

DETECCIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS CONTAMINANTES EN AGUA DULCE

5 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El efecto toxicológico de los contaminantes en el agua dulce se determina mediante el uso de *Daphnia magna*. Esta práctica es una adaptación de una prueba real de la calidad del agua.

2. COMPONENTES para 5 grupos de estudiantes

COMPONENTES	Conservación
A Concentrado de Solución simulada de toxina*	Congelador
B Reactivo reducción de toxicidad (Solución EDTA)	Congelador
C Aditivo IQ (sustrato detección fluorescencia)	Congelador
1 Cámara de exposición	Tª ambiente
12 Pipetas de transferencia de gran capacidad	Tª ambiente
6 Pipetas de transferencia graduadas	Tª ambiente

NOTA: *Daphnia magna* no están incluidas con este kit. Consulte el apartado para información sobre pedidos y atención.

NOTA: Ninguno de los componentes de este kit se ha preparado a partir de material humano.

NOTA: Todos los componentes de este kit están destinados a la investigación educativa. No pueden ser utilizados con fines de diagnóstico o médicos, ni pueden ser administrados o consumidos por seres humanos o animales.

***Nota para el profesor de prácticas**

Los estudiantes pueden ser animados a desarrollar estrategias para la introducción de sus propias sustancias tóxicas en la realización de experimentos de laboratorio. Los ejemplos incluyen cationes de hierro, zinc, manganeso, ácido y soluciones básicas.

Esta práctica es una adaptación del Test de Toxicidad IQ, una prueba real de la calidad del agua. Esta tecnología está protegida por la patente estadounidense #5,094,944 y está disponible exclusivamente por EDVOTEK para la educación a partir de Aqua Encuesta, Inc.

2.1 Material requerido y no suministrado

- Fuente de luz ultravioleta de onda larga.
- Sistema de visualización de la luz blanca (recomendado).
- Vaso de precipitación graduado de 1 litro.
- Gafas de protección UV de seguridad.
- Cámaras de exposición IQ adicionales (según sea necesario).
Recomendado: 1 por grupo.
- Agua natural fresca (puede ser embotellada), no tratada (no clorada).
- Guantes.
- Pipetas de 5 ml y peras de succión.
- Tubos de ensayo.

NOTA: Asegúrense que el material de vidrio esté limpio, seco y libre de residuos de jabón. Para mayor comodidad, se pueden comprar pipetas de transferencia desechables adicionales.

3. INTRODUCCIÓN

DETECCIÓN DE CONTAMINANTES TOXICOS EN AGUA DULCE

El término **entorno** describe todo lo que rodea a un organismo vivo. El medio ambiente de un organismo incluye cosas no vivas, tales como el suelo, el aire y el agua, otros organismos que viven en asociación con este organismo, así como otros factores, como la temperatura, la humedad y la radiación. El término "ecotecnología" se refiere a la aplicación de las nuevas tecnologías, como la biotecnología, y cómo estos factores ambientales interactúan entre sí. La ecotecnología a menudo se centra en el efecto que los cambios tendrán sobre el medio ambiente de un organismo. Con el fin de tomar decisiones sensatas sobre la política ambiental, la gente tiene que entender cómo funcionan los sistemas ecológicos.

Los sistemas ecológicos, a menudo referidos como ecosistemas, son difíciles de estudiar porque tienen muchos componentes, incluyendo las plantas, los animales, el ciclo de los materiales esenciales, transformaciones de la energía, y el impacto en la economía humana. Además, los ecosistemas a menudo cubren grandes áreas y presentan amplios desfases entre causa y efecto. Por esta razón, el impacto de la alteración humana a menudo no se detecta hasta que es demasiado tarde para revertir el daño.

Experimentos de bioensayo, como éste, se utilizan habitualmente para detectar y evaluar los niveles perjudiciales de sustancias químicas tóxicas en el manejo de residuos peligrosos, vertidos o en los flujos de residuos de plantas de tratamiento de aguas residuales industriales. Este experimento determinará cuando el nivel de un contaminante es inaceptable en una concentración de agua dulce. La especie indicadoras para este ensayo es *Daphnia magna*, una pulga de agua común. Es un invertebrado de agua dulce, aproximadamente 0,2 a 3 mm de largo, que es visible para el ojo humano sin ayuda de ningún equipo especial.

