

Prefectura Naval Argentina

ORDENANZA N° 01/98 (DPMA)

Tomo 6

"REGIMEN DE LA PROTECCION DEL MEDIO AMBIENTE"

Buenos Aires, 16 de febrero de 1998.

--
**NORMAS PARA LA AUTORIZACION DE USO DE PRODUCTOS
QUIMICOS UTILIZADOS PARA COMBATIR
LA CONTAMINACION POR HIDROCARBUROS**

VISTO lo informado por la Dirección de Protección del Medio Ambiente, los antecedentes obrantes al respecto, y;

CONSIDERANDO:

Que la Ley General de la Prefectura Naval Argentina (Ley N° 18398) en su artículo 5°, inciso a), subinciso 23) establece que le corresponde "Entender en lo relativo a las normas que se adopten tendientes a prohibir la contaminación de las aguas fluviales, lacustres y marítimas, por hidrocarburos u otras sustancias nocivas o peligrosas, y verificar su cumplimiento";

Que la Ley N° 22.190 le asigna funciones relevantes y exclusivas a la Prefectura Naval Argentina, al establecer el régimen de la prevención y vigilancia de la contaminación de las aguas u otros elementos del medio ambiente por agentes contaminantes provenientes de los buques y artefactos navales;

Que las Leyes N° 24.089, aprobatoria del Convenio Internacional para Prevenir la Contaminación por los Buques (MARPOL 73/78), y N° 24.292, que aprueba el Convenio Internacional sobre Cooperación, Preparación y Lucha contra la Contaminación por Hidrocarburos (OPRC/90), confieren a la Prefectura Naval Argentina el carácter de autoridad de aplicación de estos convenios.

Que el Decreto N° 1886/83 incorpora al REGINAVE su Título 8 con la denominación "De la Prevención de la Contaminación Proveniente de Buques", autorizando en su artículo 2° a la Prefectura Naval Argentina a proceder al dictado de normas complementarias que fueran necesarias;

Que el artículo 801.0503 inciso b) del REGINAVE establece las condiciones que deben satisfacer los sistemas y medios químicos para combatir la contaminación, estableciendo además que

su empleo debe estar autorizado por la Prefectura, para la cual resulta necesario regular la autorización de uso de tales productos;

Por ello;

EL PREFECTO NACIONAL NAVAL

DISPONE :

ARTICULO 1°- Apruébanse las normas para la autorización del uso de productos químicos utilizados para combatir la contaminación, que como Agregado N° 1, integran esta Ordenanza Marítima.

ARTICULO 2°- Todos aquellos productos que hayan sido autorizados con anterioridad a la presente norma, al vencimiento de los respectivos certificados deberán reiniciar la tramitación cumpliendo con los requisitos exigidos en la presente Ordenanza Marítima.

ARTICULO 3°- Derógase, a partir de la entrada en vigencia de la presente, la Ordenanza Marítima N° 1-95.

ARTICULO 4°- La presente Ordenanza entrará en vigor una vez cumplidos treinta (30) días corridos, a contar desde el siguiente al de la fecha consignada en su encabezamiento.

ARTICULO 5°- Publíquese, comuníquese y archívese.

Buenos Aires, 15 de diciembre de 1997. -

Parcial de Ordenanza N° 12 (DPMA).
(Nro. De orden 339).

**NORMAS PARA LA AUTORIZACION DE USO DE PRODUCTOS
QUIMICOS UTILIZADOS PARA COMBATIR
LA CONTAMINACION POR HIDROCARBUROS**

1.- OBJETO

Estas normas tienen por objeto establecer los procedimientos a seguir para obtener la autorización de uso de los productos químicos utilizados para combatir derrames de hidrocarburos.

2.- APLICACION

Las presentes normas se aplican a todos los productos químicos de fabricación nacional o extranjeros que se intenten utilizar para combatir la contaminación por hidrocarburos en aguas de jurisdicción nacional.

3.- REGISTRO DE PRODUCTOS AUTORIZADOS

Aquellos productos que de acuerdo a la información técnica suministrada, superen satisfactoriamente los ensayos y requisitos de la presente norma, serán incluidos en un registro que llevará la Dirección de Protección del Medio Ambiente (DPMA).

4.- DEFINICIONES

A efectos de la aplicación de estas normas, además de las definiciones establecidas en el Régimen de la Navegación Marítima, Fluvial y Lacustre (REGINAVE), rigen las siguientes:

Agente misceláneos de control de hidrocarburos: Cualquier otro producto distinto de los llamados dispersantes, aglutinantes o barreras químicas, como por ejemplo los absorbentes químicos.

Agente Tensioactivo o surfactante: Es la parte química del dispersante que produce la reducción de la tensión superficial. Contiene dos grupos químicos bien definidos: uno con características oleofílicas y otro con características hidrofílicas.

Aglutinante o barrera química: Productos químicos que rociados en el perímetro de una mancha de hidrocarburo, evitan su expansión.

Certificado de autorización de uso: Es el documento expedido por la Prefectura, el cual certifica que el producto ha cumplido con las exigencias de la presente Ordenanza y que su utilización está autorizada bajo las condiciones establecidas en el mencionado certificado.

DPMA: Dirección de Protección del Medio Ambiente, de la Prefectura Naval Argentina

Dispersante: Son sustancias químicas que reducen la tensión superficial entre el petróleo y el agua. Bajo condiciones apropiadas de uso, pueden promover la ruptura de la película de petróleo en gotas que se distribuyen en las capas superiores de la columna de agua.

Distribuidor: Toda persona física o jurídica que ha suscripto un contrato de distribución en la República Argentina, de un producto químico importado, destinado a ser utilizado para combatir la contaminación por hidrocarburos.

Fabricante: Toda persona, sociedad o institución dedicada a la fabricación de productos químicos destinados a ser utilizados para combatir la contaminación por hidrocarburos, legalmente responsable de dichos productos, que cumple con todos los requisitos exigidos a ese efecto por las leyes de la Nación.

Solvente: Es el vehículo que reduce la viscosidad del agente tensioactivo para hacerlo dispersable.

Petróleo: Se define para la presente norma como el crudo del mismo y cualquiera de sus

productos refinados.

5.- **TRAMITES A EFECTUAR PARA SOLICITAR LA APROBACION DE UN PRODUCTO QUIMICO.**

El Fabricante o Distribuidor solicitará por nota a la Dirección de Protección del Medio Ambiente, la autorización de uso del respectivo producto a cuyo efecto proporcionará, adjunta a la nota presentación, la siguiente información:

- 5.1. Nombre e identificación del producto cuya autorización se solicita.
- 5.2. Tipo de producto, dispersante, agentes misceláneos de control de hidrocarburos, aglutinante u otro.
- 5.3. Si el producto es de fabricación nacional o importado; en este último caso deberá presentar la documentación que acredite la importación del producto.
- 5.4. Nombre, Dirección y Teléfono del fabricante del producto
- 5.5. Nombre, Dirección y Teléfono de los distribuidores autorizados en el país para comercializar el producto.
- 5.6. Nombre, Dirección y Teléfono del lugar donde se pueden realizar las inspecciones establecidas en esta Ordenanza.
- 5.7. Breve descripción de la composición química, apariencia y estado del producto. Agente activo surfactante, solventes utilizados y vida útil del producto.
- 5.8. **Características físicas del producto**
 - 5.8.1. Punto de inflamación (°C).
 - 5.8.2. Punto de congelación (°C).
 - 5.8.3. Viscosidad en centipoise (cp) a 0°C y 20°C.
 - 5.8.4. Densidad a 15 °C (g/cm³).
 - 5.8.5. pH.
 - 5.8.6. Solubilidad en agua.
 - 5.8.7. Temperatura mínima y máxima de almacenamiento.
 - 5.8.8. Temperatura de separación de fases o cambios químicos.
- 5.9. **Características químicas del producto**

