

METODOLOGIA PARA EL DISEÑO DE BIOENSAYOS EN TOXICOLOGIA ACUATICA

Methodology for the desing of bioassays in aquatic toxicity

Juana Raquel Robles González¹ y Ricardo Martínez Becerra²

¹ Profesora, Universidad de Córdoba, Montería

² Profesor Titular. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá

RESUMEN

La creciente descarga de residuos industriales y domésticos, el derrame de hidrocarburos, así como de otros productos químicos ha generado serios problemas de contaminación en las aguas y, por lo tanto, es necesario usar la metodología adecuada que permita medir la naturaleza y mecanismos de los efectos de esos contaminantes sobre organismos vivientes. En este trabajo se busca: Determinar los efectos letales y subletales del endosulfan en nemátodos *Panagrellus redivivus*; comparar los resultados mediante los métodos Probit y Logístico. Se realizaron 16 bioensayos bajo un diseño completamente al azar, para probar las concentraciones 1,6; 3,2; 6,5; 13,1 y 26 ppm de endosulfan y un control, con cinco repeticiones y 10 individuos por unidad experimental. A 96 horas, la CL₅₀ (Concentración Letal Mediana) para endosulfan fue 10,89 ppm. y las CE₅₀ (Concentración Efectiva Mediana) de las variables supervivencia, crecimiento y maduración fueron 10,54; 0,70 y 0,73 ppm, respectivamente.

Palabras claves: Concentración letal, concentración efectiva, endosulfan, nemátodos.

SUMMARY

The growing discharge of industrial and domestic wastes, spill of hydrocarbons, as well as other chemicals has generated serious problems of contamination. It is necessary to use the appropriate methodology to evaluate the nature and mechanisms of these contaminants on living organisms. The objectives of this work were: To establish a methodology regarding the experimental design for bioassays, to determine lethal and sublethal effects of Endosulfan in nematode *Panagrellus redivivus*, and to compare the results by means of the Probit and Logit methods. Sixteen bioassays were carried out under a completely randomized design, to test the concentrations 1.6, 3.2, 6.5, 13.1, 26 ppm of Endosulfan and a control, with five replications and 10 individuals as the experimental unit. The endosulfan CL₅₀ was 10.89 ppm, and the CE₅₀ for survival, growth and maturation were 10.54, 0.70

and 0.73 ppm, respectively.

Key words: Lethal concentration, effective concentration, endosulfan, nematodes

INTRODUCCION

Las pruebas de toxicidad forman parte del grupo de las medidas para evaluar el riesgo ecológico de los contaminantes. El efecto más obvio de un contaminante es la muerte rápida y es práctica común evaluar este tipo de toxicidad mediante la CL₅₀ (concentración de la sustancia), prueba que logra matar el 50% de los organismos utilizados en el ensayo o una medida similar (Reyes, 1996).

Aunque no todos los productos químicos son nocivos para los organismos vivos, la descarga al medio ambiente de éstos conlleva riesgos, ya sea por aplicación directa (fertilizantes, plaguicidas y herbicidas) o como producto de procesos de combustión (óxidos de azufre y de nitrógeno e hidrocarburos) o a través de efluentes generados por la fabricación, transporte y consumo de productos utilizados por la sociedad moderna, ha llevado a que en muchos de los medios naturales, se detecten, en la actualidad, niveles realmente alarmantes de un gran número de sustancias tóxicas (Díaz, 1995).

A nivel legislativo, en nuestro país, el Decreto 1594 de 1984 establece que las Entidades de Manejo y Administración de Recursos (EMAR) deberán realizar las pruebas de toxicidad necesarias, así como determinar los valores de CL₅₀ o CE₅₀ para sustancias que afecten la calidad del recurso hídrico en lo relativo a preservación de flora y fauna (Díaz, 1995).

Las técnicas estadísticas empleadas en el presente trabajo, se pueden utilizar para estudios con especies nativas que son de consumo humano y que se desarrollan en ciénagas y ríos de gran tamaño. Con el propósito de empezar a realizar este tipo de estudio en la región de Córdoba, se realizó este trabajo con los siguientes objetivos:

Establecer una metodología estadística para la realización de bioensayos eniendo como organismo de prueba, el nemátodo *Panagrellus Redivivus*.

