se espere que la concentración de la sustancia de ensayo se mantenga dentro del  $\pm 20$  % de la concentración nominal (es decir, en el intervalo del 80-120 %, véanse los apartados 1.4 y 1.8.4), se recomienda que las concentraciones de ensayo máxima y mínima se analicen recién preparadas y en el momento de su renovación al menos una vez durante la primera semana del ensayo (es decir, los análisis deben efectuarse en una muestra de la misma solución, recién preparada y en el momento de su renovación). A partir de este momento, las determinaciones han de repetirse a intervalos al menos semanales.

En ensayos en los que no se espere que la concentración de la sustancia de ensayo se mantenga dentro del  $\pm 20$  % de la concentración nominal, es preciso analizar todas las concentraciones de ensayo recién preparadas y en el momento de su renovación. No obstante, en los ensayos en los que la concentración inicial medida de la sustancia de ensayo no esté dentro del  $\pm 20$  % de la concentración nominal, pero en los que puedan aportarse pruebas suficientes de que las concentraciones iniciales son repetibles y estables (es decir, que están dentro del intervalo del 80 - 120 % de la concentración inicial), las determinaciones químicas podrían limitarse en las semanas 2 y 3 del ensayo a las concentraciones máxima y mínima. En todos los casos, la determinación de las concentraciones de la sustancia de ensayo antes de la renovación sólo debe realizarse en un recipiente en paralelo de cada concentración de ensayo.

Para los ensayos dinámicos es apropiado un régimen de muestreo similar al descrito para los semiestáticos (si bien en este caso no cabe hacer determinaciones antes de renovar las soluciones). Sin embargo, puede ser aconsejable aumentar el número de ocasiones de muestro durante la primera semana (tres series de mediciones, por ejemplo) para garantizar que las concentraciones de ensayo permanezcan estables. En esta clase de ensayos, los regímenes de flujo de diluyente y sustancia de ensayo deben verificarse a diario.

Si se demuestra que la concentración de la sustancia de ensayo se ha mantenido satisfactoriamente a lo largo de todo el ensayo dentro de un intervalo de  $\pm 20\%$  de la concentración nominal o de la medida inicialmente, los resultados pueden basarse en los valores nominales o medidos inicialmente. Si la desviación con respecto a la concentración nominal o inicial medida es superior al  $\pm 20\%$ , los resultados deben expresarse en términos de media ponderada en función del tiempo (véase el anexo 5).

## 2. RESULTADOS E INFORME

### 2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

El objeto de este ensayo es determinar el efecto de la sustancia de ensayo sobre el número total de descendientes vivos producidos por cada parental vivo al final del mismo. El número total de descendientes por parental debe calcularse para cada recipiente de ensayo (es decir, para cada recipiente en paralelo). Si en uno cualquiera de los recipientes en paralelo el parental muere durante el ensayo o resulta ser macho, dicho recipiente se excluye del análisis. Por tanto, éste se basará en un número reducido de recipientes en paralelo.

Para estimar la LOEC y, por tanto, la NOEC, correspondiente a los efectos del producto químico sobre el resultado reproductor, es preciso calcular el resultado reproductor medio de los recipientes en paralelo para cada concentración y la desviación estándar residual acumulada, lo que puede hacerse mediante un análisis de la varianza (ANOVA). A continuación se compara la media obtenida a cada concentración con la del control aplicando un método de comparación múltiple apropiado. Las pruebas de Dunnett o Williams pueden ser útiles (14)(15)(16)(17). Hay que comprobar si se sostiene la hipótesis del ANOVA de homogeneidad de la varianza. Es recomendable realizar esta verificación gráficamente en lugar de mediante una prueba formal de significación (18); una alternativa adecuada es aplicar una prueba de Bartlett. Si la hipótesis no se sostiene, hay que considerar la transformación de los datos para homogeneizar las varianzas antes de aplicar el ANOVA, o bien la realización de un ANOVA ponderado. Hay que calcular y documentar la magnitud del efecto detectable con el ANOVA (es decir, la mínima diferencia significativa).