A pesar de su nombre común, *Daphnia magna* no es un insecto; es un miembro de la clase de crustáceos, entre cuyos parientes se incluyen otros artrópodos tales como langostas y cangrejos. Las características externas más destacadas de la *Daphnia magna* son un solo ojo compuesto grande y dos pares de antenas altamente ramificados. El animal utiliza las antenas para la locomoción. El tórax y el abdomen de la *Daphnia magna* están protegidos por una cubierta transparente. Visible a través del caparazón hay de 5 a 6 pares de patas con setas (pelos). Las patas en movimiento generan una corriente de agua que trae protozoos, algas, bacterias y detritus orgánico a la boca.

Muchas de las pruebas que actualmente se utilizan para medir la toxicidad requieren la exposición del organismo a una sustancia tóxica por períodos de 2 a 28 días. En esta práctica, sin embargo, la *Daphnia magna* estará expuesta a un tóxico simulado durante aproximadamente 45 minutos. La *Daphnia* se alimenta de un sustrato de azúcar llamado **Aditivo IQ**. El aditivo IQ usado en este experimento es el azúcar-D-galactósido con un marcador fluorescente 4-methylumbellifery unido (C₁₆H₁₈O₈). La molécula formada por la unión del azúcar y el marcador no produce fluorescencia. Un organismo no estresado por las toxinas del medio tiene un nivel de actividad enzimática suficientemente alto como para metabolizar el sustrato análogo del hidrato de carbono, separando de esta forma el azúcar del marcador. El marcador se libera y produce fluorescencia.

Los organismos sanos tendrán la capacidad para ingerir y digerir el compuesto de azúcar. Por lo tanto, van a brillar bajo la luz ultravioleta de onda larga (también conocida como luz negra) después de que se digiere el azúcar. Si una toxina tiene efectos significativos sobre el organismo, hará que su nivel de actividad enzimática se inhiba. Cualquier *Daphnia* que deja de brillar intensamente bajo luz UV morirá dentro de las siguientes 48 horas. La relación de fluorescencia/no fluorescencia hace que sea posible estimar los valores de concentración letales (**LC**). El valor de **LC50** es la concentración letal en la que 50% de los organismos mueren después de la exposición al agente tóxico.

REDUCCIÓN DE LA TOXICIDAD Y EVALUACIÓN

Una preocupación ambiental importante es la contaminación de nuestros sistemas acuáticos. Para algunas industrias, es una práctica común eliminar sus residuos en concentraciones de agua cercanos. La descarga es por lo general un **efluente**, que es un material de residuos complejos, tales como aguas residuales o subproductos químicos. Debido a que los residuos crudos no se pueden descargar directamente en los cursos de agua, deben tratarse para que sean menos tóxicos, y para evitar exceder los límites de descarga aceptables establecidos por los gobiernos. Con el fin de calificar los efluentes poder obtener un permiso de descarga, las industrias deben realizar pruebas de toxicidad en sus efluentes para determinar si cumplen con los estándares legales para su descarga. Organismos tales como *Daphnia magna* se utilizan como sensores, ya que son buenos indicadores biológicos de cómo efluente afecta a las poblaciones de organismos existentes en el agua que está siendo contaminada.

La reducción de la toxicidad juega un papel importante en la alteración de los efectos dañinos de un efluente y también si una empresa pueda seguir eliminando al medio los residuos que se generen como consecuencia de su producción. En general, es más fácil reducir la toxicidad de un efluente si se conocen sus contenidos. Si no se conocen los componentes de un efluente, deben llevarse a cabo una Reducción de la Toxicidad y Evaluación y (TRE, Toxicity Reduction and Evaluation).