Determinar la concentración letal (CL₅₀) del endosulfan en nemátodos.

Establecer los efectos subletales que el insecticida endosulfan causa en el nemátodo.

Comparar los resultados obtenidos mediante los métodos Probit y Logístico.

MATERIALES Y METODOS

Se analiza la información proveniente de un experimento realizado por la estudiante de postgrado Marta Molina, en el laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia, en el segundo semestre de 1997 y el primer semestre de 1998 (comunicación personal). Se usó, como sustancia de referencia, el insecticida endosulfan (Tiodan) aplicada al nemátodo *Panagrellus redivivus* y se llevaron a cabo 16 bioensayos.

Para este trabajo, se usó una especie pura de nemátodos traída del Canadá, llamada *Panagrellus redivivus*. Los organismos de prueba se expusieron a cinco dosis (1,6ppm; 3,2ppm; 6,5ppm; 13,1ppm y 26ppm de endosulfan) y un control. Se seleccionaron nemátodos y se hicieron las observaciones de los individuos en cada etapa (J2; J3; J4 y adulto) al final de 96 horas de exposición. Para cada unidad experimental, se usaron 10 organismos, con cinco repeticiones por dosis para un total de 50 individuos por concentración.

Efectos letales. La variable dependiente analizada fue:

Supervivencia: Es el porcentaje de sobrevivientes en la prueba de una muestra relativa a los sobrevivientes en la población control. (Saimoloff *et al.*, 1980)

$$\text{SUPERVIVENCIA} = 100 \times \frac{S_{\text{prueba}} (\# \text{ de sobreviv. en la prueba})}{S_{\text{control}} (\# \text{ de sobreviv. en el control})}$$

Para determinar si la supervivencia ha sido significativamente inhibida por el material de prueba se calcula la prueba ji-cuadrado, un valor mayor que cinco indica letalidad significativa.

$$\text{JI-CUADRADO} = \frac{[S_{\text{prueba}} - S_{\text{control}}]^2}{S_{\text{control}}}$$

Efectos subletales. Para estos efectos, se midieron las variables maduración y crecimiento.

Maduración. Es la expresión del número de animales J4 que llegan a la etapa adulta. La inhibición del cambio final de la población probada en relación con la población de muestra control se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$\text{MADURACION} = 100 \times \frac{[A_{\text{prueba}}] / [J4_{\text{prueba}} + A_{\text{prueba}}]}{[A_{\text{control}}] / [J4_{\text{control}} + A_{\text{control}}]}$$

Donde:

$J4_{\text{prueba}}$ y A_{prueba} corresponden respectivamente, al número de los J4 y a los adultos en la muestra de prueba.

$J4_{\text{control}}$ y A_{control} es el número de los J4 y adultos en el control, respectivamente.

La prueba ji-cuadrado se realiza para determinar si se presenta una significancia estadística de inhibición de la maduración. Un valor mayor que cinco indica un efecto significativo sobre la maduración.

$$\text{JI-CUADRADO} = \frac{[A_{\text{prueba}} - A_{\text{control}}]^2}{A_{\text{control}}}$$

Una tercera variable que se usó fue la disminución en el crecimiento del animal. Cambio incompleto de los J2-J3 o J3-J4 indica un efecto negativo sobre el proceso bioquímico o fisiológico no esencial del nemátodo.

Crecimiento. La inhibición al crecimiento se muestra cuando un número significativo de animales de prueba fallan en las etapas J4 o la etapa adulta. El crecimiento de la población prueba, relativa al control, se puede expresar como:

$$\text{CRECIMIENTO} = 100 \times \frac{[J4_{\text{prueba}} + A_{\text{prueba}}] / S_{\text{prueba}}}{[J4_{\text{control}} + A_{\text{control}}] / S_{\text{control}}}$$

Donde:

$J4_{\text{prueba}}$ y A_{prueba} corresponden respectivamente, al número de los J4 y a los adultos en la muestra de prueba.

$J4_{\text{control}}$ y A_{control} son respectivamente, el número de los J4 y adultos en el control.

