CALIBRACION DEL BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON *DAPHNIA PULEX* (CRUSTACEA: CLADOCERA) USANDO UN TOXICO DE REFERENCIA

CALIBRATION OF THE ACUTE TOXICITY BIOASSAY WITH DAPHNIA PULEX (CRUSTACEA:CLADOCERA) USING A REFERENCE TOXICANT

Jeannette Silva¹, Guillermo Torrejón², Enrique Bay-Schmith¹ & Alberto Larrain¹

¹Laboratorio de Bioensayos, Depto. de Zoología, Fac. Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile. E-mail: jsilva@udec.cl

²Consultor Ambiental, Linares 599, Tierras Blancas, Coquimbo, Chile

RESUMEN

Los bioensayos de toxicidad, como cualquier instrumento analítico, requieren ser calibrados contra un patrón, el tóxico de referencia. Aunque el instrumento, en este caso los organismos de prueba, no puede ser ajustado a una respuesta esperada, la calibración permite aceptar o rechazar los organismos de prueba cuando provienen de una población cuya respuesta ante el tóxico de referencia está dentro o fuera del rango determinado para ese compuesto químico. El estudio de calibración que aquí se expone determina la precisión y exactitud intralaboratorio (Laboratorio de Bioensayos, Universidad de Concepción) alcanzadas en la ejecución del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* De Geer 1877 (Crustacea: Cladocera) mediante la determinación de la inhibición de la movilidad (mortalidad) utilizando bicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) como tóxico de referencia. El objetivo final del estudio de calibración es determinar la CL_{50-24h} (concentración letal 50) promedio y el rango de sensibilidad, representado por los límites de vigilancia superior (LVS) e inferior (LVI), al 95 %, de la mortalidad de *Daphnia pulex* frente al tóxico de referencia. La calibración fue realizada en base a nueve (n=9) valores de CL_{50-24h} de bicromato de potasio, dando como resultado el siguiente rango de sensibilidad = 0,092 - 0,197 $mg \cdot L^{-1}$ y una CL_{50-24h} de 0,145 $mg \cdot L^{-1}$. Esos valores revelan una mayor sensibilidad de la población chilena de *D. pulex* respecto a las poblaciones del hemisferio norte.

PALABRAS CLAVES: Toxicidad aguda, *Daphnia pulex*, bicromato de potasio, bioensayos, calibración, tóxico de referencia.

ABSTRACT

Ecotoxicity bioassays, as any other analytical instrument, require being calibrated against a standard, the reference toxicant. Although the instrument, in this case the test organism, can not be adjusted to an expected response, the calibration allows to accept or refuse the test organisms when they come from a population whose response, when exposed to the reference toxicant, falls in or out of the range determined for that chemical compound. The calibration study presented herein determines the intralaboratory (Laboratory of Bioassays, University of Concepción, Chile) precision and relative accuracy in performing the acute toxicity assesment of hexavalent chromium ($K_2Cr_2O_7$) to *Daphnia pulex* De Geer 1877 (Crustacea: Cladocera), using motility inhibition as endpoint. The final objective of the calibration study is to calculate the mean CL_{50-24h} (Inhibition Concentration 50) and the range of sensibility, represented by the upper and lower control limits at 95% of confidence of the *D. pulex* mortality in front of the reference toxicant. Calibration was set based on 9 values of CL_{50-24h} . The range of sensibility to potassium dichromate was 0.092 – 0.197 $mg \cdot L^{-1}$ and the CL_{50-24h} was 0.145 $mg \cdot L^{-1}$. These values reveal a higher sensibility of the Chilean population of *D. pulex* compared to the populations of the North Hemisphere.

KEYWORDS: Acute toxicity, *Daphnia pulex*, potassium dicromate, bioassays, calibration, reference toxicant.

INTRODUCCION

Los bioensayos son herramientas ampliamente utilizadas en el campo de la ecotoxicología, la cual se ocupa del estudio del efecto y destino de los agentes tóxicos de origen antropogénico a los ecosistemas acuícolas y terrestres (Larrain 1995). Estas pruebas de toxicidad permiten realizar mediciones experimentales del efecto de agentes químicos o físicos en sistemas biológicos, estableciendo relaciones concentración-respuesta bajo condiciones controladas en terreno o en laboratorio.

