



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
Ciencias e Ingeniería

ELABORACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO Y FORMATO ESTANDARIZADO
PARA EL REGISTRO OBSERVACIONAL DE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD
AGUDA (LC50) EN PECES

TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA OPTAR POR EL TÍTULO
PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

AUTOR(ES)
KATY JULIA ZUÑIGA PARIONA

ASESOR(ES)
LEON FAUSTINO VILLEGAS VILCHEZ

LIMA – PERÚ
2026

Revisores

Revisor 1: MSc. Brenda Delfin Barandiaran

Revisor 2: MSc. Vanessa Stefanny Arevalo Seijas



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	ZUÑIGA PARIONA KATY JULIA

(Agregar filas adicionales si hay más autores)

Pertenecientes al programa de la **CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**, autores del trabajo titulado: **ELABORACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO Y FORMATO ESTANDARIZADO PARA EL REGISTRO OBSERVACIONAL DE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA (LC50) EN PECES**, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el **TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA** bajo la modalidad de **TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	VILLEGAS VILCHEZ LEON FAUSTINO	FACI	ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **10%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3638162408**; fecha de entrega: **01/09/2026**)
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 01 de septiembre de 2026**

Firma del asesor

Nº DNI: 07042189

ORCID: 0000-0001-6030-2877

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	5
II. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivos generales	9
2.2. Objetivos específicos	9
III. METODOLOGÍA	10
3.1. Lugar de estudio	10
3.2. Revisión de lineamientos normativos internacionales aplicables a bioensayos de toxicidad	10
3.3. Obtención y revisión de formatos observacionales previos	11
3.4. Elaboración del procedimiento y formato	12
3.4.1. Procedimiento para la ejecución de ensayos de toxicidad aguda (LC50) en peces	12
3.4.2. Formato para el registro de signos clínicos y seguimiento de bioensayos de toxicidad aguda (LC50) en peces	14
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1. Revisión de lineamientos normativos internacionales	15
4.2. Revisión de registros observacionales previos	18
4.3. Elaboración del procedimiento experimental y formato de registro de datos	20
V. CONCLUSIONES	22

VI. BIBLIOGRAFÍA	23
ANEXOS	26

RESUMEN

Los bioensayos de toxicidad aguda constituyen una herramienta importante en los laboratorios de investigación para evaluar los efectos de sustancias potencialmente contaminantes sobre organismos acuáticos. En este tipo de ensayos, además del registro de la mortalidad para la determinación de la concentración letal media (LC50), se realizan observaciones de los signos clínicos presentados por los organismos, los cuales aportan información relevante sobre la respuesta biológica de los organismos expuestos. Sin embargo, en muchos casos, este tipo de observaciones se registran de forma cualitativa y mediante descripciones libres, lo que puede generar variabilidad en la interpretación y documentación de los signos de toxicidad.

El presente Trabajo de Suficiencia Profesional (TSP) consiste en la elaboración de un formato y un procedimiento estandarizado para el registro observacional de signos clínicos en peces sometidos a bioensayos de toxicidad aguda (LC50), tomando como referencia un laboratorio de investigación de biología acuática perteneciente a una universidad. Para ello, se analizaron registros observacionales previamente generados, con el fin de identificar limitaciones en la forma de documentar los signos clínicos. Asimismo, se realizó una revisión de guías y normativas internacionales, como las establecidas por *Guidelines for the Testing of Chemicals* N°203 (OECD), la guía OCSPP 850.1075: *Freshwater and Saltwater Fish Acute Toxicity Test de la Environmental Protection Agency* (EPA) y la norma ASTM E1562-00, *Standard Guide for Conducting Acute, Chronic, and Life-Cycle Aquatic Toxicity Tests with Polychaetous Annelids*, con el propósito de sustentar técnicamente la propuesta.

Se espera que la implementación de este formato contribuya a mejorar la sistematización, trazabilidad y consistencia de la información generada durante los bioensayos, facilitando

la interpretación y comparación de resultados entre ensayos y analistas. Además, esta propuesta busca fortalecer la calidad de la documentación interna del laboratorio, optimizar sus procesos de control y aportar a la mejora continua de las prácticas de investigación en el área de la ecotoxicología experimental.

PALABRAS CLAVE: Ecotoxicología, LC50, Signos clínicos, registro observacional, estandarización

ABSTRACT

Acute toxicity bioassays are an important tool in research laboratories for evaluating the effects of potentially contaminating substances on aquatic organisms. In this type of assay, in addition to mortality records for determining the median lethal concentration (LC50), observations of clinical signs presented by the organisms are carried out, which provide relevant information on the biological response of exposed organisms. However, in many cases, these observations are recorded qualitatively and through free-text descriptions, which can generate variability in the interpretation and documentation of toxicity signs.

The present Professional Sufficiency Work consists of the development of a standardized format and procedure for the observational recording of clinical signs in fish subjected to acute toxicity bioassays (LC50), using an aquatic biology research laboratory belonging to a university as a reference. To this end, previously generated observational records were analyzed in order to identify limitations in the way clinical signs were documented. Likewise, a review of international guidelines and regulations was conducted, including those established by the Guidelines for the Testing of Chemicals No. 203 (OECD), the EPA's OCSP 850.1075: Freshwater and Saltwater Fish Acute Toxicity Test, and the ASTM E1562-00 Standard Guide for Conducting Acute, Chronic, and Life-Cycle Aquatic Toxicity Tests with Polychaetous Annelids, in order to provide technical support for the proposal.

It is expected that the implementation of this format will contribute to improving the systematization, traceability, and consistency of the information generated during bioassays, facilitating the interpretation and comparison of results across assays and analysts. Furthermore, this proposal seeks to strengthen the quality of the laboratory's

internal documentation, optimize its quality control processes, and contribute to the continuous improvement of research practices in the field of experimental ecotoxicology.

KEYWORDS: Ecotoxicology, LC50, Clinical signs, observational recording, standardization

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental constituye uno de los principales desafíos del mundo contemporáneo. Con el crecimiento industrial y urbano, la producción masiva de plásticos y el vertimiento de residuos a los cuerpos de agua, los ecosistemas acuáticos se han convertido en uno de los ambientes más afectados. En ellos se ha registrado un incremento progresivo en la concentración de compuestos orgánicos, como el nitrato y el fósforo, que favorecen la eutrofización y degradan la calidad del agua (1,2,3). Esta situación plantea la necesidad urgente de evaluar de qué manera dichas alteraciones afectan a los organismos que habitan estos ecosistemas, en particular a los peces, cuya salud y comportamiento sirven como indicadores sensibles del estado del ambiente acuático (4).

En este contexto, los bioensayos de toxicidad en organismos acuáticos se han consolidado como una herramienta fundamental dentro de la ecotoxicología para evaluar los efectos de sustancias químicas presentes en el ambiente (4,5,6). Estos ensayos exponen organismos vivos a diferentes concentraciones de una sustancia bajo condiciones controladas, permitiendo analizar su respuesta fisiológica y conductual. Uno de los parámetros más utilizados es la concentración letal media (LC50), definida como la concentración capaz de provocar la muerte del 50% de los organismos expuestos en un tiempo determinado, generalmente 96 horas (4,7). Su determinación, complementada con el registro de la supervivencia, mortalidad, signos clínicos y estudios histológicos, permite comprender de manera integral las alteraciones fisiológicas y los daños metabólicos producidos por los contaminantes, así como predecir sus efectos a largo plazo en organismos acuáticos (4,8)

A nivel internacional, estos ensayos se encuentran regulados por guías técnicas estandarizadas que establecen las condiciones experimentales, los tiempos de exposición

y los criterios de evaluación. Entre las más reconocidas se encuentran el Test No. 203: *Fish, Acute Toxicity Test* de la OECD (7) y la guía OCSPP 850.1075: *Freshwater and Saltwater Fish Acute Toxicity Test de la Environmental Protection Agency* (EPA) (9) que definen aspectos como el número de organismos a emplear, las concentraciones de ensayo, las condiciones ambientales y la frecuencia de observación. Estas guías son la referencia obligatoria en laboratorios de investigación de biología acuática para garantizar la reproducibilidad y comparabilidad de los resultados.

Los signos clínicos se definen como cualquier manifestación observable de alteración fisiológica o conductual que presentan los organismos como respuesta a la exposición a un agente tóxico (10). Además del registro de mortalidad, los bioensayos permiten observar los signos clínicos presentados por los organismos durante la exposición al agente tóxico. Estos incluyen modificaciones en los patrones de nado, pérdida de equilibrio y función respiratoria anormal, entre otros (10,11). Estudios han demostrado que estos signos pueden presentarse incluso antes de que aparezcan efectos letales o alteraciones morfológicas visibles, lo que los convierte en indicadores tempranos y sensibles de toxicidad (12,13). Asimismo, algunos compuestos son capaces de generar alteraciones conductuales sin producir mortalidad inmediata, de modo que la evaluación conjunta de la mortalidad y los signos clínicos permite identificar con mayor eficiencia el potencial tóxico de una sustancia (12,10).

A pesar de su importancia, el registro de los signos clínicos en los bioensayos suele realizarse de manera cualitativa y variable, lo que limita su análisis e interpretación (14). Diversas investigaciones han evidenciado que, incluso bajo condiciones experimentales similares, los métodos observacionales generan dificultades para comparar resultados, particularmente cuando no se dispone de sistemas de registro estructurados (15). Se ha destacado que las observaciones del comportamiento en peces presentan un alto grado de

complejidad y pueden introducir variabilidad interpretativa, por lo que se enfatiza la necesidad de emplear métodos cuantitativos y estandarizados (16). En este mismo sentido, un estudio publicado en *Frontiers in Toxicology* concluye que la variabilidad en los registros es un problema generalizado en toxicología “in vivo”, y que mejorar la estandarización constituye una medida clave para fortalecer la reproducibilidad de los estudios (17). Esta variabilidad no solo afecta la reproducibilidad de las investigaciones, sino también la confiabilidad de las conclusiones obtenidas (15,18).

El presente Trabajo de Suficiencia Profesional (TSP) se desarrolló en el laboratorio de investigación de biología acuática perteneciente a una universidad, espacio en el que se realizan bioensayos de toxicidad aguda en peces con fines de investigación científica. Durante la ejecución de estos ensayos, se identificó que el registro de los signos clínicos de toxicidad se llevaba a cabo de forma no estructurada, sin contar con un formato estandarizado que permitiera sistematizar la información de manera consistente entre analistas y entre ensayos. Asimismo, se observó que la ejecución de estos ensayos no contaba con un procedimiento interno documentado, sino que se realizaba con base en la interpretación directa de las guías internacionales por parte de cada analista, lo que dificulta la uniformidad metodológica entre ensayos.