La prueba ji-cuadrado se realizó para determinar si hubo una inhibición significativa o estimulación de crecimiento por el material de prueba.

$$\text{JI-CUADRADO} = \frac{[(J4_{\text{prueba}} + A_{\text{prueba}}) - (J4_{\text{control}} + A_{\text{control}})]^2}{(J4_{\text{control}} + A_{\text{control}})}$$

Un valor total resumido, que pone mayor énfasis sobre el crecimiento comparado con la maduración, se usó para indicar un mejor ajuste total de la muestra probada.

$$\text{Ajuste} = 100 \times \frac{(4 \times S_{\text{prueba}}) + (2 \times C_{\text{prueba}}) + M_{\text{prueba}}}{7}$$

La disminución en la supervivencia indica que la muestra probada está afectada por los procesos bioquímicos y fisiológicos de los nemátodos. La disminución en la maduración indica un fracaso del nemátodo para usar su información genética. El cambio de J4 a adulto suministra la mayor actividad genética en la vida de los nemátodos. (Samoiloff *et al.*, 1980).

Una vez recolectados los resultados de los bioensayos, se procedió al procesamiento estadístico, con el fin de hallar la varianza del error de los datos obtenidos. Se aplicó una prueba de homogeneidad de varianzas de los errores (Hartley) a los bioensayos. Los resultados se analizaron mediante el software S.A.S y TOXSTAT, utilizando los métodos Probit y Logístico, con el fin de obtener información sobre la relación concentración del contaminante-respuesta de los organismos y

determinar la CL_{50} y los intervalos de confianza para el 95% de toxicidad aguda CE_{50} y CL_{50} .

RESULTADOS Y DISCUSION

En cada uno de los bioensayos, se determinó el número de sobrevivientes, tanto en el control como en cada concentración evaluada, con el fin de determinar la CL_{50} y la CE_{50} y se midió el tamaño de dichos individuos con el objetode apreciar los efectos sobre su crecimiento y maduración.

Efectos letales

Los resultados obtenidos de cada uno de los bioensayos se presentan en el Cuadro 1. Como se puede observar en este cuadro al comparar los resultados obtenidos mediante ambos métodos, el Probit para ambos software (SAS y TOXTAT) presenta una CL_{50} inferior al obtenido con el método Logístico. Debido a esta situación, se trabajó con los resultados del método Probit con el sistema S.A.S.

Se nota que los bioensayos 1; 3; 4; 6; 8 y 10 no reportan límites de confianza del 95%, debido a que los datos no se ajustaron a una distribución normal. Por esta razón, estos bioensayos se descartaron y el grupo quedó conformado por 10 bioensayos. Con este nuevo grupo, se llevó a cabo el análisis para determinar la CL_{50} y la CE_{50} del endosulfan, mediante los métodos Probit y Logístico, así como para evaluar los efectos subletales de esta sustancia, en cuanto a crecimiento y desarrollo.

Los valores de CL_{50} oscilaron dentro de un rango que se debió estandarizar con el fin de calcular un valor promedio de CL_{50} . Para obtener este rango con un alto nivel de confianza (95%) fue necesario determinar dos estimadores de los parámetros estadísticos básicos, la media (X) y la desviación estándar (S).

Los bioensayos cuyos CL_{50} no se encontraran dentro del rango ($X - 2S$, $X + 2S$), el cual representa una confianza del 95%, fueron excluidos de este estudio. Según el Cuadro 2, se

obtuvieron los siguientes valores: Media (X) = 10,8936 ppm., desviación estándar (S) = 1,6985ppm y el límite superior fue 14,2907 ppm y el límite inferior, 7,4965 ppm

Como se observa en el Cuadro 1, el grupo quedó conformado ahora por nueve bioensayos, debido a que el N° 5, cuya CL_{50} es de 6.6483 ppm no estuvo dentro del rango (7,4965 ppm, 14,2907 ppm).

Al realizar la prueba de homogeneidad de varianzas (prueba de Hartley) para todos los bioensayos que caían dentro del rango establecido (nueve bioensayos), donde la varianza (CM) mayor fue 0,95 y la varianza (CM) menor fue 0.20 (Cuadro 2), $F_{\max} = 0,95/0,20 = 4,75$, el cual al compararlo con el $F_{(k,v)}$ crítico al 1% $F_{(9,24)}=5,5$, indicó homogeneidad de varianzas.