Para estimar la concentración que provocaría la reducción en un 50 % del resultado reproductor (es decir, la  $CE_{50}$ ), hay que ajustar a los datos una curva adecuada, tal como la curva logística, mediante un método estadístico como el de los mínimos cuadrados. La curva puede parametrarse de manera que la  $CE_{50}$  y su error estándar puedan estimarse directamente. Esto facilitará considerablemente el cálculo de los límites de confianza en torno a la  $CE_{50}$ . Salvo que haya razones de peso para preferir otros, deben darse límites de confianza bilaterales del 95 %. El método de ajuste debe proporcionar preferentemente un medio para evaluar la significación de la falta de ajuste. Esto puede hacerse gráficamente o dividiendo la suma residual de cuadrados en 'falta de ajuste' y 'componentes de error puro' y efectuando una prueba de significación para la falta de ajuste. Como los tratamientos que inducen fecundidad elevada tienen más probabilidades de inducir una varianza más elevada del número de inmaduros producidos que aquéllos que inducen fecundidad reducida, hay que considerar la conveniencia de ponderar los valores observados de manera que reflejen las distintas varianzas de los diferentes grupos de tratamiento (véase información de tipo general en la referencia 18).

En el análisis de los datos del estudio final interlaboratorios (2) se ha ajustado una curva logística usando el modelo siguiente, aunque pueden usarse otros adecuados:

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

donde:

Y: número total de inmaduros por parental vivo al final del ensayo (calculado para cada recipiente)

x: concentración de sustancia

c : número esperado de inmaduros cuando  $x = 0$

$x_0$ :  $CE_{50}$  en la población

b : parámetro "pendiente"

Este modelo será probablemente adecuado en gran número de situaciones, pero habrá ensayos para los cuales no sea apropiado. Es preciso comprobar la validez del modelo tal como se ha sugerido en párrafos anteriores. En algunos casos puede estar indicado un modelo de hormesis, según el cual concentraciones bajas producen efectos amplificados (19).

También pueden estimarse otras concentraciones que provoquen un porcentaje de efecto determinado, como la  $CE_{10}$  o  $CE_{20}$ , aunque quizá sea preferible parametrizar el modelo de una forma distinta a la empleada para estimar la  $CE_{50}$ .

## 2.2 INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

### 2.2.1 **Sustancia de ensayo:**

- naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes;
- identificación química, incluida la pureza.

### 2.2.2 **Especie sometida a ensayo:**

- clon (si se ha tipificado genéticamente), proveedor u origen (si se conoce) y condiciones de cultivo aplicadas. Si se ha usado una especie distinta de *Daphnia magna*, debe consignarse y justificarse.

### 2.2.3 **Condiciones de ensayo:**

- método de ensayo utilizado (por ejemplo, semiestático o dinámico, con indicación de volumen y carga expresada en número de individuos de *Daphnia* por litro);
- fotoperíodo e intensidad luminosa;
- diseño del ensayo (por ejemplo, número de recipientes en paralelo, número de parentales por recipiente en paralelo);
- detalles del medio de cultivo usado;
- si se usan, complementos de materia orgánica, con su composición, origen, método de preparación, COT/DQO de las preparaciones madre, estimación de los valores COT/DQO obtenidos en el medio de ensayo;
- información detallada de la alimentación, con indicación de la cantidad (en mg C/*Daphnia*/día) y el programa (tipo de alimento, con indicación en su caso del nombre específico (especie) del alga y, si se conocen, la cepa y las condiciones de cultivo);
- método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (si se usan, hay que indicar el disolvente o dispersante y su concentración).



