

Universidad de La Salle

Ciencia Unisalle

Ingeniería Ambiental y Sanitaria

Facultad de Ingeniería

1-1-2007

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

Juliana Orozco Holguín
Universidad de La Salle, Bogotá

Ángela María Toro Barbier
Universidad de La Salle, Bogotá

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

Citación recomendada

Orozco Holguín, J., & Toro Barbier, Á. M. (2007). Determinación de la concentración letal media(CL50-48) del cromo y el cobre por medio de bioensayos de toxicidad acuática sobre *Daphnia pulex*. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria/328

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 (CL_{48}^{50}) DEL CROMO Y EL
COBRE POR MEDIO DE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD ACUÁTICA SOBRE DAPHNIA
PULEX

JULIANA OROZCO HOLGUÍN
ANGELA MARÍA TORO BARBIER

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y SANITARIA
BOGOTÁ D.C.
2007

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL_{48}^{50}) DEL CROMO Y EL
COBRE POR MEDIO DE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD ACUÁTICA SOBRE DAPHNIA
PULEX

JULIANA OROZCO HOLGUÍN
ANGELA MARÍA TORO BARBIER

TRABAJO DE GRADO

Director
Químico Industrial. Pedro Miguel Escobar Malaver

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y SANITARIA
BOGOTÁ D.C.
2007

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL_{50-48}) DEL CROMO Y EL COBRE POR MEDIO DE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD ACUÁTICA SOBRE DAPHNIA PULEX

Nota de aceptación:

Firma del Director de Tesis

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Bogotá D.C., Noviembre de 2007

BARBIER

JULIANA OROZCO HOLGUÍN - ANGELA MARÍA TORO

*Al ángel que siempre me acompaña porque nunca dejo que mi camino
se oscureciera y me permite alcanzar las alegrías más grandes e
inesperadas.*

*A mis padres por su apoyo y confianza incondicional, porque sin ellos
sería imposible haber alcanzado tanto y poder seguir soñando con un
futuro lleno de satisfacciones.*

*A mi familia porque siempre creyeron en mi y estuvieron ahí para
impulsarme a dar un paso mas.*

A Germán por su confianza y paciencia durante este largo camino.

*A mi mejor amigo, que también es mi novio por recordarme que
siempre debo tener un pie sobre la tierra pero al mismo tiempo soñar
con las cosas más inalcanzables.*

*Y por supuesto a la negra porque sin ella a mi lado todos estos años
este sueño no sería realidad.*

JULIANA

No podría dejar pasar esta ocasión sin agradecerles a todas aquellas personas que hacen parte esencial de mi vida.

A Dios, por darme la oportunidad de de vivir y prestarme la vida para cumplir mis sueños.

A mis padres, por su confianza, apoyo y consejos que me ayudaron a formar y ser lo que gracias a ellos soy hoy.

A mi hermanita, por su paciencia durante todo este camino, las traspasadas juntas, su alegría y ánimo en cada momento.

A mi novio, que es mi apoyo incondicional en la vida, mi amigo y esa fuerza para salir adelante y nunca darme por vencida.

A la negra, por su amistad en todo este tiempo y por que sin ella no se habría realizado este proyecto.

ANGELA MARIA

AGRADECIMIENTOS

Las autoras desean expresar sus agradecimientos a:

Al profesor Pedro Miguel Escobar Malaver, Químico Industrial, director del proyecto de grado, por su colaboración, confianza, paciencia y ayuda durante el desarrollo de este proyecto.

Ing. Camilo Hernando Guáqueta Rodríguez, Decano de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de La Salle, por su apoyo incondicional, entusiasmo y consejos apropiados durante toda la carrera.

Jorge Hernán Otero, por su colaboración, apoyo y guía durante la realización de este proyecto.

Oscar Suárez, Ing. Químico, jefe de planta de la empresa ALFACROM LTDA, por su colaboración y ayuda para llevar a cabo nuestra investigación.

Todos los monitores e integrantes del laboratorio de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, en especial a Oscar Contento por su ayuda, paciencia y colaboración durante este largo camino y estadía en las instalaciones de la universidad.

A los profesores de la Universidad de La Salle, quienes con una disposición generosa, en aras de transmitir todos los conocimientos y velar por que cada uno de los alumnos aprendiéramos sus enseñanzas, han permitido que muchos profesionales sean ejemplo a seguir en el cuidado y la implementación de ideas para la protección del medio ambiente.

Todos nuestros amigos y a las personas que contribuyeron de una u otra manera en el desarrollo de esta investigación.

CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN	21
1. OBJETIVOS.	23
1.1. OBJETIVO GENERAL.	23
1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.	23
2. MARCO TEÓRICO.....	24
2.1. ECOSISTEMAS ACUÁTICOS.....	24
2.1.1. Tipos de ecosistemas acuáticos.	24
2.1.2. Componentes de los ecosistemas acuáticos.....	24
2.1.2.1. Factores bióticos.....	24
2.1.2.2. Factores abióticos.....	25
2.1.3. Clasificación ecológica de los organismos de agua dulce.....	25
2.1.4. Factores que influyen en el medio acuático.....	27
2.1.4.1. Temperatura.	27
2.1.4.2. Iluminación.....	27
2.1.4.3. Gases disueltos.	28
2.1.4.3.1. Oxígeno.....	28
2.1.4.3.2. Anhídrido carbónico.	28
2.1.4.4. Sales minerales.	28
2.1.4.5. pH.....	29
2.2. DAPHNIA PULEX.....	29
2.2.1. Alimentación.	30
2.2.2. Criterio de Selección.....	30
2.2.3. Importancia Ecológica.....	31
2.2.4. Morfología.....	31
2.2.5. Reproducción.....	34
2.2.6. Respiración.....	35
2.2.7. Sistema Circulatorio.....	35
2.2.8. Sistema Excretor.....	35

2.2.9. Sistema Nervioso.....	35
2.2.10. Identificación Taxonómica.	36
2.3. SCENEDESMUS	37
2.4. BIOENSAYOS	38
2.4.1. Ensayos de Respuesta Directa. Bioensayos de toxicidad:.....	39
2.4.1.1. Bioensayos Agudos.....	39
2.4.1.1.1. De tipo estático.	40
2.4.1.1.2. De flujo continuo.	40
2.4.1.2. Bioensayos Crónicos.....	40
2.4.1.3. Bioestimulación.....	40
2.4.1.4. Bioensayos de Repelencia.	40
2.4.1.5. Bioacumulación.	41
2.4.2. Ensayos de Respuesta Indirecta.	41
2.4.2.1. Ensayos Organolépticos.....	41
2.4.2.2. Ensayos de Bioestimulación.....	41
2.4.3. Métodos estadísticos para el análisis de toxicidad.	45
2.4.3.1. Métodos estadísticos.....	47
2.4.3.1.1. Diseño experimental.	47
2.4.3.2. Establecimiento de una relación dosis-respuesta de tipo mortalidad....	48
2.4.3.2.1. Método Probit (paramétrico).	49
2.4.3.2.2. Método de Litchfield-Wilcoxon (gráfico).	49
2.4.3.2.3. Método de Spearman-Kärber (no paramétrico).	49
2.4.3.2.4. Método gráfico.	49
2.4.3.3. Análisis de Varianza (ANOVA).	49
2.5. METALES PESADOS	50
2.5.1. Cobre.....	51
2.5.1.1. Características principales.....	51
2.5.1.2. Efectos del Cobre.	53
2.5.1.2.1. Seres humanos/ mamíferos.....	54
2.5.1.2.2. Plantas.....	54
2.5.1.3. Comportamiento en el medio ambiente.....	55
2.5.1.3.1. Agua.....	55
2.5.1.3.2. Aire.....	55

2.5.1.3.3. Suelo.....	55
2.5.1.3.4. Cadena alimentaria.....	55
2.5.2. Cromo.....	56
2.5.2.1. Características principales.....	56
2.5.2.2. Efectos del Cromo.....	57
2.5.2.2.1. Seres humanos/ mamíferos.....	58
2.5.2.2.2. Plantas.....	58
2.5.2.3. Comportamiento en el medio ambiente.....	59
2.5.2.3.1. Agua.....	59
2.5.2.3.2. Suelo.....	59
2.5.2.3.3. Cadena alimentaria.....	59
2.6. INDUSTRIA GALVANICA.....	60
2.6.1. Galvanoplastia.....	60
2.6.1.1. Desengrase.....	61
2.6.1.2. Decapado.....	62
2.6.1.3. Activado.....	62
2.6.1.4. Sensibilización y activación de la superficie.....	62
2.6.1.5. Post-nucleación.....	62
2.6.1.6. Pre-metalizado.....	62
2.6.1.7. Metalizado.....	63
2.6.1.7.1. Cobrizado.....	63
2.6.1.7.2. Cromado.....	64
2.6.1.8. Abrillantado.....	65
2.6.1.9. Secado.....	66
2.6.2. Galvanoestegia.....	66
2.6.2.1. Talleres de Pulido Y Brillo.....	67
2.6.2.2. Talleres de Servicio De Acabado.....	68
3. INDUSTRIA EVALUADA.....	71
4. METODOLOGÍA.....	76
4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	76

