

1-1-2007

Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del mercurio por medio de bioensayos de toxicidad acuática sobre *Daphnia pulex*

Alba Janneth Bernal Paredes
Universidad de La Salle, Bogotá

Andrea Paola Rojas Avella
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria

Citación recomendada

Bernal Paredes, A. J., & Rojas Avella, A. P. (2007). Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del mercurio por medio de bioensayos de toxicidad acuática sobre *Daphnia pulex*. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria/281

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Facultad de Ingeniería at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Ingeniería Ambiental y Sanitaria by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL50-48) DEL
MERCURIO POR MEDIO DE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD ACUÁTICA SOBRE
Daphnia Pulex

ALBA JANNETH BERNAL PAREDES
ANDREA PAOLA ROJAS AVELLA

Tesis de Grado para Optar al Título de
Ingenieras Ambientales y Sanitarias

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA
BOGOTA D.C.
2007

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL50-48) DEL
MERCURIO POR MEDIO DE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD ACUÁTICA SOBRE
Daphnia Pulex

ALBA JANNETH BERNAL PAREDES	41012014
ANDREA PAOLA ROJAS AVELLA	41001100

Tesis de Grado para Optar al Título de
Ingenieras Ambientales y Sanitarias

Director
PEDRO MIGUEL ESCOBAR MALAVER
QUÍMICO INDUSTRIAL
LIC QUÍMICA Y BIOLOGIA

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA
BOGOTA D.C.
2007

Nota de Aceptación

Director

Jurado 1

Jurado 2

Bogotá D.C., mayo 24 de 2007

A nuestras Familias por sus sacrificios, cariño y
apoyo incondicional, compañía,
ayuda, comprensión, cariño y amor
brindado en el transcurso de nuestras vidas
para la culminación de nuestra carrera.
A Dios por su apoyo y por las oportunidades
ofrecidas en la vida de cada una.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras expresa sus agradecimientos a:

A nuestro director Pedro Miguel Escobar Malaver, por sus excelentes y valiosas orientaciones y enseñanzas brindadas a lo largo de este trabajo de investigación.

A Yanneth Parra y Rubén Darío Londoño, sus apreciables intervenciones, orientaciones y motivación en la realización de este proyecto.

A la empresa REFISAL – BRINSA S.A., en especial a la Ingeniera Andrea Rosero, por su valiosa colaboración y ayuda para la utilización de vertimientos que contienen Mercurio, en la realización del proyecto de investigación sobre Bioensayos de Toxicidad.

GLOSARIO

- **Aclimatación:** Adaptación de organismos acuáticos a condiciones estandarizadas, experimentales, apropiadas, incluyendo estímulos diversos, cumpliendo así protocolos de ensayos.
- **Bioacumulación:** Sustancias que se acumulan en plantas y animales acuáticos, que tienen contacto con aire, agua o alimento contaminado; las grandes concentraciones de sustancias tóxicas en los tejidos debido a lenta metabolización y excreción pueden causar la muerte.
- **Bioensayos acuáticos (pruebas de toxicidad):** Es un método para determinar y evaluar las concentraciones y los efectos tóxicos potenciales que causa un compuesto específico sobre un organismo vivo, mediante la exposición controlada a sustancias puras o combinadas, vertimientos (industriales, municipales y agrícolas) y cuerpos de agua.
- **Bioensayos agudos:** Con ellos se miden las concentraciones letales de un agente tóxico en particular.
- **Biomagnificación:** Aumento de la concentración de un agente contaminante en los tejidos vivos a través de la cadena alimentaría.
- **Biota:** Conjunto de especies de animales, plantas y otros organismos que ocupa un área o lugar determinado.
- **Cinabrio:** Mineral de la clase de los sulfuros. Está compuesto 85% por mercurio. Tiene un parecido notable con el cuarzo; su forma química HgS (sulfuro de mercurio); se forma junto a las formas volcánicas y rocas cálidas.

- Concentración letal media (CL50): Concentración del compuesto tóxico que afecta al 50% de la población de la especie modelo, causando su muerte, bajo condiciones de prueba en un tiempo determinado.
- Consumidor Primario: organismo que se encuentra en el segundo nivel de la cadena trófica y su alimentación esta encaminada hacia los productores.
- Contaminación: Presencia de sustancias, elementos o energía, en un medio que altere física, química o biológicamente el aire, agua o suelo, provocando daños irreversibles o no a los organismos y/o ambiente.
- Cuerpo de Agua (Recurso Hídrico): Defínase como todos los objetos espaciales que se encuentra sobre la superficie terrestre entre ellos mares, lagunas, estuarios, ríos, acuíferos, redes colectoras, etc., excepto alcantarillados.
- *Daphnia Pulex* (cladóceros): Crustáceos pequeños, representantes de un eslabón intermedio importante en la cadena alimenticia de productores primarios y peces, sensibles a las sustancias tóxicas presentes en los cuerpos de agua.
- Dilución: Disolver cualquier sustancia (compuestos químico o no) en un líquido el cual debe cumplir ciertas características.
- Dureza: Medida de la concentración de iones de calcio y magnesio en el agua, expresada como mg/l de carbonato de calcio.
- Ecosistemas Acuáticos: Comunidad biótica que interactúa con su medio en un cuerpo de agua, conformando un sistema abierto.
- Efluvios: cápsula protectora, la cual se encuentra en la cámara incubadora de las *Daphnia Pulex*, engrosando sus paredes, en ella se desarrollan los machos de esta especie, cuando cambian las condiciones favorables del ambiente o el cultivo. Su característica principal es su color oscuro y se observan dos huevos grandes.

- **Electrólisis:** Es un procedimiento para la descomposición de ciertos cuerpos (electrolitos) por el paso de una corriente eléctrica. El cuerpo ha de estar en estado líquido, fundido o en disolución.
- **Ictiofauna:** conjunto de especies que existen en una determinada región biogeográfica.
- **Mercurio:** metal pesado de origen natural y antropogénico, que se encuentra en los sedimentos. Es una sustancia de interés sanitario debido su grado alto de toxicidad.
- **Mercurio Elemental:** Metal en estado líquido, volátil a temperatura ambiente, conllevando a un alto riesgo de exposición de sus vapores.
- **Partenogénesis:** forma y/o modo de reproducción asexual por hembras no fecundadas, la cual se presenta en ciertos animales y plantas.
- **Tóxico:** sustancia pura o combinada que al entrar en contacto con el organismo produce daños estructurales, alteraciones bioquímicas o fisiológicas o incluso la muerte dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición.
- **Tóxico de referencia:** sustancia química utilizada en bioensayos de toxicidad, cuyo efecto en los organismos, a determinadas concentraciones, es conocido y por lo tanto permite establecer el estado de respuesta de los organismos de prueba empleados, así como comparar los resultados intra e inter laboratorios. El uso de estos tóxico, proporciona también una evaluación general de la precisión (estabilidad y reproducibilidad del método a través del tiempo).
- **Toxicidad:** capacidad que tiene una sustancia, elemento o compuesto, en ocasionar un efecto nocivo o la muerte sobre un organismo, dependiendo de la concentración, duración, o frecuencia en que este sea expuesto al agente toxico.

- Toxicidad aguda: Efecto nocivo causado a los organismos utilizados en los Bioensayos acuáticos, en un periodo de cuatro (4) o menos días.
- Toxicidad Crónica: Efecto toxico causado a los organismos utilizados en los bioensayos acuáticos relacionados con causar cambios en el apetito, crecimiento, metabolismo, reproducción, movilidad o la muerte en un periodo de cinco (5) días en adelante.
- Vertimiento Líquido: Descarga de un líquido a un receptor como un cuerpo de agua o a un alcantarillado.

RESUMEN

Con la presente investigación se determinó la concentración letal media del mercurio mediante la utilización de organismos acuáticos como *Daphnia Pulex* (neonatos de 6-24 horas de nacido), ya que son organismos representativos de la cadena trófica y presentan alta sensibilidad a numerosos compuestos químicos. La determinación, se realizó por medio de pruebas de toxicidad, en un período de 48 horas (tiempo manejado por el ciclo de vida de la *Daphnia Pulex*), para calcular la concentración del tóxico que produce la muerte al 50% de la población expuesta en este tiempo; esta, se expresó como la concentración letal media, estableciendo sus límites superior e inferior.

La investigación se llevó a cabo mediante la adecuación de la zona de bioensayos, en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. El procedimiento que se utilizó para la estandarización de esta fue: Preparación del agua reconstituida, Preparación del medio Bristol, Captura y aclimatación de los organismos prueba, Mantenimiento de cultivos, Preparación de soluciones prueba, Toma y preservación de muestras ambientales para la realización de los ensayos de toxicidad, Montaje de ensayos toxicológicos, Sensibilidad real de la *Daphnia Pulex*, Aceptabilidad de los resultados y estimación de la concentración letal media

Se manejaron y validaron procedimientos establecidos por CETESB (Compañía de Tecnología y Saneamiento ambiental de Sao Paulo, Brasil), y se trabajó con programas estadísticos como el Probit y análisis de varianza que son utilizados en pruebas de toxicidad para los ensayos agudos estáticos.

Una vez concluida la investigación se establecieron los valores y/o rangos del mercurio (oscilaron entre 0.078 µg/l – 0.163 µg/l y un valor promedio de 0.113µg/l) y los rangos y/o valores de la muestra ambiental que contiene trazas de este (oscilaron entre 0.0241 % v/m - 0.0602 % v/m y un valor promedio de 0.0398 % v/m) y los rangos y/o valores de la muestra ambiental filtrada en el laboratorio (oscilaron entre 0.400 % v/m - 0.854 % v/m y un valor promedio de 0.5960 % v/m); y los efectos tóxicos que afectan en forma considerable los organismos acuáticos existentes en el medio.

Palabras Claves: Concentración letal media, *Daphnia Pulex*, Mercurio, pruebas de toxicidad (Bioensayos), Organismos acuáticos.

ABSTRACT

With the present investigation the lethal concentration was determined average of mercury by means of the use of aquatic organisms like *Daphnia Pulex* (neoborn of 6-24 hours of been born), since they are representative organisms of the trófica chain and present/display numerous discharge sensitivity to compound chemistries. The determination, was made by means of toxicity tests, in a period of 48 hours (time handled by the service life of the *Daphnia Pulex*), to calculate the concentration of the toxic that produces the death to 50% of the population exposed in this time; this, expressed like the lethal concentration average, establishing its limits superior and inferior. The investigation was carried out by means of the adjustment of the zone of bioensayos, in the laboratory of the Faculty of Environmental and Sanitary Engineering. The procedure that was used for the standardization of this was: Preparation of the reconstituted water, Preparation of the average Bristol board, Capture and acclimatization of the organisms proves, Maintenance of cultures, Preparation of solutions proves, Taking and preservation of environmental samples for the accomplishment of the toxicity tests, Assembly of toxicológicos tests, real Sensitivity of the *Daphnia Pulex*, Acceptability of the results and estimation of the lethal concentration average. Procedures established by CETESB were handled and validated (Company of Technology and environmental Cleaning of Sao Paulo, Brazil), and worked with statistical programs like the Probit and analyses of variance that are used in tests of toxicity for the static acute tests. Once concluded the investigation the values and/or ranks of mercury settled down (oscillated between 0,078 µg/l - 0,163 µg/l and a value average of 0.113µg/l) and the ranks and/or values of the environmental sample that contains plans of this (they oscillated between 0,0241% v/m - 0,0602% v/m and a value average of 0,0398% v/m) and the ranks and/or values of the filtered environmental sample in the laboratory (they oscillated between 0,400% v/m - 0,854% v/m and a value average of 0,5960% v/m); and the poisonous effects that affect in considerable form the existing aquatic organisms in means.

Key words: Lethal concentration average, *Daphnia Pulex*, Mercury, aquatic tests of toxicity (Bioensayos), Organisms.

LISTA DE TABLAS

		Pág
Tabla 1.	Clasificación de aguas según su Dureza	28
Tabla 2.	Clasificación Taxonómica de la <i>Daphnia Pulex</i>	35
Tabla 3.	Clasificación Taxonómica de la <i>Selenastrum Capricornutum</i>	45
Tabla 4.	Clasificación Taxonómica de la <i>Scenedesmus Quadricauda</i>	46
Tabla 5.	Características de Mercurio	47
Tabla 6.	Periodo de Semieliminación biológica del Mercurio	52
Tabla 7.	Preparación de Agua Reconstituída	61
Tabla 8.	Parámetros de control a evaluar en el agua reconstituida	62
Tabla 9.	Preparación del medio Bristol	63
Tabla 10.	Registro de la Temperatura en el área del mantenimiento del cultivo	68
Tabla 11.	Rangos de Índices toxicológicos	76
Tabla 12:	Volumen de Alimento Administrado a cada pecera	86
Tabla 13.	Carta de Control de Sensibilidad del cultivo de <i>Daphnia pulex</i>	89
Tabla 14:	Comparación de resultados de Sensibilidad con Dicromato de Potasio (CL_{48}^{50})	91
Tabla 15.	Promedio de la CL_{48}^{50} del Mercurio	93
Tabla 16.	Formato de datos de Prueba de Toxicidad	95
Tabla 17.	Caudales Obtenidos de la Industria Evaluada	96
Tabla 18.	Análisis Fisicoquimicos realizados a la muestra industrial	97
Tabla 19.	Análisis Fisicoquimicos realizados a la muestra ambiental tratada	99
Tabla 20.	Promedio de la CL_{48}^{50} del Vertimiento sin filtrar	100
Tabla 21.	Promedio de la CL_{48}^{50} del Vertimiento filtrar	102
Tabla 22.	Comparación de las concentraciones letales medias (CL_{48}^{50})	

	De las muestras ambientales filtrada y no filtrada	103
Tabla 23.	Valores comparativos de la CL_{48}^{50} Con especies de crustáceos expuestos al Mercurio en el exterior	107
Tabla 24.	Valores comparativos de la CL_{48}^{50} Con especies de crustáceos expuestos al Mercurio en Colombia	107

LISTA DE FIGURAS

	Pág	
Figura 1.	Clasificación Ecológica de un Ecosistema Acuático	11
Figura 2.	Partes de la <i>Daphnia pulex</i>	38
Figura 3.	Morfología de la <i>Selenastrum Capricornutum</i>	45
Figura 4.	Morfología de la <i>Scenedesmus Quadricauda</i>	46
Figura 5.	Ciclo Global del Mercurio	49
Figura 6.	Ciclo Local del Mercurio y Metilmercurio	51
Figura 7.	Electrólisis con celda de amalgama de Mercurio	55
Figura 8.	Montaje de pruebas de toxicidad	59
Figura 9.	Montaje del Medio Bristol para Algas Verdes	64
Figura 10.	Separación y mantenimiento de organismos prueba	66
Figura 11.	Montaje de pruebas de toxicidad con la muestra ambiental	74
Figura 12.	Metodología para la Determinación de la Concentración letal media (CL_{48}^{50}) del Mercurio por medio de Bioensayos de Toxicidad sobre la <i>Daphnia Pulex</i>	77
Figura 13.	Montajes de pruebas de Toxicidad con Dicromato de Potasio	88

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág
Gráfica 1. Curva de Dosis – Respuesta de Organismos Expuestos a Bioensayos	19
Gráfica 2. Determinación de la CL_{48}^{50} para pruebas de Toxicidad Aguda con múltiples Concentraciones	34
Gráfica 3. Sensibilidad del Cultivo al Toxico de Referencia	84
Gráfica 4. Concentración Letal media del Mercurio (CL_{48}^{50})	87
Gráfica 5. Concentración Letal Media (CL_{48}^{50}) del vertimiento sin tratar	92
Gráfica 6. Concentración Letal Media (CL_{48}^{50}) del vertimiento tratado	94
Gráfica 7. Índice Toxicológico	101

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

	Pág
Foto 1. Humedal Guaymaral	74
Foto 2. Punto de toma de la muestra ambiental	74
Foto 3. Cuerpo de la <i>Daphnia Pulex</i>	74
Foto 4. Uña caudal bipestinada de la <i>Daphnia Pulex</i>	74
Foto 5. Acuario 1 de água reconstituída	75
Foto 6. Acuario 2 de água reconstituída	75
Foto 7. Médio Bristol inicial	76
Foto 8. Médio Bristol transcurrido 15 días	76
Foto 9. Medio Bristol listo para centrifugar.	77
Foto 10. Centrifugación del medio Bristol	77
Foto 11. Comparación de tubos de centrífuga	77
Foto 12. Extracción de concentrado de algas	78
Foto 13. Almacenamiento de concentrado de algas	78
Foto 14. Frascos sellados com papel parafilm	78
Foto 15. Zona de Ensayos de Toxicidad	81
Foto 16. Área de ubicación de las peceras	81
Foto 17. Área del mantenimiento del cultivo	81
Foto 18. Montaje de ensayos de toxicidad con dicromato de potasio	82
Foto 19. Ensayos de toxicidad con cloruro de mercurio	85
Foto 20. Siembra de neonatos en las concentraciones	85
Foto 21. Comparación entre muestras tratadas y no tratadas	90
Foto 22. Muestras del vertimiento industrial	91
Foto 23. Ensayo de Toxicidad del Vertimiento sin tratar	91
Foto 24. Ensayo de Toxicidad el vertimiento tratado	91

LISTAS DE ANEXOS

ANEXO A.	DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO INDUSTRIAL.
ANEXO B.	REGISTRÓ PARAMETROS DE CONTROL AGUA RECONSTRUIDA.
ANEXO C.	REGISTRO DE TEMERATURA EN EL ÁREA DEL MANTENIMIETNO DEL CULTIVO
ANEXO D.	RESULTADOS DE LAS PRUEBAS PRELIMINARES CON DICROMATO DE POTASIO
ANEXO E.	RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DEFINITIVAS DE LOS ENSAYOS CON DICROMATO DE POTASIO
ANEXO F.	RESULTADOS DE ENSAYOS PRELIMINARES CON MERCURIO
ANEXO G.	RESULTADOS DE PRUEBAS DEFINITIVAS DE ENSAYOS DE MERCURIO
ANEXO H.	RESULTADOS DE ENSAYOS DE LA MUESTRA AMBIENTAL SIN TRATAR
ANEXO I.	RESULTADOS DE ENSAYOS DE LA MUESTRA AMBIENTAL TRATADA

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	6
1. OBJETIVOS	7
1.1. OBJETIVO GENERAL	7
1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	7
2. MARCO TEORICO	8
2.1. ECOSISTEMAS ACUATICOS	8
2.2. TOXICOLOGÍA	11
2.3. TOXICOLOGÍA AMBIENTAL	13
2.4. ECOTOXICOLOGIA AMBIENTAL	14
2.5. BIOENSAYOS (Pruebas de Toxicidad)	16
2.6. CLASIFICACIÓN DE ENSAYOS DE TOXICIDAD	20
2.6.1. Ensayos de toxicidad según su respuesta:	20
2.6.1.1. Ensayos de Toxicidad Aguda:	20
2.6.1.2. Ensayos de Toxicidad Subaguda:	20
2.6.1.3. Ensayos de Toxicidad Crónica:	20
2.6.1.4. Ensayos de Toxicidad Subcrónica:	21
2.6.2. Ensayos de toxicidad según su técnica:	21
2.6.2.1. Ensayos estáticos:	21
2.6.2.2. Ensayos Semi-estáticos:	21
2.6.2.3. Ensayos de Flujo Continuo	21
2.6.3. Ensayos de reproducción:	21
2.6.4. Ensayos de Recuperación:	21
2.7. FACTORES QUE AFECTAN LA TOXICIDAD	21
2.7.1. Condiciones de la prueba de toxicidad:	23
2.7.2. Características Abióticas del Agua:	23

2.7.2.1	Condiciones abióticas como factores modificantes de la toxicidad	24
2.7.2.1.1	Temperatura	24
2.7.2.1.2	Oxígeno Disuelto (OD):	25
2.7.2.1.3	Concentración de hidrógeno – pH:	27
2.7.2.1.4	Dureza:	27
2.8.	EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS ENSAYOS	28
2.8.1.	Métodos estadísticos	30
2.8.1.1.	Diseño experimental:	30
2.8.2.1.	Método Probit (paramétrico):	32
2.8.2.2.	Método de Litchfield-Wilcoxon (gráfico):	32
2.8.2.3.	Método de Spearman-Kärber (no paramétrico)	33
2.8.2.4.	Método gráfico	33
2.8.3.	Análisis de Varianza (ANOVA):	34
2.9.	ORGANISMO DE PRUEBA: Daphnia Pulex	34
2.9.1.	Biología de La Daphnia Pulex:	35
2.9.2.	Descripción Anatómica del Genero Daphnia s.p.	36
2.9.2.1.	Estructura Externa:	36
2.9.2.2.	Estructura Interna y Fisiología:	39
2.9.2.2.1.	Sistema Digestivo y Nutrición:	39
2.9.2.2.2.	Sistema Respiratorio:	41
2.9.2.2.3.	Sistema Circulatorio:	41
2.9.2.2.4.	Sistema Excretor:	41
2.9.2.2.5.	Sistema Nervioso:	41
2.9.2.2.6	Locomoción:	42
2.9.2.2.7.	Sistema Reproductivo:	42
2.10.	ALGAS	44
2.10.1.	Selenastrum Capricornutum:	44
2.10.2.	Scenedesmus quadricauda:	45
2.11.	MERCURIO	46
2.11.1.	Ciclo Global Del Mercurio:	48
2.11.2.	Ciclo Local Del Mercurio:	50
2.11.3.	Eliminación del Mercurio:	52
2.11.4.	Efecto Ecotoxicológico Agudo Del Mercurio:	52

2.11.5.	Acumulación del Mercurio en los Organismos	52
3.	INDUSTRIA EVALUADA	54
4.	METODOLOGIA	58
4.1.	DISEÑO EXPERIMENTAL	58
4.2.	PREPARACIÓN DEL AGUA RECONSTITUÍDA	60
4.3.	PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CENTRIFUGACIÓN DE ALGAS VERDES <i>Selenastrum Capricornutum</i> , <i>Scenedesmus Quadricauda</i>	62
4.4.	ALIMENTACIÓN DE ORGANISMOS PRUEBA	64
4.5.	CAPTURA DE LOS INDIVIDUOS PARA EL ENSAYO	65
4.6.	ACLIMATACIÓN DE LOS ORGANISMOS PRUEBA	66
4.7.	MANTENIMIENTO DEL CULTIVO DE LOS ORGANISMOS <i>Daphnia Pulex</i>	66
4.7.1.	Separación de organismos	68
4.8.	FASE PRUEBAS DE TOXICIDAD	68
4.8.1.	Preparación de soluciones	69
4.8.2.	Montaje de las pruebas de toxicidad (bioensayos)	69
4.8.3.	Pruebas de toxicidad de sensibilidad con el tóxico de referencia dicromato de potasio	70
4.8.4.	Pruebas preliminares de toxicidad con cloruro de mercurio	71
4.8.5.	Pruebas definitivas con cloruro de mercurio	71
4.8.6.	Toma y preservación de muestras ambientales para los ensayos de toxicidad.	72
4.8.7.	Análisis fisicoquímicos a los vertimientos	72
4.8.8.	Pruebas preliminares y definitivas con el vertimiento de REFISAL S.A.	73
4.9.	RESULTADOS FISICOQUÍMICOS FINALES	74
4.10.	OBTENCIÓN DE RESULTADOS	75
4.11.	OBTENCIÓN DEL ÍNDICE TOXICOLÓGICO	75
4.12.	ÍNDICE TOXICOLÓGICO DEL VERTIMIENTO	76

4.13.	COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS.	76
5.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	78
5.1.	CAPTURA DE LOS ORGANISMOS PRUEBA <i>Daphnia Pulex</i>	78
5.2.	PREPARACIÓN DEL AGUA RECONSTITUIDA	80
5.3.	PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CENTRIFUGACIÓN DE ALGAS VERDES	81
5.4.	ALIMENTACIÓN DE ORGANISMOS PRUEBA	84
5.5.	MANTENIMIENTO DEL CULTIVO DE LOS ORGANISMOS PRUEBA <i>DAPHNIA PULEX</i>	87
5.6.	PRUEBAS DE TOXICIDAD DE SENSIBILIDAD CON EL TÓXICO DE REFERENCIA DICROMATO DE POTASIO	88
5.7.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CON EL TOXICO DE REFERENCIA, Y ELABORACIÓN DE LA CARTA DE CONTROL	89
5.8.	PRUEBAS PRELIMINARES DE TOXICIDAD CON CLORURO DE MERCURIO	92
5.9.	ENSAYOS DEFINITIVOS CON CLORURO DE MERCURIO Y OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL_{48}^{50}) DEL MERCURIO CON SUS LÍMITES DE CONFIANZA	92
5.10.	ANÁLISIS DE VARIANZA DE LAS PRUEBAS DEFINITIVAS DEL CLORURO DE MERCURIO	95
5.11.	CARACTERIZACIÓN DEL VERTIMIENTO	97
5.11.1.	Análisis fisicoquímico del vertimiento	97
5.11.2.	Tratamiento a la muestra ambiental:	98
5.11.3.	Análisis fisicoquímicos de la muestra tratada:	99
5.11.4.	Pruebas definitivas de toxicidad de agua filtrada y no filtrada:	99
5.11.5.	Análisis de varianza de la muestra ambiental tratada y no tratada	104
5.12.	OBTENCION DE LA CARGA TÓXICA E INDICE TOXICOLOGICO	104
5.12.1.	Obtención Carga Tóxica e índice toxicológico de la muestra ambiental no filtrada (unidimensional).	104

5.12.2.	Obtención Carga Tóxica e índice toxicológico de la muestra ambiental filtrada (unidimensional).	105
5.13.	COMPARACIÓN DE RESULTADOS CON OTRAS PRUEBAS DE TOXICIDAD REALIZADOS EN EL EXTERIOR Y EN COLOMBIA.	106
	CONCLUSIONES	108
	RECOMENDACIONES	110
	BIBLIOGRAFIA	111
	ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

Los Ensayos de toxicidad se iniciaron como medio para conocer los efectos en los ecosistemas, frente a la presencia de sustancias altamente tóxicas. Estos han sido estandarizados por organizaciones internacionales de regulación y control (CEE, ASTM, ISO, WHO, USEPA, CETESB) que las utilizan en la evaluación de la carga tóxica de vertimientos al medio acuático

Las industrias deben realizar un tratamiento previo a sus vertimientos para cumplir con la legislación ambiental actual y así disminuir al máximo las posibles alteraciones en los ecosistemas acuáticos y cadenas tróficas presentes. De igual manera, es deber del Estado realizar pruebas de toxicidad con el objeto de evaluar y reconocer los efectos sobre la biota acuática, permitiendo establecer así los límites de permisibilidad para diferentes sustancias de interés sanitario y evaluar el impacto que estas producen sobre todas las comunidades que se encuentran en los cuerpos de agua¹

Esto se ha desarrollado en los últimos 25 a 30 años incorporándose como un tema de interés en el área ambiental, identificando así los riesgos de contaminación química, física biológica y antropogénica, que se puede presentar en los cuerpos de agua, informando en corto plazo los posibles efectos sobre el equilibrio de los ecosistemas, sin tener aún un desarrollo continuo por las entidades encargadas del mismo

Así mismo, en el Decreto 1594 de 1984 (usos del agua y residuos líquidos), se incluye la realización de pruebas de toxicidad, las cuales forman parte del grupo de medidas para evaluar los riesgos ecológicos producidos por contaminantes tóxicos (sustancias de interés sanitario), integrándolas a las caracterizaciones físico – químicas que se deben realizar, identificando y evaluando así los efectos en las poblaciones, comunidades o ecosistemas²

¹ Decreto 1594 de 1984 Por el cual se reglamenta parcialmente el título I de la Ley 9 de 1979, así como el capítulo II del título VI - parte III - libro II y el título III de la parte III - libro I - del Decreto 2811 de 1974 en cuanto a usos del agua y residuos líquidos. Junio 26 de 1984. bogota D.C., Capítulo 6. Artículo 4-13 y 253

² Ibíd., artículo 15, 45

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la concentración letal media CL_{48}^{50} del mercurio, mediante la utilización de organismos acuáticos como la *Daphnia Pulex* por medio de Bioensayos de Toxicidad.

1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la concentración letal media CL_{48}^{50} del mercurio sobre organismos acuáticos del género *Daphnia*, utilizando los protocolos internacionales.
- Determinar la sensibilidad de los organismos mediante la utilización de Dicromato de potasio.
- Obtener la CL_{48}^{50} de una industria en la que este presente el mercurio en sus vertimientos.
- Comparar los resultados de la CL_{48}^{50} obtenidos de la especie *Daphnia Pulex* (nativa), con los resultados generados en el exterior con la especie *Daphnia Magna*.

2. MARCO TEORICO

A continuación se presentan las generalidades de este proyecto de investigación que relaciona los siguiente temas: Ecosistemas Acuáticos, Toxicología (Toxicología Ambiental, Ecotoxicología Ambiental), Bioensayos (Clasificación de los bioensayos), factores que afectan la toxicidad (Condiciones de la prueba de toxicidad, características abióticas del agua, condiciones abióticas como factores modificantes de la toxicidad, evaluación estadística de los ensayos, métodos estadísticos (metodología Probit, Litchfield–Wilconor, Spearman–Karber y gráfico), diseño experimental, organismo prueba (biología de la *Daphnia Pulex*, descripción Anatómica del género *Daphnia s.p.*), Algas, Mercurio (ciclo global del mercurio, ciclo local del mercurio, efecto toxicológico agudo del mercurio, acumulación del mercurio).

2.1. ECOSISTEMAS ACUATICOS

Son sistemas abiertos que están interactuando constantemente con los ecosistemas que lo rodean, convirtiéndose en los receptores temporales o finales de agentes contaminantes; estas sustancias vertidas poseen ciertas particularidades transforman sus características físicas, químicas y biológicas, causando un efecto nocivo, tanto para la biota acuática, como para los demás organismos que intervienen en la cadena alimenticia llegando hasta el hombre³

Las condiciones físicas y químicas dominantes en los medios acuáticos determinan el tipo de organismos que viven en ese medio. Se han propuesto varias clasificaciones ecológicas de los organismos acuáticos; la más aceptada hoy día es la que presentamos a continuación:

- Plancton: Comprende los organismos que viven suspendidos en las aguas y que, por carecer de medios de locomoción o ser estos muy débiles, se mueven o se

³ MARCANO, José E. Educación Ambiental; Elemento de ecología; Ecología de las aguas dulces 2º parte; clasificación ecológica de los organismos de agua dulce y comunidades del medio acuático. (libro en línea), consultado febrero de 2007. Disponible en Internet <<http://www.jmarcano.com/nociones/fresh2.html>>

trasladan a merced de los movimientos de las masas de agua o de las corrientes. Generalmente son organismos pequeños, la mayoría microscópicos. Esta esta constituido por el fitoplancton y el zooplancton; siendo el primero una población de pequeñas plantas microscópicas, que representan el primer eslabón de la cadena alimenticia; junto con las plantas superiores que habitan las aguas dulces, constituyen los organismos productores las cuales son consumidas por la comunidad herbívora perteneciente al zooplancton; cuyos miembros son organismos acuáticos que realizan una importante labor, la cual, es mantener el equilibrio entre el aumento de la población y la disponibilidad del alimento; la mayoría de los organismos que pertenecen al zooplancton se alimentan de otros animales más pequeños y está compuesto, desde el punto de vista trófico, por consumidores primarios o herbívoros y consumidores secundarios.⁴

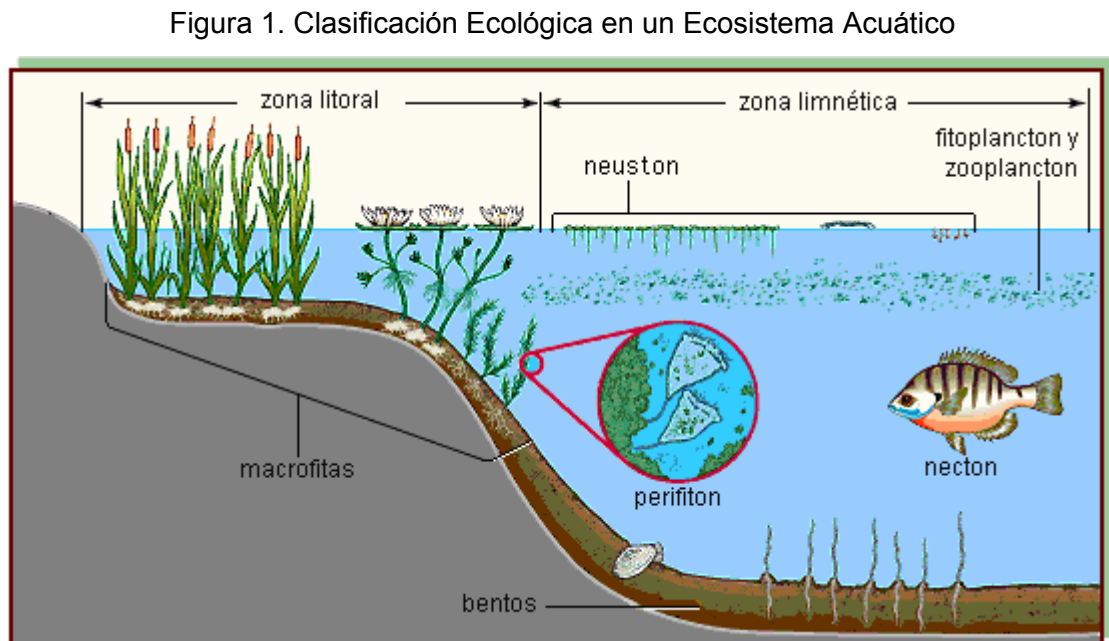
El zooplancton esta clasificado entre rotíferos y dos clases de crustáceos (copépodos, cladóceros), y su principal objetivo es la importancia en la dinámica trófica de los ecosistemas acuáticos, teniendo en cuenta la ictiofauna de un lugar determinado.⁵

- Necton: Son todos los organismos que nadan libremente en el agua y, por tanto, de trasladarse de un lugar a otro recorriendo a veces grandes distancias (migraciones). La zona litoral es rica en especies nectónicas; frecuentemente esta diversidad de especies va acompañada de gran abundancia de individuos. Los peces abundan en esta zona aunque se trasladan también por la zona limnética y la profunda, si las condiciones de vida son favorables. Entre los vertebrados que frecuentan o habitan el litoral encontramos las ranas, salamandras, tortugas y serpientes de agua. Entre los invertebrados que forman el necton tenemos los insectos (larvas y adultos) y los crustáceos.⁵
- Bentos: Comprende los organismos que viven en el fondo o fijos a él y por tanto dependen de éste para su existencia. Sus comunidades se caracterizan por ser muy ricas en especies y formas, la mayoría de los organismos que forman el bentos son invertebrados.⁵

⁴ Ibíd. Párrafo 3 - 4 y 5

- Neuston: A este grupo pertenecen los organismos que nada o "caminan" sobre la superficie del agua. La mayoría son insectos.⁶⁵
- Perifiton: Organismos vegetales y animales que se adhieren a los tallos y hojas de plantas con raíces fijas en los fondos

En la Figura 1, se muestra la distribución de la clasificación ecológica de los organismos acuáticos, anteriormente descrita.