Se deberán adjuntar, en caso de poseerlas, las características químicas del producto indicando en mg/l. el contenido de metales pesados , cianuros e hidrocarburos clorados.
- 5.10. **Características de aplicación del producto**

Se describirá la forma de utilización, dosificación y demás condiciones que permitan la correcta utilización del producto (se podrán adjuntar folletos ilustrativos).
- 5.11. **Precauciones para el manipuleo**

Breve descripción de los riesgos para el manipuleo del producto, los daños para la salud y las acciones a tomar en caso de accidente.
- 5.12. **Folletos técnicos del producto**

Se adjuntarán a la nota presentación.
- 5.13. **Certificados y autorizaciones otorgadas por autoridades extranjeras.**

Los interesados podrán presentar, en caso de poseerlos, fotocopias autenticadas de los certificados y/o autorizaciones que el producto posea. Los mismos en caso de presentarlos deberán encontrarse en vigencia, actualizados y legalizados por el Cónsul Argentino en el lugar de origen.

Todos los folletos y certificados presentados que no se encuentren en castellano

deberán ser traducidos al mencionado idioma.

La DPMA podrá solicitar información adicional o complementaria relativa a los detalles técnicos del producto.

6.- ROTULACION DE LOS ENVASES

Todos los envases que contengan el producto deberán estar perfectamente identificados y tener indicado en forma clara, visible e indeleble la forma de uso y dosis a aplicar, punto de inflamación, precauciones e instrucciones de primeros auxilios, condiciones de estiba y demás especificaciones que permitan la correcta identificación y utilización del producto.

Se adjuntará a la nota de presentación. una copia del rótulo propuesto

7.- REQUISITOS DE LOS PRODUCTOS

Los productos deben cumplir los siguientes requisitos:

7.1. Componentes prohibidos.

Los productos no deberán contener los siguientes componentes tóxicos para el medio ambiente:

- 1.- Tetracloruro de carbono y otros compuestos orgánicos clorados.
- 2.- Benceno u otros hidrocarburos cancerígenos.
- 3.- Otros aromáticos tóxicos, fenoles y cresoles.
- 4.- Componentes que dificulten el almacenamiento o uso, incluyendo ácidos y álcalis fuertes.

7.2. **Análisis químico del producto:** El producto será ensayado de acuerdo a lo establecido en el Anexo 1 de la presente norma, y deberá satisfacer las condiciones allí establecidas.

7.3. **Biodegradación:** Todos los productos químicos que sean parcial o totalmente solubles en agua deberán ser biológicamente degradables. A tal efecto dichos productos deberán satisfacer los requisitos de biodegradabilidad establecidos en el Anexo 1 de la presente norma.

7.4. **Eficacia:** El producto deberá satisfacer los requisitos de eficacia establecidos en el ensayo descrito en el Anexo 2 de la presente norma. El ensayo descrito en el mencionado Anexo es aplicable a los productos químicos denominados "Dispersantes". Para otros productos químicos, distintos de los dispersantes (por ejemplo, absorbentes, aglutinantes, etc.), se establecerán ensayos de acuerdo al criterio de esta Autoridad, siguiendo al respecto las pautas nacionales o internacionales que se desarrollen para dichos productos. El interesado podrá sugerir algún método de prueba que sirva para verificar la eficacia de los productos mencionados.

7.5. **Toxicidad:** El producto deberá satisfacer los requisitos de toxicidad establecidos en el ensayo descrito en el Anexo 3 de la presente Ordenanza.

El interesado podrá sugerir ensayos o pruebas adicionales de los aquí descritos y que sirvan para facilitar y agilizar la autorización del producto. A tal efecto presentará la descripción de la técnica propuesta.

8.- INSPECCION PARA TOMA DE MUESTRA

Aceptados los elementos técnicos de juicio, el Fabricante o Distribuidor solicitará ante la DPMA la inspección correspondiente a los efectos que personal de esta Dirección concurra a verificar que el producto, los rótulos de los envases, y demás condiciones concuerden con los elementos técnicos de juicio presentados. Además seleccionará la cantidad de muestras necesarias para efectuar los ensayos correspondientes.

El muestreo será realizado sobre lotes de fabricación o sobre envases de importación, para lo que deberá disponerse en el momento de la inspección de tres envases plásticos de 2 litros cada uno con tapa roscada y precinto de seguridad, a los efectos de colocar la muestra (dos envases) y la contramuestra (un envase). La contramuestra quedará en poder del Fabricante o Distribuidor, y las muestras perfectamente identificadas y precintadas, serán remitidas por el interesado a los laboratorios que indique esta Autoridad, conjuntamente con la orden de ensayo que se le entregará.

Los gastos emergentes de la respectiva inspección serán abonados por el Fabricante o Distribuidor, de acuerdo a lo establecido por el régimen de inspecciones vigente.

9.- ANALISIS/ENSAYOS DE LOS PRODUCTOS

Las muestras perfectamente identificadas, serán remitidas por el interesado en el plazo y forma que se acuerde con la Prefectura, a los laboratorios que indique esta Autoridad, con el objeto de realizar los ensayos que se establecen en la presente norma.

Los gastos emergentes de dichos ensayos serán abonados por el Fabricante o Distribuidor, los que deberán previamente al pedido de inspección ante la DPMA, contactarse con el organismo designado a los efectos de coordinar la realización de los respectivos ensayos.

10.- ACEPTACION DE UN PRODUCTO

Efectuados los ensayos y comprobaciones del producto presentado, a satisfacción de la DPMA, se aprobará el mismo y se otorgará un "Certificado de Autorización de Uso".

El usuario del producto deberá contar con el original o fotocopia autenticada del mencionado documento, el que deberá encontrarse en condiciones de ser presentado a requerimiento de la PNA.

11.- CAMBIO DE UN PRODUCTO AUTORIZADO

Previo a introducir cualquier modificación a un producto autorizado el Fabricante o Distribuidor informará a la DPMA, la que dispondrá la realización de la totalidad de las pruebas que dieron origen a la aprobación original y otorgará un nuevo certificado de autorización de uso.

12.- PLAZO DE VALIDEZ DEL CERTIFICADO DE AUTORIZACION DE USO DEL PRODUCTO.

El "Certificado de Autorización de Uso del Producto" mencionado en el punto 10 de la presente, tendrá una validez máxima de ocho (8) años contados a partir de la fecha en que se expida el certificado.

13.- RENOVACION DEL CERTIFICADO DE AUTORIZACION DE USO DEL PRODUCTO.

La renovación del certificado de autorización de uso del producto deberá solicitarse como mínimo dentro de los ciento ochenta (180) días previos a la fecha del respectivo vencimiento.

La DPMA dispondrá las inspecciones y la realización de la totalidad de los ensayos que dieron origen al certificado original.

14.- FRECUENCIA DE LAS PRUEBAS

A los efectos de mantener la vigencia del "Certificado de Autorización de Uso" el Fabricante o Distribuidor deberá solicitar a la DPMA las correspondientes inspecciones de convalidación del certificado, las que deberán realizarse cada dos (2) años, tomándose como fecha de inicio del cómputo la de extensión del certificado.