Un TRE implica la adición de ciertas sustancias químicas en el efluente para alterar su toxicidad. Dependiendo de lo que se añade, y si hay una reducción significativa de la toxicidad, un toxicólogo puede ser capaz de identificar la causa de la toxicidad. Por ejemplo, la toxicidad resultante de la contaminación por metales pesados puede ser detectada por la adición de un quelante de catión divalente, tal como EDTA. Este se une a los metales, lo que los hace inaccesibles para perjudicar a los organismos que pueblan una concentración de agua concreta. A veces un valor de pH extremo puede ser tóxico para un organismo, y la adición de NaOH elevará un pH ácido, y la adición de HCl bajará un pH alcalino. La zeolita es una sustancia natural que absorbe diferentes materiales tóxicos, tales como amoníaco, que es perjudicial para los organismos acuáticos.

Cuando la toxicidad se reduce como resultado de la adición de productos químicos conocidos, se hace posible determinar cuál puede ser el ingrediente dañino. Un toxicólogo puede utilizar esta información para analizar cómo puede reducirse la toxicidad en el efluente.

La sección II de esta práctica utiliza *Daphnia magna* en una reducción de la toxicidad y evaluación mediante el uso de EDTA para quelar un catión divalente (la sustancia tóxica será una solución de cobre). Dos grupos de prácticas añadirán solución de EDTA a la solución con la sustancia tóxica, añadirá esta combinación a la *Daphnia* y observará la mortalidad de *Daphnia magna*. Los grupos de prácticas que realizan la Sección II compararán sus resultados con los grupos de prácticas que realizan la Sección I (tres grupos) sin EDTA. Toda la clase debe observar y evaluar la eficacia potencial de la adición de EDTA para reducir la contaminación por cobre u otros metales

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El efecto toxicológico de los contaminantes en el agua dulce se determina mediante el uso de *Daphnia magna*. Esta práctica es una adaptación de una prueba real de la calidad del agua.

4.1 Precauciones

1. Se deben usar los guantes y gafas de protección de forma rutinaria como buenas prácticas de laboratorio.
2. Deben tener mucho cuidado al trabajar con equipos que utilizan calor y/o fusión de los reactivos.
3. NO PIPETEAR LOS REACTIVOS CON LA BOCA - PIPETEAR CON PERAS DE SUCCIÓN.
4. Lavarse bien siempre las manos con agua y jabón después de manipular reactivos o materiales biológicos del laboratorio.
5. Tener cuidado al usar cualquier equipo eléctrico en el laboratorio.

4.2 Preparaciones previas

Notas a los preparativos del profesor de la práctica

El tamaño de la clase, la duración de las clases de prácticas y la disponibilidad de los equipos son factores que deben ser considerados en la planificación e implementación de esta práctica con sus alumnos. Estas directrices pueden adaptarse para encajar en sus circunstancias específicas.

Registro de las actividades de laboratorio

Los alumnos deben registrar en su libreta de prácticas las actividades indicadas a continuación.

Antes de iniciar la práctica:

- Escribir una hipótesis que refleje la práctica.
- Predecir los resultados experimentales.

Durante la práctica:

- Registrar (dibujar) sus observaciones, o fotografiar los resultados.

Al finalizar la práctica:

- Formular una explicación de los resultados.
- Determinar lo que podría cambiar en la práctica si la repites.
- Escribir una hipótesis que refleje este cambio.

Pedidos y atención de *Daphnia magna*

Recomendamos la compra de *Daphnia magna* vivas en tiendas de animales o acuarios que estén próximas al centro educativo y sean de su confianza. Con el fin de garantizar que la *Daphnia* esté lo suficientemente sana para la práctica, se recomienda programar la práctica para el día después de su recepción. Tras la recepción, la *Daphnia* debe ser preparada para la práctica (ver apartado 4.2.A).

Instrucciones generales

A. PREPARATIVOS ANTES DE LA PRÁCTICA

***Daphnia magna* en ayunas**

Daphnia magna deben pasar hambre durante la noche antes de realizar este experimento.

1. El día antes la práctica (a mediados de la tarde) colar y desechar el agua del envío (una malla fina y limpia funciona bien). Suspender rápidamente la *Daphnia* en un recipiente limpio con agua natural fresca (puede ser embotellada), no tratada (no clorada).

El agua de dilución.

2. Suministrar a cada uno de los 5 grupos de prácticas un vaso de precipitación marcada que contenga 60 ml de agua de dilución (agua natural fresca no tratada). No tapar el agua.

La solución de toxina.