Fuente: MARCANO, José E. Educación Ambiental; Elemento de ecología; Ecología de las aguas dulces 2° parte; clasificación ecológica de los organismos de agua dulce y comunidades del medio acuático. (libro en línea), consultado febrero de 2007. Disponible en Internet <http://www.jmarcano.com/nociones/fresh2.html>. Figura 2.

El equilibrio de este sistema depende del balance que debe existir entre la entrada y salida del agua, entrada de materia y energía, dándose una distribución de las mismas dentro del ecosistema, que va ascendiendo entre sus miembros, formando así cadena trófica (cadena alimenticia); demostrando que cada individuo desempeña un papel

⁵ Ibíd. Párrafo 6

específico y este es afectado por alteraciones en las funciones de otros individuos y las características de su medio ⁶

Los ecosistemas acuáticos son muy susceptibles a modificaciones en sus condiciones ambientales naturales, ya sea por una intervención antrópica (directa o indirecta); ejemplo de esta es cuando a el llega un vertimiento industrial, agrícola y doméstico, que lo contaminan cambiando sus característica químicas, físicas y biológicas; los efectos biológicos de la contaminación se mide a través del cambio que experimentan las comunidades a medida que reciben las descargas de desechos de diferente orden.

2.2. TOXICOLOGÍA

La toxicología estudia los efectos nocivos de agentes físicos, químicos y biológicos, las alteraciones en la estructura y respuesta de los organismos vivos, esta rama de la ciencia se centra en las sustancias que son tóxicas para el hombre. ⁶

Si se fuese a establecer el origen de la toxicología, se debería situar paralelamente con el origen de la biología, puesto que en el momento en que aparece la vida, aparece el riesgo que esta entre en contacto con agentes nocivos que ponen en peligro el funcionamiento normal del organismo. Pero la toxicología es una rama de la medicina que cada vez adquiere mayor importancia en el mundo entero. ⁷

En la toxicología es fundamental conocer el potencial tóxico de la sustancia que este generando el efecto adverso, para poder evaluar el peligro que representa. El efecto tóxico es el producido por uno o varios agentes tóxicos sobre un organismo, población o comunidad que se manifiesta por cambios biológicos. Su grado se evalúa por una escala de intensidad o severidad y su magnitud está relacionada con la dosis (cantidad de sustancia administrada, expresada generalmente por unidad de peso corporal) o la concentración (sustancia aplicada en el medio) del agente tóxico. ⁷

⁶ SAMITIER, Josep ; Unidad de Toxicología Experimental y Ecotoxicología (UTOX-PCB). Parc Científic de Barcelona. Universidad de Barcelona (en línea), febrero 2007. disponible en Internet <http://www.pcb.ub.es/homePCB/live/es/p1229.asp>

Dosis letal (DL) es la cantidad de la sustancia toxica que causa la muerte a la totalidad de la población expuesta.⁷

La dosis letal cincuenta (DL)₅₀ es la cantidad del tóxico que al ser administrada una sola vez, en un determinado tiempo produce una mortalidad del 50% de los organismos que son expuestos, esta es expresada en miligramo de la sustancia por Kilogramo del animal (ml/Kg)

La concentración letal cincuenta (CL)₅₀ es la cantidad de un agente toxico que es administrado al medio, causa la muerte al 50% de la población de organismos en un determinado tiempo, es expresada tanto en miligramos por litro (mg/L).⁷

Los casos en que la contaminación atmosférica, la destrucción de los ecosistemas o desaparición de especies afectaban a los seres humanos incluyendo a su descendencia, empezaron a presentarle desde el inicio de la revolución industrial, pero en la literatura especializada aparecieron a finales de los años veinte, sin embargo no se les prestó mayor importancia. Aunque con el tiempo el número, frecuencia y gravedad de accidentes, entre ellos las intoxicaciones con metilmercurio en Irak, con pesticidas órganoclorados como el paration en México y Colombia, fue aumentando, la mayoría de los investigadores lo seguían tomando como algo que ocurría en lugares remotos, que afectaban solo a los grupos marginados por su cultura, ubicación geográfica o por razones económicas.⁸

Fue hasta los años sesenta y setenta, que en los países desarrollados los casos de enfermedad y muerte causados por la contaminación atmosférica, aumentaron notablemente, atrayendo así la atención de las comunidades y de los gobiernos, que comprendieron que la contaminación no era solo una molestia, sino que de seguir ignorándola podía llegar a poner en riesgo la existencia de la humanidad.⁷

⁷ CAMPO MARTI, Miguel. Principios de ecotoxicología. Diagnostico tratamiento y gestión del medio ambiente. Mcgraw Hill. Interamericana de España. Barcelona; 2002. p 2

Generándose así un desarrollo rápido de la toxicología ambiental, y de una de las disciplinas relacionadas con ella, la ecotoxicología, las que no existían antes de 1960. Actualmente la toxicología ambiental ya no es una rama secundaria de la toxicología, sino que es el motor que origina los estudios experimentales, las acciones de monitoreo ambiental, los estudios de prevención, y los estudios epidemiológicos.⁸

2.3. TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

La toxicología ambiental estudia los efectos que causan los agentes tóxicos sobre organismos individuales, al ser expuestos en una duración, intensidad y frecuencia determinadas; para prevenir los riesgos que se puedan presentar en los ecosistemas intervenidos. Estos efectos dependen si la toxicidad se presenta directamente sobre el organismo o en el ambiente donde este se desarrolla.⁹

En el área de toxicología ambiental, los componentes químicos se estudian más por el reflejo de la peligrosidad potencial que por su toxicidad relativa, aplicándolo más bien a determinadas condiciones de exposición, puesto que, de lo contrario, no tiene significado.⁹

Las poblaciones simples no responden a los agentes químicos de una manera natural en régimen de aislamiento, por esta razón los estudios toxicológicos no deben ser realizados en ellos, sino en las poblaciones complejas; ya que las interacciones que se presentan en las poblaciones, requieren conductas y respuestas, las cuales no son evidentes en el aislamiento. Por consiguiente la toxicología ambiental presenta una propia metodología para la evaluación de los efectos que generan los contaminantes.⁹

⁸ ALBERT, Lilia. Introducción a la toxicología. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Mundial de la Salud. Editorial Limusa S. A de C. V. Grupo Noriega Editores. México; 1997. p 11-18

⁹ VALLEJO ROSERO, María del Carmen. Toxicología Ambiental. Librería Lerner Ltda. Santafé de Bogotá; 1997. p 14 - 15

2.4. ECOTOXICOLOGIA AMBIENTAL

En 1950 Truhaut, sustituyo el término de toxicología ambiental por el de ecotoxicología, que se usaba hasta ese momento. Posteriormente se pretendió mostrar una diferencia entre los dos términos, al designarle a la ecotoxicología todo lo referente a la contaminación de los ecosistemas y a la toxicología ambiental lo referente a la contaminación originada por el hombre, considerando al contaminante como un agente físico o una sustancia química que se encuentra en el ambiente y que tiene un efecto letal sobre los organismos vivos, pero muchas veces esta diferencia era no factible.¹¹

Entonces se puede decir que la ecotoxicología ambiental estudia los efectos nocivos de sustancias altamente tóxicas (químicas o físicas) presentes en el ambiente, sobre organismos vivos, los cuales son parte esencial en los ecosistemas (vegetales, microorganismos, animales y el hombre), en esta interviene la toxicología y la ecología; su finalidad es evaluar el riesgo ecológico que se puede presentar por la presencia de sustancias potencialmente tóxicas en un ambiente acuático reuniendo así, la suficiente información para la protección de los ecosistemas. En este estudio se debe resaltar las características de la sustancia entre ellas: distribución en el ambiente, patrones de descarga, efectos en organismos vivos, degradación, actividad biológica, formas de bioacumulación, etc.; así como las características y propiedades de los ecosistemas.¹⁰

Con ella se evalúa la probabilidad de ocurrencia de efectos adversos que pueden ocurrir o están ocurriendo en ecosistemas que se encuentran en exposición a sustancias de interés sanitario que producen estrés en los organismos, esta evaluación esta determinada en dos elementos:

- Exposición de organismos en estudio con agentes contaminantes: interacción entre frecuencia, intensidad y respuesta de los organismos frente a sustancias que alteran su ecosistema.

¹⁰ CAMPO MARTI, Miguel. Principios de ecotoxicología. Diagnostico tratamiento y gestión del medio ambiente. McGraw Hill. Interamericana de España. Barcelona; 2002. p 2-10

- Características de los efectos producidos por sustancias tóxicas: relación dosis – respuesta entre la sustancia química contaminante y los efectos que produce en el organismo.

Las sustancias ecotóxicas son aquellas que al ser liberadas en el ambiente producen un impacto ambiental significativo, de naturaleza reversible o irreversible, debido a procesos conocidos de toxicidad, bioacumulación, persistencia y residualidad. Por consiguiente la ecotoxicología no se enfoca a que cierto agente haga desaparecer a la mitad de los individuos de una especie, sino a determinar el impacto ecológico que produce, ya que muchos contaminantes no tienen efectos sobre los organismos individualmente, pero su consecuencia ecológica es digna de tenerse en cuenta.¹¹

Las sustancias ambientales que son el resultado de las actividades del hombre son conocidas como xenobióticos; en otras palabras son aquellas que por sus estructuras químicas, creadas por el hombre, no pueden ser asimiladas por los microorganismos, por lo tanto no son biodegradables, y por ende constituyen uno de los principales factores de destrucción del equilibrio del medio ambiente.¹¹

Si partimos que los ecosistemas naturales son un conjunto armónico consecuente con sus propios equilibrios biológicos, y las sustancias químicas pueden, en ocasiones, perturbar estos equilibrios y trastornar dicha armonía, no solo si se originan muertes, sino también al alterarse la capacidad de sobrevivir en las condiciones ecológicas producidas. Esto es lo que causa que en la ecotoxicología no sea suficiente la evaluación de la toxicidad que se realiza en la toxicología convencional, ya que los efectos tóxicos tienden siempre a ser remotos.¹¹

Por consiguiente la respuesta de posibles riesgos ecológicos frente a la exposición de un contaminante se realiza mediante pruebas o bioensayos ecotoxicológicos principalmente desarrollados en organismos de una determinada población, obteniendo así respuestas del daño a la biota y ecosistemas de manera rápida, aún cuando algunas sustancias altamente tóxicas no puedan ser detectadas por análisis rutinarios (análisis

¹¹ Ibíd. p.11

fisicoquímicos) ya que sus características son tan complejas que son casi imposible de detectarlas y por ende difícil de pronosticar el efecto en el ecosistema. Suministrando la evidencia de los posibles efectos acumulativos en las cadenas tróficas, alterando la cadena alimenticia presente en el ecosistema.¹²

En ocasiones, la única diferencia entre *toxicología* y *ecotoxicología* parece estar centrada en las especies seleccionadas para las pruebas toxicológicas.

Sin embargo, la diferencia esencial entre las dos ciencias radica en su enfoque frente al problema. La *toxicología* concierne a los efectos sobre los organismos individuales, estudia los efectos sobre los organismos individuales, estudia los efectos de la introducción directa del compuesto dentro del organismo, focaliza su atención en una sola especie, incluido el hombre. En los estudios toxicológicos se habla de dosis de aplicación.¹³

La *ecotoxicología* se ocupa de los efectos sobre los ecosistemas, estudia los consecuencias de la introducción del xenobiótico en el medio. Su interés abarca toda la biota, incluyendo los aspectos estructurales y funcionales del ecosistema expuesto. Estudia los procesos de *transformación* del xenobiótico en el medio además de su *degradación*, *absorción* del xenobiótico y/o sus metabolitos, su *redistribución* al ser liberados, y los procesos de *bioacumulación* y *biomagnificación*. En los estudios ecotoxicológicos, se habla de concentración del xenobiótico en el medio.¹³

2.5. BIOENSAYOS (Pruebas de Toxicidad)

Los Bioensayos están definidos con el objeto de evaluar y reconocer la reacción que puede producir sobre organismos vivos, una sustancia altamente toxica en un tiempo determinado, permitiendo establecer la respuesta de un organismo (miembro de un ecosistema presente en cualquier recurso) a cambios específicos en su hábitat. Siendo este método una opción para determinar los límites de tolerancia para diferentes

¹² VALLEJO ROSERO, Op.citp., p 21-23

¹³ PALACIO CORDOBA, Darío. Toxicología. Bogotá D.C., 1993; p 33 – 37

sustancias de interés sanitario y evaluar los efectos potenciales e impactos en los cuerpos de agua, biota acuática y ecosistemas presentes.¹⁴

Son herramientas que se utilizan en la ecotoxicología, con la que se estudia el efecto y destino de los contaminantes antropogénicos tóxicos en ecosistemas acuáticos y terrestres, mediante, mediciones experimentales bajo condiciones controladas en laboratorio, descubriendo en ciertos casos concentraciones muy bajas de contaminantes.

Son un elemento clave en el control de la contaminación, si se tiene en cuenta que las caracterizaciones fisicoquímicas no dan la suficiente información para determinar la concentración a la cual un vertimiento se vuelve tóxico para ecosistemas presentes en los mismos.¹⁵

La finalidad primordial de las pruebas de toxicidad es establecer la concentración suficiente en la cual un contaminante dado produce efectos tóxicos en organismos vivos, determinando la relación dosis – respuesta, esta se puede manifestar con la muerte, inmovilización, pérdida del equilibrio, deterioro de la facultad de reproducción, de desarrollo o natatoria, cambios histológicos o bioquímicos, etc., dependiendo de las características del Bioensayo y del ciclo de vida del organismo que se este utilizando en el mismo. Estos son la herramienta mas adecuada para determinar en el laboratorio en condiciones apropiadas y estandarizadas, el efecto que pueden generar las sustancias tóxicas en una biota acuática determinada, la cual, es usada como reactivo; estableciendo la relación entre el grado de contaminación y la mortalidad de los individuos.¹⁵

Existen ciertas características de los bioensayos con organismos según EPA (1999a) las cuales son:

- Suministran información sobre los posibles efectos y probable deterioro de los ecosistemas acuáticos.
- Su predicción es alta cuando en el ambiente acuático existe descargas con alta magnitud de toxicidad

¹⁴ Ensayos de toxicidad y su aplicación al control de la contaminación industrial; Universidad Nacional; Facultad de Ingeniería.1996. pág. 30-40

- Se han entregado concentraciones confiables para muchas sustancias altamente tóxicas que causan efectos de bioacumulación en ecosistemas acuáticos
- Proveen resultados confiables por estar altamente estandarizados con alta calidad específica, controles, replicas y comparaciones con otros bioensayos.
- Proporcionan una anticipada señal de alerta, para minimizar impactos negativos y tomar medidas sobre la misma
- Al ser interpretados en forma rápida y corto plazo permiten la acumulación de dosis – respuesta, caracterizando las aguas residuales o sistemas ambientales.

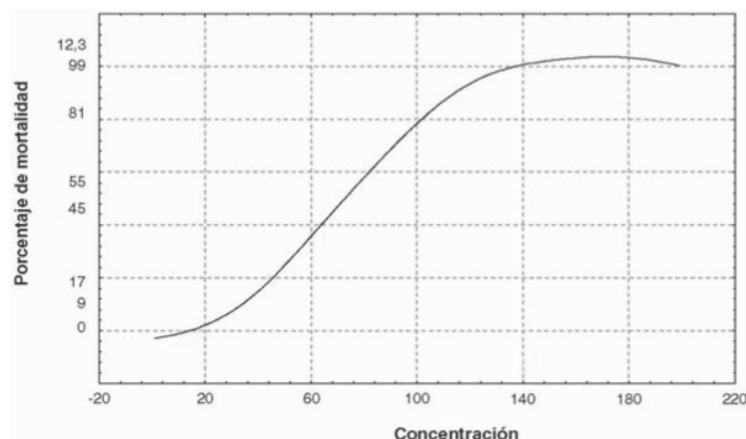
Al encontrar la relación dosis – respuesta, se puede establecer una curva de toxicidad, que permita un análisis estadístico de los resultados para si obtener la concentración letal media (CL^{50}) de los organismos prueba, expresada en partes por millón (ppm)

Partiendo que la concentración letal media (CL^{50}) es la concentración de un agente que se encuentra en el agua, suelo o sedimento que es letal para el 50% de los organismos utilizados en los bioensayos.¹⁵

La forma correcta de realizar los bioensayos es mediante el empleo de la respuesta cuantitativa, es decir, considerando solo dos resultados experimentales muerto o vivo, a partir de esto se puede determinar la relación entre la concentración y el efecto, en porcentaje. Como se dijo anteriormente los datos cuantitativos permiten la determinación estadística de la posición e inclinación de la curva de “concentración – mortalidad” para un periodo de exposición. Con esto se puede evaluar el peligro y riesgo generado por sustancias de interés sanitario que se encuentran en el medio donde vive el organismo prueba. A continuación se muestra la gráfica 1 de la relación dosis - respuesta que puede sufrir cualquier organismo a ciertas concentraciones de contaminantes presentes en su medio, los cuales producen alteraciones en su hábitat.¹⁶

¹⁵ BUSTOS LOPEZ, Martha Cristina; DIAZ BAEZ, María Consuelo; ESPINOSA RAMIREZ, Adriana Janneth. Pruebas de toxicidad acuática. Fundamentos y métodos. Universidad nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería, sección de Ingeniería Ambiental. Bogotá D.C.; 2004 p 36

Gráfica 1. Curva de Dosis Respuesta de Organismos Expuesto a Bioensayos



Fuente: BULUS ROSSINI, Gustavo Daniel; DÍAZ BAEZ, María Consuelo; PICA GRANADOS, Yolanda, Capítulo 5. Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad. En línea. Diciembre de 2006 <http://www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html. 2004>, figura. 4

Cuando se implementan pruebas de toxicidad, se debe realizar la estandarización de las mismas, en la cual se establece la sensibilidad de las especies y su secuencia de efecto frente a un tóxico de referencia, según las repeticiones del experimento. Con esto se certifica que la respuesta de la población en estudio se debe al efecto del tóxico de referencia y no a variaciones de sensibilidad de los organismos o a fallas operacionales en la aplicación del método, elaborando así cartas de vigilancia, teniendo en cuenta la precisión y exactitud que se deben y pueden obtenerse en los resultados generados por un determinado bioensayo.¹⁶

Este tóxico de referencia debe cumplir con las siguientes características:

- Amplio espectro tóxico.
- Facilidad de obtención en forma pura
- Alta solubilidad en agua
- Persistencia y estabilidad en solución
- Estabilidad en almacenamiento
- Facilidad de cuantificación

¹⁶ Ibid. p. 37

Determinando el rango de variabilidad máximo aceptable en los resultados, así como el rango de sensibilidad frente al tiempo de exposición, tóxico de referencia y manifestación de organismos (muerte, inmovilización, etc.).¹⁷

2.6. CLASIFICACIÓN DE ENSAYOS DE TOXICIDAD

Las pruebas de toxicidad son clasificadas según el objetivo que se busque con ellas, el área de estudio y el espacio que se límite para las mismas, como se muestra a continuación:

2.6.1. Ensayos de toxicidad según su respuesta:

2.6.1.1. Ensayos de Toxicidad Aguda: Los organismos son expuestos al agente toxico durante un tiempo corto no mayor a 96 horas y se presenta una sola vez.

2.6.1.2. Ensayos de Toxicidad Subaguda: Los organismos son expuestos al agente toxico diariamente durante periodos que oscilan entre 15 días y 4 semanas.

2.6.1.3. Ensayos de Toxicidad Crónica: El periodo de exposición cubre, al menos una generación del organismo de prueba. Son considerados como ensayos a largo plazo. Permiten evaluar la exposición continuada al tóxico y efectos subletales como reducción de crecimiento o reproducción. Sus resultados se expresan en niveles NOEC (no se observan efectos adversos en los organismos de prueba) y LOEC (causan efectos adversos estadísticamente significantes en los organismos de prueba) y MATCH (es el rango entre el NOEC y LOEC y es la concentración máxima aceptable del tóxico) este último utilizado ampliamente por la EPA para evaluar pesticidas y químicos industriales (EPA 1999a).

¹⁷ BRUCE VARELA, Ramón Alejandro. Determinación del nivel de toxicidad aguda del fungicida carbendazim y el herbicida 2,4 d mediante bioensayos con *galaxias maculatus* Universidad Católica de Temuco. 2005; p 9

2.6.1.4. Ensayos de Toxicidad Subcrónica: En ellos el periodo de exposición al tóxico cubre al menos el 10% del periodo de generación del organismos de prueba; se aplica a organismos que tienen ciclo de vida de por lo menos un año de duración. Permiten la evaluación de la alternancia de periodos de exposición y no exposición al tóxico.

2.6.2. Ensayos de toxicidad según su técnica:

2.6.2.1. Ensayos estáticos: Este consiste en colocar en cámaras de prueba o montajes las soluciones que se vayan a utilizar en el ensayo y los organismos que se van a examinar.

2.6.2.2. Ensayos Semi-estáticos: En ellos se renueva periódicamente el medio de ensayo (ejemplo: una vez cada 24 horas).

2.6.2.3. Ensayos de Flujo Continuo: En los que existe una renovación continua del medio de ensayo.

2.6.3. Ensayos de reproducción: el periodo de exposición cubre, al menos, tres generaciones de los organismos prueba. Permiten evaluar el comportamiento reproductivo como consecuencia de la exposición al tóxico.

2.6.4. Ensayos de Recuperación: en los que el periodo de exposición es seguido por la transferencia y observación de los organismos de prueba en un medio no tóxico.¹⁸

2.7. FACTORES QUE AFECTAN LA TOXICIDAD

Las características del agua como las de los microorganismos pueden modificar la toxicidad de los contaminantes presentes en el agua. Por consiguiente se deben eliminar los factores extraños que pueden afectar las pruebas de toxicidad, teniendo un control en

¹⁸ ESCOBAR MALAVER, Pedro Miguel. Implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando *Daphnia pulex* para la evaluación de riesgos ambientales. Santafé de Bogotá D. C., 1997; p.23-24

las mismas de OD, pH, dureza y temperatura, con este registro se mantiene un valor constante de estos parámetros, eliminando así todas las variables excepto la concentración del tóxico.

En algunos casos los cambios en el potencial tóxico están dados por las características del agua de dilución. El conocimiento de las posibles variaciones puede ayudar a ejercer un control estricto para tener certeza sobre los resultados obtenidos.

Tanto las características bióticas como las abióticas actúan, como factores modificantes de la toxicidad. Las bióticas incluyen todos los factores que son inherentes a los microorganismos; entre ellas:

- Tipo de microorganismos (algas, insectos, peces, etc.)
- Especies, toda vez que una especie puede responder en forma diferente a otra especie frente a un tóxico dado en el mismo grupo
- Estado de la vida (larva, joven, adulto)
- Tamaño del individuo
- Estado nutricional y salud del individuo
- Sexo del organismo prueba
- Estado fisiológico y grado de aclimatación a las condiciones medioambientales

Dentro de las condiciones abióticas que pueden actuar como factores modificantes se encuentran toda la gama de características fisicoquímicas del agua que rodean el microorganismo: temperatura, pH, oxígeno disuelto, salinidad, dureza, sólidos suspendidos orgánicos e inorgánicos, sales disueltas, nutrientes y sus proporciones relativas; el CO₂ disuelto y otros gases, la intensidad de la luz, el fotoperíodo, el movimiento del agua y las variaciones de todos estos factores en un cuerpo de agua particular.¹⁹

Considerando la toxicidad como la resultante de los efectos adversos que causan en un organismo los contaminantes presentes en el agua, a una concentración y tiempo de

¹⁹ CRUZ TORREZ Luís Eduardo; DIAZ BAEZ, María Consuelo; REYES, Carmen; Ensayos de toxicidad y su aplicación al control de la contaminación industrial; Universidad Nacional; Facultad de Ingeniería. 1996. factores que afectan la toxicidad pág. 15

exposición específicos, es claro que el efecto tóxico, así como la respuesta del organismo a tal efecto pueden modificarse por los factores bióticos y abióticos que afectan tanto al organismo como al contaminante mismo por esta razón estos factores en un momento dado pueden variar los resultados obtenidos. La certeza en el resultado dependerá del hecho de tener constantes estos parámetros en las pruebas de toxicidad.

2.7.1. Condiciones de la prueba de toxicidad: En este aspecto se consideran algunos factores como el tener suficiente solución de prueba de acuerdo a los organismos utilizados, y que a su vez estos estén contemplados en las buenas prácticas de planeación experimental y rutina de laboratorio.²⁰

La actividad de un organismo confinado en un medio (tanque, acuario, etc.) no parece que produjera una mayor incidencia en relación con su comportamiento con respecto a un hábitat natural. Sin embargo, uno de los aspectos que originan las diferencias en las respuestas es la actividad física del organismo, la cual tiene algún efecto en la resistencia.

La naturaleza artificial de un tanque o acuario en ciertos organismos prueba como los peces y las *Daphnias* generalmente no se tienen en cuenta como factor, sin embargo puede tener un efecto sobre la tolerancia o al menos sobre la variabilidad de la respuesta.

La clave para reducir tales variaciones, radica en seguir buenas prácticas de laboratorio y estandarizar cada uno de los factores involucrados, excepto la variable que se esta estudiando que es la concentración del tóxico.

2.7.2. Características Abióticas del Agua: La mayoría de las características que poseen las aguas naturales, son modificadas por factores antropogénicos. Estos son de fundamental importancia en virtud de su acción directa sobre los organismos acuáticos. Para cada una de estas características naturales, existe un valor o nivel óptimo y en algunos casos una zona o franja para una especie dada, donde los organismos adquieren un mejor desarrollo y una mejor actividad fisiológica (aclimatación) para alimentarse y reproducirse. Si las condiciones ambientales cambian a un nivel menos favorable,

²⁰ Ibid. p .16

entonces el organismo, haciendo uso de procesos fisiológicos que le permiten compensar parcialmente el efecto, reacciona en sentido de contrarrestar la acción modificadora; eventualmente se alcanza un límite por encima del cual el organismo muere a causa de una condición ambiental drástica, como puede ser una temperatura alta, pH extremo o baja concentración del oxígeno disuelto.

Las implicaciones de las acciones directas de los factores medioambientales presentes en las aguas naturales, las cuales modifican la acción de los contaminantes tóxicos son obvias. Si un organismo dado se encuentra ya bajo una condición de estrés o carga metabólica, dada por una condición ambiental, entonces el organismo se enfrentará a esta condición más la producida por la acción del contaminante tóxico y por consiguiente el organismo será menos capaz de soportar la acción del contaminante y mostrara un incremento considerable en su susceptibilidad. Entonces los factores medioambientales tendrán un comportamiento como si fuesen factores modificantes de la toxicidad del contaminante.²¹

2.7.2.1 Condiciones abióticas como factores modificantes de la toxicidad

2.7.2.1.1 Temperatura: Las especies de organismos presentes en una comunidad acuática dada, están determinados por el régimen de temperatura del agua y existe un límite letal de temperatura tanto superior como inferior, más allá del cual el organismo no puede sobrevivir.

Existen temperaturas óptimas para ciertos procesos de los microorganismos como el crecimiento, reproducción y desarrollo de ciertas actividades. Para la mayoría de los microorganismos más que un valor puntual, existe un rango óptimo de temperatura para las actividades metabólicas.

²¹ Ibid ; p.17

La temperatura del agua puede modificarse por la descarga de aguas calientes o frías de los procesos industriales y el efecto se refleja en menor grado en lagos que en ríos y corrientes.²²

Para proteger la vida acuática contra los cambios de temperatura, se deben tener en cuenta todos los factores que el cambio de temperatura puede modificar. Por ello la EPA (1999) recomienda para cada especie de organismo los siguientes factores:

- Mantener una temperatura que no cause letalidad en exposiciones cortas
- Mantener un máximo durante las estaciones frías que proteja contra la letalidad producida por las caídas repentinas de temperatura.
- Mantener un promedio semanal de temperatura en la estación cálida que proteja contra la carga metabólica sub. – letal.
- Tener en cuenta para ciertas especies los requerimientos específicos de temperatura, por ejemplo para obtener una reproducción exitosa se requiere un determinado nivel de temperatura.

El incremento de la temperatura también incrementa la solubilidad de muchas sustancias, lo cual influye en la forma o estado químico de las mismas. Los cambios de temperatura en una dirección dada pueden incrementar, disminuir o no causar ningún cambio en la toxicidad de una sustancia, lo cual depende del tipo de tóxico, de las especies de organismos involucrados y en muchos casos del experimentador mismo, quien ha seleccionado un procedimiento y respuestas particulares. De igual manera la temperatura es uno de los factores que gobierna el nivel de oxígeno disuelto del agua.

El contenido de oxígeno disuelto, de las aguas superficiales es de 14.6 mg/L para la saturación a 0°C y 1 atmósfera de presión y decrece gradualmente con una variación de temperatura hasta 9 mg/L a 20°C y 7.5 mg/L a 30°C.

2.7.2.1.2. Oxígeno Disuelto (OD): El nivel de oxígeno disuelto para la mayoría de las corrientes se encuentra por debajo del nivel de saturación particularmente en el fondo de los lagos. La concentración puede fluctuar por la fotosíntesis de las algas, estando el OD

²² Ibid ; p.18

por debajo de la saturación durante la noche y cerca de la saturación y a veces sobresaturada durante el día.²³

Uno de los efectos más estudiados en contaminación de aguas, es la baja del OD originado por la acción de materia orgánica, la cual consume el OD en el proceso de descomposición química y biológica.²⁴

En muchos trabajos se considera al OD como el indicador de especies y se desarrollaron sistemas de clasificación del grado de contaminación con base en estos factores. Cuando las aguas se desoxigenan por la acción de las descargas con residuos orgánicos, se producen un decrecimiento dramático en las especies existentes y un cambio drástico en las mismas. Las poblaciones de organismos que viven en el fondo de los ríos, se reemplazan en casos extremos por un número grande de larvas rojas (contienen hemoglobina).