Al implementar bioensayos y pruebas de toxicidad es necesario efectuar su estandarización, que consiste en establecer la sensibilidad de las especies y la reproducibilidad del experimento frente a un tóxico de referencia. Lo anterior es útil para asegurarse que la respuesta de la población expuesta a cierto agente tóxico se deba al efecto de éste y no a variaciones de la sensibilidad de los organismos. La estandarización permite comparar los resultados entre diferentes laboratorios, siguiendo una metodología común. Además, cada laboratorio que trabaje habitualmente con bioensayos debe calibrar constantemente su método y para ello debe elaborar cartas de vigilancia con cada una de las especies que son utilizadas como organismos de prueba.

Organizaciones internacionales (ASTM, 1996; OECD, 1993; ISO, 1996; EC, 1992 y USEPA, 1994) han estandarizado metodologías para la realización de estos bioensayos con distintos organismos, en donde además se describen métodos de cultivo, condiciones de los experimentos, aplicabilidades y restricciones.

Una vez estandarizadas las metodologías experimentales, los laboratorios que ejecuten el bioensayo deben realizar una calibración de su método. La calibración es un proceso relacionado con los conceptos que rigen el control de calidad, y cuyo objetivo es determinar la precisión y exactitud que puede y debe alcanzarse en los resultados generados por un determinado bioensayo. Lo anterior es útil para asegurarse que la respuesta de la población expuesta a cierto agente tóxico se deba al efecto de éste y no a variaciones tanto de la sensibilidad de los organismos como de fallas operacionales en la aplicación del método. La precisión y exactitud se determina con el concurso de un químico llama-

do tóxico de referencia, el cual permite definir un rango de variabilidad máximo aceptable en los resultados generados por el bioensayo. Además, los resultados de la calibración permiten definir en forma estadística el rango de sensibilidad de la especie frente al tóxico de referencia, al tiempo de exposición y a la manifestación biológica empleados.

Uno de los organismos más corrientemente usados en bioensayos acuáticos es la pulga de agua, un crustáceo cladóceros particularmente sensible a numerosos compuestos químicos (Mayer & Eilersieck 1986). Dos especies de este crustáceo crecen y se reproducen abundantemente en el laboratorio, *Daphnia pulex* y *Daphnia magna*. En Chile sólo la primera está presente en las aguas continentales del país (Comité Limnológico de Chile, 1985), pero los laboratorios de la especialidad comúnmente mantienen cultivos de *D. magna* importada, por su mayor tamaño y por ser una especie usada mundialmente. Por estos motivos, el Instituto de Normalización (INN) de Chile ha normado el protocolo de bioensayo con *Daphnia* considerando ambas especies (NCh2083c, 1999). La carencia de información ecotoxicológica con representantes chilenos de *D. pulex* nos llevó a evaluar su sensibilidad ante un tóxico de referencia (bicromato de potasio) calibrando con esta especie la metodología aplicada en el Laboratorio de Bioensayos, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.

MATERIALES Y METODOS

PROCEDIMIENTO PARA LOS BIOENSAYOS

El Servicio Ambiental Canadiense (EPS, 1990) indica la realización de un número mínimo de 5 bioensayos de toxicidad triplicados consecutivos para una correcta calibración intralaboratorio. En este estudio fue realizado un total de 9 bioensayos de toxicidad aguda con individuos de *Daphnia pulex* mediante la determinación de la inhibición de la movilidad (IC_{50} 24 h) utilizando bicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) como tóxico de referencia. Los bioensayos fueron realizados entre noviembre del año 1999 y agosto del año 2000 en el Laboratorio de Bioensayos de la Universidad

de Concepción. Los organismos de la especie *D. pulex* usados en los bioensayos proceden de cultivos de laboratorio (productivos desde 1995) iniciados a partir de individuos extraídos de cuerpos de agua dulce de la VIII Región de Chile. Los protocolos de cultivo para esta especie son básicamente los mismos propuestos por ISO (ISO 6341, 1996) y por EC (1992).

Se utilizó agua reconstituida para los cultivos de los dáfidos y en la preparación de las distintas concentraciones del compuesto estudiado. Esta agua fue preparada según el protocolo de ISO 6341, 1996 (*op. cit.*) y consiste básicamente en agua destilada a la cual se le agregan sales inorgánicas de grado analítico (p.a.). El agua reconstituida debe airearse hasta que la concentración de oxígeno disuelto alcance la saturación y el pH se estabilice. Las soluciones stock del $K_2Cr_2O_7$ ensayadas fueron preparadas con agua destilada.