4.2. PREPARACIÓN DEL AGUA RECONSTITUÍDA.	78
4.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CENTRIFUGACIÓN DE ALGAS VERDES, SCENEDESMUS Y CHLORELLA.	80
4.4. ALIMENTACIÓN DE ORGANISMOS PRUEBA.	82
4.5. CAPTURA DE LOS INDIVIDUOS PARA EL ENSAYO.	83
4.6. ACLIMATACIÓN DE LOS ORGANISMOS PRUEBA.	84
4.7. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO DE LOS ORGANISMOS DAPHNIA PULEX.	85
4.7.1. Separación de organismos.	87
4.8. FASE PRUEBAS DE TOXICIDAD.	88
4.8.1. Preparación de soluciones.	88
4.8.2. Montaje de las pruebas de toxicidad (bioensayos).	89
4.8.3. Pruebas de toxicidad de sensibilidad con el tóxico de referencia dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$).	90
4.8.4. Pruebas preliminares de toxicidad con cromo y cobre.	91
4.8.4.1. Pruebas preliminares de toxicidad con cromo.	91
4.8.4.2. Pruebas preliminares de toxicidad con cobre.	91
4.8.5. Pruebas definitivas con cromo y cobre.	91
4.8.5.1. Pruebas definitivas con cromo.	91
4.8.5.2. Pruebas definitivas con cobre.	92
4.8.6. Toma y preservación de muestras ambientales para los ensayos de toxicidad.	92
4.8.7. Análisis fisicoquímicos a los vertimientos.	94
4.8.8. Pruebas definitivas con el vertimiento de cromo y cobre de ALFACROM LTDA.	94
4.9. RESULTADOS FISICOQUÍMICOS FINALES.	95
4.10. OBTENCIÓN DE RESULTADOS.	95
4.11. OBTENCIÓN DEL ÍNDICE TOXICOLÓGICO.	96
4.12. INDICE TOXICOLÓGICO DEL VERTIMIENTO.	96
4.13. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS.	97
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.	99

5.1. ADAPTACIÓN DE LOS ORGANISMOS PRUEBA DAPHNIA PULEX, AL NUEVO GRUPO DE INVESTIGACIÓN.....	99
5.2. PREPARACIÓN DEL AGUA RECONSTITUIDA	99
5.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CENTRIFUGACIÓN DE ALGAS VERDES	101
5.4. ALIMENTACIÓN DE ORGANISMOS PRUEBA	103
5.5. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO DE LOS ORGANISMOS PRUEBA DAPHNIA PULEX.....	106
5.6. PRUEBAS DE TOXICIDAD DE SENSIBILIDAD CON EL TÓXICO DE REFERENCIA DICROMATO DE POTASIO $K_2CR_2O_7$	108
5.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CON EL TOXICO DE REFERENCIA, Y ELABORACIÓN DE LA CARTA DE CONTROL	109
5.8. PRUEBAS DE TOXICIDAD PRELIMINARES CON CROMO Y COBRE	111
5.8.1. Pruebas de toxicidad preliminares con cromo	111
5.8.2. Pruebas de toxicidad preliminares con cobre	112
5.9. ENSAYOS DEFINITIVOS CON CROMO Y COBRE, Y OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CL_{48}^{50} DEL CROMO Y COBRE CON SUS LÍMITES DE CONFIANZA.....	113
5.9.1. Ensayos definitivos de cromo y obtención de la concentración letal media CL_{48}^{50} del cromo con sus límites de confianza	113
5.9.2. Ensayos definitivos con cobre y obtención de la concentración letal media CL_{48}^{50} del cobre con sus límites de confianza	115
5.10. ENSAYOS DEFINITIVOS CON EL VERTIMIENTO DE ALFACROM LTDA, Y OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CL_{48}^{50} DEL CROMO Y COBRE CON SUS LÍMITES DE CONFIANZA	117
5.10.1. Ensayos preliminares con el vertimiento de cromo.	117
5.10.2. Ensayos definitivos con el vertimiento de cromo y obtención de la concentración letal media CL_{48}^{50} del cromo con sus límites de confianza... ..	118
5.10.3. Ensayos preliminares con el vertimiento de cobre.	119

5.10.4. Ensayos definitivos con el vertimiento de cobre y obtención de la concentración letal media CL_{48}^{50} del cobre con sus límites de confianza. ...	120
5.11. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LAS PRUEBAS DEFINITIVAS DEL CROMO Y COBRE Y EL VERTIMIENTO DE ALFACROM LTDA.	122
5.11.1. Análisis de varianza de las pruebas definitivas del cromo ($K_2Cr_2O_7$).	122
5.11.2. Análisis de varianza de las pruebas definitivas del cobre ($CuSO_4.5H_2O$).	123
5.11.3. Análisis de varianza de las pruebas definitivas del vertimiento de cromo.	123
5.11.4. Análisis de varianza de las pruebas definitivas del vertimiento de cobre.	124
5.12. CARACTERIZACIÓN DEL VERTIMIENTO	124
5.12.1. Análisis fisicoquímico del vertimiento.	125
5.13. ALTERNATIVA DE TRATAMIENTO PARA LA REDUCCIÓN DE TOXICIDAD POR CROMO Y COBRE	126
5.13.1. Alternativa de tratamiento para la reducción de toxicidad por cromo.	126
5.13.2. Alternativa de tratamiento para la reducción de toxicidad por cobre	129
5.14. OBTENCION DE LA CARGA TÓXICA E ÍNDICE TOXICOLÓGICO	131
5.14.1. Obtención Carga Tóxica e índice toxicológico de la muestra de cromo... ..	131
5.14.2. Obtención Carga Tóxica e índice toxicológico de la muestra de cobre... ..	132
5.15. COMPARACIÓN DE RESULTADOS CON OTRAS PRUEBAS DE TOXICIDAD REALIZADOS EN EL EXTERIOR Y EN COLOMBIA.	132
5.15.1. Comparación de resultados con otras pruebas de toxicidad por cromo realizadas en el exterior y en Colombia.....	133
5.15.2. Comparación de resultados con otras pruebas de toxicidad por cobre realizadas en el exterior y en Colombia.....	133
CONCLUSIONES	135
RECOMENDACIONES.....	137
BIBLIOGRAFÍA	138
ANEXOS.....	138

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Clasificación de los factores fisicoquímicos de los ecosistemas acuáticos.....	25
Tabla 2. Partes del cuerpo Daphnia Pulex. Hembra.	33
Tabla 3. Diferencia taxonómica entre Daphnia Pulex y Daphnia Obtusa.....	36
Tabla 4. Factores fisicoquímicos que afectan la toxicidad en los microorganismos.	43
Tabla 5. Factores fisicoquímicos que afectan la toxicidad en los bioensayos.	44
Tabla 6. Características generales del cobre.	52
Tabla 7. Características generales del cromo.	56
Tabla 8. Forma de preparación de agua reconstituida.....	78
Tabla 9. Formato de control del agua reconstituida.	79
Tabla 10. Parámetros de control a evaluar en el agua reconstituida.	79
Tabla 11. Preparación del medio Bristol.....	80
Tabla 12. Registro de la Temperatura en el área de mantenimiento del cultivo.	86
Tabla 13. Resumen de las condiciones recomendadas para el mantenimiento de cultivos de Daphnia Pulex.	87
Tabla 14. Rangos de índices toxicológicos.	97
Tabla 15. Volumen de alimento administrado a cada pecera.	106
Tabla 16. Carta de Control de Sensibilidad del cultivo de Daphnia Pulex.	109
Tabla 17. Comparación de resultados de Sensibilidad con Dicromato de Potasio (CL_{48}^{50}).	111
Tabla 18. Resultados preliminares de las concentraciones iniciales de cromo.	112
Tabla 19. Resultados preliminares de las concentraciones iniciales de cromo.	113
Tabla 20. Promedio de la CL_{48}^{50} de cromo	114
Tabla 21. Promedio de la CL_{48}^{50} de cobre.	116
Tabla 22. Rango pruebas definitivas cromo.....	117
Tabla 23. Promedio de la CL_{48}^{50} del Vertimiento de cromo.	118
Tabla 24. Rango pruebas definitivas.....	120