Como el oxígeno disuelto se requiere para la respiración; la disminución en los niveles de este, puede tener un efecto como si se tratara de un factor limitante para los organismos acuáticos. Los criterios modernos de calidad del agua reconocen que una reducción del OD por debajo del nivel natural tendrá un efecto drástico sobre los organismos y no existe un número que pueda usarse como criterio de nivel aceptable.

Se debe esperar que el estrés causado en los organismos por una reducción en el nivel de oxígeno disuelto, incrementa considerablemente la toxicidad de los contaminantes en el agua. En los últimos años se ha investigado mucho respecto y se ha encontrado un incremento de la toxicidad de ciertos metales y fenoles en relación con el grado de desoxigenación.

Este comportamiento se basa en la relación incremento de la letalidad - disminución de oxígeno que entra en las branquias de los organismos prueba; la reducción de oxígeno, origina una mayor concentración de los contaminantes en las membranas de las branquias y por consiguiente una alta concentración de los tóxicos dentro de las

²³ Ibid ; p.20

branquias; si la toxicidad de una sustancia depende del pH, un cambio en el mismo puede reducir los niveles de OD.²⁴

A bajos valores de OD, hay mayor irrigación y baja respiración de CO₂, lo cual origina un incremento en el pH en las zonas de las branquias.

2.7.2.1.3. Concentración de hidrógeno – pH: Los efectos directos de pH sobre los organismos son graduales; el mayor efecto de este como factor modificante esta dado para sustancias que ionizan bajo la influencia del pH, como la mayoría las moléculas no disociadas, las cuales, pueden ser más tóxicas toda vez que ellas puedan penetrar las membranas celulares fácilmente, esta situación es opuesta para el caso de los metales en los cuales la forma disociada es más tóxica que la no disociada.

2.7.2.1.4. Dureza: El calcio y en menor extensión el magnesio, son los cationes disueltos predominantemente en aguas naturales y son los principales responsables de la dureza de las aguas. Una clasificación de las aguas con respecto a la dureza se muestra en la siguiente tabla 1:

Tabla 1: Clasificación de aguas según su Dureza

Tipo de agua	Concentración de CaCO ₃
Blanda	0 a 75 mg/L CaCO ₃
Moderadamente Dura	75 a 150 mg/L CaCO ₃
Duras	150 a 300mg/L CaCO ₃
Muy Duras	>300 mg/L CaCO ₃

Fuente: CRUZ TORREZ Luís Eduardo; DIAZ BAEZ, María Consuelo; REYES, Carmen; Ensayos de toxicidad y su aplicación al control de la contaminación industrial; Universidad Nacional; Facultad de Ingeniería.1996.

Factores que afectan la toxicidad. P. 22

La mayoría de los metales son más tóxicos en aguas blandas que en aguas duras. La afectación de la dureza con los metales hace que las membranas celulares de las branquias sean más permeables, lo que ayuda a la entrada del metal en el organismo prueba. Los organismos que crecen en aguas blandas son más sensitivos que los de

²⁴ Ibíd., p 22

aguas duras ya que requieren menos tiempo para perder el calcio que se encuentra en el tejido de los mismos, involucrando así efectos en la resistencia del organismo.²⁵

2.8. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS ENSAYOS

La estadística desempeña un papel importante no sólo para el cálculo, sino para la planificación y ejecución de las pruebas de toxicidad y para el análisis e interpretación de los resultados obtenidos en ellas. Por tanto, el diseño experimental, el muestreo, la modelación, la recolección de datos, las pruebas y los análisis deben ceñirse a principios estadísticos estrictos. En general, los métodos de análisis de los resultados están bien documentados, son aplicables a la mayoría de los datos obtenidos en este tipo de pruebas y pueden ser manejados por personas sin entrenamiento estadístico.²⁶

El análisis de relaciones entre dos o más variables implica, en la mayoría de los casos, la utilización de técnicas estadísticas de regresión. Estas técnicas requieren, antes de ser aplicadas, la selección de la ecuación matemática (en adelante, el modelo) con la que se relacionarán las variables analizadas. A su vez, en la selección del modelo a utilizar, es de vital importancia el tipo de variables a relacionar.

En general, las variables se clasifican en cualitativas y cuantitativas, pudiéndose distinguir en el último caso entre discretas y continuas. Las cuantitativas discretas son las que sólo pueden tomar valores pertenecientes al conjunto numérico de los enteros, mientras que las continuas pueden tomar cualquier valor en el conjunto numérico de los reales. Las variables cuantitativas pueden ser analizadas en forma directa a través de análisis estadísticos de regresión, mientras que las cualitativas deben ser expresadas de forma cuantitativa antes de ser analizadas. Este último caso es el que se verifica en los ensayos en los que se evalúa la mortalidad como variable, ya que ésta sólo puede tomar los

²⁵ Ibíd. p.24

²⁶ BULUS ROSSINI, Gustavo Daniel; DÍAZ BAEZ, Maria Consuelo; PICA GRANADOS, Yolanda, Capítulo 5. Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad. En línea. Diciembre de 2006 < http://www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html. 2004>

estados vivo o muerto (variable cualitativa), y debe ser expresada como porcentaje de muertos antes de poder ser analizadas por métodos de regresión.

Finalmente, es importante destacar que, en lo que respecta al análisis de las relaciones entre la concentración de un tóxico y la respuesta o efecto del mismo en la materia viva, existen otras aproximaciones al análisis de dichas relaciones en las que, básicamente, sólo se pretende determinar la concentración a la cual no se observa un efecto nocivo del tóxico sobre el organismo expuesto, o la concentración más baja a la cual se observa un efecto tóxico. Este tipo de análisis se realiza a través del método de ANOVA (análisis de la varianza) o su equivalente no paramétrico.²⁷

En una prueba de toxicidad típica se involucra un agente o estímulo, el cual es aplicado a un organismo o grupo de organismos al que genéricamente se denomina sujeto, sobre el cual se evalúa cierta respuesta. La magnitud del estímulo puede medirse como un peso, un volumen o una concentración. La respuesta del sujeto se valora mediante la cuantificación final de algunas características, el cambio de ella o por la ocurrencia o no de un determinado fenómeno (muerte, inhibición del crecimiento, una contracción muscular, etc).

Las pruebas de toxicidad suelen diseñarse utilizando diferentes dosis, ya que la respuesta dependerá directamente de la concentración aplicada. La información obtenida de este tipo de ensayos permite la cuantificación de la relación entre las dos variables (dosis y respuesta). Normalmente, las pruebas de toxicidad se diseñan para comparar o estimar la potencia de un agente con relación a una *preparación estándar* o *control*.

Es importante destacar que la respuesta a una dosis en particular se verá afectada en mayor o menor medida por factores no controlados durante el experimento.²⁸

Para el análisis de las relaciones cuantitativas entre la dosis y la respuesta, es necesario recurrir a modelos matemáticos que describan dicha relación. En general, los modelos matemáticos se pueden clasificar en:

²⁷ Ibid., párrafo 8

²⁸ BULUS ROSSINI, Gustavo Daniel; DÍAZ BAEZ, Maria Consuelo; PICA GRANADOS, Yolanda, Capítulo 5. Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad. En línea. Febrero 2007. <http://www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html. 2004>

- Mecánico: es un modelo que intenta describir un proceso basándose en postulados acerca de la mecánica de dicho proceso.
- Empírico o descriptivo: es un modelo que intenta describir cuantitativamente los patrones de las observaciones sin basarse en los procesos subyacentes o mecánica del proceso.
- Determinístico: es un modelo en el que dado un dato en particular, la predicción que se obtiene del modelo es siempre el mismo valor.
- Probabilístico: es un modelo en el que dado un dato en particular, la predicción que se obtiene del modelo es un valor variable.

En el caso particular de las pruebas de toxicidad, los más utilizados son los de tipo empírico o descriptivo de forma rectilínea, a los cuales se llega muchas veces luego de haber transformado una o las dos variables estudiadas.³⁰

Dentro de la gran cantidad de modelos y técnicas de análisis disponibles para evaluar los resultados de los ensayos de toxicidad, sólo se describirán aquellos asociados al análisis de los ensayos que se realizaron en esta investigación.

2.8.1. Métodos estadísticos: Para que se de el cumplimiento a los requerimientos de validez y precisión de las pruebas se debe utilizar una metodología estadística desde la planificación hasta la ejecución y, luego, el posterior análisis de los resultados. El criterio básico para seleccionar el método estadístico, es escoger el que se ajuste a las condiciones experimentales y que permita obtener resultados válidos.²⁹

2.8.1.1. Diseño experimental: Las condiciones de experimentación tienen que ver con la *reproducibilidad* o *replicabilidad*. En este sentido, las propiedades físicas y químicas de los compuestos químicos que se utilizan deben ser muy bien conocidas y controladas, por lo que la preparación y almacenamiento de los compuestos y solventes constituyen un elemento técnico importante, además de los asociados con la producción de los

²⁹ Ibíd., párrafo 10

organismos de prueba. Igualmente, el uso de réplicas es básico cuando se lleva a cabo la evaluación estadística de medidas.³⁰

En pruebas de toxicidad deben tenerse en cuenta algunos factores que pueden ser una fuente potencial de confusión. Entre ellos se pueden mencionar: número de repeticiones, número de tratamientos/grupos de dosis o concentraciones.³¹

El principio básico en el diseño estadístico es la aleatorización, por ello los esfuerzos y el tiempo dedicados a cumplir con este principio producirán resultados más confiables y reproducibles, ya que el concepto de muestra aleatoria es un requisito indispensable para la validez de cualquier prueba estadística.³¹

En las pruebas de toxicidad en general se utilizan dos diseños básicos:

1. Establecimiento de una relación dosis-respuesta.

2. Análisis de varianza (ANOVA)

Como resultado del análisis de los datos de un diseño para estimar una relación dosis-respuesta, lo que se pretende obtener son las estimaciones de los parámetros del modelo seleccionado para relacionar las variables y, a continuación, utilizar el modelo con las estimaciones de los parámetros encontrados para determinar los valores de la variable *concentración de tóxico* que causan un grado de efecto, en particular sobre los organismos expuestos. Entre estas concentraciones, la más utilizada es la que se conoce como concentración letal 50 (CL⁵⁰), que es la concentración que produce la respuesta esperada sobre el 50% de los organismos expuestos.”³¹

2.8.2. Establecimiento de una relación dosis-respuesta de tipo mortalidad: La selección del método a utilizar para estimar los valores de CL⁵⁰ de pruebas de toxicidad aguda dependerá de la forma de la distribución de tolerancias, y que tan bien las concentraciones seleccionadas la caracterizan (por ejemplo, el número de mortalidades parciales).³¹

³⁰ Ibíd., párrafo 12-13 y 14

En la gráfica 2 se presenta el diagrama de flujo recomendado por la US EPA (1993) para la selección del método, basado en los requerimientos de cada uno.³¹

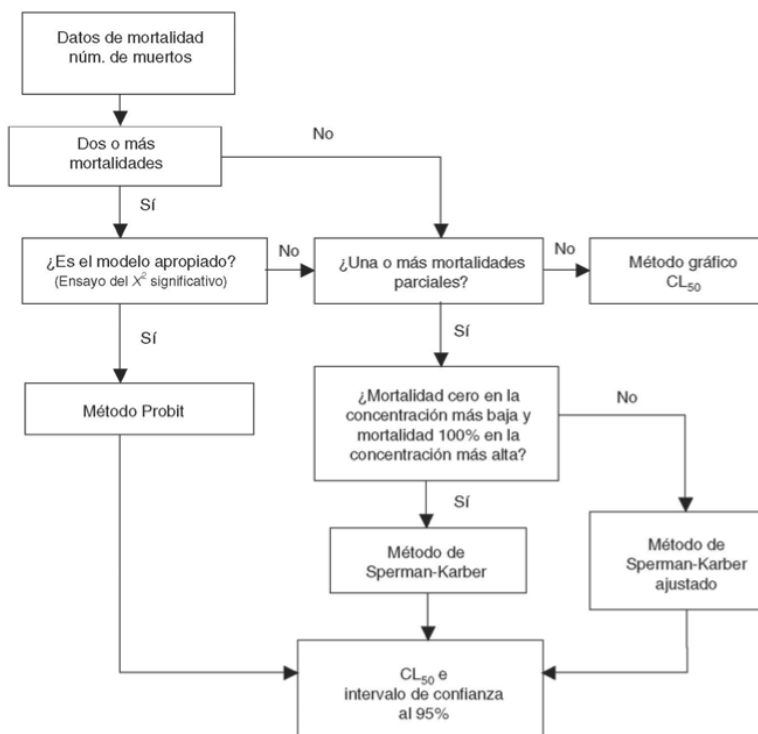
En general, se recomiendan cuatro métodos para la estimación de CL50/CE50/CI50 los cuales son:

2.8.2.1. Método Probit (paramétrico): El método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre una población a los fenómenos físicos peligrosos; nos da una relación entre la función de probabilidad y una determinada carga de exposición.³²

2.8.2.2. Método de Litchfield-Wilcoxon (gráfico): Este método consiste en la construcción de una gráfica a partir de los datos obtenidos en pruebas de toxicidad aguda de un agente tóxico. Se utiliza papel *prob-log*, en el cual se colocan en el eje de las X el logaritmo (X) de las concentraciones usadas y en el eje de las Y el porcentaje de respuesta del efecto observado. Para el cálculo de la CL50/CE50/CI50 mediante este método, es necesario tener por lo menos, un porcentaje intermedio de efecto observado (valores entre 0 y 100% de efecto).³²

³¹ Ibíd., párrafo 15-16

Gráfica 2. Determinación de CL^{50} para pruebas de toxicidad aguda con múltiples concentraciones.



Fuente: BULUS ROSSINI, Gustavo Daniel; DÍAZ BAEZ, Maria Consuelo; PICA GRANADOS, Yolanda, Capítulo 5. Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad. En línea. Febrero 2007. <http://www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html. 2004> figura 2.

2.8.2.3. Método de Spearman-Kärber (no paramétrico): Es un método aproximado, no paramétrico, que proporciona una buena estimación de la media y la desviación estándar. Si la distribución es simétrica, se obtiene una estimación de la concentración total mediana (CL_{50}).³²

2.8.2.4. Método gráfico: En este método, se parte de los datos obtenidos en las pruebas de toxicidad aguda, y utilizando papel logarítmico se grafican en el eje de las X las concentraciones (mg/L) y en el eje de las Y el porcentaje de mortalidad. Se colocan los puntos de los porcentajes de mortalidad observados (en escala lineal) en función de las concentraciones probadas (en escala logarítmica); se conectan los puntos obtenidos más

³² Ibid., párrafo 17

cercanos al 50% del efecto observado, o sea, a la mayor concentración que no causa efecto tóxico y a la menor concentración que causa efecto tóxico. A partir de la recta trazada, se obtiene el punto de corte correspondiente al 50% del efecto observado. Este valor corresponde a la CL50 del estímulo o agente estudiado. Cuando no se logra hacer un ajuste adecuado de los datos, se pueden utilizar otros métodos para hacer las estimaciones de CL50.³³

2.8.3. Análisis de Varianza (ANOVA): En estadística el análisis de varianza (ANOVA) es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados. Esta prueba está diseñada para comparar los resultados obtenidos para un tratamiento en particular contra un control (tratamiento con dosis cero). Para este tipo de análisis se requiere que el número de replicas por tratamiento sea superior a tres y que todos los tratamientos tengan el mismo número de replicas. En el caso que las replicas sean menores de tres no se deberá proceder con una prueba hipótesis.

Para esta investigación el análisis estadístico se realizó con el método paramétrico Probit, ya que se contó con el software que fue suministrado por la Corporación Autónoma Regional para mayor precisión del cálculo de la concentración letal media, y cuyo procedimiento se describe en el protocolo LB06, dándonos un margen de confiabilidad del 95%. Igualmente los resultados del software fueron validados mediante el análisis de varianza (ANOVA) cuyo procedimiento se describe en el protocolo LB07.³³

2.9. ORGANISMO DE PRUEBA: *Daphnia Pulex*

La especie *Daphnia* conocida comúnmente como pulga de agua, es la más utilizada en el desarrollo de pruebas de toxicidad, por su alta sensibilidad a sustancias tóxicas; ciclo de vida corto; pequeña talla; alimento y exigencias nutricionales conocidas; facilidad de cultivarse; poco volumen de agua a utilizar; alto número de producción de crías; reproducción partenogenética lo cual lo hace ideal para estudios de bioacumulación, teniendo en cuenta, las condiciones apropiadas y estandarizadas y su fácil acceso geográficamente. Son consideradas como indicadores ambientales propios de los ambientes evaluados, por su amplia distribución e importancia ecológica, ya que con el se

³³ BULUS ROSSINI, Op cit.

favorece indirectamente a la preservación de la biodiversidad local en ambientes intervenidos.

La *Daphnia Pulex* es un organismo nativo del territorio colombiano, que se encuentra en los ecosistemas acuáticos; ya que el país presenta en su mayoría cuerpos de agua y escorrentías clasificadas como aguas blandas (dureza 0-75 mg/l CaCO_3) donde habita esta especie, y es un eslabón fundamental en la cadena alimenticia, considerándose como consumidores de primer orden, y cuya familia taxonómica es la que se muestra en la tabla 2:

Tabla 2: Clasificación de la *Daphnia Pulex*

Reino	Animalia
Phylum	Artrópoda
Clase	Crustácea
Subclase	Brachiopoda
Orden	Cladóceras
Familia	Daphnidae
Genero	Daphnia

Fuente: GONZALEZ, Henry; GUTIERREZ, Sandra. Clasificación y ciclo de vida de una especie de *Daphnia* nativa de la Sabana de Bogotá, Universidad de la Salle, Departamento de Química y Biología. Bogotá D.C., 1995, 13 Pág

2.9.1. Biología de La *Daphnia Pulex*: Los crustáceos forman un grupo de artrópodos casi enteramente dulceacuícolas y en ocasiones marino. Tienen un cuerpo simétrico y con apéndices articulados normalmente con dos ramas, están cubiertos totalmente o en parte por un caparazón. La respiración se realiza a través de la superficie del cuerpo mediante branquias, este se halla dividido generalmente en tres regiones con tendencia a la fusión de los segmentos abdominales.³⁴

Los braquiópodos, pequeños crustáceos en gran parte dulceacuícolas, se presentan en los lagos temporales. Están claramente segmentados y poseen muchos pares de apéndices respiratorios y natatorios. Los huevos pueden resistir largos periodos donde hay alteraciones en su hábitat, estos eclosionan cuando reaparecen las condiciones

óptimas de humedad, como resultado de la reducción de la presión osmótica en la superficie del huevo.

En el cuarto orden de los braquiópodos los Diplostraceos, encontramos los cladóceros, compuesto principalmente por microzooplancton. Estos tienen un tamaño comprendido entre los 0.2 y los 3mm. En ellos se distinguen claramente la cabeza del resto del cuerpo, el cual esta cubierto por un caparazón cuticular bivalvo, e incluye los ojos sésiles, sus antenas son birramosas (dos ramas); usadas como apéndices nadadores, sus 4 a 6 pares de patas torácicas y un post - abdomen no articulado. ³⁴

2.9.2. Descripción Anatómica del Genero *Daphnia* s.p.

2.9.2.1. Estructura Externa: El tamaño varía entre 0.2 y 3 mm., se caracteriza principalmente por poseer un caparazón quitinoso que cubre y protege la cabeza y el cuerpo. En la región torácica y abdominal, el caparazón esta cerrado en el dorso y abierto en la parte del vientre, dando la apariencia de dos cubiertas grandes, aunque en realidad se encuentran en una sola pieza cuticular plegada. ³⁵

Las cubiertas, son cristalinas y muy traslucidas, lo que facilita su estudio. Su superficie es reticulada, marcada, punteada o con espinas.

En su cuerpo se puede diferenciar la cabeza, la cual esta mas o menos separada del cuerpo (cubierta habitualmente por el caparazón), en ella se puede observar un corto pico de forma variable, presenta un rostro, de extremo romo o anguloso, generalmente curvado con un par de antenas de tamaño y forma muy variables, insertadas en el margen ventral cefálico las cuales poseen un número variable de sedas sensitivas apicales.

“A cada lado se encuentra un fórnix, especie de quilla que marca la inserción de un par de antenas generalmente fuertes, siempre móviles y biseriadas, formadas por un segmento

³⁴ GONZALEZ GOMEZ, Henry Bernardo; GUTIERREZ ALVAREZ, Sandra del Pilar. Clasificación y ciclo de vida de una especie de *Daphnia* nativa de la Sabana de Bogotá, Universidad de la Salle, Facultad de Ciencias de la Educación, Departamento de Química y Biología. Bogotá D.C., 1995, Pág. 13

basal o basipodio, en el que se distinguen dos ramas: una dorsal o exopodio formada por 4 o 3 artejos, y otra ventral o endopodio formada por 3 artejos con sedas plumosas en número variable; tienen funciones natatorias.

El epipodo, cumple funciones respiratorias y el exopodo llevan también numerosas sedas; el primer y segundo par son mas o menos cogedores lo cual permite ayudar a la limpieza de partículas extrañas en las otras patas.

Entre la cabeza y el cuerpo se abre centralmente una pequeña boca donde se sitúan los siguientes apéndices: un labro mediano que cubre las piezas bucales; un par de mandíbulas quitinosas fuertes y dentadas que sirven para moler y un par de maxilares pequeños y rudimentarios que empujan el alimento hacia las mandíbulas.

El cuerpo esta separado generalmente de la cabeza por un seno cervical. El tórax presenta apéndices en número de 5 o 6 pares laminares y foliáceos, con numerosas sedas y pelos en el endópodo, el cual está adaptado para filtrar el alimento que captura mediante movimientos complejos de estos peines filtradores creando una corriente constante de agua a través de las cubiertas, oxigenando la superficie del cuerpo y forzando una corriente de partículas alimenticias hacia la parte anterior.

Las partículas de alimento filtradas por las sedas son recogidas en un canal estomacal localizado en la base de las patas y son llevadas hacia la boca, donde se mezclan con las secreciones bucales. Las sedas retienen organismos (generalmente pertenecientes al nanopláncton) y partículas muy finas (menores de 30 micras), inclusive bacterias.³⁵

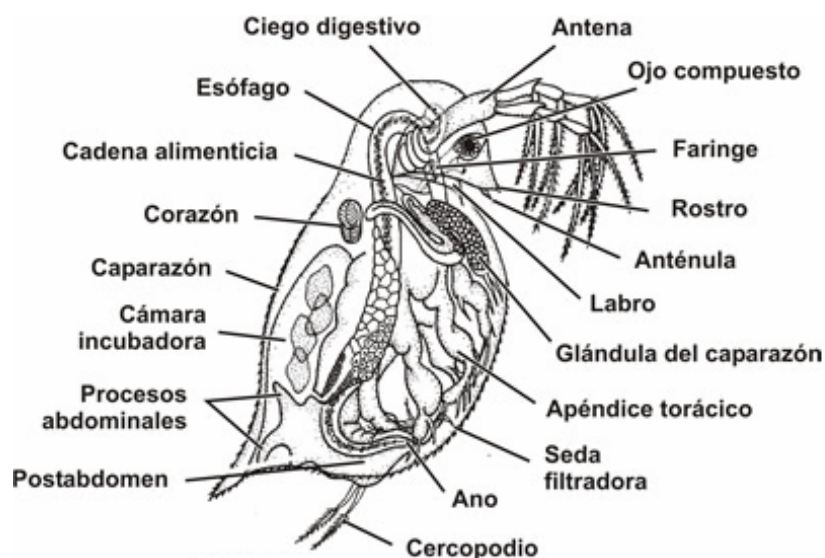
En el lado dorsal del cuerpo se encuentra la cámara de cría o incubadora, que en las hembras fecundadas esta repleta de huevos partenogénéticos (número variable dependiendo la especie), o bien está transformada en efipio que aloja uno o dos huevos de resistencia.³⁶

³⁵ Villaseñor, Carlos; García Ramírez, Angel; Martínez Alegría, Julio Cesar; Espinosa Cruz, Benjamín; Arriaga Calzada, Luis Daniel. ACUARIO FLOUNDERS. revista Aquagua de julio de 1999. En línea. Marzo 2007 <<http://www.perros-purasangre.com.mx/pps19/DAPHNIA0PULEX.html> >

³⁶ GONZALEZ GOMEZ, Op cit., Pág. 16 -18

No existen en los cladóceros un verdadero abdomen, pero poseen en cambio, un post – abdomen muy desarrollado que cierra la cámara la incubadora por detrás; es muy móvil y lleva dorsalmente dos largas sedas abdominales plumosas, distalmente termina en un par de uñas caudales largas. En el margen posterior lleva usualmente una serie de espinas anales o post – anales, marginales o laterales, de primordial importancia sistemática, que cumplen funciones de limpieza de las patas y a mismo tiempo intervienen en la locomoción.³⁷

Figura 2: Partes de la *Daphnia Pulex*



Fuente: RICO ORDÁS, José Manuel; MENÉNDEZ VALDERREY, Juan Luís. Asociación ASTURNATURA. COM. Marzo 2007. En línea. <<http://www.asturnatura.com/articulos/artropodos/branquio.php>>. Figura 4.

³⁷ RICO ORDÁS, José Manuel; MENÉNDEZ VALDERREY, Juan Luís. Asociación ASTURNATURA. COM. Marzo 2007. En línea. <<http://www.asturnatura.com/articulos/artropodos/branquio.php>>. Párrafo 3-4

2.9.2.2. Estructura Interna y Fisiología:

2.9.2.2.1. Sistema Digestivo y Nutrición: El tubo digestivo es muy simple, sin dilataciones; en algunas familias con ciegos hepáticos anteriores. Se inicia en una boca ventral y concluye en el ano que se abre en el dorso o en el extremo del post – abdomen. Las partículas alimenticias pasan directamente, de un corto esófago, la intestino medio donde son digeridas y asimiladas, en ciertos casos presentan circunvoluciones.

Las *Daphnias* son organismos filtradores, esta función la realiza con el fin de separar el de las partículas de materia orgánica es la manera más común de consumir e ingerir el alimento. Este proceso se inicia externamente al formarse una corriente de agua producto de los complejos movimientos de los apéndices foliáceos estomacales. Los cinco o seis pares de patas torácicas realizan movimientos que generan una corriente continua de agua con partículas alimenticias entre las cubiertas, las cuales, forman una cámara de succión. El agua es aspirada cuando las patas se mueven hacia fuera, formando una cámara entre el caparazón y los pares de patas número tres, cuatro y cinco; cuando estas se dirigen de nuevo al centro del cuerpo las partículas quedan retenidas entre las sedas mientras el agua es expulsada hacia fuera. Las partículas retenidas en el filtro son entonces amontonadas y arrastradas hacia la boca. Esta tarea se facilita por la secreción de unas glándulas que se encuentran en la base del cuarto par de patas. En la zona bucal, las glándulas del labro producen otra secreción que se mezclan con las partículas de los alimentos antes de la ingestión. El cúmulo de material alimenticio es triturado entre las mandíbulas y luego penetra en la boca. El material no ingerido es expulsado con la ayuda de unas espinas localizadas en la base del primer par de patas torácicas y arrojado fuera del caparazón por enérgicos movimientos del post – abdomen. El tamaño de las partículas filtradas del agua es función de la morfología de las sedas de los apéndices móviles o de la habilidad de captura, cuando la locomoción del animal dirige las partículas hacia las sedas.³⁸

³⁸ GONZALEZ GOMEZ, Op cit., Pág. 19

La dieta alimenticia preferida por este tipo de cladóceros son las algas unicelulares con gruesas paredes las cuales son digeridas rápidamente y consumidas en su totalidad. También son consumidores de algunas algas coloniales de paredes gruesas, provistas de vainas gelatinosas, las cuales pasan intactas a través del conducto digestivo permaneciendo relativamente inalteradas, viables o disgregadas en pequeñas partículas, para ser consumidas por el organismo de acuerdo con la necesidad.

Se tiene en cuenta que la asimilación de las partículas alimenticias no es constante, variando enormemente y de manera directa con la calidad del alimento (contenido energético) y las tasa de filtración.³⁹

Estas tasas de filtración se determina según el volumen de agua que contiene el número de células ingeridas por animal en un tiempo dado, este no quiere decir que el volumen de agua que pasa a través de los apéndices filtradores sea conocido, ni que todas las partículas hayan sido separadas del agua, ni mucho menos que todas las partículas retenidas por el aparato filtrador hayan sido consumidas. Las tasas de filtración de los cladóceros varían de manera considerable con el tamaño del cuerpo, el alimento y la temperatura.⁴⁰

Las tasas de filtración se estabilizan o decrecen a medida que aumenta la concentración de partículas de alimento de acuerdo con las limitaciones morfológicas del aparato filtrador y la selectividad del alimento. Esto es debido a que concentraciones mayores de alimento impiden el movimiento de los apéndices torácicos que recolectan el alimento, mientras que el movimiento de las mandíbulas y deglución permanecen igual o disminuyen ligeramente. Por ello se debe establecer la cantidad de alimento que se administra a cada hábitat según la cantidad de organismos prueba que se tengan en el mismo.

³⁹ ALAPE, Joseph; ESCOBAR MALAVER, Pedro Miguel; LARISSA NIÑO, Claudia; LOPEZ, Camilo; MOJICA, María Lucia; REYES, Carmen; SALAMANCA, Lucy Amparo; SANCHEZ, Hernán. Estudio de evaluación de toxicidad relativa de sustancias tóxicas en vertimientos y cuerpos receptores. Aclimatación y estandarización de bioensayos. Subdirección de manejo y control de Recursos Naturales. Proyecto CAR – BID – Contrato 298–94. Bogotá D. C.;1994. p. 6-9

⁴⁰ LIMNOLOGIA. Robert G. Wetzel. España. 1981. pag.397

De acuerdo con el crecimiento de los organismos, la energía utilizada en los estados de adultez aumenta por la etapa de reproducción ya que el alimento se debe asimilar más rápidamente y por ende su metabolismo es mayor.

2.9.2.2.2. Sistema Respiratorio: La respiración es aeróbica en su totalidad. Además de realizarse por los epipoditos, esta también se realiza a través de la superficie del cuerpo al formarse corrientes de agua que cuando pasan por las cubiertas las oxigena. Cuando se encuentran en un medio bien aireado son incoloros, pero cuando el mismo presenta deficiencia en oxígeno se tornan de color rojo debido a que poseen hemoglobina.⁴¹

2.9.2.2.3. Sistema Circulatorio: El sistema circulatorio es abierto como el de todos los crustáceos y la hemoglobina es impulsada por un corazón pequeño (saco globuloso con solamente dos ostíolos), ovalado o redondeado, que se encuentra en la parte superior del tronco, colocado dorsalmente. La hemolinfa entra por los ostíolos laterales y fluye a través del extremo anterior en el hemocele.

2.9.2.2.4. Sistema Excretor: Las funciones excretorias se realizan mediante una glándula especial de posición anterior denominada glándula de la concha, que consiste en un tubo contorneado que se encuentra en la parte antero - abdominal a cada lado del caparazón.⁴²

2.9.2.2.5. Sistema Nervioso: El sistema nervioso consiste en un cordón ventral doble, con unos pocos ganglios, dos pares de nervios laterales y un ganglio cerebral o cefálico frente al esófago.

Los órganos sensitivos están representados por un par de ojos compuestos, un par de ocelos y sedas sensoriales antenales y post - abdominales.

Los ojos compuestos se originan embriológicamente en forma de estructuras pareadas que se fusionan más tarde para formar un ojo único, el cual a medida que se desarrolla, se sume en la cabeza y es cubierto por el exoesqueleto, circunscribiendo una cavidad.

⁴¹ GONZALEZ GOMEZ, Op cit., p. 20 -21

⁴² Peter Alexander et.al, Biología. New Jersey. Prentice Hall; 1992 p 3223

Gracias a tres pares de músculos que desde los lados de la cabeza se dirigen al anillo del ojo, puede este realizar movimientos en varias direcciones. Estos músculos permiten también que el ojo realice un movimiento constante caracterizado por pequeños visualizaciones varias veces por segundo. Como el ojo esta compuesto por unos cuantos omatidios solamente, cada uno de los cuales concentra la luz que se produce en un área relativamente ancha, estos breves movimientos pueden mejorar la visión. Los conos cristalinos de los omatidios son grandes y hacen protrusión. Desde el ojo parte un haz de nervios ópticos que se dirigen a un gran ganglio óptico unido a un cerebro aún más grande. Rara vez son visibles los cordones conectivos circunsofágicos, el ganglio subesofágico y algunos ganglios abdominales

Adherido al borde anteroventral del cerebro, se destaca la presencia del ojo medio e impar llamado ojo nauplio, en que se aprecia una masa de pigmento central con un grupo de células visuales anteriores y dos grupos de células visuales laterales.⁴³

2.9.2.2.6 Locomoción: Las *Daphnias* nadan por medio de sus potentes segundas antenas. El movimiento es en gran medida vertical y casi siempre espasmódico. El golpe de reo hacia debajo de las antenas que impulsa al animal hacia arriba; después se sumerge lentamente utilizando las antenas a manera de paracaídas. Algunas especies se desplazan de manera más regular por movimientos continuos de las antenas.