A los efectos de facilitar su trámite, estas inspecciones podrán ser realizadas dentro de los sesenta (60) días previos a la fecha calendario establecida precedentemente. Estas

inspecciones serán asentadas en el reverso del correspondiente certificado de autorización de uso.

Para la realización de las mencionadas inspecciones se seguirá el procedimiento establecido en el punto 8 precedente, en cuanto a la toma de muestras, y se realizará como ensayo de comprobación el ensayo químico y de eficacia acorde a lo descrito en la presente norma, con el objeto de garantizar que se mantienen las condiciones que dieron origen a la autorización de uso. Los gastos emergentes de dichos ensayos serán abonados por el Fabricante o Distribuidor.

Además de las inspecciones mencionadas, la DPMA podrá efectuar inspecciones extraordinarias cuando considere que alguna razón relacionada con la disminución de la calidad del producto, mal uso del mismo o cualquier otra, así lo justifique. El costo que demanden dichas inspecciones no estarán a cargo del Fabricante o Distribuidor, a menos que de la inspección realizada se detecten anomalías con respecto al producto aprobado y como consecuencia de ello haya que realizar análisis adicionales, los cuales sí serán abonados por el Fabricante o Distribuidor.

15.- PERDIDA DE VALIDEZ DEL CERTIFICADO DE AUTORIZACION DE USO DEL PRODUCTO.

El "Certificado de Autorización de uso del producto" perderá su validez:

- a) Cuando se haya vencido el plazo por el que fue otorgado.
- b) Cuando se hayan alterado las características del producto autorizado, sin haberse cumplido con lo indicado en el punto 11.
- c) Cuando no se hayan realizado las inspecciones de convalidación del certificado de acuerdo a lo establecido en el punto 14 de este agregado.
- d) Cuando la Prefectura lo cancele por alguna causa válida a su juicio.

16.- CONSIDERACIONES GENERALES DE USO

Ningún producto que se utilice para derrames de hidrocarburos podrá ser utilizado en aguas navegables de jurisdicción nacional sin haber cumplido con lo establecido en la presente norma y obtenido el respectivo certificado de uso. La autorización de un determinado producto deberá atenerse a las condiciones establecidas en el respectivo certificado de autorización de uso. El uso o no de productos químicos dependerá fundamentalmente de la sensibilidad y características de la zona de utilización, así como del proceso de evaluación que habrá de seguirse en cada caso en particular, lo que deberá estar contemplado en los respectivos planes de contingencia locales. Los planes de emergencia de particulares (buques, empresas propietarias, armadoras o fletadoras de buques petroleros, empresas explotadoras de las unidades mar adentro, y puertos y otras instalaciones de manipulación de hidrocarburos), en lo que hace al uso de productos químicos en las respectivas zonas de influencia, deberán ser compatibles con lo establecido al respecto en los planes de contingencia locales de las dependencias jurisdiccionales de Prefectura.

A continuación se dan pautas generales de uso que servirán para determinar las condiciones particulares en cada plan de contingencia:

- 1) Al seleccionar el procedimiento de respuesta ante un derrame de hidrocarburos (equipos de contención, de recuperación mecánica, productos químicos o su combinación) deberá elegirse aquel que produzca el menor daño al medio ambiente.
- 2) Salvo disposición en contrario en el correspondiente certificado de autorización de uso, como norma general se considerará que los productos químicos denominados dispersantes, pueden utilizarse en agua salada (salinidad > 10 %) con una profundidad mayor a los 10 metros.
- 3) Al seleccionar el producto químico a utilizar, se deberán tener presentes los tipos de hidrocarburo

al cual es aplicable, así como las proporciones de uso recomendadas por su fabricante. Los equipos de rociado para su aplicación, deberán ser de tipo aprobado y estar adecuadamente calibrados para asegurar el dosaje aconsejado por el fabricante.

4) Como norma general los productos químicos denominados "dispersantes" no se usarán en los siguientes casos:

- a) En agua dulce.
- b.- En aguas poco profundas (profundidades menores a los 10 metros).
- c.- En agua que se utiliza para suministro de agua potable, o utilizadas para las torres de enfriamiento y plantas desalinizadoras.
- d.- En zonas anegadizas, pantanos, bañados y áreas de aguas estancadas.
- e.- En golfos, bahías, rías, lagos y/o lagunas con baja tasa de renovación de sus aguas.
- f.- En áreas costeras o reservas costeras o insulares (Nacionales, provinciales ó municipales), que requieren tratamiento y protección especiales por las comunidades y organismos que comprenden.
- g.- Areas de alta sensibilidad por ser áreas de reproducción de gran número de especies de importancia comercial con abundancia de huevos, larvas y juveniles, incluyendo hábitat de escasa profundidad y/o baja energía donde pueden restringirse o dificultarse los procesos de dilución y degradación del petróleo dispersado. También en áreas de asentamiento y/o reproducción de mamíferos, de nidificación y alimentación de aves.
- h.- Areas de alto riesgo bentónico, que se caracterizan por poseer asociaciones bentónicas de alta diversidad y potencial biótico, praderas de algas y pastos marinos, bancos de almejas y otros moluscos. Comprende biotopos particulares de fondos blandos y duros (restingas, cangrejales, costas rocosas y arenosas).
- i) En hidrocarburos en que la temperatura ha caído por debajo de su punto de escurrimiento.
- j) Hidrocarburos refinados de los denominados hidrocarburos blancos, como nafta, gas oíl, etc. El uso de dispersantes se aconseja en hidrocarburos negros, como por ejemplo en el caso de los crudos nacionales: crudo centenario, crudo tierra del fuego, crudo cerro redondo, crudo hidra, crudo rnedanito, crudo cañadón seco, crudo escalante, y los siguientes refinados: fuel oíl intermedio (IFO 180 y menores).

**CARACTERISTICAS QUIMICAS Y
BIODEGRADABILIDAD DEL PRODUCTO**

1. ALCANCE

El presente Anexo describe los parámetros químicos que serán determinados a todos aquellos productos químicos utilizados para combatir derrames de hidrocarburos y que permitan detectar posibles sustancias contaminantes. Asimismo, se describe en el presente Anexo el ensayo de biodegradabilidad que deberán satisfacer todos aquellos productos que tengan, dadas sus características intrínsecas, posibilidad de persistir en el medio acuático.

2. CARACTERISTICAS QUIMICAS DEL PRODUCTO

2.1. Determinaciones a realizar

Se realizará un análisis químico del producto con el objeto de determinar el contenido de los siguientes parámetros: Arsénico (As), Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Plomo (Pb), Mercurio (Hg), Níquel (Ni), Zinc (Zn), Cianuros (CN⁻) y Hidrocarburos clorados.

Los análisis de metales pesados se realizarán por espectrometría de Absorción Atómica con llama (para Cd, Cr, Cu, Pb, Ni y Zn) y por generación de vapor frío (As y Hg) de acuerdo al Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, previo tratamiento de la muestra.

La determinación de CN⁻ se realizará de acuerdo al Standard Method for the Examination of Water and Wastewater por determinación colorimétrica.

El contenido de Hidrocarburos Clorados se realizará, previo pretratamiento de muestra por Cromatografía Gaseosa.

2.2. Criterios de aceptación.

Los productos ensayados no deberán superar los siguientes valores:

As	0.5 mg/l.
Cd	2 mg/l.
Cr	3 mg/l.
Cu	5 mg/l.
Pb	5 mg/l.
Hg	0.5 mg/l.
Ni	2 mg/l.
Zn.....	5 mg/l.
CN	0.5 mg/l.
Hidrocarburos Clorados	0.1 mg/l.