Tabla 25. Promedio de la CL_{48}^{50} del Vertimiento de cobre.	121
Tabla 26. F calculado vs F teórico. Prueba definitiva de cromo.	122
Tabla 27. F calculado vs F teórico. Pruebas definitivas cobre.	123
Tabla 28. F calculado vs F teórico. Vertimiento de cromo.	124
Tabla 29. F calculado vs F teórico. Vertimiento de cromo.	124
Tabla 30. Análisis fisicoquímicos realizados a la muestra de cromo.	125
Tabla 31. Análisis fisicoquímicos realizados a la muestra de cobre.	125
Tabla 32. Análisis fisicoquímicos realizados a la muestra tratada de cromo.	128
Tabla 33. Análisis fisicoquímicos realizados a la muestra tratada de cobre.	130
Tabla 34. Valores comparativos de la CL_{48}^{50} con especies de Daphnias expuestos al cromo Cr^{+6} en el exterior.	133
Tabla 35. Valores comparativos de la CL_{48}^{50} con especies de Daphnias expuestos al cromo en Colombia.	133
Tabla 36. Valores comparativos de la CL_{48}^{50} con especies de Daphnias expuestos al cobre en el exterior.	133
Tabla 37. Valores comparativos de la CL_{48}^{50} con especies de Daphnias expuestos al cobre Cu^{+2} en Colombia.	134

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Clasificación ecológica de los organismos de agua dulce	26
Figura 2. Diferencia entre la Daphnia Pulex Macho y Hembra.	31
Figura 3. Partes del cuerpo de la Daphnia Pulex. Hembra.	33
Figura 4. Scenedesmus	37
Figura 5. Ensayos de toxicidad.	42
Figura 6. Determinación de CL_{50} para pruebas de toxicidad aguda con múltiples concentraciones.	48
Figura 7. Cobre.	53
Figura 8. Cromo.	57
Figura 9. Traslado de iones metálicos desde un ánodo a un cátodo.	61
Figura 10. Molde de las piezas de galvanotecnia	61
Figura 11. Pieza después del cobrizado.	63
Figura 12. Diagrama de flujo de un proceso de cobrizado alcalino.....	64
Figura 13. Pieza de cromado brillante.....	64
Figura 14. Diagrama de un proceso de Cromado.	65
Figura 15. Diagrama de flujo del proceso de galvanoplastia.....	66
Figura 16. Diagrama de flujo de las etapas de taller de pulido y brillo en Galvanoestegia	68
Figura 17. Diagrama de flujo de las etapas de taller de acabado en Galvanoestegia	70
Figura 18. Localización de ALFACROM LTDA	71
Figura 19. Gancheras.....	72
Figura 20. Diagrama de flujo de la PTAR, Alfacrom LTDA.	73
Figura 21. PTAR, Alfacrom LTDA. Reactores de oxidación de cianuros	74
Figura 22. PTAR, Alfacrom LTDA. Sedimentador.....	74
Figura 23. PTAR, Alfacrom LTDA. Filtros de carbón activado	74
Figura 24. PTAR, Alfacrom LTDA. Tolla de lodos y secado de lodos.	75

Figura 25. Montaje de pruebas de toxicidad.	77
Figura 26. Montaje medio Bristol para algas verdes	81
Figura 27. Cámara de Neubauer.....	83
Figura 28. Mantenimiento de cultivos de Daphnia pulex.....	85
Figura 29. Separación y mantenimiento de organismos prueba.....	86
Figura 30. Temporizador.	87
Figura 31. Lectura de organismos muertos.....	89
Figura 32. Toma de las muestras. Cromo.....	93
Figura 33. Toma de las muestras. Cobre.....	93
Figura 34. Metodología para la determinación de la concentración letal media.	98
Figura 35. Montaje de los acuarios y preparación del agua de dureza.....	100
Figura 36. Medio Bristol inicial y final.	101
Figura 37. Medio Bristol listo para centrifugación.....	102
Figura 38. Centrifuga.....	102
Figura 39. Retiro del sobrenadante.....	102
Figura 40. Diferencia de tubos de ensayo antes y después de la centrifugación.	103
Figura 41. Extracción de las algas del tubo de ensayo y almacenamiento.....	103
Figura 42. Laboratorio de bioensayos dentro del Laboratorio de Ingeniería Ambiental y Sanitaria.	107
Figura 43. Laboratorio exclusivo para bioensayos.....	107
Figura 44. Área del mantenimiento del cultivo de Daphnia Pulex.....	108
Figura 45. Montaje de Pruebas de toxicidad con Dicromato de Potasio.....	108
Figura 46. Muestras ambientales.	125
Figura 47. Precipitación química.	126
Figura 48. Precipitación química del cromo. Tess de Jarras.....	127
Figura 49. Precipitación química del cromo. Inicio de la Precipitación.....	127
Figura 50. Precipitación química del cromo. Filtración.....	128
Figura 51. Precipitación química del cromo. Sólidos Sedimentables.....	129
Figura 52. Precipitación química del cobre. Tess de Jarras.....	129
Figura 53. Precipitación química del cobre. Inicio de la Precipitación.....	130
Figura 54. Precipitación química del cromo. Filtración.....	130

LISTA DE GRAFICAS

	Pag.
Grafica 1. Sensibilidad del cultivo al toxico de referencia.	110
Grafica 2. Concentración Letal media (CL_{48}^{50}) de cobre.....	116
Grafica 3. Concentración Letal media (CL_{48}^{50}) del vertimiento de cromo.	119
Grafica 4. Concentración Letal media (CL_{48}^{50}) del vertimiento de cobre.	121

GLOSARIO

ACLIMATACIÓN: adaptación de un organismo de prueba a diversas condiciones ambientales, tales como temperatura luz o diferentes cantidades de agua.

AGUA RECONSTITUIDA: agua preparada con reactivos establecidos, con el fin de generar las condiciones ambientales presentes en los ecosistemas en los cultivos mantenidos en el laboratorio.

AGUDO: que ocurre dentro de un periodo corto (minutos, horas o algunos días) en relación con el periodo de vida del organismo de ensayo.

CADENA TRÓFICA: también llamada cadena alimentaria, es la corriente de energía y nutrientes que se establece entre las distintas especies de un ecosistema en relación con su alimentación.

CONCENTRACIÓN: cantidad de sustancia aplicada al medio.

CONCENTRACIÓN LETAL (CL): es la concentración de tóxico estimada que produce la muerte de una proporción específica de los organismos de prueba. Se define como la concentración letal media (CL_{50}), que corresponde a la concertación que mata al 50% de los organismos expuestos en un determinado periodo de tiempo.

CONTAMINANTE: sustancia introducida en el ambiente por actividades humanas, que produce efectos adversos sobre organismos individuales vivos y en el ecosistema.

DOSIS: cantidad de sustancia administrada, expresada en términos de: unidad/peso corporal.

ECOSISTEMA ACUÁTICO: es la unidad funcional básica de interacción de los organismos vivos entre sí y de estos con el ambiente acuático en un espacio y tiempo determinado.

EFECTO: cambio biológico, tanto en organismos individuales como a niveles superiores de organización; se relaciona con la exposición a un xenobiótico.

ENSAYO DE TOXICIDAD: determinación del efecto de un material o mezcla sobre un grupo de organismos seleccionados bajo condiciones definidas. Mide las proporciones de organismos afectados (efecto cuantal) o el grado de efecto (graduado) luego de la exposición a la muestra.

ENSAYO PRELIMINAR (Screening): prueba para determinarse si se produce un impacto. Estas pruebas se diseñan utilizando una concentración, múltiples replicas y una exposición de 24 a 96 horas.

ENSAYO DEFINITIVO: prueba diseñada para establecer la concentración a la cual se presenta el efecto final establecido. Los periodos de exposición son mayores que las pruebas preliminares y las de intervalo, se utilizan múltiples concentraciones a estrechos intervalos y múltiples réplicas.

NUTRIENTE: elemento requerido para el crecimiento de los organismos.

TIEMPO DE EXPOSICIÓN: tiempo de contacto de los organismos de prueba con la solución estudiada.

TOLERANCIA: es la habilidad de un organismo a tolerar una condición dada por un periodo de tiempo prolongado de exposición, sin que muera.