Ante esta situación, el propósito del presente TSP fue analizar los formatos observacionales generados durante los bioensayos de toxicidad letal media (LC50) realizados en dicho laboratorio, con el objetivo de identificar las limitaciones en la forma en que se documentaban los signos de toxicidad y, a partir de ello, desarrollar un formato estandarizado que facilite su documentación y sistematización. Como consecuencia, fue necesario elaborar también un procedimiento interno, dado que todo formato utilizado en un laboratorio debe estar respaldado por un procedimiento que indique cómo se realizan los ensayos y qué materiales emplear. Dicho procedimiento se basa en una guía

internacional, adaptada a las condiciones y al equipamiento disponibles en el laboratorio. Para la elaboración de dicho procedimiento y formato, se tomaron como referencia guías internacionales reconocidas, entre ellas el Test No. 203: *Fish, Acute Toxicity Test* de la OECD (7), la guía OCSPP 850.1075: *Freshwater and Saltwater Fish Acute Toxicity Test de la Environmental Protection Agency* (EPA) (9) y la norma ASTM E1562-00, *Standard Guide for Conducting Acute, Chronic, and Life-Cycle Aquatic Toxicity Tests with Polychaetous Annelids* (19).

La implementación de un procedimiento y formato estandarizado para el registro de signos clínicos representa una contribución concreta a la mejora de la calidad de la investigación ecotoxicológica en el laboratorio. A nivel interno, facilitará la interpretación y comparación de resultados entre ensayos, fortalecerá la trazabilidad de la documentación frente a procesos de auditoría, estandarizará los criterios entre analistas y reducirá la variabilidad en la interpretación de los signos de toxicidad, optimizando así los procesos de control de calidad.

Asimismo, este tipo de herramienta podría constituir un aporte al campo de la ecotoxicología experimental, al proponer un modelo de registro replicable en otros laboratorios que promueva datos más estructurados y comparables.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales

Elaborar un procedimiento y un formato de registro de datos estandarizado para anotar signos clínicos y dar seguimiento a bioensayos de toxicidad aguda (LC50) en peces.

2.2. Objetivos específicos

- Revisar normativas y guías internacionales (OECD N°203, OCSPP 850.1075 de la *Environmental Protection Agency* y ASTM E1562) relacionadas con el registro de observaciones en bioensayos de toxicidad.
- Analizar formatos observacionales previamente utilizados en el laboratorio con el fin de identificar variaciones y limitaciones en el registro de las observaciones durante bioensayos de toxicidad aguda.
- Elaborar un procedimiento ajustado a las condiciones del laboratorio, con base en directrices internacionales, para la ejecución de ensayos de toxicidad aguda (LC50) en peces.
- Elaborar un formato para el registro de signos clínicos y seguimiento de bioensayos de toxicidad aguda (LC50) en peces.

III. METODOLOGÍA

3.1. Lugar de estudio

El presente trabajo de suficiencia profesional se desarrolló en el laboratorio de biología acuática J. Javier Alvarado Díaz de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), donde se ejecutan proyectos orientados a la conservación y reintroducción de especies acuáticas, así como bioensayos de toxicidad en organismos acuáticos. El estudio se centró específicamente en el área de ecotoxicología.

3.2. Revisión de lineamientos normativos internacionales aplicables a bioensayos de toxicidad

Se realizó una revisión de normativas y guías internacionales aplicables a bioensayos de toxicidad aguda, incluyendo las establecidas por *Guidelines for the Testing of Chemicals* N°203 (OECD) (7), la guía OCSP 850.1075: *Freshwater and Saltwater Fish Acute Toxicity Test* de la *Environmental Protection Agency* (EPA) (9) y la norma ASTM E1562-00, *Standard Guide for Conducting Acute, Chronic, and Life-Cycle Aquatic Toxicity Tests with Polychaetous Annelids* (19).

La revisión tuvo como finalidad identificar especificaciones técnicas relacionadas con la ejecución de los ensayos, la observación y registro de signos clínicos, los cuales comprenden cualquier manifestación observable de alteración fisiológica o conductual de los organismos expuestos. Para ello, se analizaron aspectos como las condiciones experimentales, los tiempos de exposición, la frecuencia de observación, los criterios de mortalidad y los requerimientos de documentación, por constituir elementos comúnmente reconocidos como componentes esenciales en el diseño de ensayos de toxicidad acuática.

La información recopilada fue organizada mediante una tabla comparativa (Tabla 2), lo que permitió identificar coincidencias y vacíos en relación con el registro observacional de cada normativa. Asimismo, dicha revisión fundamentó el diseño del formato propuesto en el presente trabajo.

3.3. Obtención y revisión de formatos observacionales previos

Posterior a la autorización respectiva, se tuvo acceso a dos formatos observacionales facilitados por la investigadora a cargo del área. Estos formatos corresponden a bioensayos de toxicidad aguda (LC50) de una misma sustancia en peces del género *Skiffia*, realizados previamente por dos tesis distintas en el laboratorio. La elección de estos dos formatos fue en base a la disponibilidad en el laboratorio, dado que los ensayos de toxicidad aguda (LC50) se realizan en función de los proyectos de investigación específicos y no de forma rutinaria en el laboratorio.

Cada uno de los formatos proporcionados contiene el nombre de la especie en estudio, la hora de registro, la réplica correspondiente, las concentraciones de la sustancia a las que fueron sometidos los organismos, así como datos de mortalidad, comportamiento y observaciones adicionales (véase Anexo 1).

Una vez obtenidos los formatos, se procedió a su revisión y contraste con las normativas correspondientes, con el fin de verificar si estos contienen todos los datos y criterios relevantes para la realización de este tipo de ensayos. Asimismo, se evaluó la claridad en la descripción de los signos clínicos, la terminología empleada y el nivel de detalle con el que se registran dichos signos.

3.4 Elaboración del procedimiento y formato

3.4.1. Procedimiento para la ejecución de ensayos de toxicidad aguda (LC50) en peces

El procedimiento fue elaborado para dar respaldo al formato de registro de signos clínicos, ya que todo formato utilizado en un laboratorio debe estar respaldado por un procedimiento interno que precise las condiciones y la forma en que debe aplicarse. Dicho procedimiento se diseñó siguiendo directrices internacionales, tomando como base la revisión de normativas previamente analizadas en el presente trabajo y adaptándolas a las características, materiales y equipos disponibles en el laboratorio. La estructura del procedimiento comprende las secciones de objetivo, alcance, responsabilidades, información general, metodología de ensayo, datos y resultados, referencias y registros (Tabla 1). Entre ellas, la sección de información general especifica las condiciones del ensayo, modelos biológicos y los materiales y equipos requeridos, mientras que la sección de metodología detalla los aspectos técnicos para una correcta ejecución del ensayo.

Asimismo, el procedimiento incorpora un formato de registro observacional, orientado a garantizar una adecuada documentación de los signos clínicos durante el desarrollo de los ensayos de toxicidad letal media (LC50) en peces.

TABLA 1. Estructura del procedimiento para la realización de ensayos de toxicidad letal media (LC50) en peces.

OBJETIVO	Objetivo del documento elaborado
ALCANCE	Sustancias evaluadas en el ensayo
RESPONSABILIDADES	Personas responsables de realizar y supervisar el ensayo
INFORMACIÓN GENERAL	- Condiciones generales del ensayo - Modelos biológicos - Materiales y equipos
METODOLOGÍA DE ENSAYO	- Duración de la prueba (Fecha y hora) - Validación de la prueba - Preparación del organismo, calidad del agua - Cálculo y preparación de concentraciones de sustancias a evaluar - Elección de la dosis - Observación de signos clínicos y mortalidad
DATOS Y RESULTADO	- Procesamiento de los datos - Organización de la información para su interpretación
REFERENCIA	Documentos usados para la elaboración del procedimiento
REGISTRO	Formatos que son usados para la recopilación de información
HISTORIAL DE CAMBIOS	Ítem donde se recopila todas las modificaciones que tenga el documento

3.4.2. Formato para el registro de signos clínicos y seguimiento de bioensayos de toxicidad aguda (LC50) en peces

La elaboración del formato de registro observacional se realizó con la finalidad de estandarizar la recopilación de información relacionada con los signos clínicos observados durante los bioensayos de toxicidad aguda (LC50) en peces, así mismo también contempló el registro de parámetros experimentales.

Para su elaboración, se tomó como base la revisión de los formatos observacionales previamente utilizados en el laboratorio (Anexo 1), lo que permitió identificar limitaciones en la forma de documentación. Asimismo, se consideraron lineamientos y directrices de normativas internacionales aplicables a ensayos de toxicidad, con el propósito de respaldar técnicamente el formato propuesto.

El formato fue elaborado priorizando la adecuada organización y registro de la información. Este incluye secciones correspondientes a los datos generales del ensayo como: la especie en estudio, las condiciones experimentales, las concentraciones evaluadas y el número de réplicas, calidad del agua, medición de nitrato y nitrito y registro de la mortalidad. De igual modo contó con una sección para el registro observacional de los signos clínicos, los cuales se encuentran codificados, es decir tienen asignado un número con la finalidad de facilitar su registro en el formato durante el ensayo y mejorar la claridad de la documentación interna del laboratorio. Dicha numeración no corresponde a ningún nivel de gravedad, sino que cumple únicamente una función organizativa. Los signos clínicos incluidos en el formato fueron determinados a partir de la revisión de las normativas internacionales analizadas en el presente trabajo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Revisión de lineamientos normativos internacionales

Para la revisión normativa se seleccionaron tres guías internacionales de referencia en ecotoxicología acuática: la OECD N°203, la EPA OCSPP 850.1075 y la ASTM E1562, las cuales representan los principales organismos internacionales de regulación ambiental. Aunque la ASTM E1562 está orientada a poliquetos, su aporte radicó en su estructura metodológica, permitiendo contrastar los parámetros mencionados a continuación e identificar si se abordan consistentemente entre normativas, independientemente de la especie.

Con base a la revisión se identificaron los parámetros fundamentales para ser considerados dentro del formato, los cuales fueron: la duración del ensayo, la frecuencia de observación, registro de signos clínicos, condiciones experimentales y criterios de mortalidad.