#### 2.2.4

#### **Resultados:**

- resultados de cualesquiera estudios preliminares de estabilidad de la sustancia de ensayo;
- concentraciones de ensayo nominales y resultados de todos los análisis para determinar la concentración de la sustancia de ensayo en los recipientes de ensayo (véase un ejemplo de ficha de datos en el anexo 4); también deben indicarse la eficiencia de recuperación del método y el límite de determinación;
- calidad del agua en los recipientes de ensayo (pH, temperatura y concentración de oxígeno disuelto además de COT y DQO y dureza cuando proceda) (véase un ejemplo de ficha de datos en el anexo 3);
- registro completo de los descendientes vivos de cada parental (véase un ejemplo de ficha de datos en el anexo 3);
- número de muertes entre los parentales y día en que se hayan producido (véase un ejemplo de ficha de datos en el anexo 3);
- coeficiente de variación de la fecundidad de los controles (basada en el número total de descendientes vivos por parental vivo al final del ensayo);
- representación gráfica del número total de descendientes vivos por parental (para cada recipiente en paralelo) vivo al final del ensayo frente a concentración de la sustancia de ensayo;
- concentración mínima con efecto observado (LOEC) para la reproducción, acompañada de una descripción de los métodos estadísticos aplicados y de una indicación de la magnitud del efecto detectable; concentración (máxima) sin efecto observado (NOEC) para la reproducción; si procede, valores de LOEC y NOEC para la mortalidad de los parentales;
- si procede,  $CE_x$  para la reproducción e intervalos de confianza, así como una representación gráfica del modelo ajustado usado para su cálculo, la pendiente de la curva dosis-respuesta y su error estándar;
- otros efectos biológicos observados o medidos; hay que documentar todos los demás efectos biológicos observados o medidos (crecimiento de los parentales, por ejemplo) y la correspondiente justificación;
- explicación de cualquier desviación respecto al método de ensayo.

#### 3.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- 1) OCDE Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.
- 2) OCDE Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test París. 1997.
- 3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. y Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **21**, 257-265.
- 4) ElenDt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, **154**, 25-33.
- 5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (4ª ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.
- 6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **47**, 775-782.
- 7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Filadelfia P.A. 20 pp.

- 8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. y Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
- 9) Parkhurst B.R., Forte J.L. y Wright G.P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., **26**, 1-8.
- 10) Cowgill U.M. y Milazzo D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., **120**(2), 185-196.
- 11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, **36**, 209.
- 12) Sims I.R., Watson S. y Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, **12**, 2053-2058.
- 13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., **128**, 459-466.
- 14) Dunnett C.W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., **50**, 1096-1121.
- 15) Dunnett C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, **20**, 482-491.
- 16) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics **27**, 103-117.
- 17) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, **28**, 510-531.
- 18) Draper N.R. y Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, 2<sup>a</sup> ed., Wiley, N.Y.
- 19) Brain P. y Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, **29**, 93-96.
- 20) Wilson E.O. y Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- 21) Poole R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, Nueva York, p 532.
- 22) Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. y Boyce M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, **67**, 1156-1166.

**ANEXO 1**

**PREPARACIÓN DE MEDIOS ELENDT M7 Y M4 TOTALMENTE DEFINIDOS**

**Aclimatación a los medios Elendt M7 y M4**

Algunos laboratorios han tenido dificultades para transferir directamente Daphnia a los medios M4 (1) y M7. Se han obtenido resultados bastante buenos con una aclimatación gradual, esto es, cambiando del medio propio a Elendt al 30 %, luego al 60 % y por último al 100 %. El período de aclimatación necesario puede ser bastante largo, incluso de un mes.

**PREPARACIÓN**

**Oligoelementos**

Se empieza por preparar soluciones madre distintas (I) de cada oligoelemento en agua de pureza apropiada (desionizada, destilada o tratada mediante ósmosis inversa). A partir de estas soluciones madre (I) se prepara una única solución madre (II) que contiene todos los oligoelementos (solución combinada):

Soluciones madre I (una sola sustancia)	Cantidad añadida al agua mg/l	Concentración (en relación con el medio M4) veces	Para preparar la solución madre II combinada, se añade al agua la siguiente cantidad de solución madre I ml/l	
			M 4	M 7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	57.190	20.000	1,0	0,25
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	7.210	20.000	1,0	0,25
LiCl	6.120	20.000	1,0	0,25
RbCl	1.420	20.000	1,0	0,25
SrCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	3.040	20.000	1,0	0,25
NaBr	320	20.000	1,0	0,25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1.260	20.000	1,0	0,25
CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	335	20.000	1,0	0,25
ZnCl <sub>2</sub>	260	20.000	1,0	1,0
CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	200	20.000	1,0	1,0
KI	65	20.000	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43,8	20.000	1,0	1,0
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11,5	20.000	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> EDTA * 2 H <sub>2</sub> O	5.000	2.000	–	–
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1.991	2.000	–	–
Las soluciones Na <sub>2</sub> EDTA y FeSO <sub>4</sub> se preparan por separado, se vierten juntas y se esterilizan en autoclave inmediatamente. Se obtiene así:				
Solución 21 Fe-EDTA		1.000 veces	20,0	5,0