Si bien los cladóceros suelen conservar la cabeza erguida, unos cuantos nadan invertidos, es decir, con el abdomen hacia arriba. También son raras algunas especies que cuelgan de la superficie del agua valiéndose de unas cerdas existentes en las antenas no susceptibles de humedecerse.

2.9.2.2.7. Sistema Reproductivo: Son de sexos separados, con dimorfismo sexual acentado. La hembra posee dos ovarios alargados, laterales y algo ventrales al intestino, en la región torácica del cuerpo; que cuando maduros, tienen aspecto densamente granular. Los oviductos, difícilmente diferenciables, se abren dorsalmente en la cámara

⁴³ RICO ORDÁS, José Manuel; MENÉNDEZ VALDERREY, Juan Luís. Asociación ASTURNATURA. COM. Marzo 2007. En línea. <<http://www.asturnatura.com/articulos/artropodos/branquio.php>>. párrafo 5-6

incubador. En los machos los testículos son pequeños con esperma semitransparente y con un ducto que se abre próximo al ano en el extremo post – abdominal; presentan notorios caracteres sexuales secundarios, tales como la transformación de anténulas, patas y post – abdomen y tiene un órgano copular especial.

La reproducción es de dos tipos: partenogenética y sexual, comportando un ciclo alternando heterogéneo. La población esta formada exclusivamente por hembras que producen por mitosis huevos con número diploide de cromosomas ($2n$) de los cuales se forman nuevas hembras partenogenéticas. Este tipo de reproducción se realiza cuando las condiciones ambientales son muy favorables (sequías, anoxia, bajas temperaturas, etc.). Cuando las condiciones para el desarrollo de estos organismos vuelve a ser favorable, a partir de estos dos huevos se generan dos nuevas hembras diploides, pero con una dotación genético diferente a la de sus madres. Los mecanismos fisiológicos por los cuales se desencadena estos fenómenos todavía son desconocidos.

El crecimiento de la *Daphnias*, es rápido ocurre inmediatamente después de la muda cuando el tegumento permanece aún blando. Una vez que éste se ha endurecido no hay incremento de tamaño hasta después de la siguiente muda.⁴⁴

La tasa de crecimiento es rápida al inicio del ciclo de vida para luego disminuir a niveles muy bajos hacia el final de la vida del mismo. El número de estadios por períodos y su duración es variable dependiendo de la especie. El período de huevo se desarrolla completamente dentro de la cámara de cría.

⁴⁴ GONZALEZ GOMEZ, Op cit., p. 22

2.10. ALGAS

Las algas seleccionadas como alimento para el mantenimiento de los cultivos de *Daphnia*, son algas verdes, pertenecen a la clase Chlorophyta o algas verdes. Este cultivo fue suministrado por la Corporación Autónoma Regional (CAR), las cuales fueron identificadas por la bióloga Clara Inés Ortiz funcionaria de la CAR y corroboradas por el profesor de microbiología de la Universidad de la Salle. Estas se caracterizan por que presentan cloroplastos de color verde, comprenden formas microscópicas unicelulares, filamentosas simples o ramificadas y algunas formas desarrolladas. La mayoría forman parte del plancton y del bentos de agua dulce, las especies marinas son de mayor tamaño, y constituyen en forma secundaria el plancton marino.⁴⁵

En los ensayos de toxicidad se pueden utilizar dos tipos de algas o mezcla de ellas como alimento de los organismos prueba, las cuales se manejaron en esta investigación, estas son:

2.10.1. *Selenastrum Capricornutum*: Alga verde unicelular de tamaño microscópico, en forma de media luna. Su tamaño oscila entre 5 a 6 μ de ancho y 10 a 12 μ de largo. Este género pertenece al orden Chlorococcales, familia Selenastraceae y su clasificación Taxonómica y morfología es (Komarek, et al., 1983; Cronquist, 1982; Fritsh, 1977).⁴⁶

Tabla3: Clasificación Taxonómica de la *Selenastrum Capricornutum*

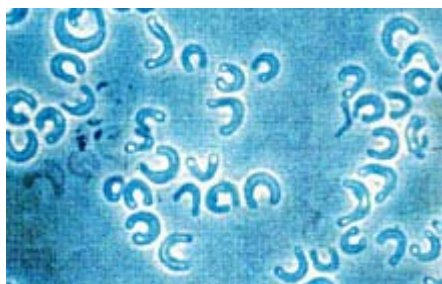
Reino	Plantae
Subreino	Thallobionta (talofitas)
División	Cholorophyta (algas verdes)
Clase	Chlorophyceae
Orden	Chlorococcales
Familia	Selenastraceae
Genero	Selenastrum
Especie	S. capricornutum

Fuente: Estudio de evaluación de toxicidad relativa de sustancias tóxicas en vertimientos y cuerpos receptores. Proyecto CAR – BID – Contrato 298–94.

⁴⁵ ALAPE, Joseph. Op cit, p. 10

⁴⁶ Ibíd. p.11

Figura 3: Morfología de la *Selenastrum Capricornutum*



Fuente: Blaise, C., F. Gagné, N. Chèvre, M. Harwood, K. Lee, J. Lappalainen, B. Chial, G. Persoone et K. Doe. 2004. febrero 2007. En línea <www.qc.ec.gc.ca/CSL/inf/inf062_f.html>

2.10.2. *Scenedesmus quadricauda*: Pertenecen al orden Chlorococcales, familia Coelastraceae. Esta familia se caracteriza por tener individuos cenobiales de 2, 4, 8 o 16 células. Las células pueden tener forma elipsoidal, oblonga o fusiforme que se agrupan en un plano en el eje longitudinal. Algunas veces, las células forman dos hileras alternas donde las células terminales de la fila difieren en forma y ornamentación. Su calificación Taxonomica y morfología es (Komarek, 1983; Cronquist, 1982, 1977):⁴⁷

Tabla 4: Clasificación Taxonómica de la *Scenedesmus Quadricauda*

Reino	Plantae
Subreino	Thallobionta (talofitas)
División	Chlorophyta (algas verdes)
Clase	Chlorophyta
Orden	Chlorococcales
Familia	Coelastraceae
Genero	Scenedesmus
Especie	S. quadricauda

Fuente: Estudio de evaluación de toxicidad relativa de sustancias tóxicas en vertimientos y cuerpos receptores. Proyecto CAR – BID – Contrato 298–94.

⁴⁷ Ibíd. p.12

Figura 4: Morfología de la Scenedesmus quadricauda



Fuente: MORGAN, Mike Microscopy UK Front Page Micscape Magazine Article Library; October 2005 edition of Micscape. Febrero 2007. En línea < www.microscopy-uk.org.uk/.../mmdesmid.html >

2.11. MERCURIO

El metal utilizado para las pruebas de toxicidad fue el mercurio; este es líquido de color plata brillante a temperatura ambiente, buen conductor de la electricidad y relativamente inerte ante el oxígeno y los ácidos; en forma líquida es volátil entre los 20 y 25 grados centígrados; es soluble en líquidos polares y no polares. Se considera como un metal noble y pesado cuyos compuestos son muy tóxicos; forma soluciones llamadas amalgamas con algunos metales como oro, platino, plata, uranio, potasio, sodio, plomo y cobre.⁴⁸ Su mineral más importante es el cinabrio; entre sus propiedades fisicoquímicas el mercurio tiene un número atómico de 80 y un peso atómico de 200.59. A continuación se dan a conocer las características más importantes del mercurio:

⁴⁸ AGUDELO GALLEGO, Luz Marina; ARENGAS CASTILLA, Ángel Isdrúval; SEPÚLVEDA GALLEGO, Luz Elena. El mercurio, sus implicaciones en la salud y en el ambiente. Universidad de Caldas. Caldas; 2006; p. 1

Tabla 5: Características del mercurio

Nombre	Mercurio
Número atómico	80
Valencia	1,2
Estado de oxidación	+2
Electronegatividad	1,9
Radio covalente (Å)	1,49
Radio iónico (Å)	1,10
Radio atómico (Å)	1,57
Configuración electrónica	[Xe]4f ¹⁴ 5d ¹⁰ 6s ²
Primer potencial de ionización (Ev)	10,51
Masa atómica (g/mol)	200,59
Densidad (g/ml)	16,6
Punto de ebullición (°C)	357
Punto de fusión (°C)	-38,4
Descubridor	Los antiguos

Fuente: WIKIPEDIA. Mercurio (elemento). Wikipedia: la enciclopedia libre (En Línea), noviembre. Disponible en Internet :< [http://es.wikipedia.org/wiki/Mercurio_\(elemento\)>](http://es.wikipedia.org/wiki/Mercurio_(elemento)>))

Las principales fuentes y usos de este metal son en las minas (sulfuro de mercurio), en la extracción de metales (tales como oro y plata), en plantas cloro alcalinas en las cuales el mercurio elemental actúa como catalizador en la obtención de cloro y soda, en instrumentos de medición (termómetros, barómetros, manómetros, etc.), en amalgamas dentales entre otros.

Se puede encontrar el mercurio en diversas formas físicas y químicas. Existe en estado elemental (Hg^0), en los estados iónicos (Hg^1 y Hg^2), en los cuales ha perdido 1 y 2 electrones respectivamente.⁴⁹

⁴⁹ WIKIPEDIA. Mercurio (elemento). Wikipedia: la enciclopedia libre (En Línea), noviembre 2006. disponible en Internet :< [http://es.wikipedia.org/wiki/Mercurio_\(elemento\)>](http://es.wikipedia.org/wiki/Mercurio_(elemento)>)

El mercurio no es un elemento esencial para la vida; sin embargo, ha estado presente siempre en la naturaleza en concentraciones a las que los seres vivos están adaptados. Sus fuentes naturales son el vulcanismo, la desgasificación de la corteza terrestre, la erosión y la disolución de los minerales de las rocas debido a la penetración del agua a través de estas por tiempo muy prolongado.⁵⁰

El receptor final del mercurio, termina siendo el ambiente, bien sea por mecanismos físicos, químicos o biológicos; por tal razón se han descrito el ciclo global y el ciclo local de este metal.

2.11.1. Ciclo Global Del Mercurio: El mercurio es un metal de alta presión de vapor, por lo que suele encontrarse en la atmósfera, fundamentalmente, en zonas donde existen depósitos de cinabrio. El mercurio llega a la atmósfera por desgasificación natural de la corteza terrestre y por la actividad volcánica, esta puede estar entre 25.000 y 150.000 toneladas de mercurio por año. La cantidad de mercurio anual que llega a la superficie terrestre a causa de la precipitación pluvial se calcula en 30.000 toneladas, determinadas probablemente por la emisión de gases volcánicos y la evaporación del océano; la escorrentía de mercurio de los ríos con un contenido de mercurio natural inferior a 200 ng/l que representa aproximadamente 5.000 toneladas de mercurio por año. Las fuentes naturales de mercurio pueden dar lugar a una significativa contaminación local, pues las fuentes de agua cercanas a yacimientos de mercurio suelen contener hasta 80 µg/l comparadas con niveles de 0,1 µg/l en las fuentes no contaminadas.⁵¹

En su ciclo global, el mercurio pasa de los continentes -por desgasificación- a los océanos en mercurio gaseoso (Hg^0), por la acción de la lluvia y de la escorrentía, el mercurio se transforma en CH_3Hg , el cual nuevamente es evaporado convirtiéndose en mercurio libre Hg^0 , con lo cual se puede depositar de nuevo en los continentes por acción de los vientos o directamente en los mismos océanos. El comportamiento de este ciclo se representa en la figura 5.

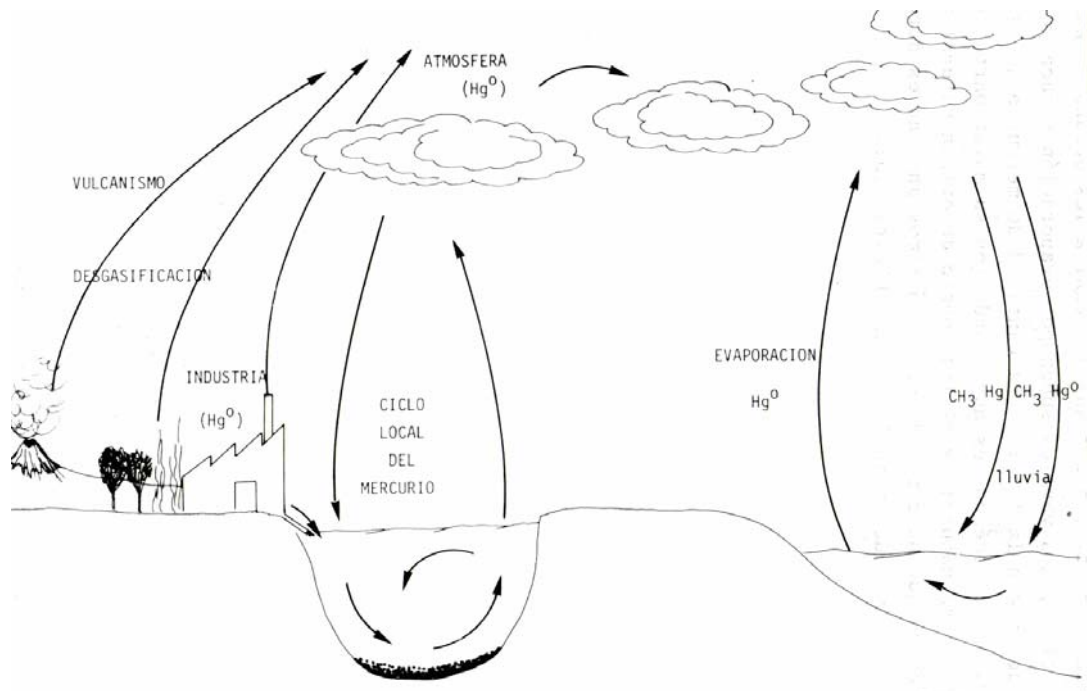
⁵⁰ Ibid., p. 3

⁵¹ AGUDELO GALLEGOS, Op. Cit, p. 3

Se calcula que la cantidad de mercurio en los océanos es de 70 millones de toneladas sobre la base de un volumen total de los océanos de $1,37 \times 10^9$ kilómetros cúbicos, considerando un contenido medio de Hg. de 50 ng/l.⁵²

El mercurio que se encuentra en los océanos es en su mayoría de origen natural encontrándose en grandes cantidades, e incrementándose en los últimos años tanto por fuentes naturales como antropogénicas.⁵³

Figura 5: Ciclo global del mercurio



Fuente: Curso básico de toxicología ambiental. Centro panamericano de ecología humana y salud. Organización panamericana de la salud. ALBERT, Lilia. 1999. p 130

⁵² ALBERT, Lilia. Curso básico de toxicología ambiental. Centro panamericano de ecología humana y salud. Organización panamericana de la salud. 1999. p. 128 – 129

⁵³ *Ibíd.*, p. 130

2.11.2. Ciclo Local Del Mercurio: En el ciclo local, las formas inorgánicas de mercurio (HgO y HgS) se transforman en el medio por reacciones de óxido-reducción. El vapor de mercurio cuando es introducido en un ecosistema acuático y en presencia del oxígeno, este se puede ionizar, oxidar y transformar en Hg^{2+} . Al ionizarse genera una gran variedad de compuestos, así el Hg^{2+} se reduce dando como resultado el Hg metálico, reacción que en condiciones anaerobias es llevado a cabo por bacterias del género *Pseudomonas*.⁵⁴

En aguas continentales o litorales es donde se da a lugar la segunda reacción, convirtiéndose el Hg^{2+} en CH_3Hg (metilmercurio) y en $\text{CH}_3\text{-Hg-CH}_3$ (dimetilmercurio); esta metilación se da por las vías anaerobia y aerobia. La primera se lleva a cabo por bacterias metanogénicas en un ambiente moderadamente reductor; ya que en este medio reductor también se genera el sulfuro de mercurio la formación del metilmercurio es escasa. En la segunda al combinarse con el oxígeno se forma sulfatos y sulfitos dejando al Hg^{2+} en forma soluble.⁵⁵

La metilación del mercurio puede ocurrir en forma anaerobia y aerobia en los sedimentos suspendidos en el agua. En la forma anaerobia, el dimetilmercurio generado es muy volátil e insoluble en agua, por lo cual pasa nuevamente a la atmósfera, y se devuelve por medio de la lluvia; la cual si es ácida el dimetilmercurio se convierte en monometilmercurio, completándose el ciclo.

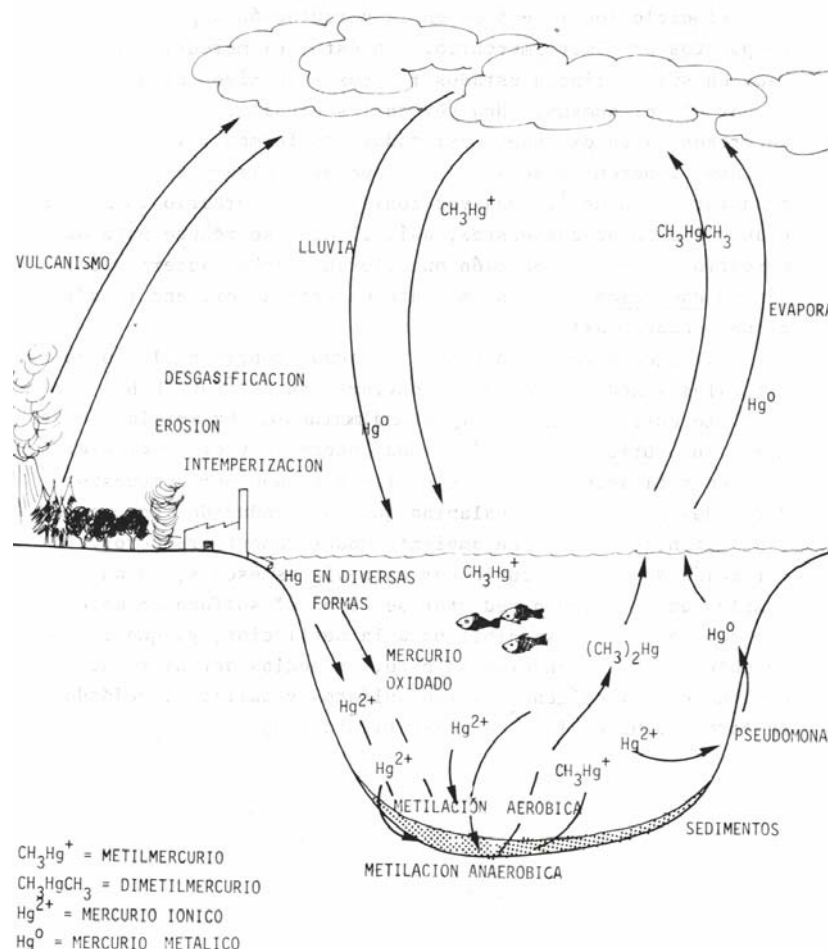
El metilmercurio libre en el agua, atraviesa las membranas biológicas con facilidad, por lo que se incorpora rápidamente a las cadenas tróficas acuáticas, siendo muy peligroso para los seres vivos. El proceder de este ciclo se representa en la figura 6.⁵⁶

⁵⁴ Ibid., p 131

⁵⁵ Ibid., p 132

⁵⁶ Ibid., p 133

Figura 6: Ciclo Local del Mercurio y Metilmercurio



Fuente: Curso básico de toxicología ambiental. p 132

El aspecto más importante de la contaminación por mercurio en el medio ambiente lo constituyen las transformaciones que sufre este elemento en los sedimentos que se encuentran en los ecosistemas acuáticos; en este sentido se sabe que las formas inorgánicas son metiladas a metil o dimetil mercurio con la participación de ciertos microorganismos anaerobios presentes en el fango. Estas formas metiladas son mucho más tóxicas que las formas inorgánicas de partida. Un hecho demostrado es que, a medida que se asciende en la cadena trófica o alimenticia, los niveles de contaminación mercurial son mayores, así, los peces depredadores acumulan más mercurio que aquellos que están en niveles más bajos de la cadena alimenticia.⁵⁷

⁵⁷ AGUDELO GALLEGU, Op. Cit, p. 4

2.11.3. Eliminación del Mercurio: Las vías de eliminación de los compuestos del mercurio son principalmente a través de heces y orina. En el caso del metilmercurio, la eliminación ocurre principalmente por vía fecal y, solo si la concentración es elevada o la exposición prolongada, predomina la vía urinaria; otras vías son mediante las secreciones y excreciones de leche, secreciones genitales, cabello, uñas y sudor.

El periodo de semi -eliminación biológica en cada organismo varia, como se muestran continuación en algunos ejemplos:⁵⁸

Tabla 6: Periodo de Semieliminación Biológica del Mercurio

PERIODO DE ELIMINACIÓN BIOLÓGICA DEL METILMERCURIO	
ORGANISMOS	DIAS
RATON	7
HUMANO	70
FOCA	500
PECES Y CRUSTACEOS	1000

Fuente: Curso básico de toxicología ambiental. p. 137

2.11.4. Efecto Ecotoxicológico Agudo Del Mercurio: El mercurio al encontrarse entre los metales pesados, posee en el agua una alta capacidad para interactuar con los organismos vivos, por ello tiene la facultad de ser absorbido rápidamente por la biota acuática. Aumentando su concentración y acumulación en el transcurso de la cadena trófica.

Los factores que determina el riesgo de este metal, depende directamente de:

- Tipo de exposición al mercurio
- Especie de mercurio presente, ya que estas varían en grado de toxicidad
- Factores geoquímicos y ecológicos que influyen en la forma de desplazamiento del metal, y los cambios que pueda presentar en este proceso.

2.11.5. Acumulación del Mercurio en los Organismos: La presencia del mercurio en el agua se ha convertido en una preocupación desde que se descubrió que el mercurio orgánico se acumula en los peces.

⁵⁸ ALBERT, Op.cit., p. 137

La capacidad de acumulación del mercurio en los organismos es muy alta, así como su ascenso por la cadena trófica (alimentaria). El mercurio inorgánico proviene de los residuos generados por algunas actividades humanas como las minas de oro que vierten a los cuerpos de agua, y este se transforma en mercurio orgánico mediante un proceso lento. Al depositarse en los sedimentos que se encuentran en el fondo de los cuerpos de agua las bacterias reductoras de sulfato ($\text{SO}_4^{2-} - \text{S}^{2-}$), que se encuentran presentes lo absorben y lo transforman en metilmercurio (CH_3Hg), que es a su vez la forma más tóxica de este metal. Este metilmercurio (CH_3Hg) es absorbido por el fitoplancton y su vez capturado por el plancton (organismos microscópicos), siendo este el alimento de los peces más pequeños y comenzando así a ascender en la cadena alimenticia hasta llegar al hombre, presentando las concentraciones más altas, cumpliéndose así el proceso de biomagnificación, convirtiéndose así en una amenaza real para los ecosistemas acuáticos; su eliminación es larga y lenta (2 años aprox.). La cadena trófica acuática llega a tener más niveles que la terrestre por lo que la biomagnificación alcanza valores mayores.

El proceso de bioacumulación y biomagnificación es muy complejo, en el cual intervienen ciclos biogeoquímicos e interacciones ecológicas complejas; por consiguiente es difícil predecir el grado de biomagnificación del mercurio en peces de diferentes sitios.

El metilmercurio (CH_3Hg) daña al organismo de las siguientes maneras:

- Afecta al sistema inmunológico
- Altera los sistemas genéticos y enzimáticos
- Daña el sistema nervioso: coordinación, sentidos del tacto, gusto, y visión.
- Induce un desarrollo anormal de los embriones (efectos teratogénicos, desarrollo anormales de vegetales o animales); los embriones son 5 a 10 veces más sensibles a los efectos del mercurio que un ser adulto. ⁵⁹

⁵⁹ SALDAÑA, Mendioroz. El mercurio. Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC. Cantoblanco. Madrid 2000. p.49

3. INDUSTRIA EVALUADA

Para la determinación de la concentración letal media (CL_{48}^{50}) del vertimiento industrial, se contó con la colaboración de la industria REFISAL, BRINSA S. A.; que se encuentra ubicada en el kilómetro 6 vía Cajicá y Zipaquirá; esta industria está compuesta por tres plantas de producción y dos de servicios:

- Planta de Sal: Cuenta con un proceso de purificación de la salmuera que se produce partiendo de la sal roca, que luego es cristalizada al vacío, esta planta utiliza el proceso de molienda o trituración en seco.
- Planta de Cloro – Soda: Esta planta es de tecnología Italiana, para la producción de derivados de la sal, la cual consiste en un proceso de electrólisis que da un rompimiento de las moléculas de cloro de sodio (sal) para obtener cloro gaseoso y soda cáustica, las cuales a su vez son materia prima para la fabricación de los demás derivados como el ácido clorhídrico, hipoclorito de sodio y el cloruro de calcio.
- Planta de Aseo: Produce toda la línea Blancox, blanqueadores y lavalozas.
- Plantas de servicio: La central térmica que genera el 40% de la energía y el 100% del vapor requerido en la empresa y la planta de agua que produce tres clases de agua (de producción, de consumo humano y desmineralizada para utilizar en las calderas)

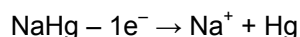
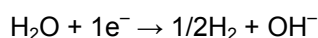
También cuenta con una planta de tratamiento de aguas residuales, una planta de tratamiento de aguas industriales y con una planta de tratamiento de lodos de purificación salmuera que consta de un filtro prensa, con tanques de adecuación de lodos, tanques colectores de recirculación total del líquido filtrado al sistema de purificación de salmuera, logrando así compactar los lodos y poder disponer de ellos en la nivelación de las vías internas y recuperar salmuera para regresarla al proceso.

El primer paso en este proceso industrial es la fabricación de la salmuera por dilución de sal en agua, decantación y filtración de las impurezas compuestas por sulfato de calcio,



En este proceso se libera el gas cloro en los ánodos, y el ión sodio metálico forma con el cátodo una amalgama de Na – Hg. La alimentación de la salmuera y el mercurio es continua y constante, asegurando un cubrimiento total al piso de la celda.

El cloro gaseoso se acumula sobre un dispositivo del ánodo y se descarga al proceso de purificación; la amalgama de sodio y la salmuera pobre, son retiradas por la cabecera de salida de la celda; la salmuera pobre va a la sección de decloración donde se le retira el cloro que lleva y desde allí es bombeado a la sección de saturación para su reciclaje. La amalgama de sodio es conducida por gravedad al reactor o desamalgamador el cual consiste en un reactor o torre vertical que contiene una canasta de acero llena de grafito activado, en donde la amalgama de sodio que proviene de la celda se distribuye uniformemente sobre el grafito, este que es conductor eléctrico forma el cátodo al entrar en contacto con el mercurio y la amalgama que se va a descomponer se convierte en ánodo reaccionando el sodio con agua desionizada (a contracorriente) para formar soda cáustica, en este, se libera hidrógeno y mercurio, produciéndose las siguientes reacciones:



El mercurio sale por el fondo del desamalgamador, y fluye por gravedad al tanque de recirculación para cerrar el circuito, allí se encuentra una bomba vertical tipo centrífuga que impulsa el mercurio de nuevo a la celda electrolítica. La soda cáustica y el hidrogeno salen a su respectivo colector por la parte superior.⁶⁰

El tanque de recirculación y las cabeceras de entrada y salida de la celda se mantienen con un sello hidráulico que asegura la no evaporación del mercurio. El hidrógeno producido en el desamalgamador es refrigerado en dos intercambiadores de calor que operan en paralelo para condensar mercurio presente en el; esta masa desmercurizante es enviada a la planta de desmercurización para recuperarla al proceso; el hidrogeno limpio es almacenado en un gasómetro para su posterior transformación en los hornos de ácido clorhídrico.

⁶⁰ CRUZ RODRIGUEZ, Blanca Nubia; MATEUS BERMUDEZ, María Fidelía. Manual de Química Aplicada a la Industria - Fase 1: química Inorgánica. Proceso – electrolisis del Cloruro de sodio. Universidad de la Salle; facultad de ciencias de la educación. Departamento de Química y Biología. 1993, pagina 55-62

La solución de soda cáustica rebosa cerca de la parte superior del desamalgamador y fluye por gravedad al colector de soda cáustica, esta se almacena en tanques de almacenamiento, de donde es bombeada a la sección de despachos o para las secciones de plata de sal y purificación de salmuera e hipocloritos.

El cloro acumulado en el dispositivo del ánodo sale de la celda por medio de compresores y pasa a una torre de lavado. El cloro húmedo se seca con ácido sulfúrico al 98% y luego pasa al licuefactor. El cloro líquido obtenido se vende como tal o se destina para la producción de hipoclorito o ácido clorhídrico.

En las cabeceras de entrada y salida de las celdas se les adiciona agua con el fin de mantener la temperatura normal de operación de mercurio. El agua utilizada en la cabecera de entrada sale de la celda para descender por gravedad hasta el tanque de recirculación del mercurio, de donde sale para ser conducida por el colector hasta el tanque de recirculación que se encuentra fuera del proceso productivo, de este tanque, el agua es succionada por una bomba que la impulsa hasta el intercambiador de calor donde se enfría y vuelve a cabeza de proceso (cabeza de entrada de la celda)⁶¹

La adición de agua al desamalgamador se controla de acuerdo a los análisis de calidad de soda cáustica y el flujo varía de acuerdo al amperaje de operación de las celdas. De igual manera, estos, tienen un dispositivo de ajuste interno para comprimir el grafito dentro de la canasta en razón al desgaste del mismo. La temperatura de operación es de 80°C, por ello se refrigera con la misma agua de las cabeceras de entrada a través de líneas de enfriamiento.

Este proceso productivo se presenta en el anexo A.

En la actualidad REFISAL tiene una planta desmercurizadora con tecnología AKZO (Holanda), especialmente diseñada para este proceso, está dotada de tres columnas desmercurizadoras con resinas de intercambio iónico, con capacidad de 15 m³/h, obtener un efluente con máximo 5 ppb de mercurio.

⁶¹ Ibíd. , pág. 63-64

4. METODOLOGIA

En este capítulo se describe la forma como se realizó este proyecto de investigación: diseño experimental, preparación del agua reconstituida y medio Bristol, captura de los individuos para el ensayo, aclimatación de organismos prueba, mantenimiento del cultivo, pruebas de sensibilidad del cultivo, pruebas de toxicidad preliminar y definitiva, las replicas de los ensayos, expresión y presentación de resultados.

Está compuesto por las siguientes fases:

4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

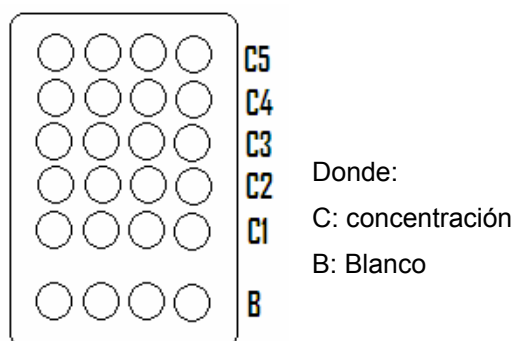
En esta investigación se controlaron y midieron las siguientes variables:

- Variable independiente: La variable que se manejó en las pruebas de toxicidad fue la concentración de la sustancia prueba o de interés (cloruro de mercurio) o el porcentaje de dilución del vertimiento. Buscando establecer un efecto sobre una determinada población en donde todas las unidades experimentales son homogéneas
- Variables dependientes: La variable que se manejó fue la obtención de la concentración letal media del mercurio en un tiempo de 48 horas de exposición por el ciclo de vida del organismo prueba (80-90 días) (CL_{48}^{50}), dado que este resultado depende de los efectos que el ión tóxico del mercurio le ocasiona a los organismo prueba.
- Constantes: Permanecieron constantes, el número de organismo utilizados (20 neonatos de *Daphnia Pulex* por cada concentración), tiempo de exposición al tóxico (48 horas) y los parámetros fisicoquímicos requeridos durante el mantenimiento de los organismos y durante las pruebas toxicológicas (pH, dureza, temperatura y oxígeno disuelto). Estos parámetros fueron controlados con el fin de cumplir con los protocolos internacionales validados para este tipo de ensayos

(CETESB). Estos protocolos fueron suministrados por el profesor Pedro Miguel Escobar Malaver pero no fotocopiados por su alto valor ya que cada uno cuesta entre 20 y 40 dólares y a partir de esta información validar y realizar los protocolos del laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria.