3. BIODEGRADABILIDAD DEL PRODUCTO

3.1. Definiciones

D.B.O.: Demanda Bioquímica de Oxígeno (mg), es la cantidad de oxígeno consumida por los microorganismos al metabolizar el compuesto ensayado; también se expresa como mg de oxígeno consumido por mg de sustancia ensayada.

D.Q.O.: Demanda Química de Oxígeno (mg), es la cantidad de oxígeno equivalente al contenido de materia orgánica de una muestra que es susceptible de oxidarse con un oxidante químico fuerte; también se expresa como mg de oxígeno consumido por mg de sustancia ensayada.

D.T.O.: Demanda Teórica de Oxígeno (mg), es la cantidad total de oxígeno requerida para oxidar completamente a una sustancia. Se calcula desde la fórmula molecular y se expresa como mg. de oxígeno requeridos por mg de sustancia ensayada.

BIODEGRADACION PRIMARIA: es la alteración en la estructura química de una sustancia, producida por acción biológica, resultando en la pérdida de una propiedad específica de esa sustancia.

BIODEGRADACION TOTAL (AEROBICA): es el nivel de degradación alcanzado cuando la sustancia ensayada es totalmente utilizada por los microorganismos, resultando en la producción de CO₂, H₂O, sales minerales y nuevos constituyentes celulares microbianos (biomasa).

TEMPRANAMENTE BIODEGRADABLE: es una clasificación arbitraria de químicos, y son aquéllos que han pasado ciertos ensayos de selección específicos para la biodegradación total, estos ensayos son tan estrictos que se asume que tales compuestos serán fácil y rápidamente biodegradados en el medio acuático bajo condiciones aeróbicas.

3.2. Método: Ensayo en botella cerrada (301D de la OECD).

3.2.1. Propósito

El propósito del método es la medida de la biodegradabilidad de los compuestos orgánicos en un medio acuoso aeróbico, para una concentración de ensayo de 2 mg/l a 10 mg/l de material activo, siendo 2 mg/l la concentración estándar.

Nota: una concentración inicial de 2 mg permite la determinación de un 95% de degradación. Los compuestos con una baja D.T.O. pueden requerir mayores concentraciones iniciales.

3.2.1.1. Definiciones y unidades

La degradación viene definida como el porcentaje de la demanda bioquímica de oxígeno (D.B.O.) durante 28 días, respecto de la demanda teórica de oxígeno (D.T.O.) o de la demanda química de oxígeno (D.Q.O.):

$$\% \text{ de biodegradabilidad} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg de sustancia activa}}{\text{D.T.O.}} \times 100$$

$$= \frac{\text{mg O}_2/\text{mg de sustancia activa}}{\text{D.Q.O.}} \times 100$$

3.2.1.2. Principio del método.

Una cantidad predeterminada del compuesto es disuelta en un medio inorgánico (solución de nutrientes minerales), que provea una concentración de 2 mg de sustancia activa por litro (S.A/l). La solución es inoculada con un número relativamente pequeño de microorganismos de una población mixta y mantenida en botellas cerradas en la oscuridad en un baño de temperatura constante $20 \pm 1^\circ\text{C}$. La degradación es seguida por el análisis del oxígeno disuelto durante un período de 28 días. Un ensayo control con el inoculo, pero sin el material ensayado es realizado en paralelo para la determinación de los blancos de oxígeno.

3.2.2. Materiales.

- * **Organismos de ensayo: (Inóculo):** se utilizará un inóculo que sea representativo de las aguas superficiales continentales o marinas.

Colectar la muestra y conservarla en aerobiosis hasta su utilización. El volumen a ser usado deberá ser determinado por ensayos de prueba.

- * **Equipamiento.**

- Además de los aparatos usuales de laboratorio, se deberá contar con:
- Botellas de D.B.O., con tapas de vidrio de 250 ml - 300 ml o de 100 ml - 125 ml.
- Baño de agua o incubadora, para mantener las botellas a temperatura constante (por lo menos con $\pm 1^\circ\text{C}$) y en la oscuridad.
- Botellas de vidrio (2l a 5l) para la preparación del medio y para llenar las botellas de D.B.O.
- Electrodo de oxígeno y lector, o equipamiento y reactivos para la titulación por Winkler.

- * **Reactivos**

- **Agua destilada o deionizada** conteniendo no más de 0.01 mg Cu/l, saturada de aire. El volumen preparado estará de acuerdo con las necesidades diarias, por ej. 50 l, a una temperatura de 20°C , fuertemente aireada por 20 min. Generalmente, el agua está lista para ser usada después de permanecer por 20 horas a 20°C .
Para propósitos de control se determina la concentración de oxígeno disuelto. La concentración a 20°C es cercana a 9 mg O_2/l .

- **Medio mineral: soluciones:**

1. Dihidrógeno ortofosfato de Potasio (KH_2PO_4) 8,50g
Hidrógeno ortofosfato de Dipotasio (K_2HPO_4) 21,75g
Hidrógeno ortofosfato de Disodio Dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 33,40g.
Cloruro de Amonio (NH_4Cl) 0,50 g

Disolver en agua hasta 1 litro. El pH de la solución debe ser de 7,4.

2. Cloruro de Calcio, anhidro (CaCl_2) 27,50g. o Cloruro de Calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 36,40g. Disolver en agua hasta 1litro.

3. Sulfato de Magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22,50g

Disolver en agua hasta 1litro.

4. Cloruro de Hierro III hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,25g

Disolver en agua hasta un litro.

Nota: para evitar la preparación de esta solución inmediatamente antes de usar, adicionarle una gota de CIH concentrado o 0,4g de EDTA por litro. Si se forma un precipitado en la solución stock, reemplazarla por una solución nueva.

- * **Preparación del medio mineral:** mezclar 1 ml de las soluciones **1,2,3 y 4** con 1000 ml de agua destilada y aireada.

- * **Soluciones de las sustancias ensayadas:**

- Si la solubilidad excede de 1 g/l, disolver 1-10g de la sustancia de ensayo o de referencia en agua y llevar a 1 litro. Preparar las soluciones en el medio mineral o adicionar la sustancia directamente al medio mineral asegurándose que las sustancias se disuelvan.

3.2.3. Procedimiento.

Colocar cada solución preparada en el respectivo grupo de botellas de D.B.O. por medio de mangueras desde el cuarto inferior de la botella (no desde el fondo), hasta que todas las botellas sean llenadas. Golpear suavemente para remover las burbujas de aire.

Analizar, en tiempo cero, el O_2 disuelto por Winkler o por método electrométrico. El contenido de las botellas puede ser preservado para posteriores análisis del O_2 por Winkler, adicionando sulfato de manganeso (II) e hidróxido de sodio (el primer reactivo de Winkler). Depositar cuidadosamente las botellas tapadas, conteniendo el oxígeno fijado como un óxido hidratado de manganeso (III), marrón, en la oscuridad a 10 - 20°C por no más de 24 hs. antes de proceder con los siguientes pasos del método de Winkler.

Tapar las botellas de réplica remanentes asegurándose de que no queden burbujas de aire, e incubar a 20°C en la oscuridad.

Cada serie debe ser acompañada por una serie paralela completa para la determinación de un

blanco del medio de cultivo inoculado.