La duración del ensayo es un criterio fundamental, ya que determina el período durante el cual los organismos están expuestos al tóxico y permite la detección de efectos letales y subletales en condiciones estandarizadas (1,6). La frecuencia de observación es igualmente relevante, pues una mayor frecuencia permite detectar de forma oportuna la aparición de signos clínicos y mortalidad, reduciendo el riesgo de subestimar los efectos del tóxico (15). El registro de signos clínicos constituye un parámetro esencial, ya que proporciona información sobre la respuesta biológica de los organismos más allá de la mortalidad, permitiendo identificar efectos subletales que pueden anticipar daños a largo plazo (2,3). Las condiciones experimentales, incluyendo temperatura, pH, oxígeno disuelto, fotoperiodo y calidad del agua, deben controlarse y registrarse obligatoriamente, dado que cualquier variación en estos factores puede alterar la respuesta de los organismos al tóxico y comprometer la

validez de los resultados (1,6). La temperatura influye directamente en el metabolismo de los organismos; el pH puede modificar la toxicidad efectiva de los compuestos evaluados; y el oxígeno disuelto, de no controlarse, puede generar signos clínicos por hipoxia que se confundan con efectos del tóxico (1,14). Finalmente, los criterios de mortalidad deben estar claramente definidos para garantizar uniformidad entre observadores y ensayos (6).

Del análisis comparativo (Tabla 2) se destaca que las tres normativas coinciden en establecer una duración de 96 horas para ensayos de toxicidad aguda y en requerir el registro de la sustancia evaluada, la especie, las concentraciones y el resultado de LC50 como requerimientos mínimos de documentación. Sin embargo, se identificaron diferencias relevantes en cuanto a la frecuencia de observación, el registro de signos clínicos y el control de condiciones experimentales. La guía OECD N°203 resultó ser la más completa en estos aspectos, al establecer una frecuencia de observación más estricta, incluir una lista detallada de signos clínicos subletales observables en peces y definir parámetros de calidad del agua más específicos. Por ello, fue seleccionada como principal referencia metodológica para la elaboración del procedimiento y el formato de registro desarrollado en el presente trabajo.

TABLA 2. Comparación de criterios metodológicos según OCSPP 850.1075, OECD N.º 203 y ASTM E1562

	OCSPP 850.1075	OECD N°203	ASTM E1562
Ejecución de los ensayos	Duración de 96h en sistemas estáticos, semi estáticos o de flujo continuo	Duración de 96h en sistemas estáticos, semi estáticos o de flujo continuo	Ensayos agudos, crónicos y de ciclo de vida con poliquetos. La ejecución depende de la especie y del tipo de prueba

Observación y registro de signos clínicos	La guía pide anotar cualquier signo tóxico visible (mortalidad, comportamiento o apariencia anormal)	Registrar mortalidad y signos clínicos visibles de manera más detallada (posee una lista amplia con signos subletales)	En poliquetos se registran principalmente supervivencia, muerte, reproducción y desarrollo.
Cambios de comportamiento	No especifica cuáles son esos signos clínicos concretos	Describe varios cambios de comportamiento, es la guía más detallada	No lo aborda de manera específica
Condiciones experimentales	Exige controlar temperatura, pH, oxígeno disuelto, fotoperiodo, tipo de agua y ausencia de alimentación durante el ensayo	Controla temperatura, pH, oxígeno, salinidad cuando aplica, luz, tamaño de los peces y calidad del agua	Las condiciones dependen de la especie.
Tiempos de exposición	Duración mínima de 96 horas	Duración fija de 96 horas	96 horas para agudo, más de 96 horas para crónico y varias semanas o meses para ciclo de vida
Frecuencia de observación	La mortalidad se registra a las 24, 48, 72 y 96 horas. Los signos clínicos no tienen frecuencia definida.	Observar al menos dos veces dentro de las primeras 24 horas y luego dos veces al día en los días 2 al 4	Registrar la mortalidad cada 24 horas
Criterios de mortalidad	Ausencia de movimiento visible ni reacción al tocar la base caudal	Ausencia de movimiento visible	En poliquetos se consideran muertos por coloración blanca opaca, inmovilidad y falta de reacción al estímulo suave.
Requerimientos de documentación	Reportar el nombre de la sustancia, dosis, especie, condiciones del ensayo, agua, controles, resultados LC50, análisis estadístico	Informe sobre la sustancia, peces, condiciones, preparaciones, concentraciones medidas, métodos estadísticos, LC50 y signos clínicos.	Documentar materiales, especies, condiciones experimentales, agua, alimento, duración, observaciones biológicas, resultados estadísticos, LC50 y cumplimiento de criterios de validez

4.2. Revisión de registros observacionales previos

Se realizó la revisión del formato actual del laboratorio, correspondientes a dos ensayos de toxicidad letal media, desarrollados por dos tesistas distintos (Anexo 1).

En primer lugar, se observó que el registro en la sección de comportamiento se realizó de forma libre, sin contar con categorías ni escalas definidas. No obstante, se identificó el uso de algunas abreviaturas por parte de cada tesista; sin embargo, estas no se encontraban estandarizadas ni codificadas, lo que genera dificultades al momento de interpretar dicha sección.

En cuanto a la variabilidad de la terminología, se evidenció que un mismo tesista utilizó diferentes términos para referirse a un mismo signo clínico. Por ejemplo, inicialmente registró el número de organismos ubicados en el fondo de la pecera y, horas más tarde, consignó el término “pérdida de flotabilidad”, lo que permite inferir que ambos registros hacían referencia al mismo signo clínico. De manera similar, empleó los términos “hiperventilando” y “boqueo” para describir un mismo signo, evidenciando falta de consistencia terminológica.

Respecto al nivel de detalle, se identificó una inconsistencia entre los tesistas, ya que uno de ellos utilizaba únicamente abreviaturas para el registro de signos, mientras que el otro proporcionaba descripciones más específicas.

Por lo expuesto, se evidencia la existencia de dificultades en la interpretación de los registros, lo que a su vez limita su comparabilidad entre ensayos realizados en el mismo laboratorio, incrementando el grado de subjetividad. Además, el formato evaluado carece de algunos ítems que la guía OECD N.º 203 establece como requerimientos dentro de la documentación, como por ejemplo los parámetros fisicoquímicos del agua, condiciones

ambientales del ensayo e información sobre la norma técnica empleada, aspectos que la guía OECD N°203 establece como requerimiento de documentación (7).

Estas limitaciones resultan relevantes, ya que diversos estudios señalan que los signos clínicos observados en peces representan indicadores sensibles a la exposición de contaminantes. Entre ellos, las alteraciones conductuales destacan por manifestarse tempranamente, incluso antes de la aparición de efectos letales o daños morfológicos visibles (20,16) Por ende, un registro organizado de estos signos clínicos y según lo establecido por las normas ayudará a complementar la evaluación ecotoxicológica y mejorar la interpretación de los efectos fisiológicos generados por los contaminantes (20,21).

4.3. Elaboración del procedimiento experimental y formato de registro de datos

Como resultado de lo expuesto anteriormente, se elaboró un procedimiento experimental y un formato para bioensayos de toxicidad aguda (LC50) en peces; donde se detalla cómo realizar la evaluación y la toma de datos, los cuales se presentan en el Anexo 2 y Anexo 3, respectivamente.

El procedimiento experimental incorpora aspectos relacionados con la preparación de ensayos, acondicionamiento de organismos, validación experimental, calidad de agua y procesamiento de resultados. Su elaboración tomó como base las normativas internacionales previamente analizadas, adaptándolas a las condiciones y recursos específicos del laboratorio, lo que constituye un beneficio para la trazabilidad documental y el control metodológico.

Por otro lado, el formato fue elaborado para sintetizar la recopilación de la información correspondiente a los ensayos generales, parámetros fisicoquímicos del agua, mortalidad y registro observacional de signos clínicos. La incorporación de esta sección se debe a los requerimientos identificados en la revisión normativa y a las deficiencias encontradas en el formato previo del laboratorio.

Con respecto al registro observacional, el formato incorpora una clasificación estructurada de signos clínicos organizados en tres categorías: pérdida del equilibrio, comportamiento anormal de natación y función respiratoria anormal (véase Tabla 1 Anexo 2). Dichos signos fueron tomados de la lista de efectos subletales observables descrita en la guía OECD N.º 203, por ser la normativa que proporciona el mayor nivel de detalle en este aspecto.

Con el fin de estandarizar la terminología empleada durante los ensayos, se elaboró una tabla de referencia (Tabla 1), incluida en el procedimiento, que contiene la clasificación completa de los signos clínicos, sus definiciones y los sinónimos identificados en la literatura y en los registros previamente revisados. No obstante, debido a la amplitud de signos clínicos que pueden presentarse durante un bioensayo de toxicidad aguda, se consideró poco práctico incluir la totalidad de ellos en el formato de registro. Por esta razón, el formato incorpora únicamente un cuadro resumen con los principales signos clínicos reportados con mayor frecuencia en la literatura, cada uno con su respectiva codificación.

A cada signo clínico incluido en el formato se le asignó un código numérico de elaboración propia, cuya función es exclusivamente organizativa. De este modo, el analista consigna el código correspondiente al signo observado junto con la cantidad de organismos afectados, permitiendo un registro más rápido y estandarizado durante el monitoreo experimental. Cabe señalar que dicha codificación no implica ningún orden de importancia ni jerarquía de gravedad entre los signos clínicos.

La implementación de este sistema de codificación permite además reducir la variabilidad terminológica identificada en los registros previos, al eliminar la necesidad de redactar descripciones libres durante el ensayo y establecer un vocabulario común para todos los analistas del laboratorio. Estudios recientes señalan que la estandarización de los métodos de observación y registro es clave para mejorar la reproducibilidad y comparabilidad de los resultados en estudios ecotoxicológicos (15,17,20).