### Medios M4 y M7

Los medios M4 y M7 se preparan a partir de la solución madre II con los macronutrientes y las vitaminas que siguen:

	Cantidad añadida al agua mg/l	Concentración (en relación con el medio M4) veces	Cantidad de solución madre añadida para preparar el medio ml/l	
			M 4	M 7
Solución madre II (combinación de oligoelementos) II		20	50	50
Soluciones madre de macronutrientes ( una sustancia por solución)				
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	293.800	1.000	1,0	1,0
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	246.600	2.000	0,5	0,5
KCl	58.000	10.000	0,1	0,1
NaHCO <sub>3</sub>	64.800	1.000	1,0	1,0
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> * 9 H <sub>2</sub> O	50.000	5.000	0,2	0,2
NaNO <sub>3</sub>	2.740	10.000	0,1	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.430	10.000	0,1	0,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.840	10.000	0,1	0,1
Solución madre de vitaminas combinadas	-	10.000	0,1	0,1
La solución madre de vitaminas combinadas se prepara añadiendo las 3 vitaminas a 1 litro de agua como se indica a continuación:				
Clorhidrato de tiamina	750	10.000	-	-
Cianocobalamina (B <sub>12</sub> )	10	10.000	-	-
Biotina	7,5	10.000	-	-

La solución madre de vitaminas combinadas se conserva congelada en pequeñas partes alícuotas. Las vitaminas se incorporan a los medios poco antes de usarlos.

**Nota 1:** para evitar la precipitación de las sales al preparar los medios completos, se incorporan las partes alícuotas de las soluciones madre a aproximadamente 500-800 ml de agua desionizada y a continuación se completa hasta obtener 1 litro.

**Nota 2:** la primera publicación del medio M4 puede encontrarse en Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

## ANEXO 2

### ANÁLISIS DEL CARBONO ORGÁNICO TOTAL (COT) Y ELABORACIÓN DE UN NOMOGRAMA DEL CONTENIDO EN COT DEL ALIMENTO DE ALGAS

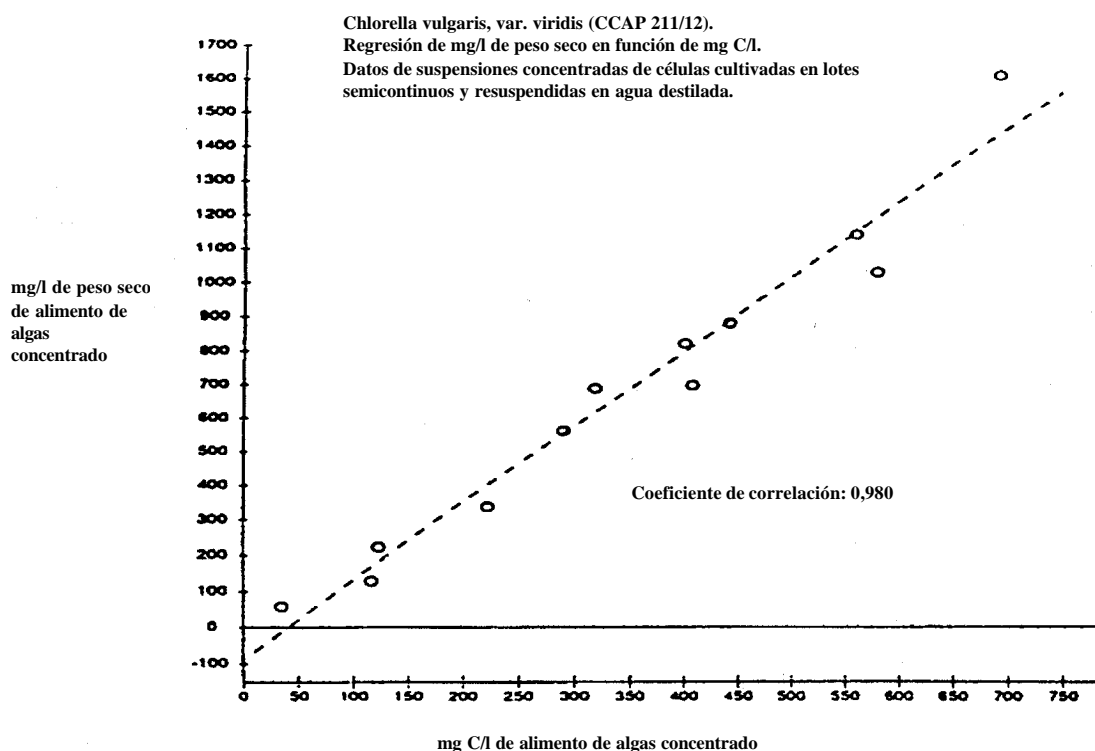
Es sabido que el contenido en carbono del alimento de algas no suele medirse directamente, sino por medio de correlaciones (es decir, de nomogramas) con medidas indirectas, como el número de células de algas o la absorbancia de luz.