Previo al bioensayo definitivo se realizaron los ensayos preliminares para determinar el rango del efecto tóxico. Una vez establecido este rango se realizaron las pruebas definitivas con al menos 5 concentraciones en progresión geométrica, entre las cuales se verificó el porcentaje de inmovilidad (mortalidad) entre un 0 y 100 %.

Los bioensayos consistieron en la exposición de 20 neonatos de *D. pulex* (< 24 horas de nacidos) por concentración, divididos en 5 individuos por réplica, mantenidos sin alimentación durante 24 horas. Al final de este período se contabilizó el número de organismos inmóviles, presumiéndose su muerte. Como es imposible verificar con certeza la muerte de los individuos expuestos, por su pequeño tamaño, se considera como parámetro de medición final (endpoint) la inmovilidad de éstos, ya que normalmente siempre se encuentran en constante movimiento. En caso de duda se recomienda agitar bien el frasco de experimentación para verificar la inmovilidad de los organismos afectados (muertos). Se utilizaron viales de vidrio de 25 mL como cámaras experimentales, los cuales se llenaron con 10 mL de las soluciones de prueba. La temperatura de los bioensayos fue de $20^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$.

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando un método paramétrico para el cálculo de los valores de CL_{50-24h} y su intervalo de confianza mediante el programa estadístico Probit (US EPA, 1988).

DISEÑO GENERAL

Se realizó un total de 9 bioensayos de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* mediante la determinación de la inhibición de la movilidad utilizando bicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) como tóxico de referencia.

La calibración fue realizada de acuerdo a las metodologías prescritas por el Servicio de Protección Ambiental de Canadá (EPS, 1990) y por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 1990).

Este estudio de calibración consideró la determinación de estadísticos descriptivos básicos (de forma y de distribución); determinación de la precisión intralaboratorio mediante la estimación de coeficientes de variación (CV) y construcción de cartas de vigilancia para estimar la exactitud, estableciendo, en forma objetiva, el rango dentro del cual se deberían encontrar futuros valores de la CL_{50-24h} para la especie, la manifestación biológica y el tóxico de referencia usado.

Los estadísticos descriptivos utilizados en este estudio son: Número de datos, media, desviación estándar, valor mínimo, valor máximo, quartil inferior, quartil superior, rango interquartil, sesgo, sesgo estandarizado, curtosis, curtosis estandarizada, coeficiente de variación, tablas e histogramas de frecuencia.

PRECISIÓN INTRALABORATORIO

La precisión, es decir, cuan cerca se encuentran los valores de diferentes mediciones (CL_{50-24h}) realizada a un mismo sujeto de medición (bicromato de potasio) con igual herramienta o instrumento de medición (bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad con *D. pulex*), por un mismo o diferentes operarios, fue determinada mediante el cálculo del coeficiente de variación (CV), que es la medida de dispersión basada en el valor promedio y la desviación estándar.

EXACTITUD INTRALABORATORIO

La exactitud intralaboratorio, es decir, cuan cerca se encuentra el valor de toxicidad (CI_{50-24h}) para el tóxico de referencia en un bioensayo determinado al valor de toxicidad aceptado o verdadero para ese

tóxico de referencia, fue determinada mediante la construcción de la carta de vigilancia (también llamada carta de control).

La carta de vigilancia consistió en la representación gráfica de los siguientes datos:

a. Disposición en forma consecutiva, sobre el eje x, de la serie sucesiva de bioensayos de toxicidad aguda considerados en la calibración.

b. Disposición de los valores de $CL_{50-24\text{ h}}$ e intervalos de confianza correspondientes a cada uno de estos bioensayos sobre la abscisa.

c. Promedio para el conjunto de valores de $CL_{50-24\text{ h}}$ considerados. Al ser graficada, la media recibe el nombre de línea de tendencia central (LTC).

d. Límites de confianza superior (LCS) e inferior (LCI) al 95 % y 99,7 % para el conjunto de valores de $CL_{50-24\text{ h}}$ considerados.