V. CONCLUSIONES

- La revisión de guías y normativas internacionales, permitió la identificación de criterios metodológicos y parámetros observacionales importantes para la elaboración de un procedimiento aplicable a bioensayos de toxicidad aguda en peces.
- El análisis de los formatos observacionales previos evidenció variaciones en la forma de documentar las observaciones conductuales y experimentales, lo que dificulta la uniformidad y trazabilidad de la información obtenida durante el bioensayo.
- La elaboración del procedimiento y del formato permitió establecer una propuesta orientada a mejorar la sistematización y trazabilidad de la información generada durante los bioensayos de toxicidad aguda (LC50) en peces dentro del laboratorio.
- La elaboración de un procedimiento según lo establecen los sistemas de gestión, permitió establecer una secuencia organizada para la ejecución y seguimiento de ensayos de toxicidad aguda (LC50), contribuyendo a una mayor sistematización en el desarrollo de los bioensayos y en el registro de información experimental.
- La incorporación de una escala de evaluación basada en puntajes favorece una interpretación más uniforme de los signos clínicos observados y facilita el análisis comparativo de las respuestas registradas durante el ensayo.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Rand GM. Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate, and risk assessment. *Water SA*. 2005;31(4):583–584. doi: 10.1080/02508060508691889
2. Bownik A. Behavioral endpoints in aquatic toxicology. En: Férard JF, Blaise C, editores. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Cham: Springer; 2020. p. 1–12. doi: 10.1007/978-3-030-45909-3_24
3. Bownik A, et al. Behavioral responses of aquatic organisms as indicators of environmental contamination. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2023;30:31440–31455. doi: 10.1007/s11356-023-31440-5
4. Villa-Villaseñor IM, Yáñez-Rivera B, Rueda-Jasso RA, Herrera-Vargas MA, Hernández-Morales R, Meléndez-Herrera E, et al. Differential sensitivity of offspring from four species of goodeine freshwater fish to acute exposure to nitrates. *Front Ecol Evol*. 2022;10:1014814. doi: 10.3389/fevo.2022.1014814
5. Rueda-Jasso RA, De los Santos-Bailón A, Fuentes-Farias AL, Gutierrez-Ospina G. Toxicidad letal y subletal del fosfato de sodio dibásico y efectos en branquias y conducta de las crías del pez goodeido *Skiffia multipunctata*. *Hidrobiológica*. 2014 Dec;24(3):207-214. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972014000300004&lng=es [cited 2026 Mar 23].
6. Rand GM, editor. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. 2nd ed. CRC Press; 1995. doi: 10.1201/9781003075363
7. Organisation for Economic Co-operation and Development. Guía de buenas prácticas de la OCDE [Internet]. Paris: OECD Publishing; 2023 [cited 2026 Mar 15]. Available from: <https://www.oecd.org>

8. Kim JH, Kang YJ, Kim KI, Kim SK, Kim JH. Toxic effects of nitrogenous compounds (ammonia, nitrite, and nitrate) on acute toxicity and antioxidant responses of juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Environ Toxicol Pharmacol.* 2019;67:73–78. doi: 10.1016/j.etap.2019.02.001
9. United States Environmental Protection Agency. *OCSPP 850.1075: Freshwater and saltwater fish acute toxicity test*. Washington, DC: Office of Chemical Safety and Pollution Prevention; 2016.
10. Villa-Villaseñor IM, Herrera-Vargas MA, Yáñez-Rivera B, Uribe MC, Rueda-Jasso RA, Phillips-Farfán BV, et al. Realistic nitrate concentrations diminish reproductive indicators in *Skiffia lermæ*, an endemic species in critical endangered status. *PeerJ.* 2023;11:e17876. doi: 10.7717/peerj.17876
11. Sloman KA, McNeil PL. Using physiology and behaviour to understand the responses of fish early life stages to toxicants. *J Fish Biol.* 2012;81(7):2175–2198. doi: 10.1111/j.1095-8649.2012.03435.x
12. Thunga P, Truong L, Tanguay RL, Reif DM. Concurrent evaluation of mortality and behavioral responses: a fast and efficient testing approach for high-throughput chemical hazard identification. *Front Toxicol.* 2021;3:670496. doi: 10.3389/ftox.2021.670496
13. Petersen BD, Bertonecello KT, Bonan CD. Standardizing zebrafish behavioral paradigms across life stages: an effort towards translational pharmacology. *Front Pharmacol.* 2022;13:833227. doi: 10.3389/fphar.2022.833227
14. Nikinmaa M, Anttila K. Individual variation in aquatic toxicology: Not only unwanted noise. *Aquat Toxicol.* 2019;207:29–33. doi: 10.1016/j.aquatox.2018.11.021

15. Melvin SD, Petit MA, Duvignacq MC, Sumpter JP. Towards improved behavioural testing in aquatic toxicology: acclimation and observation times are important factors when designing behavioural tests with fish. *Chemosphere*. 2017;180:430–436. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.04.058
16. Eguiraun H, Martinez I. Non-linear analyses of fish behaviours in response to aquatic environmental pollutants: a review. *Fishes*. 2023;8(6):311. doi: 10.3390/fishes8060311
17. Karmaus AL, Kreutz AL, Oyetade O, Friedman KP, Paparella M, Reinke EN, et al. Perspectives on variability of in vivo toxicology studies: considerations for next-generation toxicology. *Front Toxicol*. 2026;8:1778353. doi: 10.3389/ftox.2026.1778353
18. Polverino G, Aich U, Brand JA, Bertram MG, Martin JM, Tan H, et al. Sex-specific effects of psychoactive pollution on behavioral individuality and plasticity in fish. *Behav Ecol*. 2023;34(6):969–978. doi: 10.1093/beheco/arad065
19. ASTM International. *ASTM E1562-00(2018): Standard guide for conducting acute, chronic, and life-cycle toxicity tests with polychaetous annelids*. West Conshohocken (PA): ASTM International; 2018.
20. Porras-Rivera G, Górski K, Colin N. Behavioral biomarkers in fishes: a non-lethal approach to assess the effects of chemical pollution on freshwater ecosystems. *Environ Res*. 2024;260:119607. doi: 10.1016/j.envres.2024.119607
21. Calisi A. Integrating bioindicators and biomarkers in aquatic ecotoxicology: an overview. *Appl Sci (Basel)*. 2023;13(21):11920. doi: 10.3390/app132111920

ANEXOS

ANEXO 1: Formatos de registro previamente empleados en el laboratorio

Formato correspondiente al testista 1.

Especie: <i>Skiffia francesae</i>				
Horario	NO3-N mg/L Nominal	Mortalidad	Comportamiento	Observaciones
0.5 horas				
Replica 1	Control	0	N7	
	100	0	N7	
	200	0	N7	
	400	0	1 superficie	
	800	0	1 superf. (el + pequeño)	
	1200	0	1 Nota plagada	
Replica 2	Control	0	N7	
	100	0	N7	
	200	0	N7 forrajeo	
	400	0	N7	
	800	0	2 forrajeando	
	1200	0	1 superficie	
Replica 3	Control	0	N7	
	100	0	N7 (forrajeo)	
	200	0	1 en la superficie	
	400	0	N7 forrajeo	
	800	0	N7	
	1200	0	1 tomo aire de la superficie	
1 horas				
Replica 1	Control	0	N7	
	100	0	N7	
	200	0	1 superficie	
	400	0	2 superficie	
	800	0	1 Superficie, hipoactividad	
	1200	0	forrajeo	
Replica 2	Control	0	N7	
	100	0	1 hipoactividad	
	200	0	1 AP	
	400	0	2 forrajeo, 1 superficie	
	800	0	hipoactividad	
	1200	0	forrajeo, 1 hipoactividad	
Replica 3	Control	0	forrajeo	
	100	0	3 hipoactividad	
	200	0	2 superficie, 1 AP	
	400	0	1 fondo, 4 AP	
	800	0	2 forrajeo	
	1200	0	fondo nadando	
2 horas				
Replica 1	Control	0	N7	
	100	0	N7	
	200	0	2 superficie	
	400	0	2 forrajeo 1 superficie boqueo	
	800	0	1 fondo 1 superficie 4 AP	
	1200	0	3 fondo AP	
Replica 2	Control	0	N7	
	100	0	2 hipoactividad	

Horario	NO3-N mg/L Nominal	Mortalidad	Comportamiento	Observaciones
	200	0	3 superficies 1 boqueo	
	400	0	3 AP	
	800	0	1 superficie hiporactividad	
	1200	0	1 fondo	
Replica 3	Control	0	N7	
	100	0	3 superficies, 1 fondo hiporactividad	
	200	0	1 superficie, 1 AP	
	400	0	1 fondo hiporactividad	
	800	0	hiporactividad	
	1200	0	nado parte inferior	
3 horas				
Replica 1	Control	0	N7	
	100	0	N7	
	200	0	1 superficie 1 boqueo 3 AP	
	400	0	1 superf. 1 boqueo	
	800	0	1 superficie, 2 fondo, 2 AP	
	1200	0	3 fondo hiporactividad 2 AP	
Replica 2	Control	0	N7	
	100	0	hiporactividad	
	200	0	2 superf. boqueo AP	
	400	0	1 superficie, 3 AP, hiporactividad	
	800	0	hiporactividad	
	1200	0	1 fondo, hiporactividad	
Replica 3	Control	0	1 superficie	
	100	0	4 AP, 1 superficie	
	200	0	1 superf. boqueo	
	400	0	2 fondo, hiporactividad 3 AP	
	800	0	1 fondo hiporactividad	
	1200	0	2 fondo 3 AP 1 HV	
4 horas				
Replica 1	Control	0	N7	
	100	0	1 boqueo	
	200	0	1 boqueo 1 forro	
	400	0	2 superficies boqueo	
	800	0	1 foca reacción al estímulo, 2 fondo, 3 AP	
	1200	0	3 fondo 1 boqueo 3 AP	
Replica 2	Control	0	N7	
	100	0	1 fondo	
	200	0	1 superficie, 1 boqueo, 2 AP	
	400	0	3 fondo hiporactividad, 2 AP, hiperventilación	
	800	0	3 superficie boqueo hiporactividad	
	1200	0	1 fondo, 1 x, hiporactividad, AP	
Replica 3	Control	0	N7	
	100	0	2 boqueo	
	200	0	1 superficie 3 AP	
	400	0	3 fondo hiporactividad	
	800	0	hiporactividad 1 boqueo	
	1200	0	4 AP, 1 fondo	