TOXICIDAD: es la capacidad de una sustancia para causar algún efecto nocivo sobre un organismo vivo. Se debe hacer referencia a la cantidad administrada o absorbida (dosis o concentración), la vía (inhalación, ingestión, inyección, etc), distribución en el tiempo

(dosis simple, múltiple), naturaleza y severidad del daño producido y el tiempo necesario para producir el efecto.

TÓXICO: agente capaz de producir un efecto adverso, dañando la estructura y el funcionamiento del ecosistema.

XENOBIÓTICO: compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el hombre en el laboratorio.

ZONA LIMNÉTICA: Corresponde a la zona de las aguas abiertas que se extienden hasta la profundidad donde se alcanza el nivel de compensación, es decir donde la fotosíntesis equilibra a la respiración. Por debajo de este nivel, y debido a la escasez de radiación solar, hay déficit de productividad. Naturalmente esta zona se presenta en los lagos de profundidad considerable.

INTRODUCCIÓN

La actividad humana produce gran variedad de desechos que son liberados a los ambientes terrestres, aéreos y acuáticos. La introducción de un determinado desecho antropogénico puede generar desequilibrios en un ecosistema que conduzcan a su deterioro. Los sistemas naturales poseen la capacidad de soportar alteraciones debidas a la presencia de agentes foráneos mediante los procesos internos de autodepuración. El deterioro de un ecosistema se produce cuando la cantidad y calidad de los desechos introducidos superan su capacidad de recuperación (TORTORELLI, 1990). Adicionalmente de los problemas que se presentan en los diversos ecosistemas, la introducción de tóxicos al ambiente también afecta la salud del hombre, su calidad de vida y genera problemas genéticos.

El uso de bioensayos para la evaluación de toxicidad de sustancias liberadas al medio, son herramientas ampliamente utilizadas en el campo de la ecotoxicología a nivel mundial para conocer los efectos en los diferentes ecosistemas, frente a la presencia de sustancias altamente tóxicas. Estos han sido estandarizados por organizaciones internacionales de regulación y control como lo son: CEE, ASTM, ISO, WHO, CETESB.

En Colombia el decreto 1594 de 1984, da a conocer aquellas entidades encargadas de realizar los Bioensayos o pruebas de toxicidad para establecer los valores de la concentración letal (CL_{50}), que afectan la calidad del recurso hídrico en cuanto al uso, para preservación de flora y fauna. Actualmente en el País las entidades encargadas de la realización de las pruebas de toxicidad no las han implementado de manera continua con todas las sustancias clasificadas como potencialmente peligrosas en este decreto (sustancias de interés sanitario).

Para minimizar el riesgo de los vertimientos, es obligación de todas las industrias 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.

El siguiente documento muestra la investigación realizada durante el 2007, para hallar la concentración letal media del cromo y cobre en *Daphnia Pulex*, consta de cinco capítulos conformados por: *los objetivos, el marco teórico*, en el cual se encuentra información sobre los ecosistemas acuáticos, la *Daphnia Pulex*, los bioensayos de toxicidad, entre otros, *la industria evaluada, la metodología* seguida durante la elaboración del proyecto, *los análisis y resultados* obtenidos de la investigación, sus *conclusiones y recomendaciones*.

También se encuentra un glosario con la terminología específica que permite entender el documento y las fuentes bibliográficas que fueron consultadas para la elaboración del texto.

1. OBJETIVOS.

1.1. OBJETIVO GENERAL.

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

1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Determinar la concentración letal media CL_{48}^{50} del cromo sobre organismos acuáticos del genero *Daphnia*, utilizando los protocolos internacionales.

Determinar la concentración letal media CL_{48}^{50} del cobre sobre organismos acuáticos del genero *Daphnia*, utilizando los protocolos internacionales.

Determinar la sensibilidad de los organismos mediante la utilización de Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$).

Obtener la CL_{48}^{50} de una industria de galvanotecnia en la que se encuentre presente el cromo y el cobre en sus vertimientos.

Determinar y probar a nivel laboratorio, una alternativa de tratamiento para la reducción de toxicidad por cromo y cobre presente en los vertimientos de la industria de galvanotecnia.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ECOSISTEMAS ACUÁTICOS

Los ecosistemas acuáticos son sistemas termodinámicamente abiertos que reciben del exterior (sol, materia orgánica) y las transmiten a los ecosistemas vecinos a través de los flujos de materias o los movimientos de individuos (migraciones). Los organismos de una comunidad y los factores abióticos asociados con los que están en interacción se encuentran en continuo intercambio con las numerosas plantas e insectos que mantiene y que forman la base de las cadenas tróficas. Pueden considerarse entre los más importantes de la naturaleza y su existencia depende totalmente del régimen que tengan.

2.1.1. Tipos de ecosistemas acuáticos.¹

Partiendo del movimiento del agua, se acuerda una división de los ecosistemas de agua dulce. Esta división tiene relevancia tanto para estudiar la naturaleza como para la explotación y gestión de las aguas interiores.

Ecosistema léntico: es de agua quieta o de escaso caudal como en los lagos, estanques, pantanos y embalses.

Ecosistema lótico (latín lotus: participio de lavere, lavar): sistema de agua corriente como en los ríos, arroyos y manantiales.

Ecosistema de humedal: áreas donde el suelo está saturado de agua o inundado por una parte del año.

2.1.2. Componentes de los ecosistemas acuáticos.

2.1.2.1. Factores bióticos.

Son los componentes de un ecosistema que poseen vida y que permiten el desarrollo de la misma. En general los factores bióticos son los seres vivos; como: animales, plantas, hongos, bacterias, etc.

¹ 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 junio de 2007. Disponible en Internet <http://www.jmarcano.com/nociones/fresh2.html>

2.1.2.2. Factores abióticos.

Son los componentes de un ecosistema que no requieren de la acción de los seres vivos, o que no poseen vida, es decir, no realizan funciones vitales dentro de sus estructuras orgánicas. Los factores fisicoquímicos se clasifican en:

Tabla 1. Clasificación de los factores fisicoquímicos de los ecosistemas acuáticos.

FACTORES ABIÓTICOS QUÍMICOS	FACTORES ABIÓTICOS FÍSICOS
pH	Lluvias
Composición del agua	Intensidad de la luz solar
Sustancias químicas	Temperatura

Fuente: BASTARDO, Milagros y LONGAR, Jesús E. Ecosistema y Contaminación ambiental. Universidad de Oriente. Venezuela (documento en línea). Disponible en Internet: <http://www.monografias.com/trabajos16/ecosistema-contaminacion/ecosistema-contaminacion.shtml>

2.1.3. Clasificación ecológica de los organismos de agua dulce².

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 trasladan a merced de los movimientos de las masas de agua o de las corrientes. Generalmente son organismos pequeños, la mayoría microscópicos. El plancton compuesto por vegetales recibe el nombre de fitoplancton y el que está formado por animales se denomina zooplancton.

El fitoplancton representa el primer eslabón de la cadena alimenticia; junto con las plantas superiores que habitan las aguas dulces, constituyen los organismos productores. La mayoría de los organismos que pertenecen al zooplancton se alimentan de otros animales más pequeños. El zooplancton está compuesto, desde el punto de vista trófico, por consumidores primarios o herbívoros y consumidores secundarios.

- Necton.

Son organismos capaces de nadar libremente y, por tanto, de trasladarse de un lugar a otro recorriendo a veces grandes distancias (migraciones). En las aguas dulces, los

²Ibid.,p.1.

peces son los principales representantes de esta clase, aunque también encontramos algunas especies de anfibios y otros grupos. 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.

- Bentos.

Comprende los organismos que viven en el fondo o fijos a él y por tanto dependen de éste para su existencia. La mayoría de los organismos que forman los bentos son invertebrados. Las comunidades de bentos se caracterizan por ser muy ricas en especies y formas. La zonificación de los lagos presenta problemas, ya que su delimitación resulta en algunos casos muy artificial y poco clara. La variedad de lagos y lagunas que existen en cuanto a profundidad y extensión hace muy difícil generalizar la zonificación.

- Neuston.

A este grupo pertenecen los organismos que nadan o "caminan" sobre la superficie del agua. La mayoría son insectos. En la superficie de las aguas dulces, principalmente en aguas lénticas o estancadas, viven o se trasladan por la película superficial algunas especies, principalmente de especies, entre los cuales se encuentran los escarabajos (Coleópteros), arácnidos, entre otros.