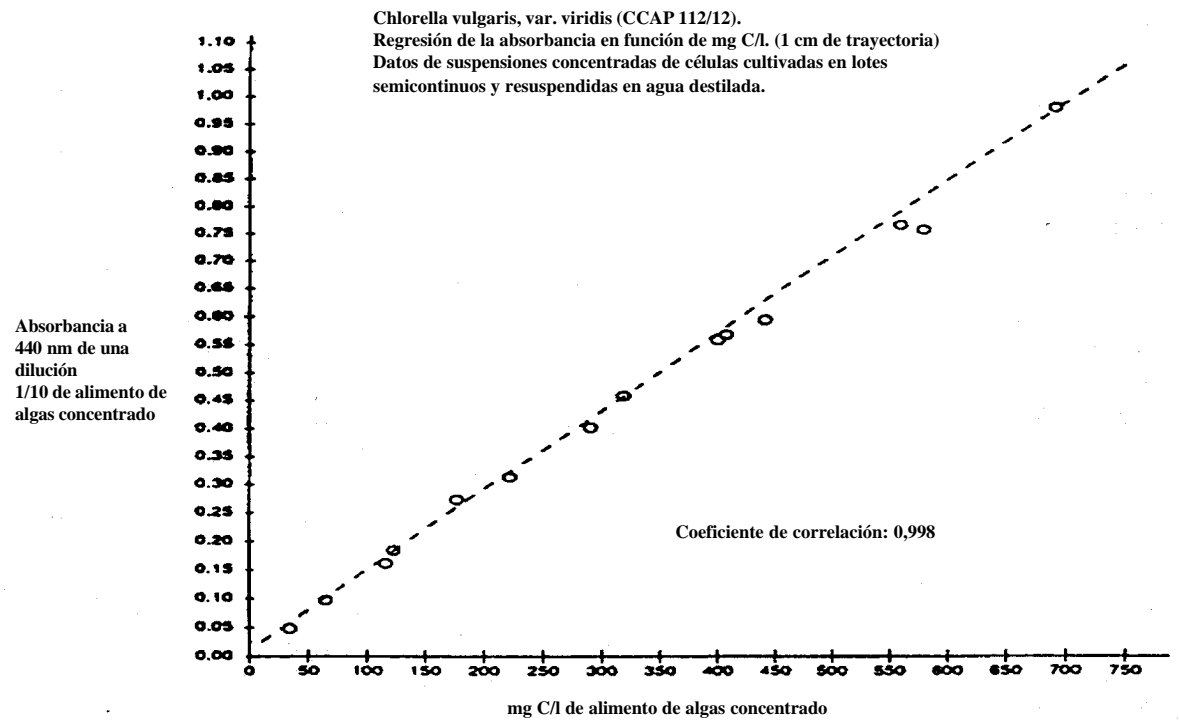
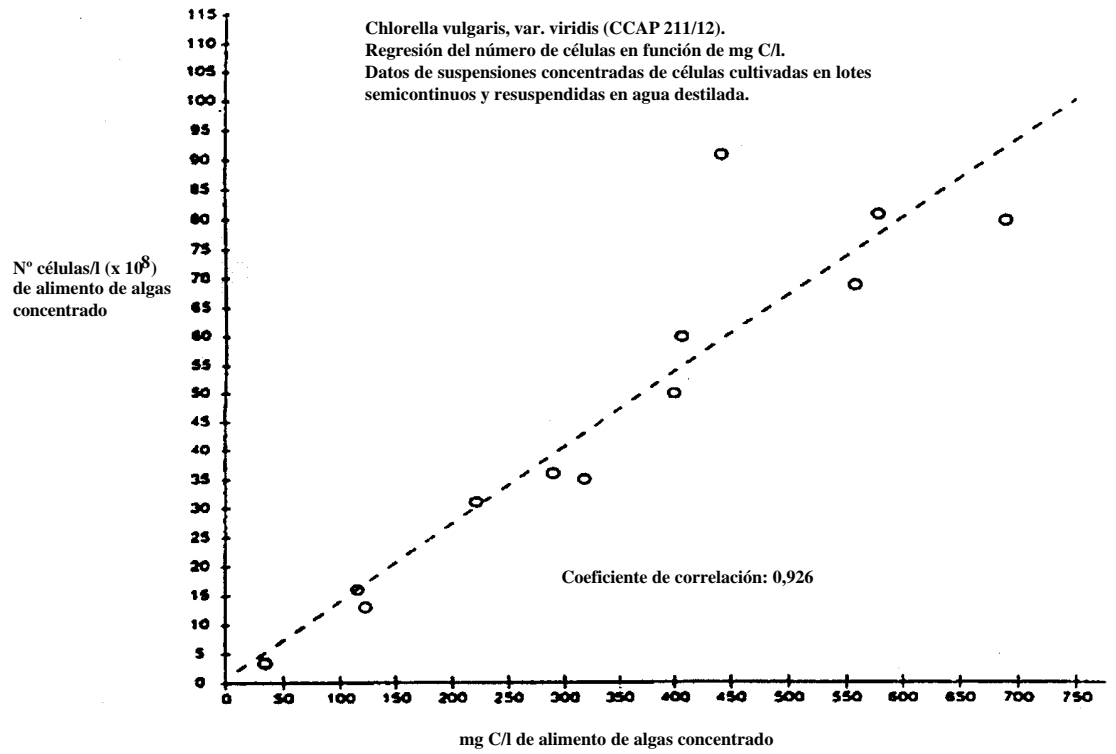
El COT debe medirse por oxidación a alta temperatura y no con los métodos UV o del persulfato. (Véase: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Para elaborar el nomograma, las algas se separan del medio de crecimiento por centrifugación seguida de resuspensión en agua destilada. Se mide la variable indirecta y la concentración de COT en cada una de las muestras por triplicado. Hay que analizar controles con agua destilada únicamente y deducir la concentración de COT a partir de la observada en la muestra de algas.