En este diseño inicialmente se realizaron pruebas preliminares, utilizando rangos entre concentraciones 100 y 1 ppm del mercurio. Posteriormente con los datos de los rangos obtenidos en el ensayo preliminar, se realizaron las pruebas definitivas, utilizando cinco (5) organismos por tubo de ensayo, basándonos en los protocolos establecidos por CETESB, baterías de cinco concentraciones más el control y cuatro réplicas por ensayo con un total de 24 tubos de ensayo por prueba toxicológica y 120 organismos por montaje y 20 organismos por concentración correspondiendo cada uno al 5%. Como se muestra a continuación:

Figura 8: Montaje De Pruebas De Toxicidad



Fuente: Autoras 2007

Una vez obtenidos los resultados de mortalidad se realizó el análisis Probit para la obtención de la respectiva CL_{48}^{50} , utilizando el protocolo LB06 “Análisis De Regresión y Análisis Probit” donde se dan a conocer los pasos a seguir para la obtención de la misma; la información obtenida a partir del experimento diseñado estadísticamente, fue analizado por el método conocido como Análisis de Varianza (ANOVA). Se trata de una técnica que consiste en aislar y estimar las varianzas separadas que contribuyen a la varianza total de un experimento; es entonces posible, ensayar si ciertos factores producen resultados significativos diferentes de las variables ensayadas. En nuestro caso, se realizó para determinar si existían o no, diferencias significativas en las

mortalidades de los diferentes tratamientos, para ello se desarrollo el protocolo LB07 “*Análisis de Varianza*”, donde se describe el procedimiento para la realización del análisis.

Estos protocolos hacen parte del proyecto de investigación de los profesores Pedro Miguel Escobar Malaver, Yanneth Parra y Rubén Darío Londoño y se encuentran en los archivos del laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, para su consulta.

4.2. PREPARACIÓN DEL AGUA RECONSTITUÍDA

El agua reconstituída fue realizada según metodología CETESB, protocolo L5.017 y Escobar Malaver⁶² con el fin simular las condiciones de sales disueltas encontradas en el hábitat natural de este tipo de organismos, por medio de la dureza en un intervalo que debe estar entre 40 – 48 mg/l CaCO_3 , preparada a partir de agua desionizada grado analítico. Para ello se realizaron las soluciones de los reactivos con las siguientes concentraciones 10 g/l de NaHCO_3 , 13.5 g/l de CaCl_2 , 10g/l KCl y 20,5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Esta se prepara con los siguientes volúmenes de las soluciones:

⁶² ESCOBAR MALAVER, Pedro Miguel. Implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando *Daphnia Pulex* para la evaluación de muestras ambientales. Santafé de Bogotá; 1997.p . 57

Tabla 7. Preparación de Agua Reconstituída

No.	Reactivo	Cantidad a preparar	Mililitros (ml) adicionados	
			A partir de dureza cero (0 mg/l)	A partir de dureza veinte (20 mg./l)
1	NaHCO ₃	20	100	56
	(8 ml)*			
2	CaCl ₂	20	75	42
	(6 ml)*			
3	KCl	20	38	22
	(3 ml)*			
4	MgSO ₄	20	30	16
	(2.5 ml)*			
		Rango pH	7.3 – 7.5	7.8 - 8

* Cantidad necesaria para aumentar la dureza en 5 mg/l

Fuente: Compañía de Tecnología y Saneamiento Ambiental de Sao Paulo, Brasil. CETESB, Protocolo L5.017/ 1992

Una vez preparada el agua reconstituída, se oxigenó por un período mínimo de 48 horas, antes de adicionar los organismos prueba, se realizaron las pruebas de viabilidad. La concentración de oxígeno disuelto debe permanecer por encima de los 6 mg/l y el pH en un rango de 7.3-7.5. De igual manera se estableció un control de: pH, dureza y oxígeno disuelto.

Para establecer este control, cada vez que se preparaba el agua reconstituída se procedía a determinar la dureza, el pH, el Oxígeno Disuelto y la temperatura, con el fin que cumplan con estos intervalos: pH de 7.3 – 7.5, dureza 40 - 48 mg/l CaCO₃, oxígeno disuelto mayor a 6 mg/l. y temperatura entre 20 ± 2°C . Como se muestra a continuación:

Tabla 8. Parámetros de control a evaluar en el agua reconstituida.

Parámetros de Control	Método según el Standard métodos	Rango	Rango Ideal
Dureza	2340 C Titulométrico EDTA	40 – 48 mg/l	45 mg/l
Oxígeno Disuelto	4500-0 G. Electrodo de membrana.	5 – 7 mg/l	6 mg/l
pH	4500-H ⁺ B Electrométrico.	7.3 – 7.5	7.4
Temperatura	2550 B Laboratorio y de campo.	18 – 22 ° C	20 °C

Fuente: Autoras 2007

Para ello se desarrollo el protocolo LB01 “*Preparación del Agua Reconstituida*”, en el cual, se describe la metodología que se debe realizar para preparar el agua reconstituida para el mantenimiento del cultivo y preparación de soluciones para las pruebas de toxicidad Este protocolo hace parte del proyecto de investigación de los profesores Pedro Miguel Escobar Malaver, Yanneth Parra y Rubén Darío Londoño y se encuentra en los archivos del laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, para su consulta.

Para determinar los efectos que generan la calidad del agua reconstituida preparada, sobre los organismos prueba, se realizó un ensayo de viabilidad, que consiste en exponer algunos organismos en el agua reconstituida por un tiempo de 24 horas, determinando el porcentaje de mortalidad que debe ser menor al 10%, si se supera este porcentaje se descarta el agua reconstituida y se procederá a preparar una nueva con las anteriores características.

4.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CENTRIFUGACIÓN DE ALGAS VERDES *Selenastrum Capricornutum*, *Scenedesmus Quadricauda*

Hay diferentes medios para cultivar algas verdes en el laboratorio. El más utilizado es el medio Bristol; la preparación de este se realizó según la metodología Dutka (1989), con el fin de multiplicar las algas *Selenastrum Capricornutum*, *Scenedesmus Quadricauda*, en condiciones estandarizadas por medio de la fotosíntesis, este incremento se realizó, con unas soluciones de macro y micro – nutrientes. Como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Preparación del medio Bristol

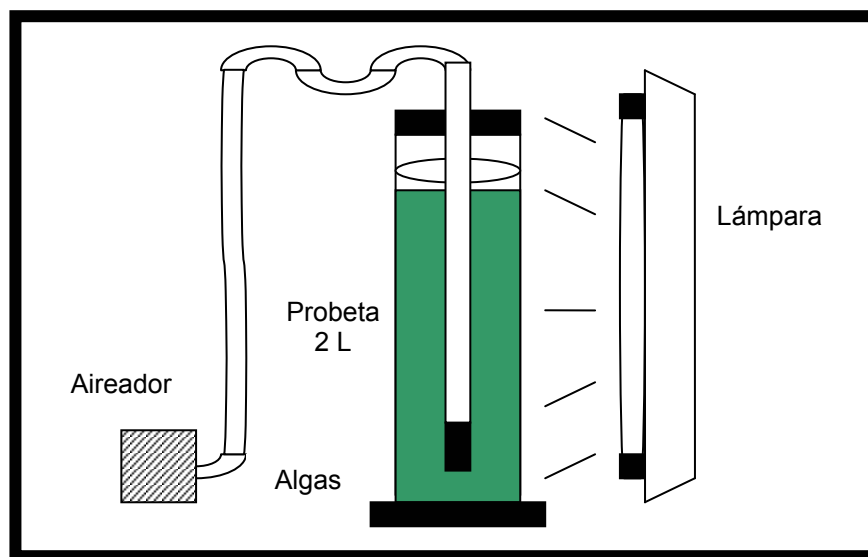
No.	COMPUESTO	STOCK	ml de Stock para 1 litro de agua destilada
1	NaNO ₃	25.0 gr./l	10
2	CaCl ₂ .2H ₂ O	2.5 gr./l	10
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	7.5 gr./l	10
4	K ₂ HPO ₄	7.5 gr./l	10
5	NaCl	2.5 gr./l	10
6	KH ₂ PO ₄	17.5 gr./l	10
7	KOH	15.5 gr. / 500 ml	1
	EDTA	25.0 gr. / 500 ml	
8	FeSO ₄ . 7H ₂ O	2.49 gr. / 500 ml	1
	H ₂ SO ₄	0.05 ml. / 500 ml	
9	H ₃ BO ₃	5.71 gr. / 500 ml	1
SOLUCION DE ELEMENTOS TRAZA			
10	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	4.41 gr. / 500 ml	1 ml del stock combinado
11	MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.72 gr. / 500 ml	
12	MoO ₃	0.355 gr. / 500 ml	
13	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.785 gr. / 500 ml	
14	Co (NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0.245 gr. / 500 ml	
15	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.174 gr. / 500 ml	

Fuente: ESCOBAR MALAVER, Pedro Miguel. Determinación de la toxicidad agua de los detergentes mediante sistemas estáticos, utilizando *Daphnia Magna*. Universidad de la Salle 1994.

Se deben adicionar los volúmenes indicados de macronutrientes, mas un (1) ml de los elementos traza y completar el volumen de la probeta que se desee preparar.

Para ello se manejo el montaje que se muestra en la figura 7, por un período de 15 días, con ayuda de una lámpara luminiscente prendida las 24 horas y oxigenadas para su constante movimiento

Figura 9: Montaje medio Bristol para algas verdes



Fuente: Las Autoras

Para ello, se elaboró el protocolo LB02 “Preparación del medio Bristol y centrifugación de algas *Selenastrum Capricornutum*, *Scenedesmus Quadricauda*”, donde se describe la metodología para la realización del medio Bristol. Este protocolo hace parte del proyecto de investigación de los profesores Pedro Miguel Escobar Malaver, Yanneth Parra y Rubén Darío Londoño y se encuentra en los archivos del laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, para su consulta.

4.4. ALIMENTACIÓN DE ORGANISMOS PRUEBA

El cultivo de *Daphnia Pulex* se alimentó con un concentrado de algas verdes compuesta por una mezcla de *Selenastrum Capricornutum*, *Scenedesmus Quadricauda*, las cuales fueron cultivadas en el laboratorio mediante el montaje del medio Bristol descrito; teniéndose en cuenta que cada organismo en su mantenimiento, necesita una dosis óptima la cual es 3.0×10^6 células por *Daphnia Pulex* /día., según metodología CETESB y Universidad Nacional

La cantidad de alimento necesaria fue calculada con ayuda de la cámara Neubauer, la cual, se utiliza para realizar el conteo de células, en una cantidad fija de líquido. La

profundidad de la cámara es de 0.1 mm. La cuadrícula de recuento muestra 9 cuadros grandes, cada uno de un (1) mm²; los cuatro cuadrados grandes de las esquinas señalados con una L están en 16 cuadrados con aristas de 0.25 mm. El cuadrado grande central está dividido en 25 cuadrados medianos, para la realización de este procedimiento se estableció el protocolo LB03 *“Cuento de Algas con la Cámara Neubauer*. Donde se describe los pasos a seguir para el desarrollo del mismo. Este protocolo hace parte del proyecto de investigación de los profesores Pedro Miguel Escobar Malaver, Yanneth Parra y Rubén Darío Londoño y se encuentra en los archivos del laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, para su consulta.

En esta fase se determinó según protocolos del convenio UN-CAR del año 1994 que la frecuencia de alimentación son los días lunes, miércoles y viernes de cada semana.

Una vez, preparada el agua reconstituída, y su respectivo alimento (algas verdes) se procedió a la captura y aclimatación de los organismos tal como se describe a continuación.

4.5. CAPTURA DE LOS INDIVIDUOS PARA EL ENSAYO

Se debe seleccionar un cuerpo de agua, en el cual se tenga la certeza que existe la especie de cladóceros a utilizar en las pruebas de toxicidad, los individuos que se capturen, deben ser transportados al laboratorio en recipientes plásticos que contengan agua del ambiente, con aireación si la distancia entre el sitio de recolección y el laboratorio es grande.

La captura de estos se debe realizar a 30 centímetros de profundidad en el cuerpo de agua, con ayuda de una red de plancton, la cual se debe desplazar por el cuerpo de agua en un lapso de 10 minutos, los organismos capturados son depositados en un recipiente plástico (botellas no retornables), el cual debe estar libre de cualquier sustancia que pueda alterar el medio donde esté el organismo, para ello se debe realizar un enjuague con agua desionizada y purga con agua del ambiente. Una vez que se llega al laboratorio

los organismos son separados en diferentes recipientes con el fin de obtener e identificar los organismos a utilizar en las diferentes pruebas de toxicidad.

4.6. ACLIMATACIÓN DE LOS ORGANISMOS PRUEBA

Una vez separados e identificados en el laboratorio los organismos se introducen en cristalizadores de vidrio de 70 mm con agua del ambiente natural. Después de 24 horas se debe estabilizar las condiciones fisicoquímicas del agua reconstituida con la del ambiente, con el fin de que se adapten al agua reconstituída anteriormente preparada cuya dureza se encuentra entre 40 a 48 mg/l de CaCO_3 , se llevaron los organismos en cristalizadores (recipientes de vidrio) de 70mm con 50% de agua de agua natural y reconstituída; 48 horas después se pasan a cristalizadores con el 100% de agua reconstituída completándose su aclimatación a esta condiciones de iniciándose la frecuencia de alimentación.

4.7. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO DE LOS ORGANISMOS *Daphnia Pulex*

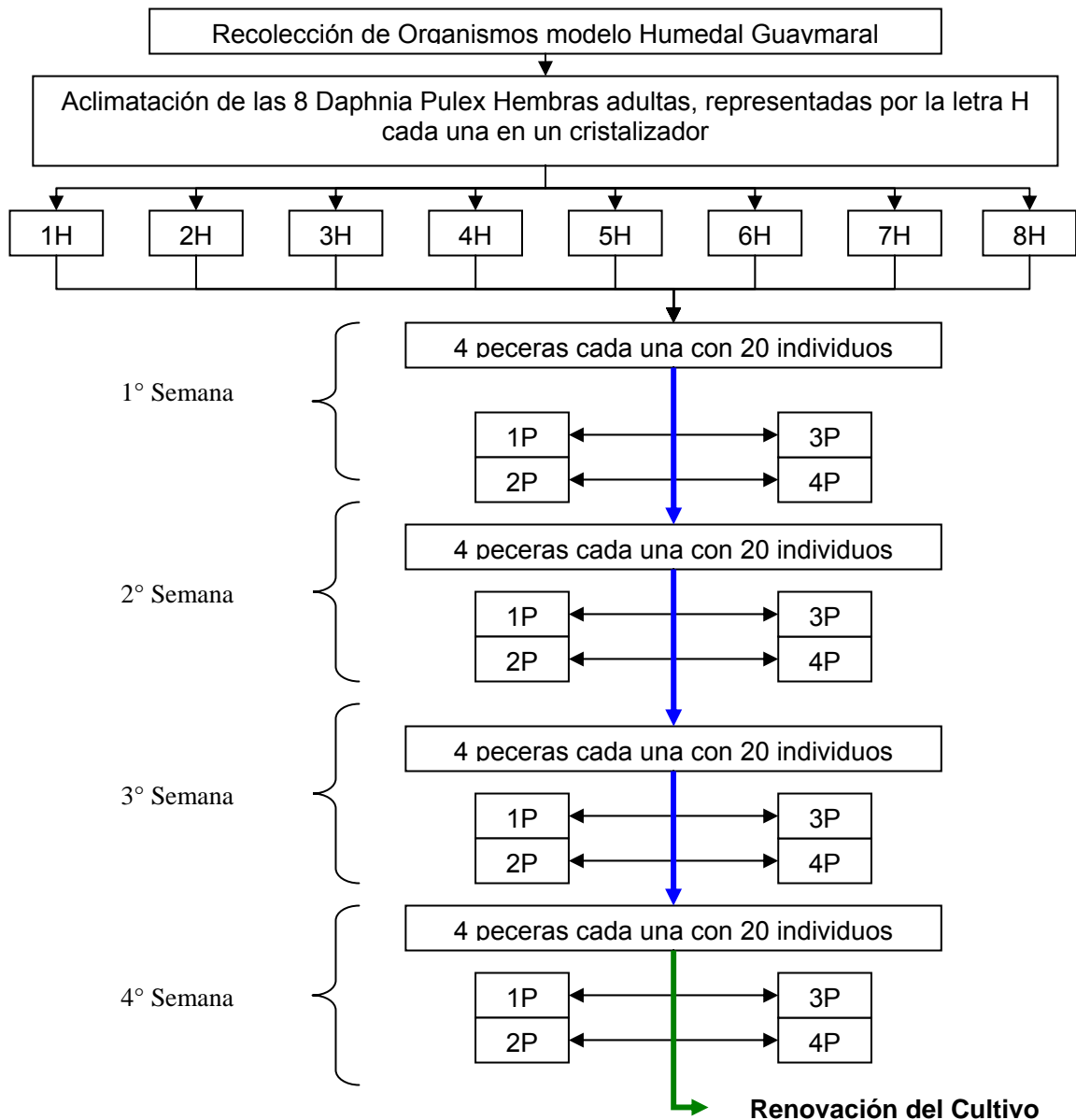
El mantenimiento del cultivo de los organismos *Daphnia Pulex*, se realizó según la metodología CETESB (L5.018), para conservar un cultivo masivo de 4 edades. Como se muestra a continuación en la figura 10.

Los cultivos de *Daphnia Pulex* se mantuvieron en peceras de 2 litros de agua reconstituida con 20 individuos en cada una de ellas, manejando la relación de 1/100 (1 individuo por cada 100ml de agua), con el fin de establecer el escenario óptimo para el crecimiento, alimentación y reproducción de los individuos.

El cultivo se renovaba de acuerdo al ciclo reproductivo de la *Daphnia Pulex*, conservándose en las etapas óptimas de reproducción, manteniéndolas en peceras separados por edad desde 0 – 1 semana hasta cuatro semanas; eliminando los organismos mayores a cinco semanas y renovando el cultivo con neonatos que se obtuvieron ese día. Esto se controlaba según la fecha de separación que cada pecera tenía. El cultivo se manejo en 4 peceras por semana obteniendo 16 peceras en el mes con un total de 320 organismos cultivados. Hasta obtener organismos de quinta generación como se muestra en la figura 10 y en el anexo A del protocolo LB004

Mantenimiento del Cultivo Este protocolo hace parte del proyecto de investigación de los profesores Pedro Miguel Escobar Malaver, Yanneth Parra y Rubén Darío Londoño y se encuentra en los archivos del laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, para su consulta.

Figura 10. Separación y mantenimiento de organismos prueba



Fuente: Autoras 2007

Se verificó diariamente la temperatura ambiente, corroborando que se encontrara en un promedio de $20 \pm 2^{\circ}\text{C.}$, reportándose el promedio semanal en el formato que se muestra en la tabla 7.

Tabla 10: Registro de la Temperatura en el área de mantenimiento del cultivo

Fecha	Promedio semanal de Temperatura
Promedio	

Fuente: Autoras

4.7.1. Separación de organismos.

La separación de los organismos se realizó todos los días, con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico de 3 mililitros, con ella se extraían los neonatos de 6 a 24 horas de nacidos.

La obtención de neonatos se utilizaba para la nueva generación de los cultivos, pruebas de viabilidad, pruebas de sensibilidad y, realización de las pruebas preliminares y definitivas de toxicidad.

4.8. FASE PRUEBAS DE TOXICIDAD

A continuación se presenta la ejecución de las pruebas de toxicidad utilizando neonatos de 6 a 24 horas de nacidas de *Daphnia Pulex*, en esta se da a conocer la preparación de las soluciones, montajes de las pruebas de toxicidad y realización de las pruebas de sensibilidad con dicromato de potasio y las pruebas con sustancias puras y vertimientos de mercurio.

4.8.1. Preparación de soluciones

Las soluciones para todas las pruebas de toxicidad fueron preparadas con agua reconstituída, cada una con un volumen de 500 ml, las cuales se mantuvieron preservadas en refrigerador por un tiempo no mayor a seis (6) meses.

Antes de la realización de los ensayos de toxicidad, las soluciones preparadas eran aclimatadas durante un período de 3 horas, para evitar la mortandad de los organismos prueba debido a un cambio de temperatura.

4.8.2. Montaje de las pruebas de toxicidad (bioensayos)

Como material para la batería de ensayo, se utilizaron 24 tubos de ensayo en su respectiva gradilla, distribuidos en cinco (5) concentraciones de las respectivas soluciones (para las pruebas de sensibilidad ($K_2Cr_2O_7$), sustancia pura (mercurio) y muestra ambiental (vertimiento que contiene trazas de mercurio)), un control y cuatro réplicas por cada concentración. Teniendo lista la batería de ensayos se procedió adicionando 10 mililitros de las concentraciones a evaluar en cada tubo y sus respectivos controles.

La prueba se inició en el momento de adicionar un total de 20 organismos por concentración distribuidos en un número de cinco (5) neonatos en cada uno de los tubos de ensayo de las cuatro replicas, utilizándose un total de 120 organismos por batería de ensayo. La batería de ensayo se cubre totalmente con un plástico negro, y se guarda en el área de mantenimiento de cultivos a una temperatura de 20 ± 2 °C por un periodo de 48 horas. Al término de las 48 horas se revisó, con ayuda de una lámpara con lupa, la lectura de los organismos muertos en cada tubo, reportando el número de ellos en el registro LB 001 “Registro de resultados por muestra analizada”. Protocolo LB 005 *Pruebas de Toxicidad*. Este protocolo hace parte del proyecto de investigación de los profesores Pedro Miguel Escobar Malaver, Yanneth Parra y Rubén Darío Londoño y se encuentra en los archivos del laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, para su consulta.

4.8.3. Pruebas de toxicidad de sensibilidad con el tóxico de referencia dicromato de potasio

Se expusieron neonatos de *Daphnia Pulex*, de 24 horas de nacidos a diferentes concentraciones de dicromato de potasio y se determinó la CL_{48}^{50} que generaron la muerte del 50% de los organismos expuestos en un período de 48 horas, esto se debe al ciclo de vida de la *Daphnia Pulex*.

Se prepararon cinco concentraciones (1, 0.7, 0.5, 0.3 y 0.1 ppm) y un blanco (agua reconstituida), cada una de ellas por cuadruplicado.

Las pruebas se llevaron a cabo en dos etapas: pruebas preliminares, en las que se empleo un amplio rango de concentraciones con el fin de establecer el 0 y 100% de mortalidad del tóxico de referencia dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) las concentraciones utilizadas fueron 2, 1.5, 1, 0.5 0.1 ppm sobre los organismos; y pruebas definitivas utilizando los rangos seleccionados de acuerdo con los resultados de los ensayos preliminares, con esto se obtiene la concentración letal media (CL_{48}^{50}).

Esta tiene el propósito de garantizar no solo la confiabilidad de los datos obtenidos de las pruebas con otros tóxicos, en relación con la capacidad de respuesta de los organismos de prueba, sino el estado fisiológico del cultivo.

Este paso se ejecutó utilizando la metodología descrita en el protocolo LB05 “*Pruebas de Toxicidad*” obteniendo así la carta de control. Este protocolo hace parte del proyecto de investigación de los profesores Pedro Miguel Escobar Malaver, Yanneth Parra y Rubén Darío Londoño y se encuentra en los archivos del laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, para su consulta.

4.8.4. Pruebas preliminares de toxicidad con cloruro de mercurio

Se expusieron neonatos de *Daphnia Pulex*, de 24 horas de nacido a soluciones de diferentes concentraciones de la sustancia pura del ión tóxico de mercurio, la cual, fue preparada a partir de la sal metálica del cloruro de mercurio (HgCl_2) a una concentración de 1000 mg/l, todas las concentraciones se registraron en concentraciones nominales del ión mercurio. Para determinar las concentraciones preliminares se tomó como referencia la bibliografía de la legislación nacional (0.01 ppm) e internacional (0.02ppm).

Se prepararon cinco concentraciones (0.15, 0.1, 0.05, 0.01 y 0.001 ppm) y un blanco (agua reconstituida), cada una de ellas por cuadruplicado. Obteniendo el 100% de mortalidad en todas las concentraciones, por ello se procedió a disminuir las concentraciones a 0.02, 0.015, 0.01, 0.005 y 0.001 $\mu\text{g/l}$, obteniendo nuevamente el 100% de mortalidad, se procedió a disminuir las concentraciones hasta 0.15, 0.01, 0.005, 0.001 y 0.0005 $\mu\text{g/l}$ logrando las concentraciones a utilizar en las pruebas definitivas de mercurio.

Esta fase se desarrollo mediante la metodología descrita en el protocolo LB05 “*Pruebas de Toxicidad*” obteniendo el rango de concentraciones a utilizar en las pruebas definitivas. Este protocolo hace parte del proyecto de investigación de los profesores Pedro Miguel Escobar Malaver, Yanneth Parra y Rubén Darío Londoño y se encuentra en los archivos del laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, para su consulta.

4.8.5. Pruebas definitivas con cloruro de mercurio

Las pruebas definitivas se realizaron siguiendo la metodología descrita en las pruebas preliminares, utilizando los rangos establecidos según los resultados de los ensayos preliminares que permitieron la obtención de las respectivas concentraciones letales medias (CL_{48}^{50}) de la sustancia pura de mercurio.

Esta etapa se estableció mediante la metodología descrita en el protocolo LB05 "*Pruebas de Toxicidad*" obteniendo la concentración letal media (CL_{48}^{50}) del mercurio con sus límites de confianza manejando la metodología descrita en el protocolo LB06 *Análisis de Regresión y Análisis Probit* y valiando los resultados por medio de análisis de varianza (ANOVA), cuya metodología esta descrita en el protocolo LB07 *Análisis de varianza*. Estos protocolos hacen parte del proyecto de investigación de los profesores Pedro Miguel Escobar Malaver, Yanneth Parra y Rubén Darío Londoño y se encuentran en los archivos del laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, para su consulta.

4.8.6. Toma y preservación de muestras ambientales para los ensayos de toxicidad.

La recolección de las muestras ambientales se realizó en recipientes plástico de dos litros y medio (2.5) de capacidad, estos se llenaron después de la canaleta Parshall. Las pruebas se realizaron dentro de las 24 horas después de la recolección de las muestras evitando las posibles alteraciones de sus características, por lo que se mantuvieron refrigeradas durante su transporte al laboratorio con ayuda de hielo seco y una nevera para su posterior almacenamiento en el refrigerador del laboratorio de Bioensayos de la facultad de Ingeniería ambiental y Sanitaria.

4.8.7. Análisis fisicoquímicos a los vertimientos

A la muestra ambiental, al llegar al laboratorio se le realizaron los siguientes parámetros fisicoquímicos:

- Mercurio: Se tomaron 500 ml de la muestra ambiental y se preservó con ácido Nítrico (HNO_3) en un recipiente de vidrio. Esta muestra fue analizada por el laboratorio particular (ASAFRANCO). Porque ser un laboratorio en proceso de acreditación y porque para esta investigación se necesito el valor exacto de la concentración de mercurio presente en la muestra ambiental.
- DQO: se preservó la muestra con ácido Sulfúrico H_2SO_4 (2ml de H_2SO_4 conc./L de muestra), para la obtención del parámetro se realizó el método 5220 D. Reflujo

Cerrado, método colorimétrico del estándar Methods, versión 19 AWWA en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de la Salle

- Sólidos totales: se realizó este análisis fisicoquímico con 100 de la muestra utilizándose el método 2540B. Sólidos totales a 103 – 105 °C del estándar Methods, versión 19 AWWA en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de la Salle
- Temperatura: se realizó in situ y en el laboratorio según método 2550 B: métodos de laboratorio y de campo C del estándar Methods, versión 19 AWWA
- Oxígeno disuelto: se realizó en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, utilizándose el método 4500-0 G. Electrodo de membrana del estándar Methods, versión 19 AWWA.
- Dureza: se realizó este análisis fisicoquímico con 100 de la muestra utilizándose el método 2340 C. Método titulométrico de EDTA del estándar Methods, versión 19 AWWA en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de la Salle

4.8.8. Pruebas preliminares y definitivas con el vertimiento de REFISAL S.A.

A la mitad del volumen de la muestra ambiental obtenida se le realizó un tratamiento físico de la siguiente manera:

Se realizó sedimentación por medio de un cono Imhoff durante un período de 2 horas y luego se procedió a filtrar por medio de un papel filtro semicuantitativo.

Con estas muestras filtradas y no filtradas se realizaron ensayos simulando un tratamiento físico (sedimentación y filtración). Demostrando los cambios en los resultados de toxicidad antes y después del tratamiento.

En estas pruebas se manejaron diferentes porcentajes de volumen diluidos con agua reconstituída, en la preparación de estas soluciones se tuvo en cuenta el intervalo de concentración que reflejarán valores de 0 y 100% de mortalidad. Cuando se presentó un alto grado de mortalidad durante las primeras horas de las pruebas preliminares, se

disminuyeron las concentraciones por medio de diluciones, hasta obtener un rango efectivo para realizar las pruebas definitivas, se prepararon 500 ml de la muestra ambiental, distribuída de a 10 ml en cada tubo de ensayo y en las correspondientes réplicas y controles respectivos, realizando el mismo procedimiento del numeral 4.8.2., como se muestra en el figura 11:

Figura 11. Montaje de pruebas de toxicidad con la muestra ambiental

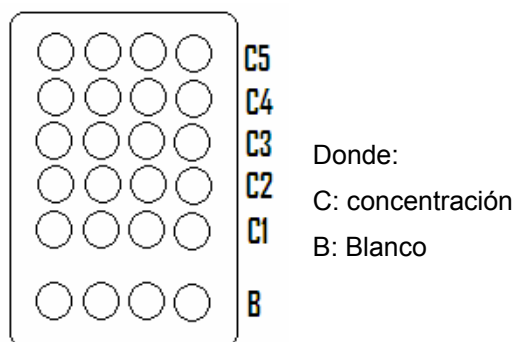


Figura 11: Montaje de Pruebas de toxicidad
Fuente: Autoras 2007

4.9. RESULTADOS FISICOQUÍMICOS FINALES

Después de las 48 horas se procede a medir el oxígeno disuelto, la dureza y el pH, en un tubo de ensayo escogido al azar de la batería de prueba, para corroborar que el efecto tóxico fue producido por un agente químico y no por las constantes que se manejan en la prueba toxicológica. De igual manera las pruebas definitivas son consideradas válidas según metodología CETESB. dentro de las siguientes condiciones:

- La mortalidad en los controles no debe ser mayor que el 10% y preferiblemente no más que el 5%.
- Si la mortalidad en el control sobrepasa el 10%, esta prueba se considera no representativa y se requiere la repetición de la misma.

- La concentración de oxígeno disuelto en las soluciones test durante el transcurso del ensayo debe ser mayor a 2 mg/l.⁶³

4.10. OBTENCIÓN DE RESULTADOS

La estimación de este valor sigue un modelo matemático que asume relación continua entre dosis y respuesta. El valor se calcula con una confiabilidad del 95%. Este valor se obtiene por medio del método Probit, obteniéndose la CL_{48}^{50} con sus respectivos límites de confianza para ello se realizó el protocolo LB 06 *ANÁLISIS DE REGRESIÓN Y ANÁLISIS PROBIT*

Después de tener este resultado se procede a realizar el análisis de varianza según el protocolo LB07 “*Análisis de varianza*” para comprobar que a diferentes concentraciones de la sustancia pura o vertimiento produce un diferente efecto en todos los organismos. Estos protocolos hacen parte del proyecto de investigación de los profesores Pedro Miguel Escobar Malaver, Yanneth Parra y Rubén Darío Londoño y se encuentran en los archivos del laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, para su consulta.

4.11. OBTENCIÓN DEL ÍNDICE TOXICOLÓGICO

Para el cálculo del índice toxicológico se contó con la información del nivel trófico afectado (*Daphnia Pulex*), caudal del vertimiento industrial, Concentración Letal media del vertimiento y carga tóxica del efluente.