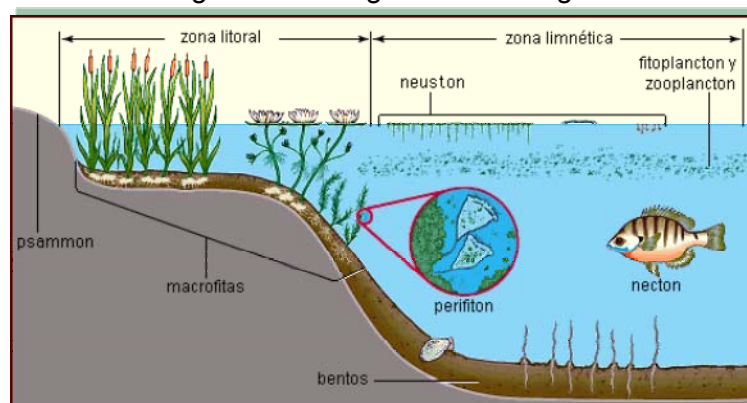
- Seston.

Es un término adoptado recientemente y se aplica a la mezcla heterogénea de organismos vivos y no vivos que flotan sobre las aguas.

- Perifiton.

Organismos vegetales y animales que se adhieren a los tallos y hojas de plantas con raíces fijas en los fondos.

Figura 1. Clasificación ecológica de los organismos de agua dulce



Fuente: 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 junio de 2007. Disponible en Internet <http://www.jmarcano.com/nociones/fresh2.html>

2.1.4. Factores que influyen en el medio acuático.

Existen diversos factores que determinan las condiciones ecológicas del medio dulceacuícola.

2.1.4.1. Temperatura³.

Es tal vez el factor que más influencia tiene en los lagos, pues determina la densidad, viscosidad y movimiento del agua. La temperatura juega un papel importante en la distribución, periodicidad y reproducción de los organismos.

2.1.4.2. Iluminación⁴.

La radiación solar penetra en las aguas, hasta determinadas profundidades, dependiendo de los materiales que se encuentran en suspensión y del ángulo de incidencia del rayo luminoso. La luz es indispensable para la fotosíntesis que realizan las plantas acuáticas, especialmente el fitoplancton. Parte de la luz que penetra en el agua es absorbida selectivamente, es decir, determinadas longitudes de onda penetran más profundamente que otras. Una parte de la luz es desviada o sufre fenómenos de reflexión. Por tanto, las condiciones ópticas de las aguas son de importancia primordial para la productividad biológica y para el mantenimiento de la vida.

Una de las propiedades ópticas del agua que influye en la penetración de la luz es la *transparencia*. Si existen muchos materiales en suspensión, la penetración de la luz será menor; esto puede constituir un factor limitante para el desarrollo de los organismos vivos. Si la turbidez del agua proviene de la concentración de los seres vivos, la productividad es mayor. Las diferencias de transparencia en las aguas dulces varían mucho, siendo mayor en los riachuelos de montañas y menor en las aguas de un río que recoja las aguas de zonas desprovistas de vegetación.

³ Ibid.,p.1.

⁴ Ibid.,p.1.

2.1.4.3. Gases disueltos⁵.

El oxígeno y el anhídrido carbónico disueltos en el agua son los dos gases de mayor importancia. Tanto la concentración de oxígeno como la del anhídrido carbónico constituyen con frecuencia factores limitantes.

2.1.4.3.1. Oxígeno.

El oxígeno disuelto en el agua proviene de la fotosíntesis que realizan los vegetales con clorofila. Como esta actividad fotosintética es mayor en las capas superiores bien iluminadas, su concentración será mayor a este nivel. En los niveles próximos al fondo, su concentración es mínima debido a los procesos de oxidación de la materia orgánica.

2.1.4.3.2. Anhídrido carbónico.

El anhídrido carbónico es un gas que se combina con el agua para formar ácido carbónico. Proviene de la atmósfera y de la actividad respiratoria de los organismos. Su concentración en el agua es variable; cuando es alta, puede constituir un factor limitante para los animales, ya que en estos casos suele ir asociado a concentraciones bajas de oxígeno. El anhídrido carbónico tiene relación con el pH del medio acuático e interviene en la formación de los esqueletos, carapachos y conchas de muchos invertebrados.

2.1.4.4. Sales minerales⁶.

En las aguas dulces las sales minerales más abundantes son los carbonatos, los sulfatos y los cloruros. Los cationes de mayor importancia son el calcio (64%), el magnesio (17%), el sodio (16%) y el potasio (3%).

El calcio juega un papel fundamental, ya que determina dos diferentes tipos de agua: *aguas duras*, cuando la concentración de calcio es inferior a 25 mg por litro; b) *aguas blandas*, cuando la concentración de calcio es inferior a 9 mg por litro. Muchos moluscos, crustáceos y otros invertebrados, tienen necesidad de calcio para formar sus caparazones o conchas y por tanto puede ser factor limitante para algunas especies.

⁵ Ibid., p.1.

⁶ Ibid., p.1.

La concentración de sales minerales en las aguas dulces, tienen relación con los procesos de osmorregulación de los seres vivos. Estos, presentan en muchos casos mecanismos de regulación de la presión osmótica, lo cual les permite subsistir en medio de diferente concentración a la del medio interno.

2.1.4.5. pH⁷.

El agua está disociada en iones H⁺ y OH⁻. Las sales minerales disueltas en el agua se disocian en iones positivos y esta ionización varía de unos compuestos a otros. Hay organismos que viven en aguas con un pH ácido; otros viven en medios acuáticos alcalinos. Las aguas dulces tienen el pH entre 6.5 y 8.7; las aguas marinas entre 8 y 8.5.

2.2. DAPHNIA PULEX

Se trata de micro-crustáceos de agua dulce que habitan en aguas estancadas o de movimiento muy ligero, como estanques, acequias, humedales, lagos y lagunas; en los diferentes continentes. También ha sido localizada en las proximidades de lagos y lagunas de agua salobre. Por su particular forma de natación, por medio de saltos rápidos y bruscos, se las conoce como "Pulgas de Agua".

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

- Filum: Artropoda
- Clase: Crustácea
- Subclase: Branchiopoda
- Orden: Anomopoda
- Suborden: Cladócera
- Familia: Daphniidae
- Género Daphnia
- Subgéneros:
 - Daphnia
 - Ctenodaphnia

⁷ Ibid.,p.1.

- Hyalodaphnia

2.2.1. Alimentación.

Son normalmente fitófagos, alimentándose por filtración. Filtran continuamente el agua en la cual viven, deteniendo las partículas suspendidas en ésta a través sedas situados en los apéndices torácicos; el tamaño promedio de las partículas ingeridas se sitúa entre 0,5 y 50 μm . Mediante diversos mecanismos de gran complejidad, las corrientes de alimento pasan al interior de una cámara sencilla precedente de la dirección anteroventral; esta cámara está cerrada dorsalmente por la pared del cuerpo, lateralmente por las valvas y los cinco pares del tronco y centralmente por el tercer y cuarto par de los mismos cuando se encuentran juntos (Bosch 1974, citado por Matuk 1996).

El primer y segundo par de apéndices crean una corriente de agua y así, un movimiento de partículas suspendidas; el quinto par se encarga de la succión del agua, mientras el tercer y cuarto par realiza la filtración de las partículas (Bosch y Gonzalez 1974, citado por Matuk 1996).

2.2.2. Criterio de Selección.

El género *Daphnia* es utilizado extensivamente en pruebas de toxicidad, permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, entre otros.

Es importante a la hora de selección tener en cuenta los períodos de aclimatación en el laboratorio, los ciclos de vida de los organismos, los requerimientos del cultivo, los cuidados a la hora de la manipulación, que no sufran daños, que se encuentren sanos y que sean de edad o tamaño uniformes, entre otros. Por esto, algunas razones para seleccionar este organismo fueron:

- Conocimiento previo de la biología de la especie (comportamiento, hábitos alimenticios, ciclo de vida, reproducción y desarrollo, etc).
- Es un representante importante de la comunidad zooplanctónica.

- Son fáciles de encontrar, en número suficiente y se recolectan sin dificultad en los humedales de la ciudad.
- Presentan sensibilidad muy alta a cualquier tipo de tóxico.
- Son fáciles de criar y manipular en el laboratorio, dado su tamaño suficientemente pequeño, no ocupan mucho espacio.
- Su reproducción es de forma partenogenética, lo que asegura la uniformidad de respuesta a determinadas condiciones ambientales.
- Por su ciclo de vida corto y su tasa de renovación alta.
- Los costos de cultivo y mantenimiento son bajos.
- Es fácil comparar los resultados obtenidos con trabajos realizados en diferentes partes, dada la gran utilización de estos microorganismos por diferentes entidades ambientales y laboratorios.
- Los ensayos proporcionando resultados que ofrecen una alta protección al resto de la cadena trófica, ya que la *Daphnia* se encuentra en un gran número de cuerpos de agua y su cambio o alteración significa un desequilibrio grave en la cadena trófica.