3. Se rehidrata el pellet con toxina mediante la adición de 0,5 ml de agua de dilución del componente A y agitar o remover vigorosamente hasta disolver el precipitado por completo. Transferir la totalidad de esta solución a 200 ml de agua de dilución (agua natural fresca no tratada).

- Agitar la solución. Esta es la solución test 100%, que tiene de 100 ppm de toxina (agente tóxico), de cobre.
- Proporcionar 25 ml de esta solución en un vaso de precipitación marcado para los tres grupos que realizan la prueba de detección de toxicidad. Colocar 50 ml de esta solución en un vaso de precipitación limpio para los dos grupos que realizan la prueba de Reducción de la Toxicidad de la práctica.

Reactivo de Reducción de Toxicidad (solución EDTA)

4. Los dos grupos de prácticas que llevarán a cabo la prueba de reducción de la toxicidad de la práctica deben preparar la solución de reducción de la toxicidad.

- Descongelar y añadir 50 µl de reactivo de reducción de la toxicidad (componente B) (solución EDTA) a 50 ml de la solución de toxina preparada en el punto 3. Mezclar con una placa o bandeja de agitación durante la noche o ir mezclando de vez en cuando con la mano.

B. PREPARATIVOS EN EL DÍA DE LA PRÁCTICA

Aditivo IQ (sustrato fluorescente de detección)

5. Añadir el polvo del **Aditivo IQ** [sustrato de detección de fluorescencia (componente C)] a 15 ml agua de primavera. Enjuague el tubo con el agua natural fresca no tratada para eliminar cualquier polvo remanente.

6. Mezclar durante 30 segundos.

7. Marcar cinco tubos como "Aditivo IQ"

8. Con una pipeta limpia, dispensar 2 ml de la solución Aditivo IQ en cada tubo para los 5 grupos de prácticas.

Distribución de *Daphnia magna*

9. Suministrar a cada uno de los 5 grupos de laboratorio con un vaso o recipiente de plástico que contenga al menos 40 *Daphnia magna* en el agua de dilución.

- Comenzar vertiendo 30 ml de agua de dilución en cada uno de los 5 recipientes.
- Usando de una pipeta de transferencia de gran capacidad, transferir las *Daphnia* a cada recipiente. Contar al menos 40 *Daphnia* por recipiente.
- Permitir que los organismos se aclimaten en estos recipientes durante al menos 30 minutos antes que los estudiantes las transfieran a las cámaras de exposición.

C. REACTIVOS PARA LA PRÁCTICA

	Componente	Marcados	Volumen para cada grupo
	<i>Daphnia magna</i> en ayunas	<i>Daphnia</i>	40 <i>Daphnia magna</i>
	Agua de dilución	Agua dilución	60 ml
A	Solución de toxina	Sol. toxina	25 ml
B	Reactivo de Reducción de Toxicidad (solución EDTA)	Sol. EDTA	25 ml
C	Aditivo IQ	Aditivo IQ	2 ml

4.3 Material que debe recibir cada grupo

Cada grupo de prácticas debe recibir los siguientes componentes antes de iniciar el procedimiento experimental.

1. Grupos que realizan la detección de toxicidad deben recibir:
 - 60 ml de agua de dilución
 - 25 ml de solución de toxina (agente tóxico) diluida
 - 2 ml de Aditivo IQ
 - 1 Vaso que contenga 40 *Daphnia magna*
 - 2 Pipetas de transferencia de gran capacidad
 - 1 Pipeta de transferencia graduada
 - 1 Cámara de exposición
2. Grupos que realizan la detección de toxicidad deben recibir:
 - 60 ml de agua de dilución
 - 25 ml de solución de reducción de toxicidad
 - 2 ml de Aditivo IQ
 - 1 Vaso que contenga 40 *Daphnia magna*
 - 2 Pipetas de transferencia de gran capacidad
 - 1 Pipeta de transferencia graduada
 - 1 Cámara de exposición

5. PRÁCTICA

A. SECCIÓN I: DETECCIÓN DE TOXICIDAD

Preparación y dilución en serie de la toxina simulada (agente tóxico)

1. Colocar la cámara de exposición (**figura 1**) sobre una mesa nivelada con la cara 1 hacia el alumno.

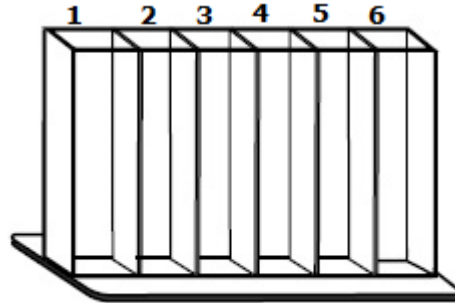


FIGURA 1: Cámara de exposición, con las 6 celdas.