Así, con los bioensayos remanentes, se encontró el promedio de la CL_{50} del endosulfan en el nemátodo *Panagrellus redivivus* de 10,8936 ppm. y su respectivo intervalo de confianza fue (7,4965 ppm; 14,2907 ppm), con un coeficiente de variación (C:V) de 15,59%.

Curva Concentración-respuesta

La curva concentración respuesta es una gráfica en la cual se expresan los porcentajes de supervivencia *versus* las diferentes concentraciones evaluadas en los ensayos de toxicidad.

$100 = \% \text{ de Mortalidad} + \% \text{ de Supervivencia}$. Así que: $\% \text{ de Supervivencia} = 100 - \% \text{ de Mortalidad}$.

Matemáticamente : $\% \text{ Supervivencia} = (Sp/Sc) * 100$

Donde Sp y Sc corresponden respectivamente al número de sobrevivientes en la muestra y número de sobrevivientes en el control.

Por lo tanto, si se reúnen los bioensayos que reportaron límites con el método Probit y los que están dentro del rango establecido y se calcula el porcentaje de supervivencia mediante la relación matemática anterior, se tienen los resultados que aparecen en el Cuadro 3.

Cuadro 1. Resultados de CL_{50} utilizando los métodos Probit y Logístico.

N°BIOEN.	(S.A.S)		CL50 (TOXSTAT)		INTERVALO DE CONFIANZA 95%	
	PROBIT	LOGIS.	PROBIT	LOGIS.	PROBIT(S.A.S)	PROBIT (TOXSTAT)
1	12,78418	13,05920	12,78760	13,07680	SIN LIMITES	(11,1109; 4,7173)
2	12,18101	12,51700	12,18130	12,52210	(6,34989; 38,628)	(10,3726; 14,3054)
5	6,64837	6,76754	6,65540	6,78020	(3,2925; 14,1905)	(5,7840; 7,6848)
6	8,47327	8,39131	8,47630	8,40380	SIN LIMITES	(7,3477; 9,7782)
7	12,07902	12,42600	12,07930	12,43200	(5,3745; 80,3282)	(10,2091; 14,2921)
9	12,03398	12,30920	12,03400	12,31100	(8,3299; 18,6862)	(10,4915; 13,8033)
11	11,81465	12,13130	11,81470	12,13310	(7,404; 21,4886)	(10,2623; 13,6020)
12	10,23060	10,36514	10,23100	10,36830	(8,9436; 11,7482)	(8,9570; 11,6861)
13	10,49830	10,63675	10,49830	10,63690	(9,2966; 11,8809)	(9,3191; 11,8269)
14	12,19492	12,42690	12,19490	12,42760	(10,7203; 13,951)	(10,7273; 13,8633)
15	11,01611	11,15238	11,01640	11,15290	(6,7957; 19,2505)	(9,6160; 12,6208)
16	10,23979	10,43200	10,24070	10,44040	(5,37019; 23,5806)	(8,8526; 11,8464)

Cuadro 2. Bioensayos analizados.

Nº BIOENSAYO	CM	CL50 (S,A,S), PROBIT
2	0,616	12,181
5	0,950	6,648
7	0,733	12,079
9	0,950	12,034
10	0,333	11,815
12	0,400	10,231
13	0,280	10,498
14	0,233	12,195
15	0,200	11,016
16	0,933	10,240

Cuadro 3. Valores promedio de supervivencia, crecimiento, maduración y ajuste para las concentraciones de endosulfan.