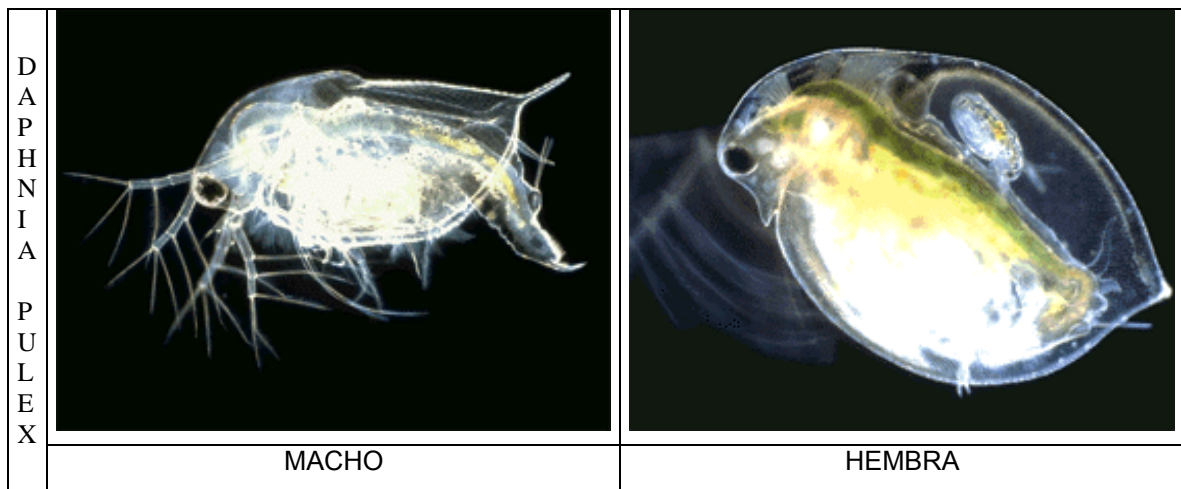
2.2.3. Importancia Ecológica.

La *Daphnia Pulex* es de gran importancia en la cadena alimenticia acuática, pues este es un animal planctónico altamente sensible, que se alimenta de organismos más pequeños y algas; y a su vez sirve de alimento para peces, insectos, hydras, entre otros. Una alteración en el ecosistema o algún efecto en ellas, causará un gran desequilibrio en la cadena trófica del ecosistema.

2.2.4. Morfología.

Estos organismos de tamaño que varía entre 0.2 y 3.0 mm, se caracterizan por poseer un cuerpo comprimido lateralmente y ovalado; no se distinguen segmentos como en otros crustáceos. Presentan dimorfismo sexual marcado, la hembra es más grande que el macho.

Figura 2. Diferencia entre la *Daphnia Pulex* Macho y Hembra.



Fuente: TORRENTERA BLANCO, Laura y TACON, Albert G.J. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis. VI Cultivo de micro crustáceos de agua dulce. FAO. Brasil Abril, 1989 (proyecto en línea). Disponible en Internet: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB473S06.htm#chVI>

Presentan un caparazón de quitina transparente, las antenas o apéndices con numerosas setas que usa para nadar; ojos compuestos y simples (ojo nauplio). En la parte dorsal del cuerpo de la hembra entre el caparazón y la pared del cuerpo se encuentra una cavidad, la cámara de incubación, donde se desarrollan los huevos y posteriormente las crías. En la parte central del cuerpo se localiza el tubo digestivo que recorre el cuerpo desde la parte anterior (boca) hasta la parte posterior (ano). El intestino medio mas o menos tubular y no se diferencia fácilmente de las otras partes del aparato digestivo (Carvalho 1987; Ortiz 1987, citado por Matuk 1996).

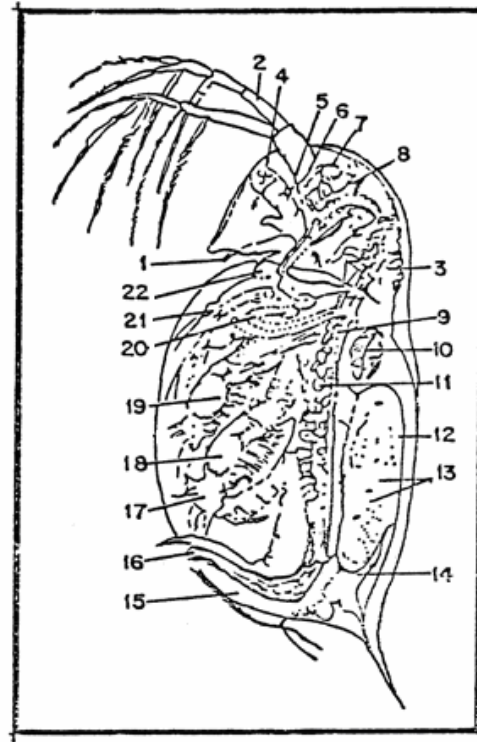
En la parte dorsal por arriba de la cámara de incubación, se localiza el corazón, el cual es un pequeño saco globuloso con solamente 2 aberturas (ostila). La velocidad de contracción del músculo cardiaco es de 240 a 450 pulsaciones por minuto (Gardiner 1978, Ortiz 1987). La variación en latidos del corazón refleja un incremento o disminución del metabolismo. La hemolinfa es de color roja. (Pennak 1978, citado por Matuk 1996)

El aparato excretor se puede decir que posee una glándula maxilar bien desarrollada y queda dentro del engrosamiento del borde de las valvas, hacia el extremo anterior (Universidad Jorge Tadeo Lozano, Weeb 1989, citado por Matuk 1996).

Una cavidad embrionica con huevos y embriones situados en la parte dorsal, entre el carapacho y el dorso del cuerpo. Para la identificación de especies son importantes los apéndices torácicos en la forma y número de espinas y setas.

Una de las características anatómicas más destacadas de las pulgas de agua es que la mayor parte de su cuerpo está rodeado por una concha o caparazón, que en realidad es como su esqueleto externo. Periódicamente cambian de caparazón para poder crecer y expandirse, antes de que la siguiente capa pueda endurecerse.

Figura 3. Partes del cuerpo de la Daphnia Pulex. Hembra.



Fuente: TORRENTERA BLANCO, Laura y TACON, Albert G.J. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis. VI Cultivo de micro crustáceos de agua dulce. FAO. Brasil Abril, 1989 (proyecto en línea). Disponible en Internet: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB473S06.htm#chVI>

Tabla 2. Partes del cuerpo Daphnia Pulex. Hembra.

1.	Antenula	12.	Cámara embrionaria
2.	Antena	13.	Embrios
3.	Músculos de las antenas	14.	Procesos abdominales
4.	Ojos compuestos	15.	Post-abdomen
5.	Ganglio óptico	16.	Ano
6.	Músculo del ojo	17.	Huevo torácico
7.	Cerebro	18.	Saco respiratorio

8.	Procesos hepáticos	19.	Seta filtradora
9.	Intestino	20.	Glándula maxilar
10.	Corazón	21.	Primer par de apéndices
11.	Ovario	22.	Mandíbula

Fuente: TORRENTERA BLANCO, Laura y TACON, Albert G.J. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis. VI Cultivo de micro crustáceos de agua dulce. FAO. Brasil Abril, 1989 (proyecto en línea). Disponible en Internet: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB473S06.htm#chVI>

2.2.5. Reproducción.

La daphnia tiene dos maneras distintas de reproducción: Una asexual y otra sexual. *La asexual* se produce por partenogénesis (Parthenos=Virgen) y las poblaciones ordinariamente están constituidas íntegramente de hembras que, según la edad y el tipo de alimentación, puede llegar a dar entre 5-6 hasta los 100 ejemplares. Si la ingesta sólo es suficiente para balancear los requerimientos energéticos de ellas, no habrá producción de huevos.

A partir del quinto estadio producen una nueva camada después de cada muda. Los huevos se depositan y desarrollan dentro de la cámara de cría; de aquí las crías se liberan como versiones en miniatura de los adultos.