Horario	NO3-N mg/L Nominal	Mortalidad	Comportamiento	Observaciones
5 horas				
Replica 1	Control	0	1 boqueo	
	100	0	4 medio	
	200	0	1 superficie 1 forrajeo 2 AP	
	400	0	1 superficie boqueo, 1 HV	
	800	0	3 fondo 1 AP 1 boqueo	
	1200	0	3 fondo, 1 nadado inclinado AP, 1 HV boqueo	
Replica 2	Control	0	N7	
	100	0	3 fondo	
	200	0	3 superficie 2 AP hipoactividad	
	400	0	3 fondo 2 AP	
	800	0	1 superficie, 2 fondo, 1 AP	
	1200	0	1 fon	
Replica 3	Control	0	2 superficie	
	100	0	2 superficie, 2 AP	
	200	0	1 superficie 2 AP	
	400	0	5 fondo	
	800	0	4 fondo 1 forrajeo Hipoactividad	
	1200	0	3 fondo, 1 agresivo (mordida), 1 HV	
6 horas				
Replica 1	Control	0	N7	
	100	0	1 fondo 1 forrajeo	
	200	0	7 medio hipoactividad	
	400	0	1 superf, 1 hipoactividad	
	800	0	Poca reacción al estímulo, 9 fondo pérdida flotabilidad	
	1200	0	3 fondo HV	
Replica 2	Control	0	N7	
	100	0	2 fondo	
	200	0	2 superf hipoactividad	
	400	0	2 superf 1 fondo 1 AP	
	800	0	2 fondo, 4 AP	
	1200	0	1 superf 1 fondo, si reacción estímulo, 1 boqueo Hipoactividad	
Replica 3	Control	0	N7	
	100	0	3 AP	
	200	0	2 superf 4 medio letargo	
	400	0	2 fondo 1 hiperactividad, 1 pérdida de flotabilidad	
	800	0	1 poca reacción al estímulo, 5 fondo, 1 agonista	
	1200	0	2 fondo, 1 pérdida de flotabilidad, hipoactividad	
12 horas				
Replica 1	Control	0	N7	
	100	0	2 fondo hipoactividad	
	200	0	1 fondo hipoactividad	
	400	0	1 fondo vertical 3 fondo 1 HV	
	800	1	4 fondo 1 superf 2 agonizando	
	1200	0	6 fondo, 1 espasmos, 3 agonizando	
Replica 2	Control	0	N7	
	100	0	2 fondo	
	200	0	3 fondo hipoactividad 1 AP	

Horario	NO3-N mg/L Nominal	Mortalidad	Comportamiento	Observaciones
	400	0	2 fondo hipocatividad 1 Agresivo	
	800	0	6 agonizando de lado, 1 fondo, 6 HV	
	1200	1	5 fondo, 3 agonizando hipocatividad, 1 Nado anormal 1 HV	
Replica 3	Control	0	N7	
	100	0	1 superf, 1 fondo	
	200	0	5 fondo 1 Superficie	
	400	0	4 fondo 1 superf 1 Agonizando de lado, 1 canibalismo 1 boqueo 1	
	800	0	7 fondo Agonizando, 1 enervado, 7 HV	
	1200	0	1 superf agonizando, 5 fondo, 1 boqueo, 1 espasmos, 1 corkscrew	
24 horas				
Replica 1	Control	0	N7	
	100	0	1 fondo, 4 AP, 1 hipocatividad	
	200	0	2 tetania 1 curvado, 1 semimuerto de lado pero aun reaccion a los	
	400	3	3 tetania, 1 canibalismo, 1 Nado de costado, 1 agonizando, 1 HV	
	800	0	4 corkscrew, 4 agonizando, 1 Nado de lado HV	
	1200	0	7 agonizando hipocatividad, 2 boqueo	
Replica 2	Control	0	N7	
	100	2	2 muertos tetania los 2 pequeños, 1 fondo HV, 1 boqueo	
	200	0	4 HV, 2 fondo, Nado anormal Horizontal	
	400	2	1 corkscrew, 1 canibalismo, 1 lado inclinado, 2 agonizando, 4 AP	
	800	1	1 tetania, 5 moribundo hipocatividad de lado, 1 Nado de lado boqueo	
	1200	0	6 agonizando, 5 boca abierta, 1 nado corkscrew, 1 nado horizontal	
Replica 3	Control	0	N7	
	100	0	1 Superf, 2 boqueo, 2 HV	
	200	2	2 tetania boca abierta aleta extendida, 3 fondo, 1 Nado *	
	400	3	3 tetania, 2 agonizando, 1 canibalismo, 2 hiperactividad	
	800	0	7 agonizando 7 fondo 7 HV, 7 hipocatividad	
	1200	2	2 tetania, 5 agonizando, 1 encuerado, 5 boqueo HV, Nado horizontal	
36 horas			irregular	
Replica 1	Control	0	N7	
	100	0	1 boqueo, 6 hipocatividad	
	200	1	1 tetania, 4 fondo, 4 HV	
	400	2	2 tetania, perdida de flotabilidad, 2 fondo HV boqueo	
	800	2	3 fondo boqueo, 3 HV, 2 tetania	
	1200	2	4 agonizando, espasmos, 3 tetania	
Replica 2	Control	0	N7	
	100	2	2 tetania, 3 AP, 1 boqueo	
	200	1	1 agresividad, 1 tetania, 1 convulsiones, 3 boqueo 3 agonizando	
	400	1	1 tetania, 1 AP, 3 boqueo fondo HV	
	800	1	1 tetania, 5 agonizando HV, espasmos	
	1200	1	1 tetania, No flotabilidad	
Replica 3	Control	0	N7	
	100	0	3 HV, 7 hipocatividad	
	200	1	1 tetania, 1 boqueo, 2 fondo HV	
	400	3	1 tetania, 2 agonizando, boca abierta	
	800	1	6 agonizando fondo, HV, sin flotabilidad	
	1200	3	2 agonizando HV, boqueo	

Horario	NO3-N mg/L Nominal	Mortalidad	Comportamiento	Observaciones
48 horas				
Replica 1	Control	0	N7	
	100	0	2 fondo, 1 Forrajeo	
	200	1	3 AP, 1 pérdida de Flotabilidad, 3 HV	
	400	1	1 agonizando, Hipoactividad, fondo, pado delado, HV	
	800	2	1 edema, 2 HV, Fondo, boqueo	
	1200	3	1 tetania, 2 Fondo HV, boqueo, Hipoactividad, agonizando	
Replica 2	Control	0	N7	
	100	1	1 boqueo, 2 AP, 1 tetania	
	200	2	1 pérdida Flotabilidad, 3 AP HV, tetania	
	400	0	2 Hipoactividad, HV, espasmos, boqueo	
	800	1	1 muerto, tetania, 4 HV, boqueo, fondo, agonizando	
	1200	2	3 HV, boqueo, fondo, espasmos	
Replica 3	Control	0	N7	
	100	0	2 Superf. HV, 1 fondo HV, 2 medio AP, 1 boqueo, Hipoactiv.	
	200	1	1 tetania, 1 boqueo HV, 1 fondo, 3 AP, 1 estema ocular (muerto)	
	400	2	1 tetania, 2 boqueo HV, fondo AP	
	800	4	2 Hipo fondo, HV, boqueo	
	1200	2	2 muertos	
60 horas				
Replica 1	Control	0	N7	
	100	0	4 fondo, 5 HV, 1, hipo actividad 3	
	200	2	2 tetania, 1 convulsión	
	400	0	1 fondo boqueo HV, 1 fondo mani HV	
	800	1	1 tetania, 1 fondo HV, boqueo	
	1200	0	2 fondo HV grandes	
Replica 2	Control	0	N7	
	100	0	1 fondo, 2 HV, 1 agresividad	
	200	2	1 fondo boqueo HV AP, 1 comenzando vulto en cabeza	
	400	1	—	
	800	2	1 tetania, 2 fondo agonizando HV	
	1200	1	1 tetania, 2 fondos espasmos HV, boqueo	
Replica 3	Control	0	N7	
	100	0	1 superf, 6 medio	
	200	1	1 fondo, 2 boqueo HV AP, 1 inmovil, 1 movi, 1 tetania	
	400	1	1 muerto, 1 HV fondo inmovil	
	800	2	2 tetania	
	1200	—	—	
72 horas				
Replica 1	Control	0	N7, 1 forrajeo	
	100	0	1 fondo agonizando HV, 1 pérdida de Flotabilidad, 2 fondo boqueo	
	200	0	1 fondo hipoactividad	
	400	—	—	
	800	0	1 fondo, espasmos, HV, AP	
	1200	2	2 tetania	
Replica 2	Control	0	N7	
	100	0	1 Fondo HV, 1 Hipoact. HV, boqueo medio de la columna	
	200	0	1 boqueo, AP, Hipoact. HV, Superficie	

Horario	NO3-N mg/L Nominal	Mortalidad	Comportamiento	Observaciones
	400	0	1 fondo, espasmos, saltos, Hv, boqueo, AP, cuerpo curvo	
	800	1	1 tetania, 2 fondo, Hv, boqueo, AP	
	1200	1	1 fondo, Hv, boqueo, 1 tetania	
Replica 3	Control	0	1 superficie	
	100	0	3 forrajeo, 1 hipo actividad, 1 pérdida de Flotabilidad	
	200	0	1 pérdida de Flotabilidad, AP, nado acostado	
	400	0	2 fondo, espasmos, brinco, Hv	
	800	-	-	
	1200	-	-	
84 horas				
Replica 1	Control	0	N7	
	100	1	3 fondo, espasmos, Hv, 3 fondo hipo actividad, 1 tetania	
	200	0	1 fondo Hv, pérdida de equilibrio	
	400	-	-	
	800	0	1 fondo, Hv	
	1200	-	-	
Replica 2	Control	0	N7	
	100	0	2 fondo, hipo actividad, AP	
	200	1	1 tetania, 1 fondo Hv, AP	
	400	1	-	
	800	0	1 fondo Hv	
	1200	0	1 Hv fondo	
Replica 3	Control	0	N7	
	100	0	N7	
	200	1	1 tetania, 1 AP, pérdida de equilibrio	
	400	0	2 fondo espasmos Hv	
	800	-	-	
	1200	-	-	
96 horas				
Replica 1	Control	0	N7	
	100	1	2 fondo boqueo Hv, espasmos, 3 fondo Hv	
	200	0	1 AP, Hv, pérdida de Flotabilidad	
	400	-	-	
	800	1	1 tetania	
	1200	-	-	
Replica 2	Control	0	N7	
	100	0	1 fondo Hv, nado movimiento lento, 1 fondo espasmos Hv	
	200	0	1 fondo AP	
	400	-	-	
	800	1	tetania, cuerpo curvo	
	1200	1	-	
Replica 3	Control	0	N7	
	100	0	4 AP, 2 forrajeo, Hipo actividad	
	200	0	1 fondo Hv, AP, Nado de lado	
	400	1	1 Hv fondo hechado	
	800	-	-	
	1200	-	-	