Retirar al menos un duplicado de todas las series para el análisis de O₂ disuelto a intervalos (al menos semanalmente) durante los 28 días de incubación.

El muestreo semanal permitirá evaluar el porcentaje de remoción dentro de una ventana de 14 días, mientras que muestreando cada 3-4 días permitiría la identificación de una ventana de 10 días, pero requeriría más del doble de botellas.

Para sustancias ensayadas que contengan nitrógeno, se deben realizar correcciones por la toma de oxígeno por alguna nitrificación que pudiere ocurrir. Para hacer ésto, usar el método electrométrico para determinar el O₂ disuelto y luego extraer una muestra de la botella de D.B.O. para el análisis de nitritos y nitratos. A partir del incremento en la concentración de nitritos y nitratos calcular el O₂ consumido.

3.2.4. Tratamiento de los resultados.

Primero calcular la D.B.O. para cada período, restando la disminución del O₂ (mg O₂/l) del blanco, de aquél exhibido por la sustancia ensayada. Dividir esta disminución corregida por la concentración (mg/l) de la sustancia ensayada, para obtener la D.B.O. específica como mg O₂ por mg de sustancia ensayada.

Calcular el porcentaje de biodegradación, dividiendo la D.B.O. específica por la D.T.O. o D.Q.O.:

$$\text{D.B.O.} = \frac{\text{mg O}_2/\text{l consumido por la sustancia ensayada} - \text{O}_2/\text{l consumido por el blanco}}{\text{mg de sustancia ensayada/l}} = \text{mg O}_2/\text{mg}$$

$$\% \text{degradación} = \frac{\text{D.B.O. (mg O}_2/\text{mg sustancia ensayada)}}{\text{D.T.O. (mg O}_2/\text{mg sustancia ensayada)}} \times 100$$

$$\% \text{degradación} = \frac{\text{D.B.O. (mg O}_2/\text{mg sustancia ensayada)}}{\text{D.Q.O. (mg O}_2/\text{mg sustancia ensayada)}} \times 100$$

Estos dos métodos no dan necesariamente el mismo valor; es preferible usar el primer método.

Para las sustancias que contengan nitrógeno, usar la D.T.O apropiada (NH₄⁺ ó NO₃) de acuerdo a la nitrificación esperada.

3.2.5. Validación de los resultados.

La disminución del oxígeno en el blanco no debe exceder los 1,5 mg O₂ disuelto/l después de 28 días. Valores más elevados requerirán la investigación de las técnicas experimentales.

La concentración residual de oxígeno en las botellas de ensayo no debe caer por debajo de los 0,5 mg/l en ningún momento. Estos bajos niveles de oxígeno son aceptables sólo si el método de

determinación usado es capaz de medirlos con exactitud.

3.2.6. Criterios de aceptación.

Una sustancia es considerada tempranamente biodegradable si alguno de los siguientes parámetros son satisfechos:

Reducción del carbono orgánico disuelto: $\geq 70\%$

Generación del CO_2 : $\geq 60\%$ de la producción teórica de CO_2

Disminución del O_2 : $\geq 60\%$ del requerimiento teórico o de la Demanda Química (DQO).

Dentro de los 28 días de ensayo, siempre y cuando se haya alcanzado el 10 % del parámetro seleccionado, diez días antes de haber logrado el valor aceptado.

3.2.7. Productos a ensayar.

Se determinará la biodegradabilidad del producto químico sólo.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS DE METODOLOGIAS.

- Métodos normalizados, para el análisis de aguas potables y residuales, Edición 17^{ava}, APHA-AWWAWPCF.
- OECD. Guideline for testing of chemicals. 301D (Adopted 17.07.92).

ENSAYO DE EFICACIA

1. CONSIDERACIONES PRELIMINARES

El ensayo de eficacia que se describe en la presente norma es exclusivamente aplicable a productos químicos denominados "DISPERSANTES". Este método, que ha sido adaptado para ser utilizado en nuestro país se ha denominado "METODO DE EFICACIA CON SISTEMA DE AGITACION DE ACCION DE MUÑECA" y será el método utilizado para evaluar la eficacia de un dispersante de petróleo.

2. ALCANCE

Este método estima la cantidad de hidrocarburo de referencia que se dispersa en agua de mar (o agua dulce según corresponda) por medio de la aplicación de un dispersante de derrames de petróleo, bajo condiciones de ensayo estándar en laboratorio. El método también se podrá utilizar para estimar las cantidades de crudo y otros derivados del petróleo que se puedan dispersar. Para los fines de la Especificación para los dispersantes de derrames de petróleo se requiere llevar a cabo el ensayo con dos crudos de referencia: Cañadón Seco y Escalante.

3. DEFINICION

El índice de Eficiencia se define como el porcentaje de hidrocarburo de prueba que ha sido transferido como pequeñas gotas a la fase acuosa, respecto al total de hidrocarburo utilizado en el ensayo y bajo las condiciones del mismo, asumiendo una distribución completa y pareja en la fase acuosa, en el momento de la toma de la muestra.

4. RESUMEN DEL METODO

- 4.1. Se sujetan 4 embudos de separación de 250 ml a un agitador de acción de muñeca Burrell. Se puede variar la energía de mezclado del agitador, para este ensayo se seleccionó un nivel de agitación muy bajo, es decir, un ángulo de desviación de 1,5 a 1,6°. Se llenan los embudos de separación con aproximadamente 250 ml de agua de mar o agua dulce, a 15 °C ± 1°C, según corresponda, y se agrega el petróleo de prueba a cada uno. Se puede realizar la premezcla del petróleo crudo y el dispersante en la proporción de dispersante/petróleo (PDP) deseada.
- 4.2. Se agitan los embudos en el agitador de acción de muñeca durante 15 minutos para dispersar el petróleo en el agua. Durante la operación de agitación, se agregan almohadillas absorbentes a la superficie del agua y se continúa el proceso de agitación durante 5 minutos adicionales. Se vacía el agua y se extrae el petróleo dispersado del agua con solvente. Luego se extrae por separado el petróleo no dispersado remanente en el embudo y en la almohadilla.

- 4.3. Se determina el contenido de petróleo de los dos extractos usando un espectrofotómetro ajustado a un valor de longitud de onda adecuado, por ejemplo, 460 nm. Se diluyen los extractos a fin de obtener una lectura en el intervalo lineal, por ejemplo, 0,1 a 1,1. Se determina la proporción de petróleo dispersado respecto a la suma del petróleo dispersado más el no dispersado sobre la base de la dilución y la medición de absorbancia de cada extracto. Se repite el procedimiento por cada par de extractos y se calcula el porcentaje de petróleo dispersado para cada uno. Se calcula el promedio y la desviación estándar correspondientes a los cuatro puntos de datos (o más si se desea).
- 4.4. La extracción del agua y la almohadilla absorbente, y el uso de ese total como 100% del petróleo, elimina la necesidad de una curva de calibración para cada petróleo.

5. APARATOS.

5.1. Embudos de separación.

- (i). Cuatro embudos de separación de vidrio de 250 ml. para su sujeción al agitador. La línea de 250 ml. debe estar aproximadamente en el punto ancho del frasco (se recomienda embudos de aproximadamente 20,32 cm desde la base del cuello hasta el robinete en lugar de los embudos de separación más cortos "con forma de pera"). Se tapa cada embudo para evitar salpicaduras.
- (ii). Cuatro embudos de separación de 500 ml con tapones de vidrio para extraer la muestra de petróleo dispersado en agua.