Para el cálculo de la carga tóxica se utilizó la siguiente ecuación: expresada en unidades tóxicas (UT)

$$CargaTóxica(UT) = \frac{100}{CL50} \times \bar{Q}$$

⁶³ Ibid. p. 63

En donde:

- CL 50: Concentración letal media (Concentración del efluente que produjo la mortalidad del 50% de los organismos expuestos en un período de 48 horas)
- \bar{Q} : Caudal promedio del efluente, el cual varía según la producción de la empresa evaluada.

4.12. ÍNDICE TOXICOLÓGICO DEL VERTIMIENTO

Con el cálculo y transformación logarítmica en base 10 de la carga tóxica se obtuvo el índice toxicológico de la siguiente manera:

$$IT = \text{Log}(1 + UT)$$

Con el que se clasificó el vertimiento, basado en los rangos establecidos en la tesis “Implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando *Daphnia Pulex* para la evaluación de muestras ambientales”, realizada por Escobar Malaver; Pedro Miguel, los cuales se encuentran consignados en la tabla 11:

Tabla 11. Rangos de índices toxicológicos

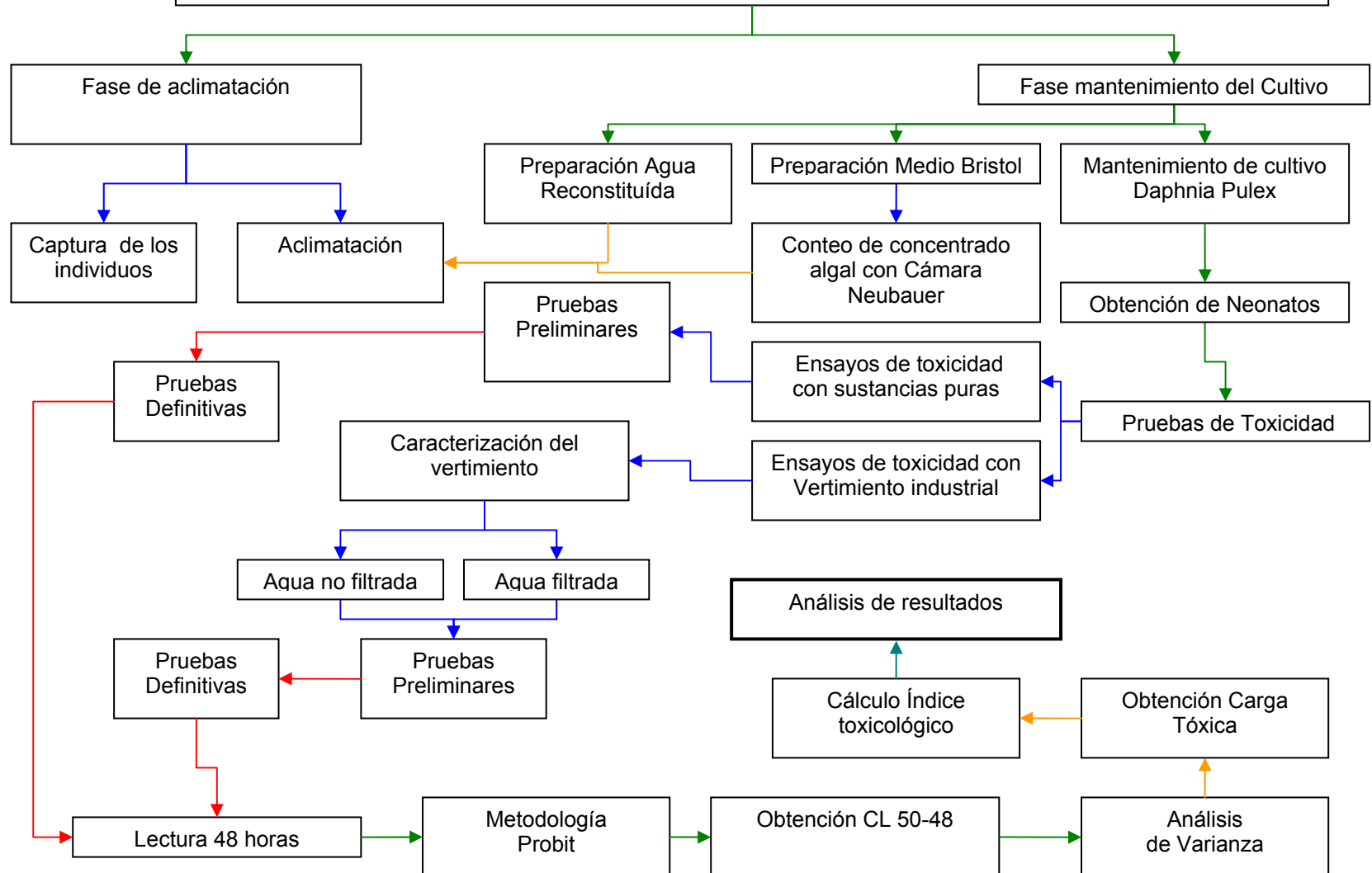
Rangos	Carga Tóxica
1 -1.99	Despreciable
2 - 2.99	Reducida
3 -3.99	Moderada
4 - 4.99	Considerable
> 5	Elevada

Fuente: ESCOBAR, MALAVER; Pedro Miguel. Implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando *Daphnia Pulex* para la evaluación de muestras ambientales.1997

4.13. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Las concentraciones letales medias que se obtuvieron en esta investigación se compararon con otros resultados encontrados en pruebas de toxicidad realizados en laboratorios de investigación de Colombia y el exterior.

Figura 12. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL50 – 48) DEL MERCURIO POR MEDIO DE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD SOBRE LA *Daphnia Pulex*



Fuente: Autoras 2007.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En esta investigación los ensayos de toxicidad, se trabajaron bajo metodología de la guía de CETESB (Brasil), por lo tanto la mayoría de los protocolos de bioensayos validados han sido ajustados tomando como modelo los publicados por ese organismo.

Un aspecto muy importante en las pruebas de toxicidad es obtener resultados similares con la misma sustancia química; estandarizando las pruebas bajo protocolos establecidos en CETESB, los cuales especifican un número mínimo de veinte (20) bioensayos de toxicidad consecutivos con el tóxico de referencia, ($K_2Cr_2O_7$), antes de realizar las pruebas definitivas con el agente tóxico.

Una vez establecidas estas fases dentro de la investigación, se analizó cada resultado obtenido de acuerdo con los objetivos planteados y la metodología establecida, a continuación se da conocer los resultados y análisis de resultados de éste proyecto de investigación teniendo en cuenta la metodología antes descrita:

5.1. CAPTURA DE LOS ORGANISMOS PRUEBA *Daphnia Pulex*

La captura de los organismos se realizó en el humedal Guaymaral costado occidental, al lado del colegio Nueva York en la autopista norte, kilómetro 15 (Calle 227 No 49 – 64), se capturaron 64 microorganismos de la especie *Daphnia Pulex*, de la siguiente manera: por medio de una red de plantón en un tiempo de 10 minutos, la cual fue sumergida 30 cm en el cuerpo de agua; y los organismos capturados se llevaron al laboratorio para su respectiva aclimatación y mantenimiento del cultivo, la aclimatación se realizó a lo largo de 4 meses, terminado este tiempo el cultivo sufrió una alteración provocando la muerte de todas las *Daphnias Pulex*.

El 30 de noviembre del 2006 se volvió a recolectar en el humedal Guaymaral 8 microorganismos con los que se realizó la aclimatación y mantenimiento del cultivo; igualmente se cambiaron todas las condiciones del laboratorio tales como:

- Preparación de reactivos
- Preparación de agua reconstituida
- Limpieza de todos los materiales y equipos

Así como el cambio de área de trabajo evitando la alteración del ambiente y por ende la muerte de las *Daphnia Pulex*.



Foto 1: Humedal Guaymaral



Foto 2: Punto de toma de muestra ambiental

Ubicación geográfica:

Coordenadas		
NORTE	OESTE	ALTITUD m.s.n.m.
4°51'31,969	74°20'22,452	2670

Fuente: Autoras

Se realizó la identificación del organismo mediante la ayuda del profesor Pedro Miguel Escobar Malaver que cuenta con la experiencia en la identificación de esta especie y basándose en la tesis realizada en la universidad de la Salle, por González Gómez, Henry Bernardo; Gutiérrez Álvarez, Sandra del Pilar, titulada Clasificación y ciclo de vida de una especie de *Daphnia* nativa de la Sabana de Bogotá y las claves utilizadas en esta misma dictadas por la Universidad del Lujan. Esta identificación de llevo a cabo por medio de observaciones realizadas a través del microscopio verificando las características más importantes de la *Daphnia Pulex*.

Como se observa en las fotos 3 y 4, presenta una cabeza normal sin cresta; rostro largo y puntiagudo; cuerpo y patas cubiertos por un caparazón bivalvo; antenas con escasas sedas, de tamaño variable y menos plumosas; uña caudal bipectinada.



Foto 3: Cuerpo de la *Daphnia Pulex*



Foto 4: Uña caudal bipectinada de la *Daphnia Pulex*

Fuente: Autoras

Además se contó con la ayuda de la profesora especialista en invertebrados Carmen Reyes de la Universidad Nacional, que corroboró que el organismo es de la especie *Daphnia Pulex*.

5.2. PREPARACIÓN DEL AGUA RECONSTITUIDA

El agua se preparó en dos acuarios con una capacidad de 20 litros cada uno, la cual era aireada constantemente para garantizar que el Oxígeno Disuelto fuera mayor de 6 mg/l, los acuarios eran tapados con plástico y sellados con cinta para evitar cualquier tipo de contaminación del agua; las soluciones preparadas para los reactivos fueron: 10 g/l de NaHCO_3 , 13.5g/l de CaCl_2 , 10g/l KCl y 20,5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, y a partir de estas soluciones se manejaron los siguientes volúmenes para la preparación del agua reconstituida 100 ml/l de NaHCO_3 , 75 ml/l de CaCl_2 , 38 ml/l KCl y 30 ml/l de MgSO_4 , garantizando una dureza entre 40 – 48 mg/l CaCO_3 necesaria para la supervivencia de las *Daphnia Pulex*.

Durante toda la investigación se llevó el control del pH, OD, dureza y temperatura, del agua reconstituída cada vez que esta era preparada, los cuales fueron registrados (ver anexo B); a continuación se muestra el montaje de los acuarios que se desarrollo en el laboratorio:



Foto 5: Acuario 1 de Agua reconstituída



Foto 6: Acuario 2 de Agua reconstituída

Fuente: Autoras

5.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CENTRIFUGACIÓN DE ALGAS VERDES

Las algas utilizadas como alimento para las *Daphnia Pulex* en está investigación fue una mezcla entre las *Selenastrum Capricornutum* y las *Scenedesmus quadricauda*. El concentrado inicial de estas algas fue suministrado por la CAR e identificado por Clara Inés Ortiz funcionaria de está institución y corroborado con ayuda del profesor de microbiología de la Universidad de la Salle.



Foto 7: Medio Bristol inicial
Fuente: Autoras

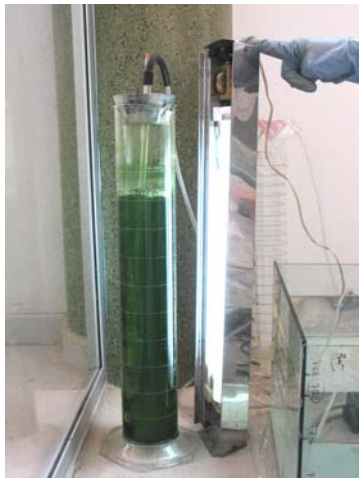


Foto 8: Medio Bristol transcurrido 15 días
Fuente: Autoras



Foto 9: Medio Bristol listo para centrifugar
Fuente: Autoras

Como se observa en la foto 7 este fue el montaje utilizado para preparar el medio Bristol en la probeta, la cual era oxigenada e iluminada con aireador y una lámpara las 24 horas del día para garantizar el proceso de fotosíntesis; este montaje se dejaba un periodo de 15 días.

Transcurrido este tiempo el medio Bristol se tornaba de color verde oscuro, como se observa en la foto 8 indicando que ya se encontraba en condiciones para centrifugar, es importante establecer que no se debe pasar del tiempo indicado, ya que las algas se precipitan y su color se torna marrón desechando este montaje, para evitar esto se llevo un control de realización del montaje.

Se trasvasa los 2 litros de medio Bristol de la probeta a una Beaker de 2000 ml, para transferirlos a tubos de centrifuga en volúmenes de 10 ml, mediante la utilización de una probeta graduada como se muestra en la foto 9.

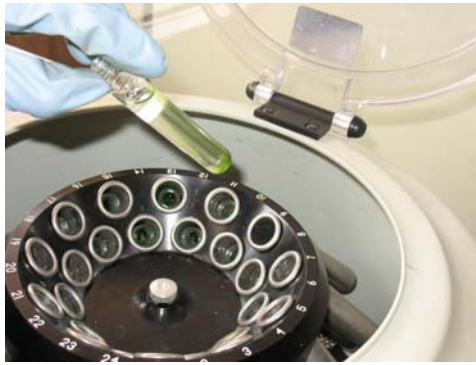


Foto 10: Centrifugación del Medio Bristol
Fuente: Autoras

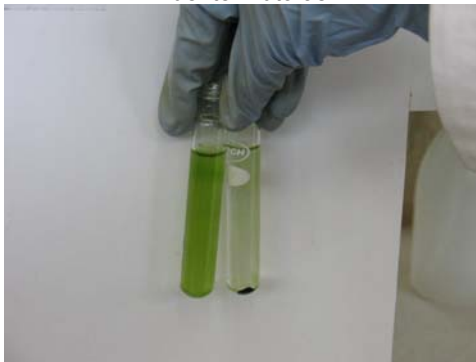


Foto 11: Comparación de tubos de centrifuga
Fuente: Autoras



Foto 12: Extracción de concentrado de algas
Fuente: Autoras

Se procede a ingresar los tubos a la centrifugadora, como se aprecia en la foto 10, con una velocidad de 3000 rpm en un tiempo de 5 minutos según metodología CETESB.

En la foto 11, se observa en el tubo de la izquierda la solución antes de centrifugar, y en el tubo de la derecha como debe estar la solución después de ser centrifugada, lista para eliminar el sobrenadante

El concentrado de algas que queda depositado en el fondo del tubo de centrifuga, es extraído por medio de una pipeta Pasteur, como se observa en la foto 12. Las cuales son depositadas en frascos de vidrio, como se muestra en la foto 13, quedado totalmente sellados con papel parafilm, (foto 14), rotulados e identificados para ser guardados en la nevera, en un periodo máximo de 20 días.



Foto 13: Almacenamiento de concentrado de algas



Foto 14: Frascos sellados con papel parafilm

Fuente: Autoras

5.4. ALIMENTACIÓN DE ORGANISMOS PRUEBA

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la lectura de la cámara Neubauer, para determinar el volumen de algas que se suministró a los cultivos de *Daphnia Pulex* en las peceras.

En el conteo realizado en el microscopio se hallaron los siguientes datos, en cada cuadrícula:

1

30			
	33		
		32	
			18

2

17			
	12		
		24	
			20

3

9				
	14			
		7		
			7	
				9

4

19			
	18		
		22	
			13

5

21			
	15		
		26	
			19

De las células contadas en cada cuadro en forma diagonal se multiplicó por 4 o 5 dependiendo de la cuadrícula; se sumaron los valores obtenidos hallando su promedio.

$$lectura1 = (30 \times 4) + (33 \times 4) + (32 \times 4) + (18 \times 4) = 452$$

$$lectura2 = (17 \times 4) + (12 \times 4) + (24 \times 4) + (20 \times 4) = 292$$

$$lectura3 = (9 \times 5) + (14 \times 5) + (7 \times 5) + (7 \times 5) + (9 \times 5) = 280$$

$$lectura4 = (19 \times 4) + (18 \times 4) + (22 \times 4) + (13 \times 4) = 288$$

$$lectura5 = (21 \times 4) + (15 \times 4) + (26 \times 4) + (19 \times 4) = 324$$

$$\sum lecturas = 1559$$

$$\bar{X} = 311.8 \text{ células}$$

Se determinó la cantidad de células que existen en un 1 ml, partiendo que la cámara tiene una capacidad de 1×10^{-4} ml, de la siguiente manera:

$$\frac{\bar{X} \text{ Células}}{1 \times 10^{-4} \text{ ml}} = \frac{\text{No. células}}{1 \text{ ml}}$$

$$\frac{311.8 \text{ células}}{1 \times 10^{-4} \text{ ml}} = \frac{\text{No. células}}{1 \text{ ml}}$$

$$\text{No. células} = 3.118 \times 10^6$$

Este valor se multiplicó posteriormente por el factor de dilución, dado así el valor real de células que existe en 1 ml

Se realizó una dilución 1/10, luego se efectuó otra dilución 1/0 que daría un factor de 100

$$3.118 \times 10^6 \times \text{factor de dilución} = 3.118 \times 10^6 \times 100 = \frac{311.8 \times 10^6 \text{ células}}{1 \text{ ml}}$$

Se calculó el volumen de alimento que necesita cada pecera que contiene 20 *Daphnia Pulex* con la siguiente fórmula:

$$V = \frac{(A \times B)}{C}$$

Donde:

V = Volumen del concentrado de algas

A = Número de *Daphnia Pulex* por acuario.

Dosis óptima recomendada (3.0×10^6 células por *Daphnia Pulex* /día).
(Según metodología CETESB / L5.018)

C = Concentración (número de células/ml) de la suspensión de algas descritas y halladas anteriormente.

$$V = \frac{(A \times B)}{C}$$

$$V = \frac{(20 \times (3 \times 10^6))}{311.8 \times 10^6} = 0.19 \frac{ml}{dia}$$

Con base en los resultados obtenidos en el conteo de la cámara Neubauer y al Número de organismos por pecera el volumen de alimento es el que se presenta en la tabla 9:

Tabla 12. Volumen de alimento administrado a cada pecera

Volumen de alimento por pecera	
Día de alimentación	Cantidad de alimento
1	0.19 ml
2	0.38 ml
3	0.57 ml
4	0.76 ml
5	0.95 ml

Fuente: Autoras

Este procedimiento se realizó cada 15 días cuando se obtenía un nuevo cultivo.

5.5. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO DE LOS ORGANISMOS PRUEBA DAPHNIA PULEX



Foto 15: Zona de ensayo de Toxicidad

Fuente : Autoras

En la foto 15, se aprecia la adecuación de la zona de bioensayos en el laboratorio de ambiental para el desarrollo de los ensayos de toxicidad. Se aisló un área determinada, con acceso restringido e iluminación.

Se dispuso de un mueble, donde se ubicaron los diferentes recipientes conteniendo los organismos para su mantenimiento, debidamente tapadas y rotuladas con la fecha en que fueron separadas, como se muestra en la foto 16; el cual es protegido por un plástico que cubre todo el mueble evitando polvo y gases externos, que puede afectar la calidad del agua y la alteración del cultivo, debidamente marcado como indica la foto 17.



Foto 16: Área de ubicación de las peceras

Fuente: Autoras



Foto 17: Área de mantenimiento del cultivo

5.6. PRUEBAS DE TOXICIDAD DE SENSIBILIDAD CON EL TÓXICO DE REFERENCIA DICROMATO DE POTASIO

Para el desarrollo de estas pruebas se tomo una gradilla, ubicando en la primera fila cuatro tubos de ensayos del control (agua reconstituida), en la segunda la concentración mas baja del dicromato de potasio como se dijo anteriormente y así sucesivamente hasta llegar a la última concentración en forma ascendente; como se muestra en la foto 18 y en el Figura 10.

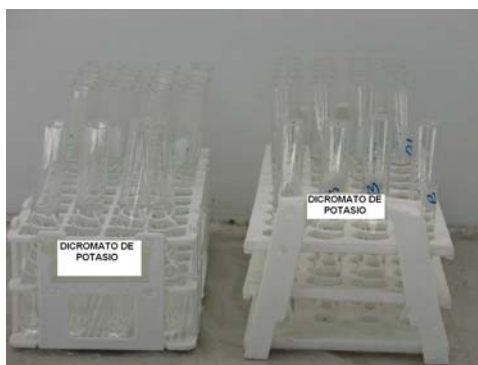


Foto 18: Montaje de Ensayos de toxicidad con Dicromato de Potasio

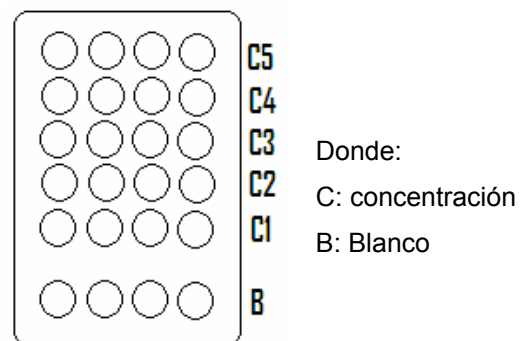


Figura 13: Montaje de Pruebas de toxicidad con Dicromato de Potasio

Fuente: Autoras

Las concentraciones de las pruebas preliminares fueron 2,1.5, 1, 0.5 y 0.1mg/l de dicromato de potasio, en ellas se obtuvo el 100% de mortalidad, por ello se procedió a disminuir las concentraciones y las definitivas fueron: 1.0, 0.7, 0.5, 0.3 y 0.1 mg/l de dicromato de potasio.

Teniendo las concentraciones definitivas se procedió a realizar la carta de control apara estimar el rango que deben oscilar los resultados de la prueba de sensibilidad:

5.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CON EL TOXICO DE REFERENCIA, Y ELABORACIÓN DE LA CARTA DE CONTROL

La concentración letal media del Dicromato de Potasio se determinó con las concentraciones definitivas, en las cuales se tuvo un porcentaje de mortalidad de 0% al 100%, estos resultados, está se calculó con el programa estadístico Probit, en el cual se suministraron los datos de los ensayos, determinando la CL_{48}^{50} con sus respectivos límites de confianza al 95%; con ellos se construyo la carta de control con el valor promedio, la desviación estándar, que se observa en la tabla 13 donde se presentan los resultados obtenidos de la evaluación, durante los meses de enero a marzo de 2007 de los cultivos de *Daphnia Pulex* Toxico de referencia:

Tabla 13: Carta de Control de Sensibilidad del cultivo de *Daphnia Pulex*

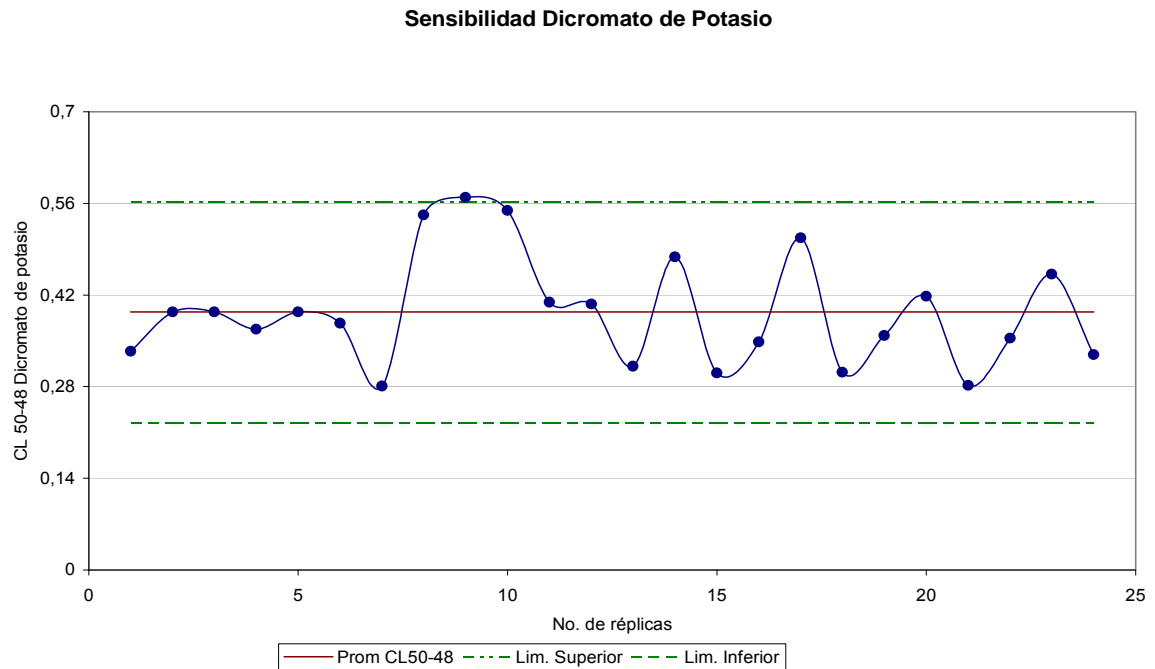
No	FECHA	CL50
1	15-01-07	0.334
2	17-01-07	0.394
3	19-01-07	0.394
4	19-01-07	0.368
5	22-01-07	0.394
6	24-01-07	0.377
7	24-01-07	0.281
8	29-01-07	0.542
9	31-01-07	0.569
10	31-01-07	0.549
11	06-02-07	0.409
12	08-02-07	0.406
13	13-02-07	0.311
14	15-02-07	0.478
15	20-02-07	0.301
16	22-02-07	0.348
17	27-02-07	0.507
18	01-03-07	0.302
19	06-03-07	0.358
20	08-03-07	0.418
21	13-03-07	0.282
22	15-03-07	0.354
23	20-03-07	0.452
24	22-03-07	0.329
X		0.394
S		0.084
2S		0.169
X+2S		0.563
X-2S		0.225

Límite Superior
Límite Inferior

Fuente: Autoras

En la Gráfica 3, se muestra la distribución de las sensibilidades obtenidas durante el tiempo de las pruebas, así como su promedio como sus respectivos límites.

Gráfica 3: Sensibilidad del cultivo al toxico de referencia



Estas pruebas se realizaron con el fin de estandarizar las pruebas de toxicidad, estableciendo la sensibilidad de la especie y su respuesta frente a un tóxico de referencia según las repeticiones del experimento. Con estas se certificó que la respuesta de la población se debe al tóxico y a no a variaciones del cultivo o a fallas operacionales en la aplicación del método, determinando el rango de variabilidad y sensibilidad frente al tiempo de exposición.

Es primordial dejar establecida la sensibilidad de los organismos prueba a un tóxico de referencia en este caso el dicromato de potasio ($K_2CR_2O_7$), ya que los bioensayos con esta especie son la base fundamental en la evaluación ecotoxicológica de los vertimientos.

Inicialmente en los ensayos preliminares se trabajo con un intervalo de concentraciones de 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 y 0.1 mg/l de dicromato de potasio, presentando el 100% de mortalidad en cada una de ellas, y a partir de este resultado se disminuyo su rango de concentración hasta 1.0, 0.7, 0.5, 0.3 y 0.1 mg/l de dicromato de potasio con los cuales se realizaron las pruebas definitivas de sensibilidad.

La concentración letal media (CL_{48}^{50}) promedio obtenida en las pruebas de sensibilidad es 0.394 mg/l y sus límites de confianza son 0.221 y 0.563 mg/l expresados como Dicromato de Potasio.

En bibliografía de investigaciones realizadas hace diez años el valor promedio de la concentración letal media (CL_{48}^{50}) de los ensayos con Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$), fue 0.1175 mg/l y sus límites de confianza oscilaban entre 0.0381 y 0.1969 mg/l.

Comparados con los resultados hallados en esta investigación, como se muestra en la tabla 14, el valor obtenido del límite inferior se acerca al límite superior de la bibliografía encontrada; sin embargo, se requiere la verificación de este rango de sensibilidad en posteriores proyectos del grupo de investigación en Bioensayos, ya que estas pruebas de toxicidad fueron afectadas por factores externos que se encontraban en el ambiente del laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, como: polvo, sustancias químicas y vapores.

Tabla 14: Comparación de resultados de Sensibilidad con Dicromato de Potasio (CL_{48}^{50})

Año de investigación	CL_{48}^{50}	Límite Superior	límite Inferior
1997	0.1175 mg/l	0.1969	0.0381
2007	0.394 mg/l	0.563	0.221

Fuente: Autoras

Los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad fueron homogéneos y constantes, dando una viabilidad al momento de hacer los ensayos preliminares y definitivos de la sustancia pura y de la muestra ambiental, estableciendo el buen estado fisiológico del cultivo garantizando la confiabilidad de los resultados.

5.8. PRUEBAS PRELIMINARES DE TOXICIDAD CON CLORURO DE MERCURIO

La solución madre para el ión de mercurio fué preparada de la sal metálica a base del cloruro del mercurio (HgCl_2) g.a, usp., a una concentración de 100 mg/L, todas las soluciones se registraron en concentraciones nominales del ión mercurio. Para determinar las concentraciones del mercurio se tomó como referencia la concentración letal media del mercurio (CL_{96}^{50}) que se encuentra en el decreto 1594 de 1984 que es 0.01 ppm. En el ensayo con mercurio Hg^{-2} se emplearon las concentraciones preliminares (0.15; 0.1; 0.05; 0.01; 0.001; 0.00002; 0.000015; 0.00001; 0.000005; 0.000001) ppm, manejándose un factor de dilución de 0.5, teniendo en cuenta los resultados de las pruebas preliminares anteriormente descritas.

5.9. ENSAYOS DEFINITIVOS CON CLORURO DE MERCURIO Y OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL_{48}^{50}) DEL MERCURIO CON SUS LÍMITES DE CONFIANZA

Las pruebas definitivas con cloruro de mercurio se realizaron, bajo los mismos parámetros que las de Dicromato de Potasio, como se observan en las fotos 19 y 20, siguiendo los lineamientos del protocolo LB05 “Pruebas de Toxicidad”.



Foto 19: Ensayos de Toxicidad con Cloruro de Mercurio



Foto 20: Siembra de neonatos en las concentraciones

Fuente: Autoras

En un ensayo de toxicidad aguda, los resultados son presentados por lo general en tablas. Se calcula el valor de la concentración letal media de las pruebas realizadas, y sus límites de confianza. La CL_{48}^{50} definitiva, corresponde al promedio de los resultados obtenidos en cada ensayo.

Para ello varios métodos han sido desarrollados; en la presente investigación se contó con el software de la metodología Probit, en la cual se digitan los datos donde se determinan los límites de confianza y la CL_{48}^{50} .

De las 15 pruebas de toxicidad que se realizaron en los meses de febrero a marzo, se determinaron para cada una, la CL_{48}^{50} con sus límites de confianza inferior y superior respectivamente; para hallar la concentración letal media definitiva del mercurio, se promediaron los resultados, como se muestra a continuación en la tabla 15:

Tabla 15: Promedio de la CL_{48}^{50} del mercurio

No de Ensayo	FECHA	CL_{48}^{50} (µg/l)	LIM INFERIOR (µg/l)	LIM SUPERIOR (µg/l)
1	06-02-07	0.118	0.082	0.167
2	08-02-07	0.104	0.066	0.159
3	13-02-07	0.121	0.087	0.171
4	15-02-07	0.105	0.073	0.150
5	20-02-07	0.104	0.073	0.146
6	22-02-07	0.109	0.073	0.159
7	27-02-07	0.121	0.087	0.171
8	01-03-07	0.117	0.076	0.176
9	06-03-07	0.109	0.078	0.154
10	08-03-07	0.109	0.077	0.154
11	13-03-07	0.109	0.072	0.159
12	15-03-07	0.118	0.082	0.167
13	20-03-07	0.126	0.087	0.180
14	22-03-07	0.122	0.083	0.176
15	22-03-07	0.109	0.078	0.154
	Promedio:	0.113	0.078	0.163

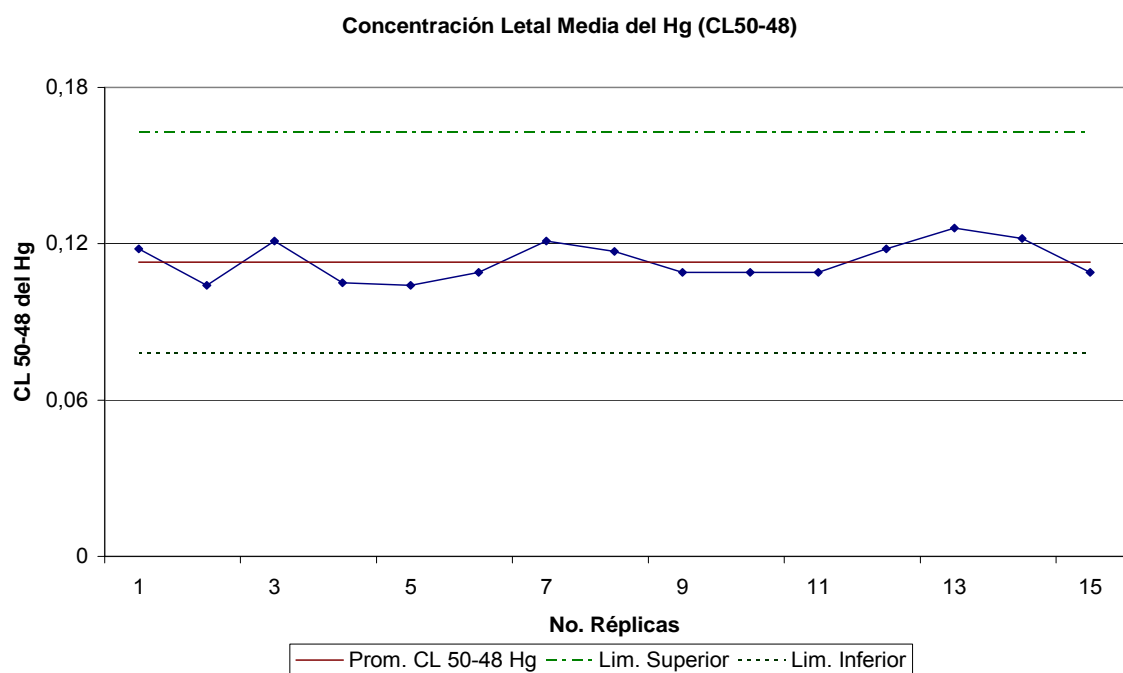
Fuente: Autoras

Como resultado de la concentración letal media del mercurio en esta investigación, con sus límites de confianza son:

- Límite inferior: 0.078 µg/l
- $CL_{48}^{50} = 0.113 \mu\text{g/l}$
- Límite Superior: 0.163 µg/l

Se realizaron 15 pruebas con el fin de corroborar los datos, así como su homogeneidad de los resultados. De igual manera se cumplió con los protocolos internacionales, que exigen un mínimo de 10 pruebas con la sustancia pura.