Formato correspondiente al tesista 2

Especie: <u>20 de Mayo Skiffia lemanae</u>					
Horario	NO3-N mg/L Nominal	Hora	Mortalidad	Comportamiento	Observaciones
7:30					
0.5 horas	8:00				
Replica1	Control		0	N-N, E-10	
7:30	100	8:00	0	N-10, E-10	
7:35	200	8:05	0	E-10, N-10	
7:40	400	8:10	0	E-10, N-10	
7:50	600	8:20	0	E-10, N-10	
8:00	800	8:30	0	E-10, N-10	
Replica2	Control		0	N-10, E-10	
	100		0	N-10, E-10	
	200		0	E-10, N-10	
	400		0	E-10, N-10	
	600		0	E-10, N-10	
	800		0	E-10, N-10	
Replica3	Control		0	E-10	
	100		0	N-10, E-10	
	200		0	E-10, N-10	
	400		0	E-10, N-10, B-1	
	600		0	E-10, N-10	
	800		0	N-10, E-10	
1 horas	8:30				
Replica1	Control		0	E-10, N-10 <i>condunen</i>	
	100	8:30	0	E-10, N-10	
	200	8:35	0	E-10, N-10, B-3	
	400	8:40	0	E-10, N-10	
	600	8:50	0	E-10, N-10	
	800	9:00	0	E-10, N-10	
Replica2	Control	0	0	E-F-10, N-10	
	100	0	0	E-10, N-10	
	200	0	0	E-10, N-10	
	400		0	E-10, N-10	
	600		0	E-10, N-10	
	800		0	F-10	
Replica3	Control		0	E-F-10, N-10	
	100		0	E-10, N-10	
	200		0	E-10, N-10	
	400		0	E-10, N-10	
	600		0	E-10, N-10	
	800		0	E-10, N-10	

Ubicación en el acuario: Fondo - F, Superficie - S, Enmedio - E

Letargo L

baquera b

Pérdida de equilibrio P

Horario	NO3-N mg/L Nominal	Hora	Mortalidad	Comportamiento	Observaciones
2 horas					
Replica1	Control		0	E - Fondo, N-10	
	100	9:30	0	E-10, N-10	
	200	9:35	0	E-10, N-10	
	400	9:40	0	E-10, N-10	
	600	9:50	0	E-10, N-10	
	800	10:00	0	E-10, N-10	
Replica2	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-10, N-10	
	200		0	E-10, N-10	
	400		0	E-10, N-10	
	600		0	E-10, N-10	
	800		0	E-10, N-10	
Replica3	Control		0	E - Fondo - N-10	
	100		0	N-10, E-10	
	200		0	E-10, N-10	
	400		0	E-10, N-10	
	600		0	E-10, N-10	
	800		0	E-10, N-10	
3 horas					
Replica1	Control		0	E-10, N-10	
	100	10:30	0	E-10, N-10	
	200	10:35	0	E-10, N-10	
	400	10:40	0	E-10, N-10	
	600	10:50	0	E-10, N-10	
	800	11:00	0	E-10, N-10	
Replica2	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-10, N-10	
	200		0	E-10, N-10	
	400		0	E-10, N-10	
	600		0	E-10, N-10	
	800		0	E-10, N-10	
Replica3	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-10, N-10	
	200		0	E-10, N-10	
	400		0	E-10, N-10	
	600		0	E-10, N-10	
	800		0	E-10, N-10	

Horario	NO3-N mg/L Nominal	Hora	Mortalidad	Comportamiento	Observaciones
4 horas					
Replica1	Control		0	E-10, N-10	
	100	11:30	0	E-10, N-10	
	200	11:35	0	E-10, N-10	
	400	11:40	0	E-10, N-10	
	600	11:50	0	E-10, N-10	
	800	12:00	0	E-10, N-10	
Replica2	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-10, N-10	
	200		0	E-10, N-10	
	400		0	E-10, N-10	
	600		0	E-10, N-10	
	800		0	E-10, N-10	
Replica3	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-10, N-10	
	200		0	E-10, N-10	
	400		0	E-10, N-10	
	600		0	N-7, E-10, Algas ple-3	
	800		0	N-10, E-10	
5 horas					
Replica1	Control	12:30	0	E-10 - N-10	
	100		0	E-10 - N-10	
	200	12:35	0	E-10 - N-10	
	400	12:40	0	E-10 - N-10	
	600	12:50	0	E-10 - N-10	
	800	1:00	0	E-10, N-10	
Replica2	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-10, N-10	
	200		0	E-10, N-10	
	400		0	E-10, N-10	
	600		0	E-10, N-10	
	800		0	E-10, N-10	
Replica3	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-10, N-10	
	200		0	E-10, N-10	
	400		0	E-10, N-10	
	600		0	Algas ple-3, N-7, E-10	
	800		0	N-10, E-10	

Horario	NO3-N mg/L Nominal	Hora	Mortalidad	Comportamiento	Observaciones
6 horas					
Replica1	Control		0	E-10, N-10	
	100	1:30	0	E-10, N-10	
	200	1:35	0		
	400	1:40	0		
	600	1:50	0		
	800	2:00	0	E-10, N-10	
Replica2	Control		0		
	100		0		
	200		0		
	400		0		
	600		0		
	800		0	E-10, N-10	
Replica3	Control		0	E-10	
	100		0	E-10	
	200		0	E-10	
	400		0	E-10	
	600		0		
	800		0	F-2, E-8, N-8	
12 horas					
Replica1	Control				
	100	7:30	0	E-10, N-10	
	200	7:35	0	E-10, N-10	2-alelas, L-2, cabeza más pesada
	400	7:40	0	E-10, N-10	
	600	7:50	0	E-10, N-10	
	800	8:00	0	3-alelas, F-6, E-4,	
Replica2	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-10, N-10	
	200		0	E-10, N-10	
	400		0	E-10, N-10	
	600		0	E-10, N-10	
	800		0	L-2, F-2, E-8	
Replica3	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-10, N-10	
	200		0	E-10, N-10	
	400		0	E-10, N-10	
	600		0	L-3, F-3, CC-1, E-8	
	800		0	F-6, 3-E, 1-S	

Horario	NO3-N mg/L Nominal	Hora	Mortalidad	Comportamiento	Observaciones
24 horas					
Replica1	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	F-3, E-7, L-10-4	
	200		0	E-3, E-7	
	400		0	F-4, E-6 poco movimiento	
	600		0	F-5, E-5 poco movimiento	
	800		0	F-10, L-7, hiper-ventilando	
Replica2	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-10, N-10	
	200		0	E-10, N-10	
	400		0	E-10,	
	600		0	F-5, E-5 L-5	
	800		0	F-10, L-2, nada de lado-3	
Replica3	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-10	
	200		0	E-6, E-4	
	400		0	S-4, B-3, E-6	
	600		0	S-1, E-5, L-5, E-4	
	800		0	F-9, S-1, L-9	
36 horas					
Replica1	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-10, 2-alelas elegantes, L-1	
	200		0	E-10, 3-alelas	
	400		0	F-7, S-1, B-1, E-2, cc-6, 3 nada cruz-znc, 7-alelas	
	600		0	F-9, E-1, cc-7, alelas-9, zic-zic	
	800		0	F-8, 2 alelas - hipur, b-2, cc-10, alelas-10 L-5	
Replica2	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-9, F-2, cc-2, alelas 2	
	200		0	E-10	
	400		0	F-1, E-9, alelas 3	
	600		0	F-8, E-1, S-1, b-1 a-9, alelas 9, L-9	
	800		3	S-2, b-2, p-3, F-5	
Replica3	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-9, F-1, alelas-2, L-2 cc-2	
	200		0	E-10-alelas-2, cc-2,	
	400		0	F-5, 2-5, 2-8, E-3, cc-7, alelas-4, p-2	
	600		1	ale - F-6, b-3 - S-3, cc-9, alelas-9, L-9, de lado 1	
	800		1	F-7, b-2, S-2, E-1, alelas-10, zic-zic-10,	

de lado-3,

Horario	NO3-N mg/L Nominal	Hora	Mortalidad	Comportamiento	Observaciones
48 horas					
Replica1	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	F-5, E-5, L-7, aletas 5	
	200		0	F-6, cc-3, aletas-3	Murieron 2 alacranes hembra
	400		0	4-acostados, F-80, P-2, cc-10, aletas 10, lado-3	
	600		0	F-8, b-2, E-2, cc-10, aletas-10, v.c.-10, P-2	
	800		6	3-acostados 1- de lado, L-3, cc-3	
Replica2	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-9, cc-2, aletas 2, acostado -1	
	200		0	E-10, 2 cabeca mirando	
	400		0	cabeca mas pesada-2, F-2, E-7, cc-3, aletas 10	
	600		0	2-S, 8-F, P-4, L-8, cc-10, aletas-10	
	800		2	b-1, 2-acostados, 1-de lado, P-2, F-2	
Replica3	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	cc-2, E-10, aletas-2,	
	200		0	E-10, aletas-1	
	400		0	cc-10, F-4, E-6, aletas-10	
	600		0	b-1, F-8-Acostado-1, lado-1, L-8, P-1	
	800		1	b-1, P-2, F-6, 3-acostados, lado-3	
60 horas					
Replica1	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-9, F-1, cc-2, P-2, aletas 2	
	200		0	E-7, F-3, cc-3, aletas 3	
	400		0	F-8, E-3, acostados-3, L-4	cc-10, aletas-10
	600		0	S-2, F-1, E-1, acostado-2, de lado 2, L-5, P-2	
	800		2-4	Acostados-2	
Replica2	Control		0	E-10, N-10	
	100		1	E-9, cc-1, aletas 1	
	200		0	E-10	
	400		0	Acostado-1, F-5, E-6, L-3, cc-4, aletas 10	
	600		1	F-9, Acostado-3, cc-9, aletas	
	800		1	3-acostados, 1- por el b-1	
Replica3	Control		0	N-10, E-10	
	100		1	E-9, N-9	
	200		0	E-10, de formidad es largo-3	
	400		0	S-1, F-9, cc-10, aletas 10	
	600		1	F-8, cc-8, aletas-8, b-1, 4 de lado P-6	
	800		2	S-1, F-5, 4-acostados, 1-lado, b-1	

Horario	NO3-N mg/L Nominal	Hora	Mortalidad	Comportamiento	Observaciones
72 horas					
Replica1	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	F-E-10, L-10	
	200		0	E-F-9, S-1, aletas 8	
	400		2	F-8, Acastados-3, S-1, C-1	
	600		1	F-8, S-1, C-1, Acastados 3, lado 5, P-8	
	800		0+1	Acastados-2	
Replica2	Control		0	G-10, N-10	
	100		0	E-F-9, CC-1, aletas 1, cabeza parada-1	
	200		0	E-F-10, más lentos, aletas	
	400		1	F-9, Acastados-2, CC-8, aletas	
	600		1	F-8, Acastados 4, lado 2	
	800		2	2 Acastados	
Replica3	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-9, CC-1, aletas 1	
	200		0	E-F-10, lentos	
	400		0	F-8, S-1, C-1, 2-lado, CC-10, aletas 10	
	600		0	F-8, CC-8, 8-acastados, 1-lado	
	800		1	S-Acastados	
84 horas					
Replica1	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-3, N-3, F-2, CC-2	
	200		0	E-10, CC-3, aletas 8	
	400		1	F-7, 2-acastados, 1-lado, CC-7 - aletas	
	600		0	2-5, F-7, 3-acastados, 4-lado CC-	
	800		0	2 acastados, hiperactividad	
Replica2	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	CC-1, E-F-9, lentos	
	200		1	E-F-9, lentos	
	400		1	E-2, F-6, 1-acastado, CC-8, lentos	
	600		0	4-acastados, F-8, 4-lado	
	800		2		
Replica3	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-10, CC-1, cabeza parada abajo	
	200		0	S-1, C-5, E-5, F-1, CC-6, aletas	
	400		0	S-2, C-4, F-6, CCC-9, aletas, 1-acastado	
	600		0	F-8, 4-acastados, 3-lado, P-4	
	800		2	3-acastados	