El nomograma debe ser lineal dentro del intervalo necesario de concentraciones de carbono. A continuación se ilustran algunos ejemplos.

**Nota: no deben usarse para hacer conversiones; es esencial que cada laboratorio prepare sus propios nomogramas.**





**ANEXO 3**

**EJEMPLO DE FICHA DE DATOS RELATIVA A LA RENOVACIÓN DEL MEDIO, LA VIGILANCIA FÍSICOQUÍMICA Y LA ALIMENTACIÓN**

**REPRODUCCIÓN Y MORTALIDAD DE ADULTOS DE DAFNIA**

Experimento N<sup>o</sup>:      Fecha de inicio:      Clon:      Medio:      Tipo de alimento:      Sustancia de ensayo:      Conc. nominal:

<b>Día</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Renov. medio (marcar)																								
pH *																								nuevo
																								antiguo
O <sub>2</sub> mg/l *																								nuevo
																								antiguo
Temp. (°C) *																								nuevo
																								antiguo
Aporte alim. (marcar)																								
N <sup>o</sup> descend. vivos †																								Total
Recipiente 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																								Total
Mortalidad acumulada adult. ‡																								

\* Indíquese el recipiente usado para el experimento

‡ La mortalidad de los animales adultos se registra escribiendo 'M' en la casilla correspondiente

† Las camadas abortadas se registran escribiendo 'AB' en la casilla correspondiente