Los límites de confianza superior e inferior al 95 % son representados por la concentración ($CL_{50-24\text{ h}}$) que iguala dos veces la desviación estándar (sd) sobre o bajo la media ($X \pm 2\text{ sd}$), respectivamente. Al ser graficados estos límites de confianza reciben, en forma respectiva, el nombre de líneas de vigilancia superior (LVS) e inferior (LVI).

Los límites de confianza superior e inferior al 99,7 % son representados por aquellas concentraciones ($CL_{50-24\text{ h}}$) que igualan la media $\pm$ tres veces la desviación estándar ($X \pm 3\text{ ds}$), referidos en lo que sigue como 99 %. Si se grafican estos valores resultan las líneas de vigilancia superior e inferior al 99 %. En este nivel de confianza, la probabilidad que los datos caigan fuera es sólo del 0,3 % (uno de cada 300 bioensayos). Aunque no es necesaria la inclusión de los límites al 99 % de confianza, servirán como un índice para interpretar la severidad o magnitud de los datos que caen fuera de los límites de confianza al 95 %.

Los límites de vigilancia superior (LVS) e inferior (LVI) al 95 % definen la exactitud intralaboratorio y el rango de vigilancia dentro del cual se encuentra el valor de toxicidad verdadero para el tóxico de referencia.

Mientras más cerca se encuentre la $CL_{50-24\text{ h}}$ correspondiente a cada uno de los bioensayos consecutivos respecto a la línea de tendencia central (LTC) y más alejada en relación a los límites de vigilancia superior (LVS) e inferior (LVI) al 95 %, mayor será la exactitud alcanzada en la ejecución del bioensayo con el tóxico de referencia.

RESULTADOS

VALORES DE $CL_{50-24\text{ h}}$ PARA BICROMATO DE POTASIO EN BIOENSAYOS DE TOXICIDAD CON *D. pulex*

En la Tabla I, puede ser observada la $CL_{50-24\text{ h}}$ y sus límites de confianza inferior (LCI) y superior (LCS) estimados para cada uno de los nueve (9) bioensayos de toxicidad aguda triplicados consecutivos con *D. pulex* realizados con bicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) como tóxico de referencia.

TABLA I: Valores de la toxicidad del bicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) como tóxico de referencia mediante la determinación de la inhibición de la movilidad ($CL_{50-24\text{ h}}$) en bioensayos de toxicidad aguda con *D. pulex* (n = 9 Bioensayos).

TABLE I: Acute toxicity values of the references toxicant potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) measured as motility inhibition ($CL_{50-24\text{ h}}$) of *D. pulex* (n = 9 bioassays).

Nº	$CL_{50-24\text{ h}}$ mg/L ⁻¹	Límites de confianza ($p \leq 0,05$)	
		LCI	LCS
1	0,135	0,022	0,024
2	0,114	0,016	0,014
3	0,153	0,019	0,018
4	0,135	0,013	0,012
5	0,182	0,028	0,043
6	0,132	0,017	0,016
7	0,113	0,022	0,020
8	0,158	0,032	0,026
9	0,183	0,023	0,029

ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS

En la Tabla II, se indican los valores mínimo y máximo, los cuartiles inferior y superior y la $CL_{50-24\text{ h}}$ promedio, incluyéndose medidas de Tendencia Central, de Variabilidad y de Forma para los nueve bioensayos generados por investigadores del equipo estable del Laboratorio de Bioensayos.

Como se observa en la Tabla II, el valor de la $CL_{50-24\text{ h}}$ promedio para los (n = 9) bioensayos fue de 0,145 mg/L⁻¹ de $K_2Cr_2O_7$, con una desviación estándar (ds), de 0,026. Los valores mínimo y máximo fueron de 0,113 y 0,183 respectivamente. El Coeficiente de Variación (CV) alcanzó un valor

promedio 17,96 %, lo cual indica una variabilidad entre la $CL_{50-24\text{ h}}$ estimada para cada bioensayo inferior al valor máximo de variabilidad ($CV = 30\%$) establecido por EPS (1990) y USEPA (1990). Por lo tanto, la precisión alcanzada en la ejecución de los bioensayos fue aproxi-

madamente un 40 % superior a la mínima especificada

El cuartil inferior indica que el 25 % de la muestra se encuentra bajo un valor de $0,132\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que el cuartil superior refleja que el 75 % de los datos están bajo un valor de $0,158\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

TABLA II: Estadísticos Descriptivos para las $CL_{50-24\text{ h}}$ de bicromato de potasio como tóxico de referencia en bioensayos de toxicidad aguda con *D. pulex* (n = 9).