Horario	NO3-N mg/L Nominal	Hora	Mortalidad	Comportamiento	Observaciones
96 horas					
Replica1	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-6, N-6	
	200		0	E-10, cc-3, alentos-3	
	400		1	1- acastado, F-5, 1- lado, cc-	
	600		3	F-6, 3- acastados, 2- lado	
	800		2		
Replica2	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-F lentos	
	200		0	E-F - lentos	
	400		1	F-7, 1- acastado, cc-, lentos	
	600		2	F-6, 5- acastados, 1- lado	
	800				
Replica3	Control		0	E-10, N-10	
	100		0	E-10, más lentos	
	200		0	E-F	
	400		1	S-1, F-7, 1- acastado	
	600		2	F-6, 3- acastados	
	800			Todos muertos	

Control 1			Replica 1			400		
.079	18.68	16.07	.035	16.60	13.64	.025	12.45	10.58
.050	16.30	14.14	.059	17.40	15.09	.029	13.80	11.56
.052	16.79	14.05	.033	14.97	12.65	.076	20.02	16.94
.054	17.30	14.18	.052	16.80	14.30	.067	19.36	16.27
.058	17.42	15.17	.034	15.18	12.91	.034	15.04	13.29
.061	16.52	14.22	.030	14.33	12.04	.029	14.09	11.94
.062	17.58	14.21	.033	14.69	12.02	.039	14.87	12.77
.049	16.83	13.40				.039	14.49	13.06
.036	15.18	13.01				.034	15.12	12.42
.029	14.99	11.86					800	
Concentración 100						.040	16.37	13.37
.045	16.62	14.38				.064	18.18	14.82
.047	16.89	13.78				.029	14.81	12.77
.084	20.11	16.83						
.039	15.65	13.00						
.060	18.50	15.67						
.056	16.64	14.74						
Con 200								
.037	16.49	14.07						
.065	18.55	15.44						
.062	18.70	15.79						
.051	17.40	15.32						
.037	14.82	12.82						
.045	16.35	13.60						

ANEXO 2: Procedimiento para la ejecución de ensayos de toxicidad aguda (LC50) en peces

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA " _____ "	Código y Versión: LBC-PR-001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 1 de 15

1. Objetivo:

- Establecer el procedimiento para la ejecución del ensayo de toxicidad aguda (LC50) en peces basado en la OECD N°203.

2. Alcance:

- Conforme al protocolo de implementación, los productos a trabajar son:

Productos conteniendo formas de nitrógeno

3. Responsabilidades

- Los estudiantes, tesistas y pasantes responsables de la ejecución del ensayo son los encargados de realizar las pruebas y completar los formatos de registro correspondientes, de acuerdo con lo establecido en el presente documento.
- El asesor o profesor a cargo, es responsable de revisar y verificar el cumplimiento del presente procedimiento.

4. Definiciones:

- **LC₅₀ (Concentración Letal Media):** Concentración de la sustancia de ensayo que mata el 50% de los peces dentro de un periodo de exposición.
- **Signo clínico:** alteraciones conductuales, fisiológicas o morfológicas observables en los peces expuestos a la sustancia de ensayo, que reflejan una respuesta adversa al tóxico y permiten evaluar la progresión de los efectos antes de la mortalidad.

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA " _____ "	Código y Versión: LBC-PR-001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 2 de 15

5. Procedimiento

5.1. Generalidades

- Se realiza el presente procedimiento en concordancia con el protocolo de implementación de la Guía OECD 203.
- Los ensayos deben realizarse bajo condiciones controladas, empleando organismos en adecuado estado fisiológico y previamente aclimatados, a fin de garantizar la validez de los resultados.

5.2. Modelos Biológicos, materiales y equipos:

5.2.1. Modelos Biológicos

- La especie a utilizar será seleccionada conforme a los requisitos del estudio y el escenario de exposición ambiental, debiendo pertenecer a las especies recomendadas en el Anexo 2 de la OECD N°203.

5.2.2. Materiales:

- Peceras de vidrio de 15L
- Agua filtrada
- Probeta de 1L
- Red con mango para acuario
- Guantes descartables de látex
- Respirador con filtro
- Fiola

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA " _____ "	Código y Versión: LBC-PR-001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 3 de 15

- pipetas

-Alimento para peces en hojuelas y *Artemia sp*

5.2.3 Equipos:

-Termostato

-Equipo multiparamétrico

-Timer (Equipo para el fotoperiodo)

-Mangueras y conexiones

-Espectrofotómetro

5.3. Metodología de Ensayo

5.3.1. Principio de la Prueba

Los peces se exponen a la sustancia de ensayo durante un periodo de 96 horas. La mortalidad y comportamiento son registradas cada hora las primeras 6 horas, luego se realiza un registro cada 12 horas hasta terminar la prueba para determinar la LC₅₀.

5.3.2. Validación de la Prueba

Para que una prueba sea válida se deben cumplir las siguientes condiciones:

- La mortalidad en el control no debe superar el 10% al final de la prueba.

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA " _____ "	Código y Versión: LBC-PR-001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 4 de 15

- Se deben mantener condiciones constantes en la medida de lo posible a lo largo de la prueba.
- La concentración de oxígeno disuelto debe ser al menos 60% del valor de saturación del aire durante toda la prueba.
- Debe demostrarse que la concentración de la sustancia de prueba no varía significativamente respecto a la concentración nominal durante el ensayo.

5.3.3. Descripción del método

- Obtención de los organismos

Durante los meses de mayor actividad reproductiva de la especie se debe llevar a cabo la captura de hembras grávidas. Para este propósito, se utilizarán trampas tipo nasa complementadas con sebo para facilitar el proceso.

Posteriormente, los ejemplares se deben trasladar al laboratorio y acondicionar en acuarios destinados a su monitoreo. Las hembras se alimentarán con hojuelas de alimento para peces y *Artemia* sp. hasta el nacimiento de las crías.

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA " "	Código y Versión: LBC-PR-001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 5 de 15

-Preparación de los peces

Las crías se deben separar de las hembras para evitar el riesgo de canibalismo. Posteriormente, deben ingresar a los ambientes de experimentación y mantenerse en peceras con capacidad de 15 L de agua filtrada hasta alcanzar los 21 días de edad, previo a su utilización en la prueba.

Adicionalmente, los organismos deben pasar por un periodo de aclimatación de siete días en agua con la calidad requerida y que cumpla con las siguientes condiciones:

-Fotoperiodo: 12 horas Luz; 12 horas Oscuridad (Diario)

-Temperatura: 22°C ±0.5

-Concentración de oxígeno: Al menos del 80 % del valor de la saturación del aire.

-Alimentación: diariamente hasta 24 horas antes de iniciar la prueba.

Después de 48 horas, se registra la mortalidad y se aplican los siguientes criterios:

-Si la mortalidad es superior al 10% de la población en siete días: se rechaza todo el lote.

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA " _____ "	Código y Versión: LBC-PR-001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 6 de 15

-Si la mortalidad está entre el 5 y el 10% de la población: la aclimatación continuará por siete días adicionales.

-Si la mortalidad es inferior al 5% de la población: se acepta todo el lote.

-Agua

Los acuarios se llenaron con agua del grifo filtrada con un filtro de sedimentos de polipropileno, carbón activado, membrana de ultrafiltración y luz ultravioleta, y se mantuvieron a 22 ± 0.5 °C, pH 7 ± 0.5 y 7 ± 0.5 mg/L de oxígeno disuelto.

Nota: Si se utilizara agua reconstituida, los reactivos utilizados para la preparación son de grado analítico y el agua usada (tipo I o tipo II) debe ser de conductividad igual o menor que 10 uScm.

-Distribución de peces:

Una vez terminada la aclimatación, los peces son distribuidos aleatoriamente en las peceras de 15 L el mismo día del ensayo. Los cuales contienen la dosis a trabajar.

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA " _____ "	Código y Versión: LBC-PR-001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 7 de 15

5.3.4. Elección de la dosis:

Las dosis ensayadas son determinadas, en función de la información de:

- Fuentes bibliográficas
- Límite de la prueba descrita en la guía (sección 5.3.7).

5.3.5. Procedimiento

-Condiciones de exposición

- Duración: 96 horas
- Fotoperiodo: 12 horas luz; 12 horas oscuridad (diario)
- Temperatura: 22 ± 0.5 °C
- Concentración de oxígeno: Al menos 60% del valor de saturación del aire.
- Alimentación: Ninguno
- Perturbación: Evita los trastornos que puedan alterar el comportamiento de los peces.

-Medición de nitratos y nitritos

Las concentraciones de nitrito y nitrato serán medidas al inicio y al término de la prueba mediante absorbancia a 543nm y (220nm, 275nm), respectivamente; siguiendo la metodología por colorimetría descritas en la Asociación Americana de Salud Pública.

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA “ _____ ”	Código y Versión: LBC-PR-001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 8 de 15

-Número de peces

Diez peces por cada concentración de ensayo con tres réplicas cada uno y para el control.

-Concentración de prueba

Se preparan cinco concentraciones en una serie geométrica. Un ensayo preliminar realizado correctamente permite un adecuado intervalo de concentraciones.

-Control

Se utiliza un grupo control sin adición del reactivo de ensayo, el cual también contará con réplicas, previamente descrito.

5.3.6. Observaciones

Los peces se observan cada hora las primeras 6 horas y luego en un intervalo de 12 horas hasta acabar el experimento. Son considerados muertos cuando no hay movimiento visible y si al toque de péndulo caudal no se produce reacción. Los peces muertos son retirados y se registra la mortalidad. Las alteraciones conductuales observadas durante el ensayo serán registradas en el formato (LBA-FR-001).

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA “-----”	Código y Versión: LBC-PR-001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 9 de 15

Para facilitar la recopilación y estandarización de la información, cada signo clínico será identificado mediante un código numérico. En la Tabla 1 se presentan los signos evaluados y sus respectivas definiciones.