En la reproducción *sexual* la hembra produce óvulos que luego de ser fertilizados por el macho, se alojan en el epifio (saco que soporta los huevos) y estos son llamados epifidos. La producción de estos huevos se debe a la sabiduría de la Naturaleza, ya que de esta manera se asegura la subsistencia de la especie cuando las condiciones de vida no son favorables. Un ejemplo es en casos de sequía relativamente prolongada, los huevos depositados por la hembra son resistentes a la sequía y quedan enterrados en el fango o en la superficie del terreno cuando el agua se evapora. En algunos casos el viento se encarga de dispersar esos huevos, razón por la cual al llegar las lluvias son arrastrados hacia las depresiones del terreno donde se forman charcos más estables y con las condiciones necesarias para la vida. Estos huevos pueden ser mantenidos por más de 50 años.

En todas las especies de *Daphnia* las *efipias* juegan un importante rol tanto en la colonización de nuevos hábitat como en el repoblamiento del mismo hábitat luego que las condiciones desfavorables que les dieron origen han desaparecido.

2.2.6. Respiración.

La respiración es aerobia en su totalidad. El intercambio de gases en estos individuos se efectúa vía epipodito de los apéndices torácicos que están transformados en las branquias. Un intercambio normal de gases entre la sangre y el medio se lleva a cabo por el constante movimiento de los apéndices torácicos que crean una corriente continua de agua fresca (Universidad Jorge Tadeo Lozano, 1974, citado por Matuk 1996).

Cuando se encuentran en un medio aireado son incoloros, pero cuando el mismo presenta deficiencia de oxígeno, se tornan de color rojo debido a que poseen hemoglobina (González y Gutiérrez, 1995).

2.2.7. Sistema Circulatorio.

Es abierto como en 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 anterior del tronco, colocado dorsalmente. La hemoglobina entra por los ostíolos laterales y fluye a través del extremo anterior en el hemocel. (González y Gutiérrez, 1995).

2.2.8. Sistema Excretor.

Las funciones excretoras 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 anteroventral a cada lado del corazón. (González y Gutiérrez, 1995).

2.2.9. Sistema Nervioso⁸.

El sistema nervioso consiste en un cordón vertical, doble, con unos pocos ganglios, dos pares de nervios laterales y un ganglio cerebral o cefálico ubicado frente al esófago.

⁸ GONZÁLEZ GÓMEZ, Henry Bernardo y GUTIÉRREZ ÁLVAREZ, Sandra del Pilar. Clasificación y ciclo de vida de una especie *Daphnia* nativa de la sabana de Bogotá. 1995. p. 23

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

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 circunesofágicos, el ganglio subesofagico y algunos ganglios ventrales.

2.2.10. Identificación Taxonómica.

La descripción y diferenciación morfológica de la especie del género Daphnia se presenta a continuación, realizando la comparación entre los géneros más comunes Daphnia Pulex y Daphnia Obtusa, según González y Gutiérrez (1995):

Tabla 3. Diferencia taxonómica entre Daphnia Pulex y Daphnia Obtusa

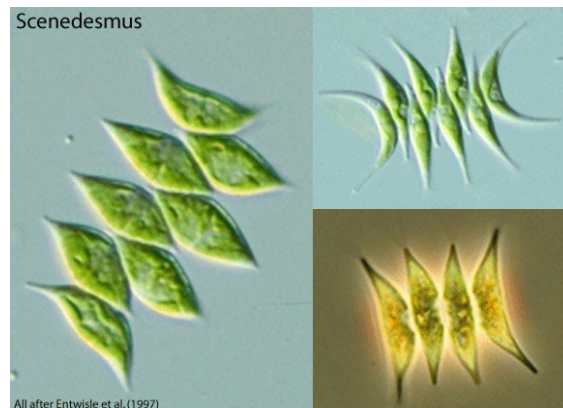
Daphnia Pulex	Daphnia Obtusa
<p>*Cabeza normal, sin cresta ni yemo.</p> <p>*Uña caudal pectinada.</p> <p>*Anténula con sedas sensitivas que no alcanzan extremo rosal.</p> <p>*Borde dorsal sin esbozo de sinus</p> <p>*Ejemplares juveniles sin el cuerpo nual.</p> <p>*Postabdomen con doce a diecisiete espinillas anales con finos fascículos de ciliias muy espaciadas.</p>	<p>Sin espina en el ángulo posterodorsal de las valvas o bien muy reducidas.</p>

Fuente: GONZÁLEZ GÓMEZ y GUTIÉRREZ ÁLVAREZ. (1995)

2.3. SCENEDESMUS

Alga verde, normalmente hallada en ambientes de agua dulce, poseen un tamaño aproximado de 7 a 25 μm de largo y 2,5 a 7,5 μm de ancho; puede encontrarse en forma unicelular o colonias no flageladas. Algunas colonias son cenóbricas (número de células es fijo), cada célula contiene un cloroplasto plano y usualmente pirenoide. Presentan formas elipsoidales o fusiformes de 2, 4 u 8 en series lineales para formar una colonia plana; pueden presentar pared lisa o verrugosa, los polos de las células se encuentra a menudo ornamentados con espinas⁹ (Parra, 1983, citado por Espinosa y Jarro, 1999).

Figura 4. Scenedesmus



Fuente: <http://www.rbgsyd.nsw.gov.au/data/assets/image/48235/Scenedesmus.gif>

Tiene la siguiente clasificación taxonómica:

- División: Chlorophyta
- Clase: Chlorophyceae
- Orden: Cholorococcales
- Familia: Scenedesmaceae
- Género: Scenedesmus

⁹ PARRA, 1983, citado por ESPINOSA y JARRO, Determinación del intervalo de sensibilidad con cromo hexavalente en dos especies de cladóceros bajo condiciones de alimentación controladas. Santafé de Bogotá, 1999. Trabajo de grado (Biologas). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.

2.4. BIOENSAYOS

Los bioensayos son pruebas en las cuales un tejido vivo, organismo o grupo de organismos son usados como agentes para determinar la potencia de cualquier sustancia fisiológicamente activa, permitiendo comparar la toxicidad de diferentes compuestos y conocer la sensibilidad de las diversas especies, para determinar los mecanismos de los efectos de las sustancias ensayadas (Alcazar, 1988).

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.

Los individuos son expuestos a concentraciones crecientes del tóxico para determinar cambios en el organismo, determinando la relación dosis – respuesta. En general la muerte es el criterio más utilizado en las pruebas, pero también se puede utilizar: la inmovilización, la pérdida del equilibrio, el deterioro de la facultad de reproducción, de desarrollo o natatoria, los cambios histológicos o bioquímicos, etc. Uno o más controles son utilizados en organismos expuestos a similares condiciones.

Los bioensayos toxicológicos tienen por finalidad determinar las concentraciones de un tóxico dado que ocasionen efectos dañinos o nocivos en un organismo modelo. Estos efectos pueden incluirse en las siguientes categorías:

- Afectación del término de vida
- Alteración de la tasa de crecimiento
- Cambios de los parámetros reproductivos¹⁰.

¹⁰ REISH, D. Y OSHIDA, P. 1987. Manual of methods in aquatic environment research. part 10 – short-term static bioassays. FAO.P.66, citado por MAC-QUHAE, Cesar Augusto. Descripción de un protocolo estandarizado de toxicidad aguda para cladóceros (documento en línea). Disponible en Internet: <http://www.monografias.com/trabajos11/clado/clado.shtml>

Existen ciertas características de los bioensayos con organismos según EPA (1999) 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.
- 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.

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.

Existen varios tipos de bioensayos que se definen de acuerdo a la duración experimental y la forma de adicionar el tóxico, se nombran a continuación según la FAO (1981):

2.4.1. Ensayos de Respuesta Directa. Bioensayos de toxicidad:

2.4.1.1. Bioensayos Agudos.

Cuantifican las concentraciones letales de un xenobiótico a una especie en particular. El valor calculado se denomina concentración letal media (CL^{50}), y representa la

concentración que causa la muerte al 50 % de la población experimental, en un tiempo determinado (generalmente 48 o 96 horas). Existen dos tipos de bioensayos agudos, estático y continuo.

2.4.1.1.1. De tipo estático.

Se efectúa sin la renovación continua del flujo constante de las diluciones sometidas al ensayo.

- Sin renovación.

Los organismos se exponen a la misma solución de prueba el tiempo de duración del ensayo.

- Con renovación.

Los especímenes se someten a una preparación fresca de la misma concentración inicialmente empleada, periódicamente (generalmente cada 24 horas). Tal renovación puede ser necesaria cuando importantes sustancias tóxicas se deterioran, o son absorbidas, o se pierden por cualquier otra razón, con suficiente rapidez para influir considerablemente con los resultados del ensayo.

2.4.1.1.2. De flujo continuo.

Circula continuamente una corriente de sustancia de prueba nueva en contacto con los individuos experimentales. Se realizan con la renovación continua o casi continua de las diluciones sometidas al ensayo, con el fin de mantener casi constantes las concentraciones de las sustancias tóxicas activas.