TABLE II: Descriptive statistics for potassium dichromate $CL_{50-24\text{ h}}$ as referece toxicant in acute toxicity bioassays with *D. pulex* (n=9).

ESTADÍSTICO	UNIDAD	VALOR
Número de Datos ($CI_{50-24\text{ h}}$)	-	9
Media	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0,145
Desviación Estándar	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0,026
Valor Mínimo	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0,113
Valor Máximo	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0,183
Quartil Inferior	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0,132
Quartil Superior	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0,158
Rango Interquartil	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0,026
Sesgo	-	0,380
Sesgo Estandarizado	-	0,465
Curtosis	-	-1,036
Curtosis Estandarizado	-	-0,634
Coefficiente de Variación	%	17,96

De particular interés son, además, el sesgo y la curtosis estandarizadas (medidas de forma), las cuales indican si la población de datos se ajusta a una distribución normal. Valores de estos estadísticos fuera del rango -2 a +2 indican una significativa desviación de la población en relación a una distribución normal, lo cual podría tender a invalidar cualquier análisis estadístico que considere la desviación estándar (estadística paramétrica) e impide la construcción de la carta de vigilancia para la cual la normalidad de los datos es requisito *sine qua non*. En este caso,

ambas medidas de forma están dentro del rango esperado para una distribución normal.

DISTRIBUCIÓN DE LOS VALORES DE $CL_{50-24\text{ h}}$

En la Tabla III se muestra que la mayor frecuencia de tabulación (3 datos de $CI_{50-24\text{ h}}$) se encuentra en el rango de $0,12-0,14\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, representando el 33 % de la población (n = 9). Los rangos $0,10-0,12$; $0,14-0,16$ y $0,18-0,20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, los tres con 2 datos, representan cada uno el 22 % de los datos.

TABLA III: Distribución de la CL_{50-24h} de bicromato de potasio como tóxico de referencia en bioensayos de toxicidad aguda con *D. pulex* (n = 9).

TABLE III: Potassium dichromate CL_{50-24h} distribution as toxicant reference in acute toxicity bioassays with *D. pulex* (n = 9).

Clase	FRECUENCIA DE TABULACIÓN PARA CL_{50-24h} (mg L ⁻¹)						PERCENTILES PARA CL_{50-24h} (mg L ⁻¹)	
	Límites		Punto Medio	Frecuencia			Percent.	Valor
	Inferior	Superior		Absoluta	Acumul.	Relativa Acumul.		
En ó bajo 0		0,10	-	0	0	0,0000	1 %	0,113
1	0,10	0,12	0,11	2	2	0,2222	5 %	0,113
2	0,12	0,14	0,13	3	5	0,5555	10 %	0,113
3	0,14	0,16	0,15	2	7	0,7777	25 %	0,132
4	0,16	0,18	0,17	0	7	0,7777	50 %	0,135
5	0,18	2,00	0,19	2	9	1,0000	75 %	0,158
sobre	2,00	-	-	0	9	1,0000	99,0 %	0,183

FIGURA 1: Carta de vigilancia para bicromato de potasio como tóxico de referencia en bioensayos de toxicidad aguda con *D. pulex* (n = 9 valores de CL_{50-24h}).

FIGURE : Control chart for potassium dichromate as reference toxicant in acute toxicity bioassays with *D. pulex* (n = 9 valores de CL_{50-24h}).

CARTA DE VIGILANCIA

En la Figura 1 se ilustra la correspondiente carta de vigilancia junto con las CL_{50-24h} ($n = 9$) utilizadas en su construcción.

La línea de tendencia central (LTC) o valor de la CL_{50-24h} promedio para los nueve ($n = 9$) bioensayos fue de $0,145 \text{ mg L}^{-1}$ de $K_2Cr_2O_7$.