5.2. **Agitador de muñeca Burrell**, modelo 75 (FISHER 14-260 o similar), con brazos equipados con dos abrazaderas dobles en cada lado (las que puedan sostener un total de 8 embudos de separación). Para mayor comodidad, es conveniente utilizar sólo 4 abrazaderas frontales.

5.3. Recipientes de vidrio.

- (i) Cuatro recipientes de vidrio de 400 ml (por prueba) para vaciar la muestra de petróleo dispersado en agua (Nota).
- (ii) Ocho recipientes de vidrio de 100 ml (por prueba) para los extractos de solvente.
- (iii) Frasco dosificador 50 ml; Opcional para dosificar alícuotas de solvente cuando se realizan varias pruebas.

NOTA: Opcional (para eliminar la necesidad de los recipientes de 400 ml se puede fabricar un bastidor para sostener los 4 embudos de separación de extracción (500 ml) y una plataforma para elevar el aparato del agitador, de manera que las puntas de los 4 embudos de separación de agitación (250 ml) se encuentren a una distancia suficiente de la mesada del banco (por ejemplo, a aproximadamente 33 cm) y se pueda vaciar la muestra de petróleo dispersado en agua directamente en los embudos de separación de extracción ubicados en el bastidor.

- 5.4. Microdosificadores digitales:** de 100 microlitos y 1000 microlitos.
- 5.5. Almohadillas absorbentes de polipropileno** (láminas absorbentes 3M recortadas en cuadrados de 3,8 cm.)
- 5.6. Espectrofotómetro.** Un espectrofotómetro para medir en el visible y una cantidad adecuada de tubos de muestra debidamente adaptados (cubetas).

6. REACTIVOS

- 6.1. Hidrocarburos de prueba.** Petróleo crudo: Cañadón Seco y Escalante.
- 6.2. Agua de mar.** Agua de mar natural o sintética; la formulación de esta última es: NaCl 21,03 g/l; Na₂SO₄ 3,52 g/l; KCl 0,61 g/l; KBr 0,088 g/l; MgCl₂·6H₂O 9,5 g/l; CaCl₂·2H₂O 1,32 g/l; NaHCO₃ 0,17 g/l.
- 6.3. Cloroformo o cloruro de metileno,** como solvente, para la extracción.

7. METODO

7.1. Procedimiento.

- (i) Si no se realiza la adición directa del dispersante, prepare la mezcla deseada de dispersante/petróleo (D/P), por ejemplo, 1 parte de dispersante en 25 partes de petróleo.
- (ii) Llene cada embudo de prueba con agua de mar o con agua dulce según corresponda, a 15° C ±1°C, hasta alcanzar la parte más ancha del embudo (aproximadamente 250 ml). Usando una pipeta de 100 microlitos, agregue con cuidado el petróleo de prueba, 1 ml, a la superficie del agua en cada embudo de prueba. Si se utiliza el método de aplicación directa del dispersante, agregue con cuidado la cantidad deseada al petróleo. Tape los embudos, ponga en marcha el agitador, y deje agitar durante 15 minutos. Luego, sin detener el agitador, agregue una almohadilla absorbente a cada embudo de prueba. Vuelva a colocar el tapón y siga agitando durante cinco minutos adicionales. El absorbente recolectará el petróleo no dispersado.

Sin detener el agitador, extraiga los tapones de cada embudo y deje que la mezcla de petróleo dispersado y agua proveniente de cada embudo se vacíe en los recipientes de vidrio de 400 ml o los embudos de separación de 500 ml (Nota 1). La almohadilla absorbente queda en el embudo. Asegúrese de cerrar el robinete inmediatamente después de que se vacía el agua a fin de evitar que el petróleo salga de los lados del embudo de prueba e ingrese al recipiente.

Detenga el agitador y agregue 50 ml de solvente a cada embudo a fin de extraer el petróleo

de las almohadillas absorbentes. Asegúrese de lavar los lados del embudo con el solvente a medida que agrega la primera alícuota de 50 ml. Agite durante 5 a 10 minutos y luego vacíe la mezcla de petróleo/solvente de cada embudo de prueba en los recipientes de 100 ml independientes, presionando la almohadilla contra el lado del frasco de vidrio para eliminar la mayor cantidad posible de petróleo. Repita este procedimiento con una segunda alícuota de 50 ml de solvente, agregando el drenaje al primer extracto en los recipientes de 100 ml respectivos. Se utiliza un total de 100 ml de solvente por cada muestra de petróleo no dispersado (Nota 2). (Se dejan estos embudos de agitación en su lugar al final del experimento y, después de enjuagarlos con agua, están listos para el siguiente ciclo de pruebas).

(iii) Mientras se extraen las almohadillas se puede comenzar a extraer las fracciones de petróleo dispersado en agua. Si se utilizaron los recipientes de 400 ml, transfiera cada una de estas fracciones a un juego de embudos de separación de 500 ml. Enjuague cada uno de los recipientes de 400 ml con 50 ml de solvente y agregue esto a los embudos de separación respectivos. Tape los embudos y agítelos vigorosamente en forma manual. Después de permitir una separación completa, extraiga la fracción inferior en un juego de recipientes de 100 ml. repita el procedimiento con una segunda alícuota de 50 ml de solvente por cada muestra, hasta que la fracción superior esté libre de petróleo. Se utiliza un total de 100 ml de solvente por cada muestra de petróleo dispersado. Estos procedimientos dan como resultado dos recipientes de 100 ml de extractos por cada embudo de prueba, uno de petróleo dispersado del agua, el otro de petróleo no dispersado de las almohadillas absorbentes.

8. CALCULO

- (i) Se examinan los extractos en el espectrofotómetro ajustado a un valor de longitud de onda adecuado, 460 nm. Es posible que se deban diluir los extractos para que queden comprendidos en el intervalo lineal, 0,1 a 1,1 del espectrofotómetro. Si una muestra diluida es demasiado baja, seleccione una longitud de onda que permita obtener una lectura en este intervalo de ser posible, y utilice ese mismo ajuste para los dos extractos. Se puede efectuar la dilución en las cubetas empleadas en el espectrofotómetro, usando goteros para agregar cantidades conocidas de extracto y solvente puro.
- (ii) Coloque en cero el espectrofotómetro con un blanco de solvente. Lea la abosorbancia de cada par de muestras de prueba, el extracto de agua y el extracto de la almohadilla absorbente. Se puede calcular el porcentaje dispersado (%D) sin usar una curva de calibración.

El %D se calcula de la siguiente manera:

$$(1) \quad \%D = [DD * DABS / (DD * DABS + UD * UABS)] * 100$$

donde: DD: factor de dilución para la muestra dispersada.

UD: factor de dilución para la muestra no dispersada.

DABS: es la lectura de la absorbancia de la muestra dispersada.

UABS: es la lectura de la absorbancia de la muestra no dispersada.

El factor de dilución se calcula de la siguiente manera:

$$D = TVOL/DVOL$$

donde: TVOL= volumen de la muestra + volumen de solvente puro

DVOL= volumen de la muestra.

La ecuación (1) se puede simplificar a:

$$\%D = [1/(1+A*F)] * 100$$

donde: A= UABS/DABS

F= UD/DD

Se puede calcular una desviación estándar a partir de los resultados porcentuales de dispersión de elementos repetitivos múltiples (por lo menos 4).