En la gráfica 4, se representa las distribuciones de las pruebas realizadas para determinar la concentración letal media CL_{48}^{50} con la utilización del mercurio como sustancia pura, así como su promedio y sus respectivos límites



Como se observa en el análisis de la concentración letal (CL_{48}^{50}) del mercurio los valores de toxicidad oscilan entre un rango de 0.078 - 0.163 y un promedio de 0.113 µg/l demostrando que este valor se encuentra por debajo del establecido en el decreto 1594 de 1984 expresada en el artículo 45 para la preservación de flora y fauna cuyo valor es 0.01 mg/l. Lo que significa que la concentración que se encuentra en la norma no garantiza la preservación fauna y flora de un ecosistema acuático.

En bibliografía de investigaciones realizadas en el exterior y en Colombia el valor de la concentración letal media (CL_{48}^{50}) del mercurio muestra que la *Daphnia Pulex* presenta mayor sensibilidad a este metal, ya que este crustáceo habita en aguas blandas y la mayoría de los metales pesados se hacen más tóxicos en estas; afectando negativamente a los micro y macroorganismos que habitan en ellas ya que sus branquias más permeables que los organismos que habitan en aguas duras, provocando mayores impactos negativos en los ecosistemas.

5.10. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LAS PRUEBAS DEFINITIVAS DEL CLORURO DE MERCURIO

A continuación se presenta un ejemplo para realizar el análisis de varianza después de obtener la concentración letal media (CL_{48}^{50}) de la sustancia pura y el vertimiento para validar los resultados obtenidos por el software Probit suministrado por la CAR:

De un ensayo de toxicidad que se realizó en el laboratorio, se obtuvieron los siguientes resultados que se muestran en la tabla 16:

Tabla 16. Formato de Datos de Prueba de Toxicidad

Tratamientos	Observaciones de Organismos muertos				Total	Porcentaje de Mortalidad
	1	2	3	4		
0.1	5	5	5	5	20	100
0.05	4	5	4	5	18	90
0.1	1	3	2	3	9	45
0.005	1	0	1	2	4	20
0.1	0	0	0	0	0	0
Control	0	0	0	0	0	0

Fuente: Protocolo LB 07

De la cual se parte de dos hipótesis así:

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Teniendo en cuenta que:

Tratamientos:	6
Observaciones:	4
Total:	24

Se construyó la tabla según el procedimiento descrito en el protocolo LB 07 “*Análisis de Varianza*” de la siguiente forma:

Tabla 16: Análisis de Varianza

FV	SS	GL	Ms	Fc	Ft
Tratamiento	96.875	5	19.375	60.65	2.77
Error	5.75	18	0.32		
Total	102.625	23			

Fuente: Protocolo LB 07

$F_c > F_t$: se rechaza la hipótesis nula

Como se observa el $F_c > F_t$, por consiguiente se rechaza la hipótesis nula, y se acepta la hipótesis alterna, concluyendo que las diferentes concentraciones producen efectos distintos en los organismos prueba. Como se muestra en el anexo G.

5.11. CARACTERIZACIÓN DEL VERTIMIENTO

La toma de la muestra ambiental se realizó al final de la planta tratamiento de la industria en la canaleta Parshall, el caudal se midió cada hora por medio de un molinete, siendo una muestra compuesta en el turno de 8 a.m. a 5 p.m., el volumen total fue de 5 litros.

Los datos del caudal obtenido se registraron en la tabla 17:

Tabla 17. Caudales obtenidos en la industria evaluada.

No. Lecturas	Hora	Caudal (l/s)
1	8:00 a.m.	355,2
2	9:00 a. m.	358,2
3	10:00 a.m.	353,2
4	11:00 a.m.	359,2
5	12:00 m.	368,1
6	1:00 p.m.	355,9
7	2:00 p.m.	360,5
8	3:00 p.m.	363,1
9	4:00 p.m.	366,3
10	5:00 p.m.	360,2
	Caudal Promedio	360,0
Caudal promedio ($m^3/día$)		31104

Fuente: Autoras

5.11.1. Análisis fisicoquímico del vertimiento: En los análisis fisicoquímicos que se realizaron en el laboratorio al vertimiento se hallaron los siguientes parámetros, según el Standard métodos , los resultados y método utilizado se encuentra en la tabla 18 que se muestra a continuación:

Tabla 18. Análisis fisicoquímicos realizados a la muestra ambiental

Parámetro	Método según el Standard métodos	Valor	Unidades
pH	4500-H ⁺ B Electrométrico	7.44	unidades
Dureza	2340 C Titulométrico EDTA	81.6	mg/l de CaCO ₃
Oxígeno Disuelto	4500-0 G. Electrodo de membrana	6.02	mg/l
Temperatura in situ	2540B. Sólidos totales secados a 103 – 105 °C	34.7	°C
Sólidos Totales	2540B. Sólidos totales secados a 103 – 105 °C	357	mg/l
DQO	5220 D. Reflujo Cerrado, método colorimétrico	36	mg/l
Mercurio	Absorción atómica	0.002	mg/l

Fuente: Las Autoras

5.11.2. Tratamiento a la muestra ambiental: A la mitad del volumen tomado del vertimiento industrial se realizó un tratamiento que consistió en lo siguiente:

- Sedimentación de sólidos presentes en un volumen de muestra de 2.5 litros por un tiempo de 2 horas en un cono Imhoff
- Posteriormente este volumen fué filtrado, con ayuda de un embudo de porcelana y un papel filtro semicuantitativo, eliminando sólidos restantes que modifiquen la toxicidad.



Como se muestra en la foto 21, la muestra de la derecha es del vertimiento sin tratar, el de la izquierda es de la muestra después de sedimentar y filtrar los sólidos. A la cual se le realizó nuevamente los análisis fisicoquímicos en el laboratorio.

Foto 21. Comparación entre muestra filtrada y no filtrada

Fuente. Autoras

5.11.3. Análisis fisicoquímicos de la muestra tratada: Los parámetros que se hallaron se encuentran en la tabla 19:

Tabla 19. Análisis Fisicoquímicos realizados a la muestra ambiental tratada.

Parámetro	Método según el Standard métodos	Valor	Unidades
pH	4500-H ⁺ B Electrométrico	7.44	unidades
Dureza	2340 C Titulométrico EDTA	44.08	mg/l de CaCO ₃
Oxígeno Disuelto	4500-0 G. Electrodo de membrana	6.02	mg/l
Temperatura en el laboratorio	2540B. Sólidos totales secados a 103 – 105 °C	25.2	°C
Sólidos Totales	2540B. Sólidos totales secados a 103 – 105 °C	39	mg/l

Fuente: Autoras

5.11.1. Pruebas preliminares de toxicidad de agua filtrada y no filtrada



Para estas pruebas se realizaron concentraciones del porcentaje del volumen de la muestra, para ambas, las cuales fueron 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, pero en todas las soluciones el porcentaje de mortalidad fue 100%.

Foto 22: Muestras del vertimiento industrial

Fuente: Autoras

5.11.4. Pruebas definitivas de toxicidad de agua filtrada y no filtrada: Estas pruebas se realizaron en un (1) día, por el tiempo de conservación de la muestra, las concentraciones manejadas para los ensayos definitivos fueron las siguientes:

- En la muestra ambiental sin filtrar , (1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01) %V/V
- En la muestra ambiental filtrada(10, 5, 1, 0.5, 0.1) % V/V

Las pruebas toxicológicas del vertimiento se realizan con concentraciones del porcentaje del volumen de la muestra, debido a que en ellas hay presentes otras sustancias que alteran la toxicidad calculada además del mercurio.

Con ellas se obtuvo la concentración letal media (CL_{48}^{50}) del vertimiento con sus límites de confianza

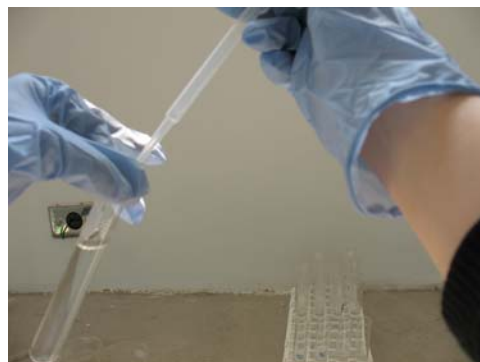


Foto 23: Ensayo de Toxicidad del vertimiento sin tratar

Foto 24: Ensayo de Toxicidad de la muestra tratada

Fuente: Autoras

De las 5 pruebas de toxicidad que se realizaron en el mes de marzo, se obtuvo para cada una la CL_{48}^{50} con sus límites inferior y superior, respectivamente; para hallar la concentración letal media definitiva en el vertimiento industrial sin filtrar del mercurio, se promedia cada resultado como se muestra a continuación en la tabla 20:

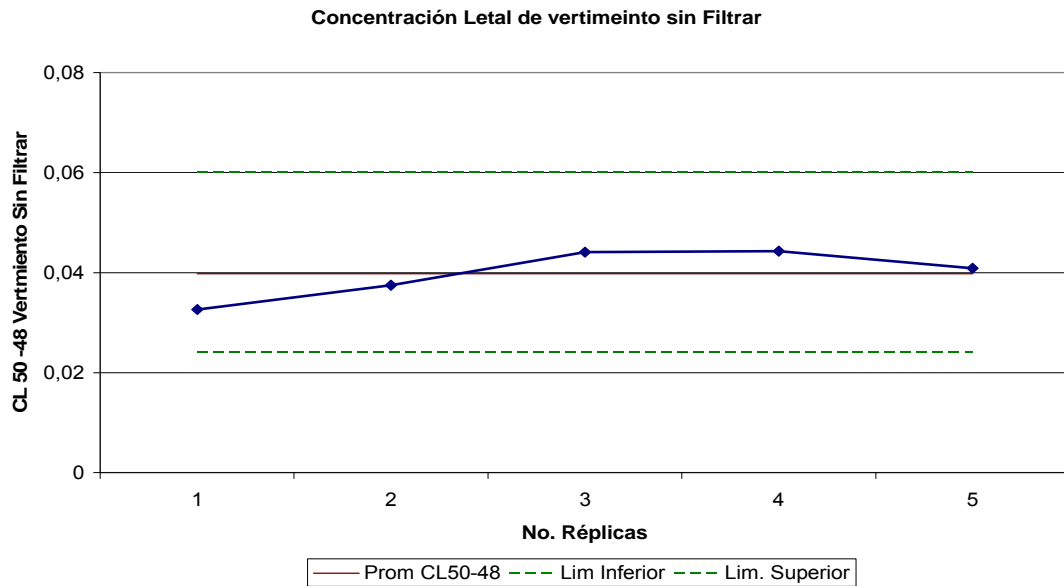
Tabla 20: Promedio de la CL_{48}^{50} del Vertimiento sin Tratar

FECHA	CL 50-48	LIM INFERIOR	LIM SUPERIOR
22-03-07	0.0326	0.0196	0.0489
22-03-07	0.0375	0.0230	0.0557
22-03-07	0.0441	0.0261	0.0678
22-03-07	0.0443	0.0266	0.0677
22-03-07	0.0409	0.0253	0.0610
Promedio:	0.0398	0.0241	0.0602

Fuente: Autoras

En la gráfica 5 se representan las distribuciones de las diferentes concentraciones letales medias (CL_{48}^{50}) del vertimiento sin filtrar, durante el periodo experimental de las *Daphnia Pulex*, sí como su promedio y sus límites superior e inferior.

Gráfica 5. Concentración Letal media (CL_{48}^{50}) del vertimiento sin Tratar



Fuente: Autoras

Como resultado se ve que la concentración letal media del mercurio en esta investigación, con sus límites de confianza son:

- Límite inferior: 0.0241 % del volumen de la muestra
- $CL_{48}^{50} = 0.0398$ % del volumen de la muestra
- Límite Superior: 0.0602 % del volumen de la muestra

De igual manera, de las 5 pruebas de toxicidad que se realizaron en los meses de febrero ha marzo, se obtuvo para cada una la CL_{48}^{50} con sus límites inferior y superior, respectivamente; para hallar la concentración letal media definitiva en el vertimiento industrial tratado, se promedió cada resultado como se muestra a continuación en la tabla 21:

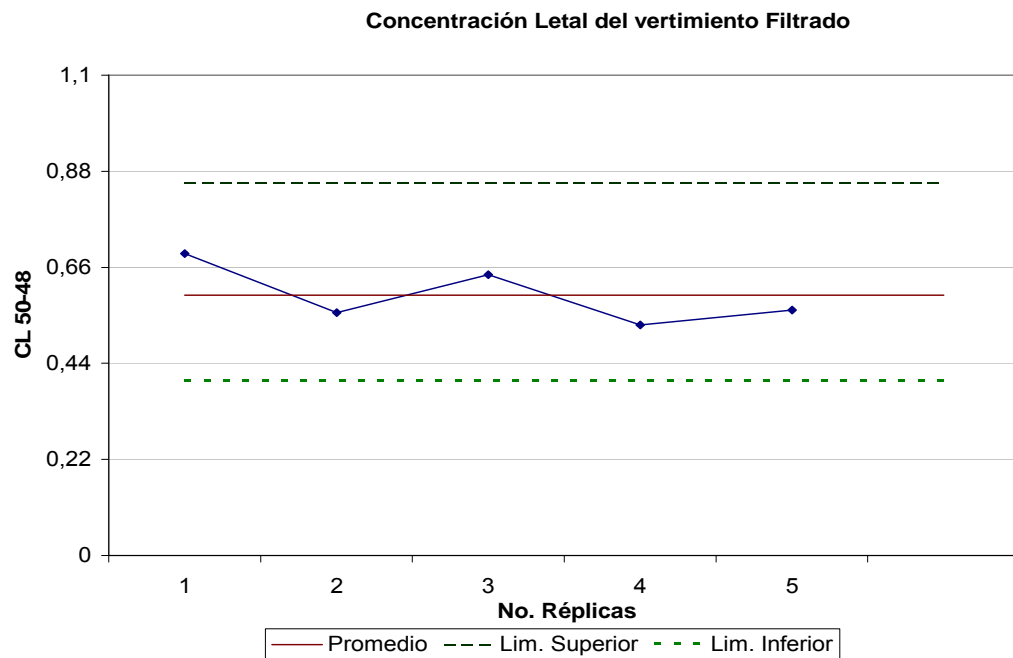
Tabla21: Promedio de la CL_{48}^{50} del Vertimiento filtrado

FECHA	CL 50-48	LIM INFERIOR	LIM SUPERIOR
22-03-07	0.6910	0.4663	0.9841
22-03-07	0.5565	0.3860	0.7755
22-02-07	0.6429	0.4146	0.9550
22-02-07	0.5277	0.3629	0.7377
22-02-07	0.5620	0.3702	0.8177
Promedio:	0.5960	0.400	0.854

Fuente: Autoras

En la gráfica 6, se representan las distribuciones de las diferentes concentraciones letales media (CL_{48}^{50}) del vertimiento tratado, así como su promedio y límites superior e inferior.

Gráfica 6. Concentración Letal media (CL_{48}^{50}) del vertimiento filtrado



Fuente: Autoras

Como resultado se ve que la concentración letal media del mercurio en esta investigación, con sus límites de confianza son:

- Límite inferior: 0.400 % del volumen de la muestra
- $CL_{48}^{50} = 0.5960$ % del volumen de la muestra

- Límite Superior: 0.854 % del volumen de la muestra

Si se compara los resultados se observa una reducción de la concentración letal media (CL_{48}^{50}) significativa utilizando el tratamiento de sedimentación y filtración como se observa en la tabla 22:

Tabla 22. Comparación de concentraciones letales medias CL_{50-48} de muestra ambiental tratada y no tratada.

<i>Muestra ambiental no Filtrada</i>	<i>Muestra ambiental Filtrada</i>	<i>% de reducción</i>
0.0398 % del volumen de la muestra	0.5960 % del volumen de la muestra	93.32

Fuente: Autoras

El efluente de la industria no tratada presenta una CL_{48}^{50} de 0.0398% del volumen de la muestra partiendo que el resultado de mercurio obtenido de la caracterización del laboratorio de ASAFRANCO (2ppb), la concentración letal de este vertimiento es 0.000796 µg/l.

No se encontró bibliografía para comparar los datos hallados, ya que no se han registrado otras investigaciones con las mismas características de esta industria, y el expediente de esta empresa que se encuentra en la Corporación Autónoma regional (CAR), esta en concepto técnico desde Diciembre del 2006 a la fecha.

La concentración letal media (CL_{48}^{50}) obtenida de la muestra es menor a la CL_{48}^{50} (0.113 µg/l) de la sustancia pura ya que en este efluente se encuentran otras sustancias (Sulfuros, cloruros, sales, etc.) que modifican las condiciones del ecosistema donde habita la *Daphnia Pulex*.

El efluente de la industria tratada presenta una CL_{48}^{50} de 0.5960% del volumen de la muestra partiendo que el resultado de mercurio obtenido de la caracterización del laboratorio de ASAFRANCO (2ppb), la concentración letal de este vertimiento es 0.0112 µg/l; comparado con la CL_{48}^{50} (0.113 µg/l) de la sustancia pura es menor, reiterando que a pesar del tratamiento físico que se le realizó en el laboratorio, el efluente presenta una concentración alta del metal.

De igual manera se determino que el vertimiento industrial, cumple las exigencias establecidas en el decreto 1594 de 1984, pero que la concentración de mercurio vertida esta afectando negativamente la fauna nativa de los cuerpos de agua receptores en este caso el Río Bogotá, por ello es necesario incluir las pruebas toxicológicas como parámetros a analizar además de las pruebas fisicoquímicas en el momento de establecer los límites permisibles en la legislación ambiental nacional.

5.11.5. Análisis de varianza de la muestra ambiental tratada y no tratada:

Como se mostró, en el ejemplo de análisis de varianza en los ensayos de cloruro de mercurio, esta fase se desarrolló de igual forma. Como se puede observar en el anexo I para muestra tratada y H para no tratada, el $F_c > F_t$, por consiguiente se rechaza la hipótesis nula, y se acepta la hipótesis alterna, concluyendo que las diferentes concentraciones producen efectos distintos en los organismos prueba.

5.12. OBTENCION DE LA CARGA TÓXICA E INDICE TOXICOLOGICO

Se obtuvo la carga e índice toxicológico de la muestra filtrada y no filtrada con el fin de clasificar y evaluar el vertimiento que contiene mercurio.

5.12.1. Obtención Carga Tóxica e índice toxicológico de la muestra ambiental no filtrada (unidimensional).

$$CargaTóxica(UT) = \frac{100}{CL50} \times \bar{Q}$$

$$CargaTóxica(UT) = \frac{100}{0.0398} \times 31104 = 78150754$$

$$IT = \text{Log}(1 + UT)$$

$$IT = \text{Log}(1 + 78150754) = 7.89$$

5.12.2. Obtención Carga Tóxica e índice toxicológico de la muestra ambiental filtrada (unidimensional).

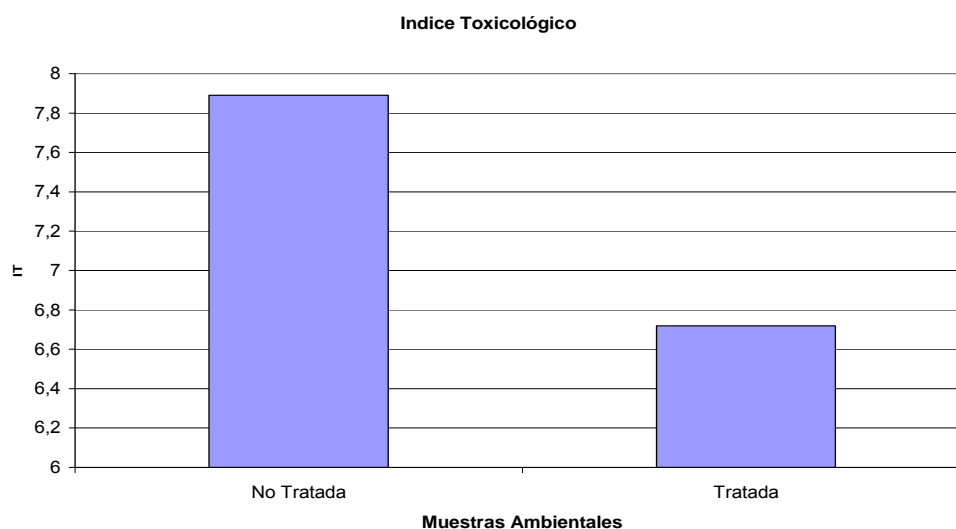
$$CargaTóxica(UT) = \frac{100}{CL50} \times \bar{Q}$$

$$CargaTóxica(UT) = \frac{100}{0.596} \times 31104 = 5218792$$

$$IT = \text{Log}(1 + UT)$$

$$IT = \text{Log}(1 + 5218792) = 6.72$$

Según los resultados obtenidos en el índice toxicológico para la muestra tratada es IT= 6.72 y para la muestra no tratada es IT=7.89, como se observa en el siguiente grafico 7:



Fuente: Autoras

Comparando estos resultados con los rangos del índice toxicológico de la tabla 8 (Rangos de Índices Toxicológicos); el vertimiento industrial presenta una carga tóxica elevada, a pesar de presentarse una reducción del 93% después de la simulación de un tratamiento físico que se le realizó a la muestra, provocando un impacto ambiental negativo en los ecosistemas acuáticos presentes en el Río Bogotá.

El Índice Toxicológico demuestra que los ensayos de toxicidad son una herramienta eficaz para clasificar las industrias que utilizan en su proceso productivo sustancias de interés sanitario. Siendo esta una herramienta y medida rápida, simple y práctica para la incorporación de este en la legislación colombiana.

5.13. COMPARACIÓN DE RESULTADOS CON OTRAS PRUEBAS DE TOXICIDAD REALIZADOS EN EL EXTERIOR Y EN COLOMBIA.

Para apreciar una relación comparativa entre los resultados encontrados en esta investigación con estudios realizados anteriormente, se presenta en la tabla 23 se muestran los estudios realizados en el exterior y en la tabla 24 los estudios realizados en Colombia, en estas encontramos el organismo prueba que utilizaron, la CL_{48}^{50} que hallaron y los autores:

Tabla 23: Valores comparativos de la CL_{48}^{50} con especies de crustáceos expuestos al mercurio en el exterior

Especie de crustáceo	CL ⁵⁰ µg /l	Tiempo de exposición	Estado	Ambiente	Referencia
<i>Daphnia Pulex</i>	2.2	48	Neonatos	Dulce	Rossini & Romo (1996)
<i>Daphnia Magna</i>	1.5 – 3.2	48	Neonatos	Dulce	Rossini & Romo (1996)
<i>Daphnia magna</i>	9.2	48	Neonato	Dulce	Brkovic – Popovic (1990)

Fuente: Efectos Toxicológicos del mercurio sobre larvas del *Emerita analoga* en Lima Perú. José Alberto Iannacone Oliver/ Lorena Alvaríño Flores

Tabla 24: Valores comparativos de la CL_{48}^{50} con especies de crustáceos expuestos al mercurio en Colombia

Especie de crustáceo	CL ⁵⁰ µg /l	Tiempo de exposición	Estado	Ambiente	Referencia
<i>Daphnia magna</i>	30	48	Neonato	Dulce	Reyes (1996)
<i>Daphnia Magna</i>	9.9	48	Neonatos	Dulce	Rodríguez Aponte (1999)

Fuente: Universidad Nacional; Facultad de Ingeniería; Unidad académica de ambiental y Facultad de Biología; área de investigación

Con se observa en Colombia no se hay registros sobre investigaciones para hallar la concentración letal media del mercurio utilizando un organismo nativo como *Daphnia Pulex*; y si se compara estos resultados con la *Daphnia Magna* con las concentraciones calculadas de la *Daphnia Pulex*, se aprecia que la *Daphnia* nativa presenta mayor sensibilidad al mercurio debido a las características morfológicas de cada especie y a las condiciones fisicoquímicas de los ecosistemas en las ellas se encuentran. Esto se debe a que las branquias de las *Daphnia Pulex* son más permeables y por ende el tóxico entra más rápido y fácil a su cuerpo provocando de manera casi inmediata la muerte del microorganismo. De igual manera, la *Daphnia* nativa habita en aguas blandas siendo más sensitiva que la *Daphnia Magna*, ya que los organismos que residen en esta agua requieren menos tiempo para perder el calcio que se encuentra en los tejidos de los mismos, involucrando así efectos en la resistencia del organismo.

CONCLUSIONES

- Se determinó la concertación letal media (CL_{48}^{50}), del mercurio sobre la *Daphnia Pulex* ($CL_{48}^{50} = 0.113\mu\text{g/l}$), la cual nos ofrece una base para delimitar el rango de toxicidad, indicado los limites de tolerancia (límite inferior: $0.078\mu\text{g/l}$, límite Superior: $0.163\mu\text{g/l}$), al que este organismo puede estar expuesto, buscando de esta forma la protección de la Ictiofauna.
- Se validaron los protocolos para *Daphnia Pulex*, realizado por el grupo de investigación en Bioensayos y las autoras; implementándolos en el laboratorio de toxicología y colocándolos a prueba en esta investigación; teniendo en cuenta que los resultados fueron homogéneos y constantes siendo validas las pruebas toxicológicas, corroborando los datos obtenidos.
- Se determinó que la sensibilidad del cultivo *Daphnia Pulex* al dicromato de Potasio ha cambiado en los últimos diez años, encontrándose más resistente en la actualidad, siendo esto un objeto de investigación mediante la realización de más ensayos, cambiando las condiciones del laboratorio. Si se comparan los datos obtenidos en esta investigación que estuvieron entre un rango de $0.221 - 0.563$ ppm y un promedio 0.394 ppm, con la investigación realizada por la Corporación Autónoma de Cundinamarca (CAR) y el profesor Pedro Miguel Escobar Malaver que oscilaban en un rango $0.038 - 0.1969$ ppm con un valor promedio de 0.117 ppm., la sensibilidad disminuye en un 30%.

- Se realizó el análisis de la muestra ambiental obteniéndose la CL_{48}^{50} , para la muestra filtrada (0.5960% v/m) y no filtrada (0.0398% v/m), demostrando que su efecto tóxico es generado en gran parte por el mercurio, ya que índice toxicológico hallado (muestra filtrada 6.72) y (muestra no filtrada 7.89) presenta una carga tóxica elevada al compararse con los rangos de índices toxicológicos, establecidos por el profesor Pedro Miguel Escobar Malaver, en la tesis titulada “implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando *Daphnia Pulex*, para la evaluación de muestra ambientales” realizada en la corporación tecnológica de Bogotá en 1997, siendo una industria de alto impacto ambiental
- Se confrontaron los resultados de la concentración letal del mercurio (CL_{48}^{50}) las dos especies comúnmente utilizadas en las pruebas de toxicidad que son la *Daphnia Pulex* y *Daphnia Magna*, observándose que la especie Magna es más resistente a los metales, debido a sus características morfológicas y características del ambiente donde habita.
- Basados en los resultados presentados, se considera a la *Daphnia Pulex* como organismo de prueba, siendo herramienta valiosa para la evaluación y clasificación de vertimientos industriales en la realización de un adecuado ordenamiento territorial (sabana de Bogotá y territorio Colombiano). Este método es sensible, rápido y confiable, permitiendo que las entidades reguladoras puedan utilizarlo fácilmente.
- Normalmente el organismos más recomendado en los estándares internacionales para los ensayos de toxicidad aguda es el micro-crustáceo *Daphnia Magna*, pero así como está este organismo de referencia, la formulación del problema ambiental implica la necesidad de buscar especies propias de los ambientes locales expuestos a la contaminación que se pretende evaluar, por lo que la evaluación de los efectos de estos contaminantes sobre los ecosistemas deben realizarse en condiciones propias de los ambiente que se pretende proteger, y con organismos que se encuentren naturalmente en esas condiciones.

RECOMENDACIONES

- Se debe disponer de un área apropiada para crear el laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de La Salle que cuente con las condiciones físicas necesarias para evitar cualquier alteración del ambiente y cualquier tipo de contaminación en las pruebas. Ya que en el desarrollo de esta investigación se presentaron dos mortandades del cultivo por condiciones externas al área del cultivo.
- Es importante seguir llevando a cabo pruebas de toxicidad con organismos nativos de la región, utilizando otras sustancias de interés sanitario, tomándose mas niveles de la cadena trófica, obteniendo así la mayor cantidad de referencias que puedan complementar los datos físico – químicos, para que posteriormente sean aplicados en la creación de normas estatales mas restrictivas en el control de vertimientos y protección de la fauna y flora, asociados con los ecosistemas acuáticos.
- Se requiere determinar la concentración letal media de este metal en toda la cadena trófica presente en ecosistemas acuáticos.
- Se requiere realizar protocolos de los análisis fisicoquímicos que se le debe realizar al agua reconstituida (pH, Dureza, Conductividad, O. D.).
- La determinación de la concentración letal media del mercurio puede conducir a la revisión del parámetro actual en la norma Colombiana, con el objeto de ser modificadas, para garantizar la preservación de la biota acuática, ya que para determinar un parámetro se deben tener en cuenta tanto la caracterización fisicoquímica como el análisis biológico de un ecosistema acuático.

BIBLIOGRAFIA

AGUDELO GALLEGO, Luz Marina; ARENGAS CASTILLA, Ángel Isdrúval; SEPÚLVEDA GALLEGO, Luz Elena. El mercurio, sus implicaciones en la salud y en el ambiente. Universidad de Caldas. Caldas; 2006

ALAPE, Joseph; ESCOBAR MALAVER, Pedro Miguel; LARISSA NIÑO, Claudia; LOPEZ, Camilo; MOJICA, María Lucia; REYES, Carmen; SALAMANCA, Lucy Amparo; SANCHEZ, Hernán. Estudio de evaluación de toxicidad relativa de sustancias tóxicas en vertimientos y cuerpos receptores. Aclimatación y estandarización de bioensayos. Subdirección de manejo y control de Recursos Naturales. Proyecto CAR – BID – Contrato 298–94. Bogotá D. C.;1994

ALBERT, Lilia A. Curso Básico de Toxicología Ambiental. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Mundial de la Salud .Editorial Limusa S. A de C. V. Grupo Noriega Editores. México; 1999

ALBERT, Lilia. Introducción a la toxicología. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Mundial de la Salud .Editorial Limusa S. A de C. V. Grupo Noriega Editores. México; 1997

BUSTOS LOPEZ, Martha Cristina; DIAZ BAEZ, María Consuelo; ESPINOSA RAMIREZ, Adriana Janneth. Pruebas de toxicidad acuática. Fundamentos y métodos. Universidad nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería, sección de Ingeniería Ambiental. Bogotá D.C.; 2004

BRUCE VARELA, Ramón Alejandro. Determinación del nivel de toxicidad aguda del fungicida carbendazim y el herbicida 2,4 d mediante bioensayos con *galaxias maculatus* Universidad Católica de Temuco. 2005; p 9

BULUS ROSSINI, Gustavo Daniel; DÍAZ BAEZ, Maria Consuelo; PICA GRANADOS, Yolanda, Capítulo 5. Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad. http://www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html.2004

CAMPO MARTI, Miguel. Principios de ecotoxicología. Diagnostico tratamiento y gestión del medio ambiente. Mcgraw Hill. Interamericana de España. Barcelona; 2002.