2. Con una pipeta de transferencia de plástico de gran capacidad, transferir rápidamente seis *Daphnia magna* en cada una de las 6 celdas, a partir de la celda de control (0% toxina) y terminando en la de 100% de toxina.

Durante la transferencia, llevar la menor cantidad de agua que sea posible desde el vaso de precipitación con el organismo (utilizar la pipeta para eliminar cualquier exceso de agua).

3. Utilizar una pipeta de plástico de gran capacidad para añadir el agua de dilución hasta la línea del nivel del agua de dilución (DW) en cada una de las celdas numeradas del #1 al #5, como se muestra en la **Figura 2**.

NOTA: No añadir dilución en agua en la celda #6.

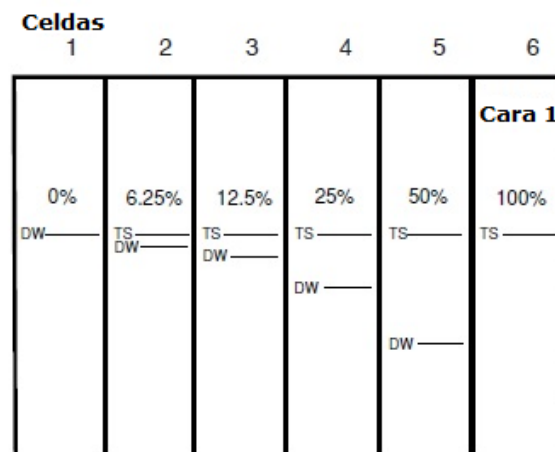


FIGURA 2: Cámara de exposición: DW = Agua de dilución

Exposición de *Daphnia magna* al agente tóxico (toxina)

4. Usando la misma pipeta de transferencia, añadir solución de toxina hasta las líneas de nivel de la Solución de toxina (TS) en celdas de #2 a #6, como se muestra en la **Figura 3**.

NOTA: No añadir solución de toxina para la celda #1.

La **toxina (agente tóxico)** es una solución que contiene sulfato de cobre (CuSO_4). Utilizar la solución que proporciona el profesor de prácticas. Esta solución inicialmente es de 100 partes por millón (ppm) de CuSO_4 .

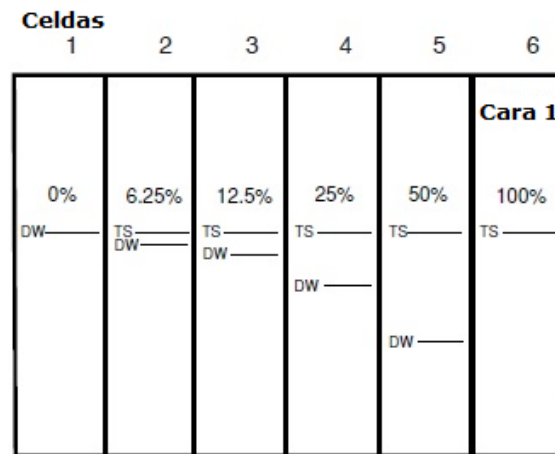


FIGURA 3: Cámara de exposición: TS = Solución de toxina

5. Utilizar la misma pipeta de transferencia para agitar la solución de toxina y agua de dilución juntos en las células 2, 3, 4 y 5.

Recordatorio Importante: No agitar la solución de la celda #1 (0%) o celda #6 (100%).

En los pasos 1-3, la dilución en serie de la solución de toxina oscila entre 0 y 100%. La solución de toxina concentrada se diluye en serie entre 100 y 6,25% por dilución de 50% cada vez. La celda de 0% sirve de control.