Los límites de vigilancia inferior (LVI) y superior (LVS) al 95 % de confianza quedaron establecidos de 0,092 y $0,197 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

En futuros bioensayos de toxicidad aguda con individuos de *D. pulex*, con la inhibición de la movilidad (CL_{50-24h}) como manifestación cuantificable y bicromato de potasio como tóxico de referencia, deberán rendir concentraciones letales que se encuentren dentro del rango de vigilancia establecido por los Límites de Vigilancia al 95 %.

Los límites de vigilancia al 99 % servirán para determinar la magnitud en que la CL_{50-24h} , para el tóxico de referencia, se aparta de los límites de vigilancia al 95 %.

DISCUSION

Un aspecto muy importante en el desarrollo de los bioensayos de toxicidad ha sido la reproducibilidad de estas pruebas, lo que consiste en obtener resultados similares con la misma sustancia química. Esto requiere que las pruebas sean estandarizadas de acuerdo a protocolos muy definidos. En el caso de la especie en estudio, el número de resultados consecutivos contemplados se ajusta a lo recomendado por USEPA (1990), organismo que establece para una correcta intracalibración un número mínimo de cinco (5) bioensayos triplicados consecutivos. Otros organismos internacionales, como EPS (1990), indican que se debe ejecutar un número mínimo de veinte (20) bioensayos de toxicidad consecutivos con el tóxico de referencia antes que se pueda realizar una calibración intralaboratorio (EPS, 1990). El Laboratorio de Bioensayos ha trabajado estrechamente bajo la guía de la US EPA, por lo tanto la mayoría de los protocolos de bioensayos generados en nuestro laboratorio se han adaptado tomando como modelo los publicados por ese organismo. Los bioensayos, como toda herramienta de medición, deben tener cierta precisión y exactitud en sus resultados.

PRECISIÓN

Mientras más cerca de cero (0) se encuentre el valor para el CV, mayor será la precisión. El Servicio de Protección Ambiental de Canadá (EPS, 1990) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 1990) fijan un coeficiente de variación menor o igual a 30 % ($CV \leq 30\%$) como la máxima variabilidad permitida entre los índices de toxicidad para el tóxico de referencia correspondientes a las réplicas de un mismo bioensayo o entre los índices de toxicidad promedio para los n bioensayos consecutivos realizados con el tóxico de referencia.

De esta forma, la mínima precisión permitida está representada por un CV igual 30 ($CV = 30\%$). Una variabilidad intralaboratorio superior al 30 % (precisión inferior a la mínima permitida) indica una gran desviación estándar alrededor de la media, lo cual causa que los límites de vigilancia superior (LVS) e inferior (LVI) al 95 % en la carta de vigilancia sean excesivamente amplios. En consecuencia, aunque un laboratorio no genere resultados con un nivel adecuado de exactitud, puede demostrar que sus datos están dentro del rango definido por los límites de vigilancia.

Sólo si se cumple que la variabilidad (CV) es menor o igual al 30 % se puede determinar la exactitud intralaboratorio. La precisión alcanzada en el laboratorio con los resultados CL_{50-24h} de los bioensayos con *D. pulex* es de un 17,96 %, lo que estaría dentro de los límites permitidos.

Los estadísticos descriptivos utilizados en el presente trabajo permiten determinar si existen valores "anormales" "(outside)" o "muy anormales" "(far outside)" que no deban ser incluidos en ningún análisis estadístico realizado sobre la población o muestra de datos. El rango intercuartil se extiende desde el cuartil inferior hasta el cuartil superior cubriendo la parte central de la población de datos. Un "valor anormal" es definido como aquel que se encuentra ubicado a más de 1,5 veces sobre o bajo el rango intercuartil. "Valores muy anormales" son aquellos ubicados a más de 3,0 veces sobre o bajo el rango intercuartil.

En este caso, ninguno de los 9 datos de CL_{50-24h} considerados caen en la categoría de «anormales» o «muy anormales». Por lo tanto, los 9 datos serán incluidos en la determinación de la precisión y exactitud intralaboratorio.

EXACTITUD INTRALABORATORIO

Los laboratorios con una variabilidad (CV) superior a la máxima permitida en sus resultados (precisión inferior a la mínima) obtendrán límites de variación al 95 % demasiado amplios, sobrestimando su exactitud y el rango de vigilancia dentro del cual se encuentra el valor de toxicidad verdadero para el tóxico de referencia. Otro caso que puede ser detectado mediante el coeficiente de variación y la carta de vigilancia lo representan aquellos laboratorios altamente precisos en los resultados de toxicidad generados pero completamente inexactos (estadísticamente alejados del valor de toxicidad verdadero).