CRUZ TORREZ Luís Eduardo; DIAZ BAEZ, María Consuelo; REYES, Carmen; Ensayos de toxicidad y su aplicación al control de la contaminación industrial; Universidad Nacional; Facultad de Ingeniería.1996. Factores que afectan la toxicidad

Decreto 1594 de 1984 Por el cual se reglamenta parcialmente el título I de la Ley 9 de 1979, así como el capítulo II del título VI - parte III - libro II y el título III de la parte III - libro I - del Decreto 2811 de 1974 en cuanto a usos del agua y residuos líquidos. Junio 26 de 1984. Bogotá D.C.

DUFFUS, John H.; Toxicología Ambiental, Ediciones Omega S.A.; Barcelona, España. 1983.

CRUZ RODRIGUEZ, Blanca Nubia; MATEUS BERMUDEZ, María Fidelía. Manual de Química Aplicada a la Industria - Fase 1: química Inorgánica. Proceso – electrolisis del Cloruro de sodio. Universidad de la Salle; facultad de ciencias de la educación. Departamento de Química y Biología. 1993

ESCOBAR MALAVER, Pedro Miguel. Implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando *Daphnia Pulex* para la evaluación de muestras ambientales. Santafé de Bogotá; 1997

GONZALEZ GOMEZ, Henry Bernardo; GUTIERREZ ALVAREZ, Sandra del Pilar. Clasificación y ciclo de vida de una especie de *Daphnia* nativa de la Sabana de Bogotá, Universidad de la Salle, Facultad de Ciencias de la Educación, Departamento de Química y Biología. Bogotá D.C., 1995.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACION. Gestión ambiental: agua. Guía para la realización de ensayos de toxicidad en organismos acuáticos (Bioensayos). Bogotá: ICONTEC., 2000.

MARCANO, José E. Educación Ambiental; Elemento de ecología; Ecología de las aguas dulces 2° parte; clasificación ecológica de los organismos de agua dulce y comunidades del medio acuático. (Libro en línea), consultado febrero de 2007. Disponible en Internet <<http://www.jmarcano.com/nociones/fresh2.html>>

PALACIO CORDOBA, Darío. Ensayos de toxicidad y su aplicación al control de la contaminación industrial; Universidad Nacional; Facultad de Ingeniería. 1996.

SALDAÑA, Mendioroz. El mercurio. Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC. Cantoblanco. Madrid 2000.

SAMITIER, Josep ; Unidad de Toxicología Experimental y Ecotoxicología (UTOX-PCB). Parc Científic de Barcelona. Universidad de Barcelona (en línea). Disponible en Internet <http://www.pcb.ub.es/homePCB/live/es/p1229.asp>

RICO ORDÁS, José Manuel; MENÉNDEZ VALDERREY, Juan Luís. Asociación ASTURNATURA. COM. En línea. <<http://www.asturnatura.com/articulos/artropodos/branquio.php>>.

VALLEJO ROSERO, María del Carmen. Toxicología Ambiental. Librería Lerner Ltda. Santafé de Bogotá; 1997.

VILLASEÑOR, Carlos; GARCÍA RAMÍREZ, Angel; MARTÍNEZ ALEGRÍA, Julio Cesar; ESPINOSA CRUZ, Benjamín; ARRIAGA CALZADA, Luis Daniel. ACUARIO FLOUNDERS. revista Aquagua de julio de 1999. En línea. <<http://www.perros-purasangre.com.mx/pps19/DAPHNIA0PULEX.html>>

WETZEL, Robert G.. LIMNOLOGIA.España. 1981.

WIKIPEDIA. Mercurio (elemento). Wikipedia: la enciclopedia libre (En Línea). Disponible en Internet :< [http://es.wikipedia.org/wiki/Mercurio_\(elemento\)](http://es.wikipedia.org/wiki/Mercurio_(elemento))>

ANEXO B

REGISTRÓ PARAMETROS DE CONTROL AGUA RECONSTRUIDA

FECHA DE PREPARACION	DUREZA	pH	OD Inicial	OD final	Temperatura
21-06-06	43,04	7.45	5.6	6.2	19°C
11-07-06	42.02	7.32	5.4	6.1	19°C
10-08-06	44.08	7.43	5.73	6.21	19°C
16-08-06	40.08	7.49	5.68	6.06	19°C
25-08-06	40.08	7.31	5.87	6.13	20°C
01-09-06	43.8	7.5	5.56	6.22	20°C
06-09-06	42.08	7.5	5.78	6.22	20°C
02-10-06	41.10	7.4	5.76	6.35	20°C
02-10-06	42.08	7.4	5.74	6.35	20°C
13-10-06	40.08	7.4	5.68	6.24	19°C
17-10-06	44.5	7.3	5.78	6.41	19°C
20-10-06	40.08	7.35	5.56	6.13	19°C
07-11-06	44.02	7.39	5.56	6.13	19°C
10-11-06	42.46	7.4	5.61	6.20	19°C
20-11-06	40.08	7.4	5.83	6.25	19°C
22-11-06	42.8	7.5	5.83	6.25	19°C
06-12-06	44.5	7.3	5.48	6.01	19°C
13-12-06	44.08	7.47	5.45	6.06	18°C
11-01-07	44.08	7.45	5.16	6.09	20.09°C
12-01-07	44.8	7.33	5.34	6.13	21.3°C
12-01-07	44.8	7.5	5.01	6.00	21.2°C
16-01-07	44.8	7.47	5.18	6.04	21.2°C
22-01-07	44.8	7.47	5.40	6.15	18.9°C
24-01-07	40.08	7.51	5.20	6.02	19.2°C
29-01-07	44.8	7.48	5.74	6.14	20°C
31-01-07	44.8	7.4	5.81	6.23	20°C
05-02-07	40.08	7.42	5.56	6.00	19°C
12-02-07	44.8	7.42	5.56	6.00	20.7°C
14-02-07	40.08	7.42	5.46	6.21	20°C
19-02-07	44.8	7.42	4.75	6.00	19°C
23-02-07	40.08	7.42	5.56	6.00	20°C
26-02-07	44.8	7.35	5.47	6.05	19°C
28-02-07	40.08	7.47	5.39	6.24	21°C
02-03-07	40.08	7.51	5.20	6.02	19.2°C
07-03-07	44.5	7.3	5.78	6.41	19°C
07-03-07	44.5	7.38	5.58	6.32	19°C
09-03-07	44.8	7.47	5.18	6.04	21.2°C
09-03-07	40.08	7.42	5.56	6.00	20°C

ANEXO C

REGISTRO DE TEMERATURA EN EL ÁREA DEL MANTENIMIETNO DEL CULTIVO

Fecha	Temperatura
31-07-06 al 4-08-06	20°C
8-08-06 al 11-08-06	19°C
14-08-06 al 18-08-06	20°C
22-08-06 al 25-08-06	20°C
28-08-06 al 1-09-06	21°C
4-09-06 al 8-09-06	20°C
11-09-06 al 15-09-06	20°C
18-09-06 al 22-09-06	21°C
25-09-06 al 29-09-06	20°C
2-10-06 al 6-10-06	20°C
9-10-06 al 13-10-06	21°C
17-10-06 al 20-10-06	20.2°C
23-10-06 al 27-10-06	19.5°C
15-01-07 al 19-01-07	20°C
22-01-07 al 26-01-07	19.5°C
29-01-07 al 2-02-07	20.2°C
5-02-07 al 9-02-07	21°C
12-02-07 al 16-02-07	20°C
20-02-07 al 23-02-07	21°C
26-02-07 al 2-03-07	19°C
5-03-07 al 9-03-07	20°C
12-03-07 al 16-03-07	20°C
19-03-07 al 23-03-07	20°C
Promedio	20.05°C

ANEXO D

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS PRELIMINARES CON DICROMATO DE POTASIO

Octubre 11 de 2006

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
2.0	5	5	5	5	100			
1.5	5	5	5	5	100	4.72	7.2	
1.0	3	4	5	4	80			
0.5	4	5	3	4	80			
0.1	0	0	0	2	10			
Control	1	0	0	0	5			

Noviembre 3 de 2006

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
2.0	5	5	5	5	100			
1.5	5	5	5	5	100	4.72	7.2	
1.0	3	4	5	4	80			
0.5	4	5	3	4	80			
0.1	0	0	0	2	10			
Control	0	0	0	0	0			

Noviembre 09 de 2006

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
2.0	5	5	5	5	100			
1.5	5	5	5	5	100			
1.0	5	5	5	5	100			
0.5	5	5	5	5	100	4.82	7.1	
0.1	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Noviembre 16 de 2006

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
2.0	5	5	5	5	100	4.88	7.2	
1.5	5	5	5	5	100			
1.0	5	5	5	5	100			
0.5	5	5	5	5	100			
0.1	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Noviembre 23 de 2006

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
2.0	5	5	5	5	100			
1.5	5	5	5	5	100			
1.0	5	5	5	5	100	4.85	7.2	
0.5	5	5	5	5	100			
0.1	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Diciembre 15 de 2006

Montaje 1

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
2.0	5	5	5	5	100			
1.5	5	5	5	5	100			
1.0	4	5	3	2	70	4.82	7.1	
0.5	4	3	2	3	60			
0.1	0	1	1	0	10			
Control	0	0	0	0	0			

Diciembre 15 de 2006

Montaje 2

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
2.0	5	5	5	5	100			
1.5	5	5	5	5	100			
1.0	5	5	5	5	100			
0.5	1	2	3	5	55			
0.1	1	1	0	0	10	4.75	7	
Control	0	0	0	0	0			

ANEXO E

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DEFINITIVAS DE LOS ENSAYOS CON DICROMATO DE POTASIO

Enero 15 de 2007

Montaje 1

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	4	5	5	5	95			
0.7	5	4	3	3	75	5.71	7.3	40.08
0.5	3	4	3	2	60			
0.3	3	3	2	3	55			
0.1	1	0	0	0	5			
Control	0	0	0	0	0			

Enero 17 de 2007

Montaje 1

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.7	5	5	5	5	100			
0.5	5	5	5	5	100			
0.3	0	0	0	1	5			
0.1	0	0	0	0	0	4.81	7.32	40.08
Control	0	0	0	0	0			

Enero 19 de 2007

Montaje 2

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.7	5	5	5	5	100			
0.5	5	5	5	5	100			
0.3	0	1	0	0	5	4.95	7.35	40.08
0.1	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Enero 19 de 2007

Montaje 3

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.7	5	5	5	5	100			
0.5	5	5	5	5	100	4.78	7.43	40.08
0.3	0	0	0	0	0			
0.1	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Enero 22 de 2007

Montaje 4

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.7	5	5	5	5	100	4.75	7.3	40.08
0.5	4	5	4	5	90			
0.3	0	0	0	0	0			
0.1	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Enero 24 de 2007

Montaje 5

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100	4.97	7.3	40.08
0.7	5	5	5	5	100			
0.5	5	5	4	5	95			
0.3	0	0	0	0	0			
0.1	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Enero 24 de 2007

Montaje 6

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.7	5	5	5	5	100			
0.5	5	5	5	5	100	4.99	7.32	40.08
0.3	1	0	1	1	15			
0.1	1	0	0	1	10			
Control	0	0	0	0	0			

Enero 29 de 2007

Montaje 7

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100	5	7.31	40.08
0.7	4	4	2	4	75			
0.5	1	1	1	1	20			
0.3	1	1	1	0	15			
0.1	0	1	0	0	5			
Control	0	0	0	0	0			

Enero 31 de 2007

Montaje 1

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.7	5	5	4	4	90	4.40	7.3	40.08
0.5	2	0	0	0	10			
0.3	1	0	0	0	5			
0.1	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Enero 31 de 2007

Montaje 2

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	4	95			
0.7	4	4	5	5	90			
0.5	2	1	0	1	20			
0.3	0	0	0	1	5	4.53	7.33	40.08
0.1	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Febrero 6 de 2007

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.7	4	4	5	5	90			
0.5	3	3	3	4	65			
0.3	0	2	1	2	25			
0.1	0	0	0	0	0	4.62	7.33	40.08
Control	0	0	0	0	0			

Febrero 8 de 2007

Montaje 1

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.7	5	5	5	4	95			
0.5	4	3	4	3	70	4.70	7.3	40.08
0.3	1	1	1	1	20			
0.1	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Febrero 13 de 2007

Montaje 2

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.7	5	4	5	4	90	4.58	7.31	40.08
0.5	4	4	4	3	75			
0.3	2	3	2	2	45			
0.1	1	0	0	0	5			
Control	0	0	0	0	0			

Febrero 15 de 2007

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100	4.79	7.3	40.08
0.7	2	3	5	4	70			
0.5	3	2	2	2	45			
0.3	0	1	0	2	15			
0.1	0	0	1	0	5			
Control	0	0	0	0	0			

Febrero 20 de 2007

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.7	5	5	4	4	90	4.81	7.32	40.08
0.5	4	3	4	4	75			
0.3	3	2	3	2	50			
0.1	0	0	0	1	5			
Control	0	0	0	0	0			

Febrero 22 de 2007

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.7	5	5	5	4	95	4.87	7.32	40.08
0.5	3	4	4	4	75			
0.3	2	1	3	2	40			
0.1	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Febrero 27 de 2007

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.7	3	3	3	4	65			
0.5	3	2	3	2	50	4.9	7.33	40.08
0.3	0	1	0	2	15			
0.1	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Marzo 01 de 2007

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100	5.03	7.3	40.08
0.7	5	5	5	4	95			
0.5	4	3	4	3	70			
0.3	3	2	2	1	40			
0.1	1	0	0	1	10			
Control	0	0	0	0	0			

Marzo 06 de 2007

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.7	5	4	4	5	90	5.07	7.32	44.08
0.5	2	3	3	4	60			
0.3	2	3	1	1	35			
0.1	1	0	0	0	5			
Control	0	0	0	0	0			

Marzo 08 de 2007

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100	4.95	7.3	44.08
0.7	4	4	5	5	90			
0.5	4	3	4	4	75			
0.3	2	0	1	0	15			
0.1	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Marzo 13 de 2007

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.7	5	4	5	5	95			
0.5	3	4	4	3	70			
0.3	3	2	2	3	50	4.98	7.39	40.08
0.1	0	2	0	0	10			
Control	0	0	0	0	0			

Marzo 15 de 2007

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100	4.95	7.3	44.08
0.7	4	5	5	5	95			
0.5	3	3	3	4	65			
0.3	2	2	1	1	30			
0.1	0	0	0	1	5			
Control	0	0	0	0	0			

Marzo 20 de 2007

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.7	5	4	3	5	85			
0.5	4	3	2	3	60	4.99	7.36	44.08
0.3	0	1	1	1	15			
0.1	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Marzo 22 de 2007

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.7	5	4	4	5	90	5.02	7.33	44.08
0.5	4	3	4	3	70			
0.3	2	1	1	2	30			
0.1	0	1	0	1	10			
Control	0	0	0	0	0			

ANEXO F

RESULTADOS DE ENSAYOS PRELIMINARES CON MERCURIO

Enero 23 de 2007

Montaje 1

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
0.15	5	5	5	5	100			
0.1	5	5	5	5	100			
0.05	5	5	5	5	100	5.2	7.1	
0.01	5	5	5	5	100			
0.001	5	5	5	5	100			
Control	0	0	0	0	0			

Enero 23 de 2007

Montaje 2

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
0.15	5	5	5	5	100			
0.1	5	5	5	5	100	5.1	7	
0.05	5	5	5	5	100			
0.01	5	5	5	5	100			
0.001	5	5	5	5	100			
Control	0	0	0	0	0			

Enero 23 de 2007

Montaje 3

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
0.15	5	5	5	5	100			
0.1	5	5	5	5	100			
0.05	5	5	5	5	100			
0.01	5	5	5	5	100			
0.001	5	5	5	5	100	5.0	7	
Control	0	0	0	0	0			

Enero 25 de 2007

Montaje 4

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
0.15	5	5	5	5	100			
0.1	5	5	5	5	100			
0.05	5	5	5	5	100			
0.01	5	5	5	5	100	4.99	7	
0.001	5	5	5	5	100			
Control	0	0	0	0	0			

Enero 30 de 2007

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
0.000020	5	5	5	5	100			
0.000015	5	5	5	5	100	4.99	7	
0.000010	5	5	5	5	100			
0.000005	3	4	4	4	75			
0.000001	1	1	0	0	10			
Control	0	0	0	0	0			

Febrero 1 de 2007

Montaje 1

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
0.15×10^{-4}	5	5	5	5	100			
0.1×10^{-4}	5	5	5	5	100			
0.5×10^{-5}	5	5	5	5	100			
0.1×10^{-5}	3	4	3	2	60			
0.5×10^{-6}	0	1	2	1	20	4.58	7	
Control	0	0	0	0	0			

Febrero 1 de 2007

Montaje 2

Concentración mg/l	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
0.15×10^{-4}	5	5	5	5	100	4.60	7	
0.1×10^{-4}	5	5	5	5	100			
0.5×10^{-5}	3	3	3	4	65			
0.1×10^{-5}	2	1	2	1	30			
0.5×10^{-6}	1	0	0	2	15			
Control	0	0	0	0	0			

ANEXO G

RESULTADOS DE PRUEBAS DEFINITIVAS DE ENSAYOS DE MERCURIO

Febrero 06 de 2007

Montaje 1

Concentración ($\mu\text{g/l}$)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1000×10^{-3}	5	5	5	5	100			
500×10^{-3}	4	5	4	5	90	4.39	7.34	40.08
100×10^{-3}	1	3	2	3	45			
50×10^{-3}	1	0	1	2	20			
10×10^{-3}	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 82.914×10^{-3}

CL50 = 118.078×10^{-3}

Límite superior = 167.157×10^{-3}

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	96.875	5	19.375	60.65	2.77
Dentro de grupos	5.75	18	0.32		
Total	102.625	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

$F_c > F_t$: se rechaza la hipótesis nula

Febrero 08 de 2007

Montaje 2

Concentración ($\mu\text{g/l}$)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	Ph	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1000×10^{-3}	5	5	5	5	100			
500×10^{-3}	4	3	4	5	80			
100×10^{-3}	2	3	2	3	50	4.31	7.37	40.08
50×10^{-3}	1	2	1	2	30			
10×10^{-3}	0	0	0	1	5			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 66.781×10^{-3}

CL50 = 104.745×10^{-3}

Límite superior = 159.098×10^{-3}

ANÁLISIS DE RESULTADOS					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	81.21	5	16.24	61.55	2.77
Dentro de grupos	4.75	18	0.26		
Total	85.96	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

$F_c > F_t$: se rechaza la hipótesis nula

Febrero 13 de 2007

Montaje 3

Concentración (µg/l)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1000 x 10 ⁻³	5	5	5	5	100			
500 x 10 ⁻³	5	5	5	4	95			
100 x 10 ⁻³	2	2	2	2	40			
50 x 10 ⁻³	1	2	0	0	15	4.57	7.39	40.08
10 x 10 ⁻³	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 87.955 x 10⁻³

CL50 = 121.385 x 10⁻³

Límite superior = 171.028 x 10⁻³

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	104.33	5	20.87	107.31	2.77
Dentro de grupos	3.5	18	0.19		
Total	107.83	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula

Febrero 15 de 2007

Montaje 1

Concentración (µg/l)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1000 x 10 ⁻³	5	5	5	5	100			
500 x 10 ⁻³	4	5	4	5	90			
100 x 10 ⁻³	2	3	2	3	50	5.02	7.33	44.08
50 x 10 ⁻³	1	1	1	2	25			
10 x 10 ⁻³	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 73.655 x 10⁻³

CL50 = 105.905 x 10⁻³

Límite superior = 150.798 x 10⁻³

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	95.21	5	19.04	124.64	2.77
Dentro de grupos	2.75	18	0.15		
Total	97.96	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula

Febrero 20 de 2007

Montaje 2

Concentración (µg/l)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1000×10^{-3}	5	5	5	5	100			
500×10^{-3}	4	5	5	5	95	54.57	7.33	40.08
100×10^{-3}	3	1	3	2	45			
50×10^{-3}	1	2	1	1	25			
10×10^{-3}	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 73.812×10^{-3}

CL50 = 104.043×10^{-3}

Límite superior = 146.794×10^{-3}

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	99.71	5	19.94	84.46	2.77
Dentro de grupos	4.25	18	0.24		
Total	103.96	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula

Febrero 22 de 2007

Montaje 1

Concentración (µg/l)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1000×10^{-3}	5	5	5	5	100			
500×10^{-3}	4	4	5	5	80	4.74	7.31	40.08
100×10^{-3}	3	2	2	2	45			
50×10^{-3}	2	1	0	1	20			
10×10^{-3}	1	0	0	0	5			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 73.542×10^{-3}

CL50 = 109.250×10^{-3}

Límite superior = 159.201×10^{-3}

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	92.83	5	18.57	74.24	2.77
Dentro de grupos	4.5	18	0.25		
Total	97.33	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula

Febrero 27 de 2007

Montaje 2

Concentración (µg/l)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1000 x 10 ⁻³	5	5	5	5	100			
500 x 10 ⁻³	4	5	5	5	95			
100 x 10 ⁻³	2	3	1	2	40	5.12	7	
50 x 10 ⁻³	1	0	1	1	15			
10 x 10 ⁻³	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 87.955 x 10⁻³

CL50 = 121.385 x 10⁻³

Límite superior = 171.028 x 10⁻³

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	104.33	5	20.87	107.31	2.77
Dentro de grupos	3.5	18	0.19		
Total	107.83	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula

Marzo 01 de 2007

Montaje 3

Concentración (µg/l)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1000 x 10 ⁻³	5	5	5	5	100			
500 x 10 ⁻³	5	4	3	4	80			
100 x 10 ⁻³	3	2	2	3	50			
50 x 10 ⁻³	1	1	1	1	20	4.95	7	
10 x 10 ⁻³	0	0	1	0	5			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 76.838 x 10⁻³

CL50 = 117.755 x 10⁻³

Límite superior = 176.296 x 10⁻³

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	84.88	5	16.98	81.48	2.77
Dentro de grupos	3.75	18	0.21		
Total	88.63	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula

Marzo 06 de 2007

Montaje 1

Concentración ($\mu\text{g/l}$)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1000×10^{-3}	5	5	5	5	100			
500×10^{-3}	4	5	5	5	95			
100×10^{-3}	3	2	2	2	45	5.04	7	40.48
50×10^{-3}	2	1	0	1	20			
10×10^{-3}	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 78.492×10^{-3}

CL50 = 109.600×10^{-3}

Límite superior = 154.468×10^{-3}

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	101.83	5	20.37	104.74	2.77
Dentro de grupos	3.5	18	0.19		
Total	105.33	23			

H₀: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H₁: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

F_c > F_t: se rechaza la hipótesis nula

Marzo 08 de 2007

Montaje 2

Concentración ($\mu\text{g/l}$)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1000×10^{-3}	5	5	5	5	100			
500×10^{-3}	5	5	5	4	95			
100×10^{-3}	2	2	2	2	40			
50×10^{-3}	1	2	1	1	25	5.01	7	44.08
10×10^{-3}	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 77.789×10^{-3}

CL50 = 109.600×10^{-3}

Límite superior = 154.466×10^{-3}

ANÁLISIS VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	99.83	5	19.97	239.60	2.77
Dentro de grupos	1.5	18	0.08		
Total	101.33	23			

H₀: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H₁: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

F_c > F_t: se rechaza la hipótesis nula

Marzo 13 de 2007

Montaje 1

Concentración ($\mu\text{g/l}$)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1000×10^{-3}	5	5	5	5	100			
500×10^{-3}	4	4	5	5	90	4.92	7	44.08
100×10^{-3}	2	2	2	2	40			
50×10^{-3}	2	1	1	1	25			
10×10^{-3}	0	0	1	0	5			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 72.864×10^{-3}

CL50 = 109.087×10^{-3}

Límite superior = 159.827×10^{-3}

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	90.83	5	18.17	130.80	2.77
Dentro de grupos	2.5	18	0.14		
Total	93.33	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula

Marzo 15 de 2007

Montaje 2

Concentración ($\mu\text{g/l}$)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1000×10^{-3}	5	5	5	5	100			
500×10^{-3}	4	4	5	5	90			
100×10^{-3}	2	2	3	2	45	5.29	7	44.08
50×10^{-3}	1	1	1	1	20			
10×10^{-3}	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 82.914×10^{-3}

CL50 = 118.078×10^{-3}

Límite superior = 167.157×10^{-3}

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	96.88	5	19.38	199.29	2.77
Dentro de grupos	1.75	18	0.10		
Total	98.63	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula

Marzo 20 de 2007

Montaje 3

Concentración (µg/l)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1000 x 10 ⁻³	5	5	5	5	100			
500 x 10 ⁻³	4	4	4	5	85	5.35	7	44.08
100 x 10 ⁻³	3	2	2	2	45			
50 x 10 ⁻³	2	1	1	0	20			
10 x 10 ⁻³	0	0	0	0	0			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 87.418 x 10⁻³

CL50 = 126.148 x 10⁻³

Límite superior = 180.217 x 10⁻³

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	92.33	5	18.47	94.97	2.77
Dentro de grupos	3.5	18	0.19		
Total	95.83	23			

H₀: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H₁: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

F_c > F_t: se rechaza la hipótesis nula

Marzo 22 de 2007

Montaje 1

Concentración (µg/l)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1000 x 10 ⁻³	5	5	5	5	100			
500 x 10 ⁻³	5	4	5	4	90			
100 x 10 ⁻³	2	2	2	2	40	5.0	7	44.08
50 x 10 ⁻³	0	1	1	1	15			
10 x 10 ⁻³	0	0	0	1	5			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 83.417 x 10⁻³

CL50 = 122.133 x 10⁻³

Límite superior = 176.292 x 10⁻³

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	95.33	5	19.07	137.28	2.77
Dentro de grupos	2.5	18	0.14		
Total	97.83	23			

H₀: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H₁: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

F_c > F_t: se rechaza la hipótesis nula

Marzo 22 de 2007

Montaje 2

Concentración (µg/l)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1000 x 10 ⁻³	5	5	5	5	100			
500 x 10 ⁻³	5	5	5	4	95			
100 x 10 ⁻³	2	3	2	2	45			
50 x 10 ⁻³	1	1	1	1	20			
10 x 10 ⁻³	0	0	0	0	0	4.95	7	40.02
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 78.492 x 10⁻³

CL50 = 109.600 x 10⁻³

Límite superior = 154.466 x 10⁻³

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	101.83	5	20.37	244.40	2.77
Dentro de grupos	1.5	18	0.08		
Total	103.33	23			

H₀: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H₁: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

F_c > F_t: se rechaza la hipótesis nula

ANEXO H

RESULTADOS DE ENSAYOS DE LA MUESTRA AMBIENTAL SIN TRATAR

Marzo 22 de 2007

Montaje 1

% Muestra (V/V)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100	5.12	7	44.08
0.5	5	5	5	5	100			
0.1	4	5	4	4	85			
0.05	2	3	3	3	55			
0.01	0	2	2	0	20			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 0.0196

CL50 = 0.0326

Límite superior = 0.0489

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	90.50	5	18.10	59.24	2.77
Dentro de grupos	5.5	18	0.31		
Total	96.00	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula

Marzo 22 de 2007

Montaje 2

% Muestra (V/V)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.5	5	5	5	5	100	5.27	7	44.08
0.1	4	4	4	3	75			
0.05	3	3	3	3	60			
0.01	1	0	2	0	15			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 0.0230

CL50 = 0.0375

Límite superior = 0.0557

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	90.33	5	18.07	92.91	2.77
Dentro de grupos	3.5	18	0.19		
Total	93.83	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula

Marzo 22 de 2007

Montaje 3

% Muestra (V/V)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.5	5	4	5	5	95			
0.1	4	3	4	4	75	5.33	7	44.08
0.05	2	3	2	3	50			
0.01	1	1	1	0	15			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 0.0261

CL50 = 0.0441

Límite superior = 0.0678

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	86.71	5	17.34	96.05	2.77
Dentro de grupos	3.25	18	0.18		
Total	89.96	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula

Marzo 22 de 2007

Montaje 4

% Muestra (V/V)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.5	4	5	5	5	95			
0.1	4	4	4	4	80			
0.05	2	2	2	3	45	5.52	7	44.08
0.01	0	1	2	0	15			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 0.0266

CL50 = 0.0443

Límite superior = 0.0677

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	89.71	5	17.94	75.99	2.77
Dentro de grupos	4.25	18	0.24		
Total	93.96	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula

Marzo 22 de 2007

Montaje 5

% Muestra (V/V)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
1.0	5	5	5	5	100			
0.5	4	5	5	5	95			
0.1	4	5	4	4	85			
0.05	2	3	3	3	55			
0.01	0	1	1	0	10	5.62	7.42	44.08
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 0.0253

CL50 = 0.0409

Límite superior = 0.0610

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	95.38	5	19.08	105.65	2.77
Dentro de grupos	3.25	18	0.18		
Total	98.63	23			

H₀: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H₁: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

F_c > F_t: se rechaza la hipótesis nula

ANEXO I

RESULTADOS DE ENSAYOS DE LA MUESTRA AMBIENTAL TRATADA

Marzo 22 de 2007

Montaje 1

% Muestra (V/V)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
10	5	5	5	5	100	5.12	7	44.08
5.0	5	5	5	5	100			
1.0	4	3	4	3	60			
0.5	1	2	1	0	20			
0.1	0	1	0	1	10			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 0.4663

CL50 = 0.6910

Límite superior = 0.9841

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	104	5	20.80	93.60	2.77
Dentro de grupos	4	18	0.22		
Total	108	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula

Marzo 22 de 2007

Montaje 2

% Muestra (V/V)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
10	5	5	5	5	100			
5.0	5	5	5	5	100			
1.0	5	4	4	3	80	5.43	7	44.08
0.5	3	1	2	1	35			
0.1	0	1	0	0	5			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 0.3860

CL50 = 0.5565

Límite superior = 0.7755

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	105.83	5	21.17	69.27	2.77
Dentro de grupos	5.5	18	0.31		
Total	111.33	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula

Marzo 22 de 2007

Montaje 3

% Muestra (V/V)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
10	5	5	5	5	100			
5.0	5	5	5	4	95			
1.0	4	3	5	2	70			
0.5	2	1	2	1	30	5.47	7	44.08
0.1	0	1	1	0	10			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 0.4146

CL50 = 0.6429

Límite superior = 0.9550

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	94.21	5	18.84	43.76	2.77
Dentro de grupos	7.75	18	0.43		
Total	101.96	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula

Marzo 22 de 2007

Montaje 4

% Muestra (V/V)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
10	5	5	5	5	100	5.17	7	44.08
5.0	5	5	5	5	100			
1.0	4	3	5	4	80			
0.5	3	2	2	1	40			
0.1	0	1	0	0	5			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 0.3629

CL50 = 0.5277

Límite superior = 0.7377

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	104.21	5	20.84	78.98	2.77
Dentro de grupos	4.75	18	0.26		
Total	108.96	23			

Ho: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H1: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

Fc > Ft: se rechaza la hipótesis nula

Marzo 22 de 2007

Montaje 5

% Muestra (V/V)	No. De individuos muertos				Mortalidad (%)	O. D.	pH	Dureza
	R1	R2	R3	R4				
10	5	5	5	5	100			
5.0	5	5	4	5	95			
1.0	4	4	4	4	80			
0.5	2	2	2	2	40	5.47	7	44.08
0.1	1	0	0	0	5			
Control	0	0	0	0	0			

Límite inferior = 0.3702

CL50 = 0.5620

Límite superior = 0.8177

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F calculado	F Teórico
Entre grupos	99.83	5	19.97	239.60	2.77
Dentro de grupos	1.5	18	0.08		
Total	101.33	23			

H₀: Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos

H₁: Las diferentes concentraciones producen un diferente efecto en todos los organismos

F_c > F_t: se rechaza la hipótesis nula

ANEXO A. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO INDUSTRIAL