NOTA: *Daphnia magna* han estado en ayunas (sin alimento) durante la noche antes de la realización de esta práctica.

6. Controlar y anotar el tiempo de duración de cada punto.

7. Exponer la *Daphnia* a las diversas concentraciones de solución de toxina durante 45 minutos.

8. Después de 45 minutos, utilizar una pipeta de transferencia graduada limpia para añadir 0,25 ml de la solución de Aditivo IQ (azúcar-marcador fluorescente sustrato) a cada uno de los seis compartimientos (celdas) de la cámara de exposición. Con cuidado y lentamente, mezclar el contenido de cada celda con una pipeta de transferencia, comenzar por la celda de control y terminar en la celda de mayor concentración, la última celda.

9. Dejar que la *Daphnia* pueda ingerir el Aditivo IQ durante 15 minutos.

10. Después de 15 minutos, oscurecer el aula de prácticas. Usar gafas de protección UV e iluminar la *Daphnia magna* mediante la colocación de una fuente de luz ultravioleta de onda larga (también llamada "luz negra") en la parte superior de la cámara de exposición.

PRECAUCIÓN: No utilizar las luces UV de onda corta para este paso. La onda corta de la luz UV puede dañar el tejido ocular si los ojos no están protegidos adecuadamente.

CONSEJO ÚTIL: La mejor manera de iluminar la cámara de exposición es mantener la fuente de luz ultravioleta de onda larga en la parte superior de la cámara. Puede que tenga que mover lentamente la luz arriba y hacia abajo la parte trasera de la cámara para contar con precisión las *Daphnia*.

11. En cada compartimento o celda, contar el número de *Daphnia magna* que no se iluminan en absoluto o brillan menos que las presentes en la celda control, la celda #1.
12. Anotar el número de *Daphnia magna* en la Tabla 2 en el apartado 6.1.
13. La concentración a la cual el 50% de los organismos emiten menos luz que los controles es el valor CL50 para esta toxina (sustancia tóxica). Estimar la CL50 siguiendo las instrucciones en el apartado 5.C.
14. Comparar los resultados de estos grupos de práctica con los del grupo que lleva a cabo las pruebas de Reducción de Toxicidad y Evaluación.

B. SECCIÓN II: REDUCCIÓN DE TOXICIDAD Y EVALUACIÓN

Preparación y dilución en serie de toxina simulada reducida

1. Colocar la cámara de exposición sobre una mesa nivelada con la cara 1 hacia el alumno.
2. Con una pipeta de transferencia de plástico de gran capacidad, transferir rápidamente seis *Daphnia magna* en cada una de las 6 celdas, a partir de la celda de control (0% toxina/reducción) y terminando en la de 100% de toxina/reducción. Durante la transferencia, llevar la menor cantidad de agua que sea posible desde el vaso de precipitación con el organismo (utilizar la pipeta para eliminar cualquier exceso de agua).
3. Utilizar una pipeta de plástico de gran capacidad para añadir el agua de dilución hasta la línea del nivel del agua de dilución (DW) en cada una de las celdas numeradas del #1 al #5, como se muestra en la **Figura 2** (apartado 5.A.3).

NOTA: No añadir solución de toxina para la celda #6.

Exposición de *Daphnia magna* al agente tóxico (toxina)

4. Usando la misma pipeta de transferencia, añadir solución de reducción de la toxicidad hasta las líneas de nivel de la Solución de toxina (TS) en celdas de #2 a #6, como se muestra en la **Figura 3** (apartado 5.A.4).

NOTA: No añadir solución de reducción de la toxicidad en la celda #1.

La **solución de reducción de la toxicidad** es una solución que contiene sulfato de cobre (CuSO_4)/complejo EDTA. Esta solución inicialmente es de 100 ppm de CuSO_4 : 100 ppm de EDTA.

5. Utilizar la misma pipeta de transferencia para agitar la solución de reducción de la toxicidad y el agua de dilución en las celdas 2, 3, 4 y 5.

Recordatorio Importante: No agitar la celda #1 (0%) o celda #6 (100%).