Concentraciones (ppm)	% de supervivencia	% de Crecimiento	% de Maduración	% de Ajuste
1,6	100,0	46,66	40,25	76,22
3,2	96,6	19,62	16,38	63,14
6,5	76,2	4,44	0,00	44,81
13,1	54,2	0,95	0,00	31,24
26,0	3,55	0,00	-	2,02

Con estos resultados, se construyó una gráfica de la curva concentración-respuesta. En general, este tipo de curvas se elabora expresando la concentración en escala logarítmica en el eje X y, en el eje Y, el porcentaje de supervivencia (%). La representación gráfica de los datos del Cuadro 3 aparece en la Figura 1. En esta figura, se observa una relación lineal inversa entre las variables concentración y porcentaje de supervivencia, es decir, que a mayor concentración de endosulfan la supervivencia de los nemátodos disminuye. Como se puede observar, las concentraciones 6,5 ppm; 13,1 ppm y 26,0 ppm presentaron un porcentaje de supervivencia menor del 90% relativo al control, esto pudo deberse a la presencia de materiales activos sobre procesos bioquímicos o fisiológicos esenciales lo cual indica que en estas dosis existían condiciones tóxicas.

Con los logaritmos de las concentraciones en el eje X y los porcentajes de supervivencia en el eje Y y al aplicar regresión lineal a estos datos, se tiene una curva ajustada, cuya ecuación es: $y = 128,93 - 77,469 \log(x)$. (Figura 1)

Con $Y = 50\%$, al despejar X, se tiene que equivale a 10,4. Por lo tanto, para un porcentaje del 50%, se tiene que la CE media para supervivencia para los nemátodos evaluados con endosulfan fue de 10,4 ppm, con un coeficiente de correlación entre las dos variables de $-0,9412$ y un coeficiente de determinación de $0,8859$. Al comparar el valor de la CL_{50} (10,8936 ppm) y el valor de la CE_{50} para supervivencia (10,44 ppm), se observa que no difieren significativamente, puesto que para un porcentaje de supervivencia del 50%, las dos concentraciones deben ser iguales ($CL_{50} = CE_{50}$ para

supervivencia), como se explicó anteriormente.

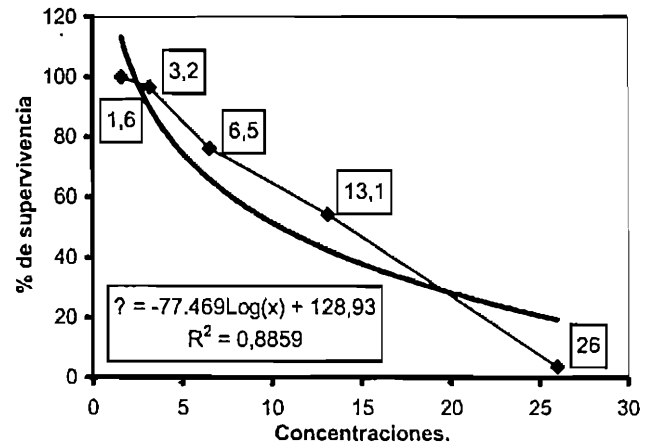


Figura 1. Curva Concentración-respuesta para supervivencia. Endosulfan.

Efectos Subletales.

Para determinar los efectos subletales del endosulfan, se evaluaron los efectos sobre crecimiento y maduración de los nemátodos, mediante el cálculo del CE_{50} .

El cuadro 3 muestra los porcentajes de crecimiento y maduración evaluados para cada uno de los nueve bioensayos. Para obtener estos cálculos, se tuvieron en cuenta los resultados individuales de cada bioensayo. Antes de representar gráficamente los resultados de este Cuadro se determinaron las CE_{50} para crecimiento y maduración a través de la curva concentración-respuesta. Al aplicar regresión lineal, se tiene una curva ajustada cuya ecuación fue: $y = 44,296 - 36,916 \log(x)$. (Figura 2).

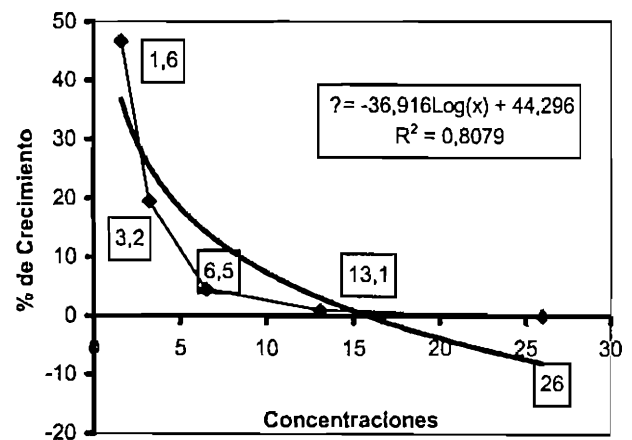


Figura 2. Curva concentración-respuesta para crecimiento. Endosulfan.