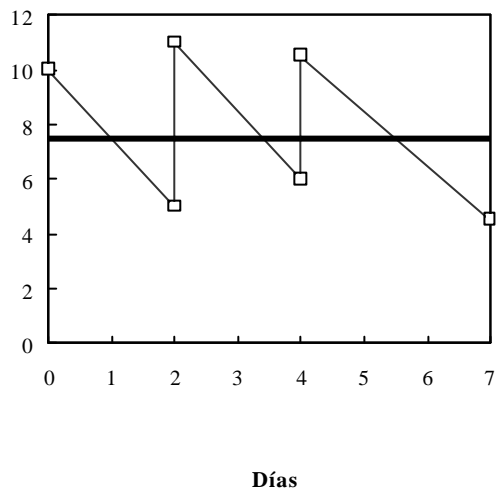


## ANEXO 5

### CÁLCULO DE UNA MEDIA PONDERADA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

#### **Media ponderada en función del tiempo**

Puesto que la concentración de la sustancia de ensayo puede disminuir a lo largo del tiempo comprendido entre las sucesivas renovaciones del medio, es preciso considerar cuál es la concentración que debe elegirse como representativa de la gama de concentraciones aplicadas a los parentales de *Daphnia*. La elección debe basarse en consideraciones biológicas y estadísticas. Si, por ejemplo, se piensa que la mayor influencia en la reproducción la ejerce la máxima concentración aplicada, debe usarse este valor máximo. En cambio, si se considera más importante el efecto acumulado o a plazo más largo, la concentración media es más relevante. En este caso, una media apropiada es la concentración media ponderada en función del tiempo, pues tiene en cuenta la variación de la concentración instantánea a lo largo del tiempo.



**Figura 1 : Ejemplo de media ponderada en función del tiempo**

La figura 1 ilustra un ejemplo de ensayo (simplificado) de 7 días de duración en el cual el medio se renueva los días 0, 2 y 4.

- La línea delgada en zigzag representa la concentración a lo largo del tiempo. Se supone que el descenso de la concentración es exponencial.
- Los 6 puntos representados corresponden a las concentraciones medidas al principio y al final de cada período de renovación.
- La línea gruesa indica la posición de la media ponderada en función del tiempo.

La media ponderada en función del tiempo se calcula de manera que el área situada bajo ella sea igual al área situada bajo la curva de concentración. El cálculo correspondiente al ejemplo anterior se ilustra en el cuadro 1.

**Cuadro 1: Cálculo de la media ponderada en función del tiempo**

Renovación nº	Días	Conc0	Conc1	Ln(Conc0)	Ln(Conc1)	Área
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Días totales: 7					Área total	50,091
					Media PT	7,156

*Días*: número de días del período de renovación

*Conc0*: concentración medida al principio de cada período de renovación

*Conc1*: concentración medida al final de cada período de renovación

*Ln(Conc0)*: logaritmo natural de Conc0

*Ln(Conc1)*: logaritmo natural de Conc1

*Área*: área comprendida bajo la curva exponencial para cada período de renovación. Se calcula como sigue:

$$\text{Área} = \frac{\text{Conc0} - \text{Conc1}}{\text{Ln}(\text{Conc0}) - \text{Ln}(\text{Conc1})} \times \text{Días}$$

La media ponderada en función del tiempo (*Media PT*) es igual al *Área total* dividida por los *Días totales*.

Naturalmente, en el caso de un ensayo de reproducción de Daphnia, el cuadro debería cubrir 21 días.

Es obvio que, si se sólo se hacen observaciones al principio y al final de cada período de renovación, es imposible confirmar que el proceso de disminución sea, en efecto, exponencial. Una curva distinta daría lugar a un cálculo de *Área* distinto. En cualquier caso, la disminución exponencial es una hipótesis plausible, y ésta es probablemente la curva mejor a falta de más datos.

Es preciso hacer una advertencia para el caso de que el análisis químico no logre detectar ninguna sustancia al final del período de renovación. Salvo que se pueda estimar la velocidad con que la sustancia desaparece de la solución, será imposible obtener un área bajo la curva realista y, por tanto, obtener una media ponderada en función del tiempo que sea razonable.