En los pasos 1-3, la dilución en serie de la solución de reducción de la toxicidad oscila entre 0 y 100%. La solución de toxina concentrada se diluye en serie entre 100 y 6,25% por dilución de 50% cada vez. La celda de 0% sirve de control.

6. Controlar y anotar el tiempo de duración de cada punto.
7. Exponer la *Daphnia* a las diversas concentraciones de solución de reducción de toxicidad durante 45 minutos.

8. Después de 45 minutos, utilizar una pipeta de transferencia graduada limpia para añadir 0,25 ml de la solución de Aditivo IQ (azúcar-marcador fluorescente sustrato) a cada uno de los seis compartimientos (celdas) de la cámara de exposición. Con cuidado y lentamente, mezclar el contenido de cada celda con una pipeta de transferencia, comenzar por la celda de control y terminar en la celda de mayor concentración, la última celda.

9. Dejar que la *Daphnia* pueda ingerir el Aditivo IQ durante 15 minutos.

10. Después de 15 minutos, oscurecer el aula de prácticas. Usar gafas de protección UV e iluminar la *Daphnia magna* mediante la colocación de una fuente de luz ultravioleta de onda larga (también llamada "luz negra") en la parte superior de la cámara de exposición.

PRECAUCIÓN: No utilizar las luces UV de onda corta para este paso. La onda corta de la luz UV puede dañar el tejido ocular si los ojos no están protegidos adecuadamente.

CONSEJO ÚTIL: La mejor manera de iluminar la cámara de exposición es mantener la fuente de luz ultravioleta de onda larga en la parte superior de la cámara. Puede que tenga que mover lentamente la luz arriba y hacia abajo la parte trasera de la cámara para contar con precisión las *Daphnia*.

11. En cada compartimento o celda, contar el número de *Daphnia magna* que no se iluminan en absoluto o brillan menos que las presentes en la celda control, la celda #1.

12. Anotar la cantidad de *Daphnia magna* en la Tabla 3 en el apartado 6.1.

13. La concentración a la cual el 50% de los organismos emiten menos luz que los controles es el valor CL50 para esta toxina (sustancia tóxica), la solución de cobre. Estimar la CL50 siguiendo las instrucciones en el apartado 5.C.

14. Determinar si se ha producido una reducción real de la toxicidad mediante la comparación de los resultados de estos grupos con los grupos que lleva a cabo el experimento sin la adición de EDTA.

C. SECCIÓN III: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL

La concentración letal a la que el 50% de los organismos emiten menos luz que los controles es el **valor CL50** para una sustancia tóxica

Método Logaritmo de la Concentración versus Porcentaje de Mortalidad

La evaluación del **Test de toxicidad IQ™** implica el registro de los datos en una gráfica semilogarítmica de dos ciclos (ver Anexo 1).

1. Marcar el eje vertical Y (logarítmica) para la concentración de toxina (agente tóxico) (ppm).

2. Marcar el eje horizontal X (lineal) para el porcentaje de los individuos afectados negativamente.

3. Para cada concentración de la prueba, representar gráficamente el porcentaje correspondiente de los individuos afectados negativamente:

$$\frac{X}{6} \times 100$$

(X = número de *Daphnia magna* que emite menos luz que los controles)

4. Dibujar el promedio que mejor se ajuste a una línea recta entre todos los puntos (véase el ejemplo de la **tabla 1** y **figura 4**)

Concentración de la toxina (sustancia tóxica) y mortalidad de la <i>Daphnia magna</i>		
% Dilución de la celda de la cámara de exposición	Concentración de la solución de toxina (Cobre) (ppm)	Número de <i>Daphnia magna</i> que emiten menos luz que el control
0% (Control)	0	--
6,25%	6,25	2
12,5%	12,5	3
25%	25	4
50%	50	4
100% (sin diluir)	100	6

TABLA 1: Ejemplo de la tabla de resultados obtenida.