Para $Y = 50\%$ de crecimiento y al despejar X de esta ecuación, se obtuvo el valor de la CE_{50} para crecimiento, que en este caso, fue de 0,70 ppm, con un coeficiente de correlación de $0,8988$ y

un coeficiente de determinación de 0,8079. Esto quiere decir que, a partir de la concentración 0,70 ppm, el insecticida endosulfan influye en el crecimiento de los nemátodos *Panagrellus redivivus*. Como se observa, este valor difiere mucho de la CL_{50} y de la CE_{50} para supervivencia. La Figura 3 presenta el crecimiento de los nemátodos evaluados con endosulfan, en la cual se observa una respuesta adversa al crecimiento con una pendiente de (-36,916ppm).

Para determinar el valor de la CE_{50} para el efecto de maduración de los nemátodos, se tomaron los resultados del Cuadro 3 y se ajustó una regresión lineal de la misma manera que se hizo para el efecto de crecimiento. La ecuación obtenida fue $y = 43,83 - 44,967 \log(X)$ (Figura 3). Al despejar, se encontró que el valor de X fue 0,73, luego la CE_{50} para el efecto de maduración del nemátodo evaluado con endosulfan fue de 0,73 ppm, la cual no difiere mucho de la CE_{50} para crecimiento, pero sí difiere de la CL_{50} . El coeficiente de correlación fue de -0,9295 y el coeficiente de determinación (R^2) fue 0,864. Este valor de la CE_{50} para maduración (0,73 ppm) refleja que el endosulfan influye notoriamente en que estos organismos no lleguen a las etapas J4 o adulta. En la Figura 3, la cual representa la maduración de los nemátodos bajo el efecto del insecticida, se observa una respuesta adversa a la maduración. La pendiente en este caso fue de (-44,967ppm)

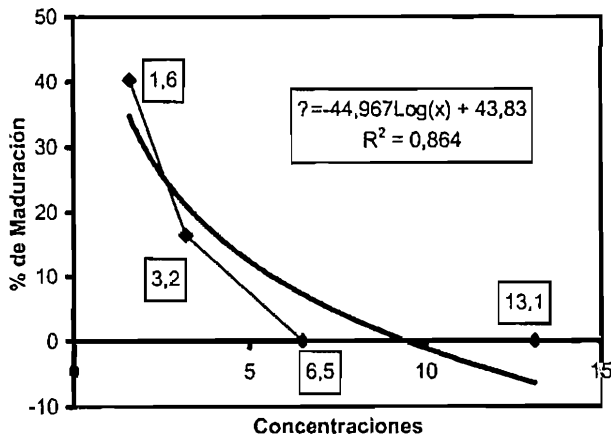


Figura 3. Curva Concentración-respuesta para Maduración. Endosulfan.

El Cuadro 3 muestra también, el valor total resumido, expresado como ajuste del endosulfan evaluado en los nueve bioensayos. Se aplicó el mismo procedimiento de regresión lineal que se hizo para crecimiento y maduración. La ecuación que se obtuvo fue: $y = 91,648 - 59,394 \log(X)$. En este caso, el valor de X fue 5,02, con un coeficiente de correlación de 0,987 y un coeficiente de determinación 0,9754. Por lo tanto, el valor de la CE_{50} para ajuste fue de 5,02 ppm, con una pendiente de (-59,394ppm).

En el Cuadro 4, se hace una interpretación práctica de tales porcentajes, ya que se expresa directamente el número de individuos que corresponde a cada porcentaje.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Para determinar si los individuos han sido significativamente inhibidos, se realiza la prueba ji-cuadrado para supervivencia, crecimiento y maduración. Luego, se comparan los resultados experimentales con los resultados calculados a través de esta prueba. (Cuadro 5). Al analizar los valores de ji-cuadrado, se tiene que para la concentración 13,1 ppm, el valor correspondiente fue de 10,58; el cual es mayor que cinco. Por lo tanto, a partir de la concentración 13,1 ppm, se presenta inhibición en la supervivencia de los nemátodos. Este valor concuerda con la CL_{50} , cuyo valor fue de 10,8936 ppm, debido a que éste nos indica el rango general por encima del cual se presenta letalidad significativa para los organismos.