NOTAS:

- 1.- Se puede eliminar un paso en el procedimiento de extracción del agua colocando el aparato de agitación en una plataforma elevada a una altura en la cual las puntas de los frascos de agitación se encuentren a una distancia suficiente por encima de la mesada del banco (por ejemplo, a aproximadamente 33 cm) de manera que se pueda colocar debajo el bastidor de embudos de extracción. Ahora se pueden transferir directamente las muestras a los embudos de separación para la extracción. El uso de un bastidor que sostenga los embudos de extracción permite al operador deslizar simplemente dichos embudos debajo de los de agitación a fin de obtener la muestra de petróleo dispersado para su extracción. La eliminación del paso de transferencia de las muestras a los recipientes de 400 ml ahorra tiempo y material.
- 2.- Un procedimiento alternativo consiste en utilizar alícuotas de solvente de aproximadamente 40 ml en cada una de las extracciones y hacer que los extractos totales alcancen 100 ml en frascos volumétricos de 100 ml, antes de colocar dichos extractos en los recipientes de 100 ml. Se pueden marcar los embudos de agitación en el nivel de 40 ml y agregar solvente por medio de un gotero, para mayor comodidad. Esto también permite efectuar extracciones adicionales de 5 a 10 ml de los embudos de separación si se desea, mientras se mantienen los 100 ml de solvente total.

9. CRITERIO DE ACEPTACION DEL PRODUCTO.

Se aceptarán aquellos productos, formulados para agua salada o agua dulce, que posean un porcentaje de eficiencia de 60% ±5% o superior.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS DE METODOLOGIAS.

- Using oil spill dispersants on the sea. Committe on effectiveness of oil spill dispersants. Natinal

Academy Press. Washington, D.C. 1989.

- United States Environmental Protection Agency. Risk reduction engineering laboratory. Cincinnati, OH 45 268. EPA/600/S-92/065. EPA/600/SR-93/113.

ENSAYO DE TOXICIDAD

1. ALCANCE

Los métodos que se describen en la presente norma se aplican a todos los productos químicos que sean utilizados para combatir derrames de hidrocarburos y que debido a sus características específicas puedan persistir en el medio acuático provocando posibles alteraciones a dicho medio.

2. DEFINICION

Concentración letal 50 (CL50): concentración de una sustancia, a la cual se produce el 50% de mortalidad de los organismos expuestos a la misma durante un período determinado de ensayo.

Concentración efectiva 50 (CE 50): concentración de una sustancia, a la cual se produce la inmovilización del 50 % de los organismos expuestos a la misma durante un período determinado de ensayo.

3. RESUMEN DE METODO

La prueba de toxicidad descrita en la presente norma implica exponer a organismos acuáticos vivos (de agua de mar o agua dulce según el producto a ensayar) a determinadas concentraciones del producto, con el objeto de determinar, en un período de tiempo predeterminado, los efectos biológicos que dicho producto pueda provocar a la vida acuática.

A los efectos de determinar la toxicidad que puedan presentar los distintos productos se han seleccionado las siguientes especies: ensayo de toxicidad aguda, 48 h de exposición con *Artemia salina*; ensayo de toxicidad aguda con peces, 96 h de exposición utilizando una de las especies marinas siguientes: y pejerrey de mar (*Odontesthes* sp), corvina rubia (*Micropogonias furnieri*) o pescadilla común (*Cynoscion striatus*) según la disponibilidad. Dado que en la actualidad no se cuenta con posibilidad técnica de ejecutar este último tipo de ensayo, se seleccionaron, de manera transitoria y alternativa el ensayo de toxicidad aguda, 96 h de exposición con *Cnesterodon descemmaculatus*, en agua dulce).

4. PREPARACION DE MUESTRA PARA ENSAYOS DE TOXICIDAD

Para preparar las soluciones de ensayo de toxicidad del producto mezclas de petróleo y producto, realizar la mezcla con un homogeneizador eléctrico con paleta de acero inoxidable, con recipiente de borosilicato de un litro de capacidad y con una velocidad de aproximadamente 10.000 rpm. En el caso que se produzca formación de espuma durante el mezclado, reducir la velocidad de agitación.

Para preparar la solución de ensayo del producto colocar 550 ml de agua de mar sintética dentro del recipiente y con una micropipeta adicionar 0,55 ml del producto. Mezclar por 5

segundos.

Para preparar la solución de ensayo de la mezcla crudo-producto, colocar 550 ml de agua de mar sintética dentro del recipiente. Mientras la homogeneizadora está en operación, adicionar 0,5 ml del crudo y 0,05 ml del producto. Mezclar por 5 segundos.

Inmediatamente después de la preparación de las soluciones, fraccionar para la realización del correspondiente ensayo.

5. ENSAYO DE TOXICIDAD CON ESPECIES DE AGUA DE MAR

5.1. Ensayo de toxicidad con Artemia salina.

5.1.1. Principio.

Determinación de la concentración a la cual el 50% de las larvas nauplii de **Artemia salina** mueren dentro de las 48 horas bajo las condiciones descritas en el presente ensayo.

5.1.2. Materiales

***Organismos de ensayo:** debe ser usada una población homogénea de larvas nauplii II y III obtenidas a partir de huevos de resistencia (de provisión comercial) de una cepa bien identificada de **Artemia salina**.

***Solución diluyente:** agua de mar artificial estándar de 35 ± 1 ‰ de salinidad, tanto para la incubación como para el ensayo.

Formulación: NaCl 21,03 g/l, Na₂SO₄ 3,52 g/l, KCl 0,61 g/l, KBr 0,088 g/l, MgCl₂·6H₂O 9,5 g/l, CaCl₂·2H₂O 1,32 g/l, NaHCO₃ 0,17 g/l.

Después de la aireación y estabilización por 24 horas, la dilución deberá tener un pH de $8 \pm 0,5$ y un contenido de oxígeno equivalente por lo menos al 90 % de saturación. Si es necesario el pH podrá ser ajustado con ácido clorhídrico o con hidróxido de sodio. Antes de ser usada el agua debe ser filtrada a través de un filtro de 1 µm y aireada; puede ser almacenada durante dos semanas a baja temperatura.

***Muestra:** se analizará la toxicidad del producto.

***Equipamiento:**

- Gabinete a temperatura constante: 25 ± 1 °C
- Cajas de vidrio de Petri (60 mm x 12 mm) o Tubos de ensayo con una capacidad de 30 ml.
- Pipetas Pasteur con aberturas planas.
- Tubos de incubación cilíndricos o preferentemente cilindrocónicos (diámetro aproximado 35 mm) con una capacidad de al menos 100 ml.
- Medidor de oxígeno disuelto.
- Lupa binocular para disección.
- Bomba de aire (de acuario)
- Tubos fluorescentes, tipo luz día.
- Materiales usuales de laboratorio.

***Tóxico de referencia:** el químico de referencia seleccionado es el laurilsulfato de sodio (grado 98%) para su utilización en controles positivos.

5.1.3. Procedimiento.

5.1.3.1. Cultivo y preparación de las larvas nauplii.

Para cada ensayo son incubados aproximadamente 10 mg de huevos de resistencia en 100 ml de agua de mar en un tubo de incubación, a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y con una intensidad de luz de 500 lux. Todos los huevos y larvas deben ser mantenidas en suspensión continua con una leve aireación provista por un tubo de aire extendido sobre el fondo del tubo de incubación. Después de 18 a 24 horas se detiene la aireación y las larvas nauplii que se encuentran en el fondo del tubo son succionadas con una pipeta Pasteur y transferidas a un vaso de precipitado conteniendo 200 ml de agua de mar. Esta suspensión debe ser aireada y mantenida durante exactamente 24 horas a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y con una iluminación de 500 - 1000 lux. Durante este tiempo todas las larvas nauplii mudarán al estadio II y algunas de ellas hasta el estadio III. Una alícuota de las nauplii es colocada en un tubo de ensayo para su subsecuente distribución manual a los tubos o cajas de ensayo.