No sólo es importante monitorear si los valores de $CL_{50-24\ h}$ para el tóxico de referencia en un bioensayo determinado caen o no dentro de los límites establecidos en la carta de vigilancia (es decir, si se cumple con la exactitud), sino que también deben ser monitoreadas las tendencias o patrones desarrollados por los datos. La ocurrencia de datos fuera de los límites puede ser prevenida por una temprana detección de una tendencia.

La teoría de probabilidad señala que la probabilidad que cualquier dato caiga bajo o sobre la media en la carta de vigilancia (LTC = línea de tendencia central) es de 1/2 (asumiendo fuentes de variación aleatorias). La probabilidad que 2 puntos se encuentren en el mismo lado de la línea es de 1/4. Por lo tanto, la probabilidad que "n" puntos estén en el mismo lado de la línea es de $1/(2^n)$. Si el $n=5$, la probabilidad que esto ocurra sólo por azar es sólo de un 3 %. Por lo tanto, si 5 o más puntos consecutivos (valores de $CL_{50-24\ h}$ correspondientes a bioensayos consecutivos) están en el mismo lado de la LTC, se deben tomar medidas para detectar fuentes de error y corregirlas (Dux 1986).

Cuando el bioensayo se emplee en la evaluación de la calidad toxicológica de muestras ambientales, se debe realizar simultáneamente un bioensayo con el tóxico de referencia, el cual debe mantener la precisión y exactitud histórica establecida en el proceso de calibración. Sólo si se cumple esto se puede asegurar con un alto grado de confianza que los índices de toxicidad para las muestras ambientales son realmente efecto de su toxicidad y no el reflejo de alguna fuente de variabilidad introducida al sistema (variaciones en la edad de los organismos, agua de dilución, procedimientos operativos, etc.).

EXACTITUD INTERLABORATORIOS

En países en donde el uso de los bioensayos es habitual como herramientas de evaluación de la calidad de efluentes y cuerpos de aguas continentales y marinas se ha desarrollado el concepto de exactitud interlaboratorios, en donde un organismo controlador de estos laboratorios distribuye muestras "ciegas" para supervisar la exactitud del trabajo experimental.

La finalidad del presente estudio es establecer valores reales de $CL_{50-24\ h}$ para la cepas de *D. pulex* existentes en nuestro país, específicamente la cepa que se cultiva y utiliza en test de toxicidad en el Laboratorio de Bioensayos de la Universidad de Concepción. Para los autores es importante dejar establecida la sensibilidad que esta especie presenta a un tóxico de referencia como el bicromato de potasio, ya que los bioensayos con esta especie serán, en un futuro próximo, una herramienta fundamental en la evaluación ecotoxicológica de aguas residuales y efluentes tanto industriales como domésticos.

Con estos valores, producto de la calibración con cepas que habitan aguas continentales de nuestra región, se pretende acceder a una futura modificación del rango de sensibilidad que está actualmente establecido en la Norma Chilena NCH208, documento oficial que norma y regula los rangos de aceptabilidad de los bioensayos realizados en Chile con esta especie. Los rangos que están establecidos en dicha norma son entre 0,3 mg/L a 0,8 mg/L (NCH2083, 1999). Debido a la carencia de información publicada con valores de bioensayos con *D. pulex* realizados en nuestro país, se estableció ese rango tomando como criterio los rangos propuestos por la ISO producto de bioensayos realizados con representantes de esta especie originarios del hemisferio norte (ISO/5725-2, 1994).

CONCLUSIONES

El presente estudio ha entregado las siguientes conclusiones:

1. El valor de la $CL_{50-24\ h}$ promedio para los ($n = 9$) bioensayos fue de $0,145\ mg\cdot L^{-1}$ de $K_2Cr_2O_7$, con una desviación estándar (ds) de

0,026. Los valores mínimo y máximo fueron de 0,113 y 0,183 respectivamente.

2. La precisión ($CV = 17,96 \%$) obtenida en los resultados (CI_{50-24h}) es aproximadamente un 40,0 % superior a la mínima precisión recomendada ($CV \leq 30 \%$) por EPS (1990) y USEPA (1990).