Cuadro 4. Valores promedio de individuos sobrevivientes, J4 y adultos para las concentraciones de endosulfan evaluadas.

Concentraciones (ppm)	Sobrevivientes	J4 + Adultos	Adultos
1,6	50,0	23,0	9,0
3,2	48,0	9,0	1,0
6,5	38,0	1,0	0,0
13,10	27,0	0,0	0,0
26,0	2,0	0,0	-

Cuadro 5. Cuadro ji-cuadrado para supervivencia, crecimiento y maduración.

Concent. (ppm)	Sobrev.	J4+Adult.	Adult.	Superv.	Crecim.	Madur.
1,6	50	23	9	0,00	14,58	31,68
3,2	48	9	1	0,08	33,62	46,02
6,5	38	1	0	2,88	48,02	48,00
13,1	27	0	0	10,58	50,00	48,00
26,0	2	0	0	46,08	50,00	48,00

Al analizar los valores de ji-cuadrado para crecimiento y maduración, se tiene que, en la concentración 1,6 ppm, los valores correspondientes fueron 14,58 y 31,68; respectivamente. Como se observa estos valores son mayores que cinco, lo cual indica que, en la concentración 1,6 ppm; hay efectos subletales en cuanto a inhibición o estimulación en el crecimiento y desarrollo de los nemátodos, debido al endosulfan, corroborando el hecho de que, a partir de la concentración 0,70 ppm (CE_{50} para crecimiento) y 0,73 ppm (CE_{50} para maduración), se produjeron efectos subletales en los nemátodos.

Es de notar que el material de prueba (endosulfan) afecta notoriamente en el crecimiento y desarrollo (efectos subletal) de los nemátodos *Panagrellus redivivus*, indicando la presencia de materiales que inhiben el funcionamiento genético normal de los nemátodos.

CONCLUSIONES

La Concentración letal media CL_{50} del endosulfan, evaluada en el nemátodo *Panagrellus redivivus*, es 10,89 ppm. Con un intervalo de confianza entre 7,4965 ppm y 14,2907 y un coeficiente de variación (CV) de 15,59%

La concentración efectiva media (CE_{50}) para supervivencia del endosulfan, evaluada en el nemátodo *Panagrellus redivivus*, es de 10,44 ppm. Valor que, a su vez, es parecido al de la concentración letal media (10,89 ppm)

La concentración efectiva media (CE_{50}) para crecimiento y maduración encontrada para el nemátodo *Panagrellus redivivus*, es 0,70 ppm y 0,73; respectivamente. Estos valores son muy importantes para los administradores y reguladores del medio ambiente, porque les indica el peligro potencial de los contaminantes.

La sustancia endosulfan causa más efectos subletales en el crecimiento y desarrollo de los nemátodos que efectos en la supervivencia.

LITERATURA CITADA

- DIAZ B Maria C. Efectos de los Contaminantes Tóxicos en el Ambiente. Ensayos de Toxicidad y su Aplicación en el Control de la Contaminación Ambiental. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia. p. 1-3. Junio de 1996.
- REYES Carmen. Fundamentación y Metodología de los Ensayos de Toxicidad con Microcrustáceos. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia. p. 1,2. Junio 1996.
- S.A.S. Institute Inc, Logistic Regression Examples Using SAS* System, versión 6. p. 145-149. 1995.
- SAIMOLOFF, M.R., S. Schulz, Y. Jordan, K. Denich and E. Arnot. A rapid simple long-term toxicity assay for aquatic contaminants using nematode *Panagrellus redivivus*. Can J.Fish. Aquat. Sc: 37:1167-1174. 1980
- WEST, Inc, and Dave Gulley, Univ. Of Wyoming. Western EcoSystems technology, Inc. TOXSTAT versión 3.5. Copyright 1996.