Tabla 1. Tabla de signos clínicos observados en peces

PÉRDIDA DEL EQUILIBRIO			
Signo clínico		Definición	Sinónimos
Orientación horizontal anormal		Pérdida del equilibrio mostrando orientación/postura horizontal anormal en la columna de agua	Inclinación lateral, pérdida del reflejo de enderezamiento
Orientación vertical anormal		Postura con la cabeza hacia arriba o hacia abajo	—
Pérdida del control de flotabilidad		Flotación en superficie o hundimiento hacia el fondo	—

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA “ _____ ”	Código y Versión: LBC-PR-001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 10 de 15

COMPORTAMIENTO ANORMAL DE NATACIÓN		
Signo clínico	Definición	Sinónimos
Hipoactividad	Disminución de la actividad espontánea	Letargo, apatía, debilidad, inmovilidad, inactividad, cese de la natación, quietud
Hiperactividad	Incremento de la actividad espontánea	Natación errática, movimientos rápidos
Natación en sacacorchos	Movimientos rotatorios alrededor del eje longitudinal; frecuentemente en ráfagas	Rodar, espiral, natación en espiral, movimientos circulares
Convulsiones	Contracción muscular involuntaria y descontrolada	Crisis, espasmos musculares, temblores, estremecimientos, vibración
Tetania	Rigidez de la musculatura corporal (intermitente o permanente)	Parálisis
Conducta anormal en superficie	Selección anormal de profundidad, cerca de la interfaz agua/aire	Salto, permanencia en superficie, cerca/debajo de la superficie
Conducta anormal en el fondo	Selección anormal de profundidad, cerca de la base del tanque	Buceo, permanencia en el fondo, reposo/orientación cerca del fondo

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA “ _____ ”	Código y Versión: LBC-PR-001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 11 de 15

Sobre reacción al estímulo	Respuesta de huida o sobresalto a estímulos visuales, táctiles o vibratorios	Hiperexcitabilidad, hiperactividad tras estímulo/amenaza
Baja reacción al estímulo	Ausencia de respuesta a estimulación externa	Inactividad tras estímulo/amenaza
Pérdida del comportamiento de cardumen	Pérdida de agregación e interacción social entre peces	Aislamiento social
Formación densa de cardumen	Incremento en la agrupación compacta de peces	Hacinamiento
FUNCIÓN RESPIRATORIA ANORMAL		
Signo clínico	Definición	Sinónimos
Hiperventilación	Incremento de la frecuencia de movimientos operculares, con posible apertura bucal y opérculos extendidos	Respiración rápida/intensa, movimientos branquiales fuertes, opérculos muy abiertos
Hipoventilación	Disminución de la frecuencia de movimientos operculares	Respiración reducida, lenta o débil
Ventilación irregular	Movimientos ventilatorios operculares irregulares	Espasmos respiratorios esporádicos

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA “ _____ ”	Código y Versión: LBC-PR-001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 12 de 15

Boqueo	Movimientos de boca y opérculos en la superficie del agua, con toma de aire	“Piping”
Sacudidas de cabeza	Movimientos laterales rápidos de la cabeza	—

Asimismo, los parámetros de calidad de agua, incluyendo pH, oxígeno disuelto y temperatura, serán medidos diariamente utilizando un equipo multiparamétrico debidamente calibrado.

5.3.7. Límite de la prueba

Un ensayo límite se puede realizar a la concentración de 100 mg/L del reactivo evaluado, con el fin de demostrar que el LC50 es mayor que esta concentración. La prueba límite debe ser realizada utilizando un mínimo 7 peces con el mismo número en el control.

Previamente, se realiza un ensayo cuando no se tiene información de los efectos de las concentraciones de la sustancia de estudio, con el fin de delimitar concentraciones límite.

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA " _____ "	Código y Versión: LBC-PR-001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 13 de 15

5.4. Datos, Informe y resultados

5.4.1. Tratamiento de Resultados

Se reporta el porcentaje de mortalidad acumulada para cada periodo de exposición frente a la concentración de manera gráfica. Se emplea el análisis estadístico de Kaplan-Meier para evaluar la supervivencia y el método estadístico de Spearman-Kärber para determinar la LC50.

Cuando los datos obtenidos son inadecuados para el uso de métodos estándar de cálculo de la LC50, la concentración más alta que no cause mortalidad y la más baja concentración de la producción de 100% de mortalidad se debe utilizar como una aproximación para la LC50 (lo que se considera la media geométrica de estas dos concentraciones).

5.4.2. Informe

El informe de ensayo debe incluir la siguiente información:

- i. Sustancia de ensayo: Datos de identificación, naturaleza física cuando sea relevante.
- ii. Especie: nombre científico, variedad, tamaño, tratamiento previo, etc.
- iii. Condiciones de la Prueba: Método empleado (estático)

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA " _____ "	Código y Versión: LBC-PR-001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 14 de 15

- a. Concentración de oxígeno disuelto, valores de pH y temperatura de las soluciones de ensayo a intervalos de 24 horas.
- b. Concentraciones utilizadas.
- c. Número de peces en cada solución de ensayo.

5.4.3. Resultado

- Concentración máxima que no cause mortalidad en el periodo de prueba.
- Concentración mínima que cause 100 % de mortalidad en el periodo de prueba.
- Mortalidad acumulada para cada concentración, valores de LC50, con el 95% de límites de confianza, de cada uno de los periodos de observación si fuera posible.
- Gráfico de curvas de concentración y mortalidad al final de la prueba.
- Método estadístico utilizado para determinar los valores de la LC50.
- Mortalidad en los controles.
- Incidentes en el transcurso de la prueba que podrían haber influido en los resultados.
- Signos clínicos observados en peces.

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA " _____ "	Código y Versión: LBC-PR-001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 15 de 15

Referencia

- Guidelines for the Testing of Chemicals N°203 (OECD)
- American Public Health Association (APHA). 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23rd edition. Washington, D.C.: APHA

Registros

- LBA – FR 001 Prueba de toxicidad aguda (LC50) en peces

Historial de cambios

N° de revisión	Fecha de aprobación	Descripción del cambio
00	07-08-26	No aplica

ANEXO 3: Formato estandarizado para el registro y seguimiento de bioensayos de toxicidad aguda (LC50) en peces

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA “ _____ ”	Código y Versión: LBA-FR 001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 1 de 6

DATOS DEL PRODUCTO A ANALIZAR:

Producto : _____

Marca : _____

Lote : _____ Fecha de vencimiento : _____

DATOS DEL ORGANISMO ACUÁTICO:

Nombre Científico : _____ Nombre Común : _____

Edad : _____ Rango de tamaño : _____

Fotoperiodo : _____

DATOS DE LA PRUEBA:

Norma Técnica : _____

Fecha de inicio de análisis: _____ Fecha de fin de análisis: _____

Duración (h) : _____

Rango de concentraciones a evaluar: _____ mg/L

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA “ ”	Código y Versión: LBA-FR 001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 2 de 6

TABLA 1. CONCENTRACIONES NOMINALES Y CANTIDAD DEL PRODUCTO UTILIZADO EN LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA.

	Concentración nominal (mg/L)	Cantidad del producto (g/L)
Concentración 1		
Concentración 2		
Concentración 3		

TABLA 2. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DEL AGUA

Horario	concentración nominal (mg/L)	Temp °C	Oxígeno %L	Oxígeno mg/L	Conduc. $\mu\text{s/cm}$	TDS mg/L	Salinidad ppt	pH
0 horas	Control							
	C1							
	C2							
	C3							
24 horas	Control							
	C1							
	C2							
	C3							
48 horas	Control							
	C1							

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA “-----”	Código y Versión: LBA-FR 001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 3 de 6

	C2							
	C3							
72 horas	Control							
	C1							
	C2							
	C3							
96 horas	Control							
	C1							
	C2							
	C3							

Donde C1, C2, C3 representan las concentraciones a evaluar

TABLA 3. MEDICIÓN DE NITRATOS Y NITRITOS

N° de réplica	concent ración nomina l (mg/L)	MEDICIÓN INICIAL					MEDICIÓN FINAL				
		NITRATO			NITRITO		NITRATO			NITRITO	
		Abs. 220 nm	Abs . 275 nm	NO_3 – N mg/L	Abs . 543 nm	NO_2 – N mg/L	Abs . 220 nm	Abs . 275 nm	NO_3 – N mg/L	Abs . 543 nm	NO_2 – N mg/L

Donde Abs. Se refiere a la absorbancia a la que se mide la concentración

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA “”	Código y Versión: LBA-FR 001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 4 de 6

REGISTRO OBSERVACIONAL:

En la tabla 4 se presentan los códigos asignados a cada comportamiento evaluado durante el ensayo.

TABLA 4. CÓDIGOS DE SIGNOS CLÍNICOS

Signo clínico	Código	Signo clínico	Código
Orientación horizontal anormal	1	Sobre reacción al estímulo	11
Orientación vertical anormal	2	Baja reacción al estímulo	12
Pérdida del control de flotabilidad	3	Pérdida del comportamiento de cardumen	13
Hipoactividad	4	Formación densa de cardumen	14
Hiperactividad	5	Hiperventilación	15
Natación en sacacorchos	6	Hipoventilación	16
Convulsiones	7	Ventilación irregular	17
Tetania	8	Boqueo	18
Conducta anormal en superficie	9	Sacudidas de cabeza	19
Conducta anormal en el fondo	10		

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA “-----”	Código y Versión: LBA-FR 001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 5 de 6

TABLA 5. REGISTRO DE SIGNOS CLÍNICOS DE LOS PECES DURANTE EL ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA.

Tiempo (Horas)	Concentración nominal (mg/L)	Nº de réplica	Código observado	Nº de organismos afectados	Observaciones

TABLA 6. RESULTADOS DE MORTALIDAD

Nº de réplica	Nº de Organismos Utilizado	concentración nominal (mg/L)	MORTALIDAD													
			1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h	84 h	96 h

(1) Mortalidad = Número de peces muertos/ número de peces ensayados;(2)
 %Mortalidad= (número de peces muertos / número de peces ensayados)
 x100.

	LABORATORIO DE BIOLOGIA ACUATICA “ ----- ”	Código y Versión: LBA-FR 001
	AREA DE ECOTOXICOLOGIA	Fecha de Emisión:
	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EN PECES	Página 6 de 6

OBSERVACIONES:

RESULTADO

(*) LC50 dato obtenido del análisis estadístico Spearman-Kärber

**RESPONSABLE
DEL ENSAYO**

**ASESOR O PROFESOR
A CARGO**

**FECHA DE
REPORTE**