5.1.3.2. Ensayo de toxicidad.

El ensayo es llevado a cabo en tubos de ensayo o cajas de petri. 10 larvas nauplii son transferidas con una pipeta Pasteur dentro de cada tubo o caja de ensayo. El volumen de agua de mar transferido con las nauplii, no puede exceder los 0,05 ml. En cada tubo o caja se adicionan 10 ml del tóxico a las distintas concentraciones a ensayar (aclimatado a 25°C) y se incuban en la oscuridad a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de 48 horas el número de larvas muertas en cada tubo o caja es determinado bajo la lupa. Las larvas nauplii se consideran muertas si no se observa movimiento de sus apéndices durante 10 segundos. Inmediatamente después de contadas, se mide la concentración de oxígeno en el recipiente de ensayo con la concentración más baja de tóxico que provocó el 100% de mortalidad.

5.1.3.3. Ensayo preliminar.

Este ensayo se realiza para determinar el intervalo crítico. Una serie de diluciones del tóxico son preparadas con agua de mar artificial (por ej.: 10.000 - 1000 - 100 - 10 - 0,1 - 0,001 mg/l).

En este ensayo se utiliza un recipiente de ensayo por cada concentración, y uno adicional con 10 larvas nauplii en 10 ml de agua de mar artificial como control.

5.1.3.4. Ensayo definitivo.

El objetivo del ensayo es la determinación de la CL_{50} _[48] a partir de las concentraciones de intervalo crítico determinadas en el ensayo preliminar.

Las concentraciones (o diluciones) son elegidas en una escala logarítmica. En principio cinco concentraciones serán suficientes, sin embargo, para una CL 50 satisfactoria, al menos dos datos deben ser situados en el intervalo de mortalidad de 5% y 95 %. Si éste no es el caso, el ensayo deberá ser repetido con concentraciones intermedias adicionales de la escala de dilución. Para cada concentración, incluyendo el control, se realizarán 3 réplicas.

5.1.3.5. Verificación de la sensibilidad de las larvas de Artemia salina y la conformidad con el procedimiento experimental.

La CL50 del químico de referencia, laurilsulfato de sodio, debe ser determinada paralelamente con el ensayo definitivo para estandarizar el procedimiento experimental. Las siguientes concentraciones de laurilsulfato de sodio deben ser ensayadas con tres réplicas: 1 - 5 - 10 - 15 y 20 mg/l.

Para preparar la solución patrón de 100 mg/l de laurilsulfato de sodio, se disuelve el químico a 25 °C usando un agitador magnético, ya que el compuesto no se disuelve rápidamente. La solución patrón no debe ser conservada durante más de 48 horas.

5.1.4. Cálculo y validez de los resultados.

La CL50_[48] puede ser calculada por interpolación gráfica. Los porcentajes de mortalidad entre 5 y 95 son calculados por la media de larvas nauplii muertas por cada concentración y volcadas en un papel logarítmico. Una línea recta es trazada a través de los puntos. La intersección de esta línea con la abscisa de 50 % de mortalidad determina la CL50_[24]. Un procedimiento alternativo (más preciso) es usar el método de la TREVORS 1986 con el cual el límite de confianza del 95 % puede ser calculado con programas de computadora.

El ensayo puede ser considerado válido si las siguientes condiciones son cumplidas:

- el porcentaje de mortalidad en el control no excede el 10 %.
- la CL50_[48] del ensayo con laurilsulfato de sodio es situada entre 5 mg/l y 10 mg/l.
- la concentración de oxígeno disuelto al final del ensayo es superior a 2 mg/l en la concentración más baja a la cual se produce una mortalidad del 100 % de las larvas.

5.1.5. Criterio de aceptación del producto: El CL50_[48] deberá ser mayor de 10ppm.

5.2. Ensayo de toxicidad aguda con “Cnesterodon descemmaculatus”.

5.2.1. Principio.

Determinación de la concentración a la cual el 50% de los organismos mueren dentro de las 96 horas bajo las condiciones descritas en el presente ensayo.

5.2.2. Materiales.

***Organismos de ensayo:** se utilizarán organismos obtenidos en laboratorio con más de dos meses de vida.

***Solución diluyente:** agua dulce artificial, dureza 150 gr CaCO₃/litro.

Formulación: CaCl₂·2H₂O 0,1764 g/l; KCl 0,00345 g/l; MgSO₄·H₂O 0,07395 g/l; NaHCO₃ 0,140 g/l.

* **Muestra:** se analizará la toxicidad del producto solo.

***Equipamiento:**

- Gabinete a temperatura constante de 20 ± 1°C.
- Recipientes de vidrio de 3 litros de capacidad.
- Tubos fluorescentes, tipo luz día, lámparas de mercurio halogenado.
- Materiales usuales de laboratorio.

5.2.3. Procedimiento.

Se utilizarán 1 pez por cada recipiente de ensayo, Con 3 réplicas por concentración. El número de peces por concentración deberá ser de 20, como mínimo y de 30 como máximo. Las concentraciones de ensayo deberán ser 5 como mínimo y tener un factor de dilución de 0,3 o 0,5.

El volumen de la solución de ensayo será de 1 litro, renovada cada 24 horas.

El fotoperíodo será de 12 horas luz-oscuridad y la aireación será la necesaria para asegurar el 50 % de saturación de oxígeno (150 burbujas/minuto).

Paralelamente se realizarán blancos por triplicado.

El ensayo se realizará durante 96 horas al finalizar se registrará la CL50. Se considerará válido el ensayo si la mortalidad en los controles es inferior al 90%.

5.2.4. Criterio de aceptación del producto: La toxicidad del producto solo deberá tener un $CL50_{[96]} > [100 \text{ mg/l.}]$. Este criterio de aceptación será aplicado exclusivamente para productos denominados “dispersantes”. Para otro tipo de producto la DPMA determinará el tipo de ensayo de toxicidad y el correspondiente criterio de aceptación.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS DE METODOLOGIAS.

- Ecotoxicological testing for the marine environment. Vol.2. Edts:G. Persoone, E. Jaspers, C. Claus, 1984.
- United States Environmental Protection Agency. Office of research and development Washington DC 20460, EPA/600/R-93/195, EPA/600/4-90/027, (protocolos modificados para las especies locales).
- Kucklick, J.H. (ed) 1994. Proceeding of the first meeting of the chemical response to oil spills: Ecological effects research forum. Marine spill response corporation, Washington, D.C. MSRC Technical report series 94-017,83p.
- Kucklick, J.H. (ed) 1995. Proceeding of the second meeting of the chemical response to oil spills: Ecological effects research forum. Marine spill response corporation, Washington, D.C. MSRC Technical report series 95-009,30p.
- 29206- Federal Register/vol. 49 Nro. 139/Wednesday, July 18, 1984/ Rules and Regulations.
- Di Marzio, W.; Saenz, M.E., Alberdi, J.L. y Tortorelli, M.C.. Protocolo para evaluar la toxicidad aguada en peces de agua dulce, utilizando como organismo de prueba *Cnesterodon decemmaculatus*. Comunicación interna de la Universidad de Luján. 1992.