Ejemplo

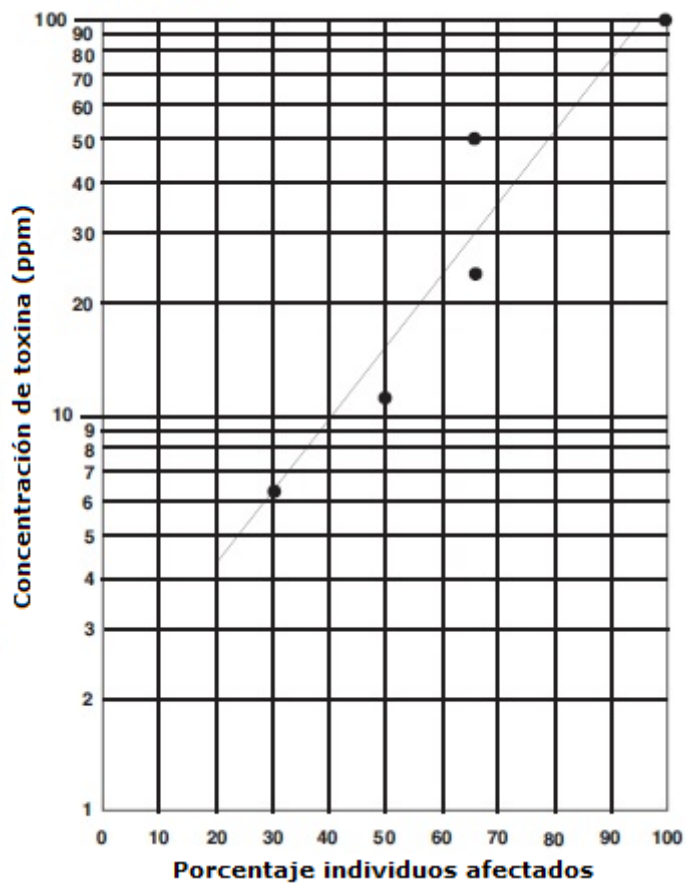


FIGURA 4: Ejemplo de la gráfica obtenida.

5. Desde el punto del eje X que representa el 50% de los individuos afectados negativamente, dibuje una línea vertical hasta que la corte la línea de la gráfica.

6. Desde el punto de intersección, dibuje una segunda línea horizontal hacia el eje Y para determinar la concentración de la toxina (agente tóxico) del valor LC50 (en ppm):

7. ¿A qué concentración de toxina (agente tóxico) (en ppm) la mitad de las *Daphnia magna* muestran efectos letales?

6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

6.1 Resultados

En las **tablas 2 y 3** registrar los resultados obtenidos en la práctica.

Concentración de la toxina (sustancia tóxica) y mortalidad de la <i>Daphnia magna</i>		
% Dilución de la celda de la cámara de exposición	Concentración de la solución de toxina (Cobre) (ppm)	Número de <i>Daphnia magna</i> que emiten menos luz que el control
0% (Control)	0	
6,25%	6,25	
12,5%	12,5	
25%	25	
50%	50	
100% (sin diluir)	100	

TABLA 2: Concentración de la toxina (sustancia tóxica) y mortalidad de la *Daphnia magna*.

Concentración de la toxina (sustancia tóxica) y mortalidad de la <i>Daphnia magna</i>			
% Dilución de la celda de la cámara de exposición	Concentración de la solución de toxina (Cobre) (ppm)	Concentración de la solución de EDTA (ppm)	Número de <i>Daphnia magna</i> que emiten menos luz que el control
0% (Control)	0	0	
6,25%	6,25	6,25	
12,5%	12,5	12,5	
25%	25	25	
50%	50	50	
100% (sin diluir)	100	100	

TABLA 3: Reducción de la toxicidad con EDTA y mortalidad de la *Daphnia magna*.

6.2 Preguntas

Responder a las siguientes preguntas en la libreta de prácticas:

- 1. ¿Qué concentración del contaminante simulado (toxina) en esta práctica debe ser considerado "inaceptable"? ¿Por qué?**
- 2. Si los organismos de control no se iluminan brillantemente, ¿cuál podría ser la causa?**
- 3. ¿Qué información toxicológica se obtiene a partir CL50?**
- 4. ¿Cómo actúa específicamente el EDTA como quelato del cobre?**

Anexo 1

10	
9	
8	
7	
6	
5	
4	
3	
2	
1	
9	
8	
7	
6	
5	
4	
3	
2	
1	
9	
8	
7	
6	
5	
4	
3	
2	
1	