3. La exactitud en los resultados (CI_{50-24h}) está señalada por la correcta amplitud entre los límites de vigilancia superior e inferior ($LVS = 0,197 \text{ mg L}^{-1}$; $LVI = 0,092 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{rango}_{(LVI-LVS)} = 0,104 \text{ mg L}^{-1}$) y causa una moderada desviación estándar alrededor de la media (como lo evidencia el CV inferior a 30 %).

4. Con respecto al monitoreo de tendencias o patrones anómalos desarrollados por los datos, éstos no son observables distribuyéndose los datos en forma azarosa alrededor de la línea de tendencia central (LTC; Ver carta de vigilancia, Figura 2) y entre las líneas de vigilancia. Según la teoría de probabilidad, la probabilidad que cualquier dato caiga bajo o sobre la media en la carta de vigilancia ($LTC = \text{línea de tendencia central}$) es de 1/2 (o 50 %). La probabilidad que 5 datos consecutivos caigan bajo o sobre la media es de tan solo un 3 % [$1/(2^5)$]. Esta probabilidad disminuye al considerar un mayor número de datos consecutivos. Por ejemplo, si tenemos 9 bioensayos consecutivos (CI_{50-24h}), la probabilidad que caigan al mismo lado de la LTC es de tan sólo un 0,19 % (en un plano real prácticamente imposible). La tendencia en los 9 datos de CI_{50-24h} analizados nos indica la inexistencia de fuentes de error serias que deban ser corregidas y, por lo tanto, la existencia de una correcta aplicación de las metodologías operacionales en las diferentes fases de los bioensayos (Cultivo, ejecución, etc.) analizado en este estudio.

5. Los parámetros de control de calidad indican el alto nivel de precisión y exactitud que puede y debe ser alcanzado en la ejecución del bioensayo de toxicidad aguda mediante la inhibición de la movilidad con *Daphnia pulex* usando bicromato de potasio como tóxico de referencia. Lo anterior considerando que cualquier herramienta o instrumento analítico (como es el caso de un bioensayo de toxicidad) debería ser

operado por operarios altamente entrenados.

*Sustancias químicas solubles bajo las condiciones de la prueba; Efluentes industriales, tratados o no tratados, después de decantación o filtración si es necesario; Efluentes de aguas servidas, tratadas o no tratadas, después de decantación o filtración si es necesario; Aguas superficiales continentales o subterráneas.

BIBLIOGRAFIA

- ASTM (American Society for Testing and Materials). 1996. Standard guide for conducting *Daphnia magna* life cycle toxicity tests. E 1193, Draft N°9, pp 66
- COMITÉ DE LIMNOLOGÍA DE CHILE. 1985. Boletín Informativo Limnológico, Universidad Austral de Chile, N° 8 pp. 54-55
- DUX, JP. 1986. Handbook of Quality Assurance for the Analytical Chemistry Laboratory. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- EPS. 1990. Guidance Document on Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants. Environment Canada. Report EPS 1/RM/12.
- EC (EUROPEAN COMMUNITY). 1992. Method for the determination of ecotoxicity, part C.2: Acute toxicity for *Daphnia* (Directive 92/69/EEC) Off. J. Eur. Comm. N°1 383:172-178 .
- ISO/6341. 1996. Water Quality – Determination of the inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera – Crustacea) (E) 12 pp.
- ISO/5725-2. 1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
- LARRAIN, A. 1995. Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad. Cienc. Tec. Mar, CONA (N° especial):39-47.
- MAYER, F.L. & ELLERSIECK, M.R. 1986. Manual of acute toxicity: Interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. U. S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Publication 160, Washington, DC, 505 pp.
- NCH2083. 1999. Aguas – Bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera). Instituto Nacional de Normalización, INN – Chile.
- OECD. 1993. *Daphnia* sp. acute immobilization test and reproduction test, Method 202, OECD Guidelines for Testing Chemicals.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency). 1988. Short-Term methods for

- estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. Report 600/4-87/028, pp 398-416.
- US EPA. 1990. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organism. Fourth Edition. Report 600/4-90/027F.
- US EPA. 1994. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Report 600/4-91/002. EPA Office of Research and Development, Cincinnati, OH.

Fecha de recepción: 19/08/02
Fecha de aceptación: 07/05/03