2.4.1.2. Bioensayos Crónicos.

Estiman la concentración efecto media (CE50), la cual es la concentración de la sustancia de prueba que causa un efecto al 50% de la población experimental, al cabo de un tiempo determinado; depende del estadio de vida considerado o del ciclo de vida del organismo empleado. A la vez, un ensayo definitivo puede utilizarse para estimar el tiempo requerido para producir un efecto al 50% de los organismos (TE50), a una concentración específica.

2.4.1.3. Bioestimulación.

Se mide la facultad de las aguas residuales o de las sustancias químicas de estimular la multiplicación y el desarrollo de algas, efecto este de eutroficación que frecuentemente se traduce en una superabundancia o proliferación de algas.

2.4.1.4. Bioensayos de Repelencia.

Trata de medir en el laboratorio las reacciones de escapes de los animales acuáticos frente a un contaminante. Al organismo utilizado (generalmente pez o crustáceo de buen tamaño) se le ofrece la oportunidad de elegir entre aguas "contaminadas" y aguas "limpias" en un tubo o tanque pequeño; el gradiente de interfaz puede ser brusco. Los aparatos y procedimientos miden también, por lo general, cuando existe la atracción hacia el contaminante. Para las especies con motilidad el escapamiento puede ser a veces la respuesta sub-letal clave, de naturaleza más sensible y más

significativa que el deterioro de la reproducción medido mediante ensayos de toxicidad crónicos. Sin embargo, es particularmente difícil predecir, a partir de estos resultados de laboratorio, lo que ocurriría en el medio. Las respuestas de escape pueden estar o no relacionadas con la toxicidad del contaminante, en algunos casos los organismos no pueden soportar determinadas concentraciones tóxicas o pueden ser atraídas por ellas.

2.4.1.5. Bioacumulación.

Son necesarios para las sustancias que se acumulan en las plantas y animales acuáticos; las grandes concentraciones de sustancias tóxicas en los tejidos pueden causar la muerte, pero el organismo es capaz de acumular durante algún tiempo cantidades menores sin sufrir daño. En este último caso, los depredadores pueden acumular las sustancias en grado tal que resulte nociva para ellos o para los depredadores del nivel trófico siguiente.

2.4.2. Ensayos de Respuesta Indirecta.

2.4.2.1. Ensayos Organolépticos.

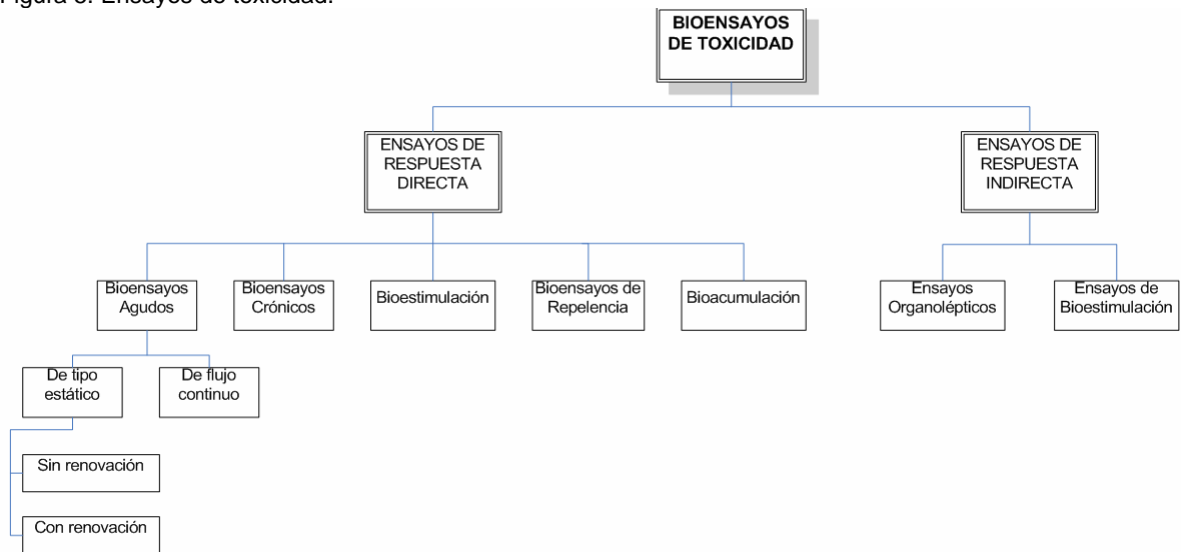
Algunos contaminantes pueden producir olores o sabores desagradables en los organismos acuáticos. El contaminante puede no ser nocivo para el organismo acuático, pero puede ocurrir que el organismo pierda valor económico. El mejor procedimiento consiste en la evaluación por parte de personas experimentadas en bromatología y emplear gran número de catadores diestros.

2.4.2.2. Ensayos de Bioestimulación.

Los efectos de los nutrientes adicionales pueden ser indirectos, como por ejemplo, la producción de sustancias tóxicas o la desoxigenación del agua debida a la proliferación de algas.

Al elegir un ensayo de toxicidad se deben tener en cuenta los siguientes elementos: los resultados deben ser relevantes a nivel ecológico y estar relacionados con los sucesos ocurridos en el ecosistema objeto de estudio; el ensayo y las variables a estudiar deben ser suficientemente sensibles para identificar el problema y distinguir entre los distintos puntos o sitios considerados; las pruebas deben ser rápidas, reproducibles y la respuesta del control predecible; la metodología debe ser estándar; las variables a medir en las pruebas deben responder de manera similar a sustancias químicas parecidas (Del Valls y Conradi, 2000).

Figura 5. Ensayos de toxicidad.



Fuente: Las autoras.2007.

A la hora de realizar las pruebas de toxicidad, se deben eliminar los factores extraños que pueden afectarlas; tanto las características bióticas como las abióticas actúan como factores modificantes. Las características bióticas, incluyen todos los factores que son inherentes a los microorganismos como lo es: 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 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, etc.

Las características abióticas que pueden actuar como factores modificantes se encuentran las 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 fotoperiodo, el movimiento del agua y las variaciones de todos estos factores en un cuerpo de agua particular.

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.

Tabla 4. Factores fisicoquímicos que afectan la toxicidad en los microorganismos.

FACTOR	CARACTERÍSTICA
Agua Natural	Es de fundamental importancia en virtud de su acción directa sobre los organismos acuáticos. En 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.
Temperatura	<p>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.</p> <p>Es uno de los factores que gobierna el nivel de oxígeno disuelto del agua.</p>
Oxígeno Disuelto	<p>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.</p> <p>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.</p> <p>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.</p>
pH	Los efectos directos de pH sobre los organismos son graduales empiezan más severos a medida que el pH se aparta de la zona neutral.
Sales Disueltas (Dureza)	<p>El calcio, y en menor extensión el magnesio, son los cationes disueltos predominantes en aguas naturales, y son los principales responsables de la dureza de las aguas.</p> <p>Una clasificación de las aguas con respecto a la dureza es:</p>

FACTOR	CARACTERÍSTICA
	<p>Blanda: 0 a 75 mg/L $CaCO_3$</p> <p>Moderadamente Dura: 75 a 150 mg/L $CaCO_3$</p> <p>Duras: 150 a 300 mg/L $CaCO_3$</p> <p>Muy Duras: mayor a 300 mg/L $CaCO_3$.</p>
Sólidos Suspendidos	Dentro de esta categoría se incluyen partículas suspendidas como las de los sedimentos, que no tiene un efecto.....que producen otros efectos sobre los organismos acuáticos.

Fuente: Las autoras.

Tabla 5. Factores fisicoquímicos que afectan la toxicidad en los bioensayos.

FACTOR	CARACTERÍSTICA
Temperatura	<p>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.</p> <p>La temperatura puede afectar la acción de un tóxico.</p> <p>La temperatura tiene un efecto muy marcado sobre el comportamiento químico de muchas sustancias disueltas en el agua así como sobre la solubilidad de otras sustancias.</p>
Oxígeno Disuelto	<p>Sería de esperarse que el stress causado en los organismos por una reducción en el nivel de oxígeno disuelto debería incrementar considerablemente la toxicidad de los polutantes en las aguas. Estos efectos si existen pero con frecuencia no son tan graves como se espetaría.¹¹</p> <p>Si la toxicidad de una sustancia depende del pH, un cambio en el mismo puede disminuir los niveles de oxígeno disuelto.</p>

¹¹ CRUZ TORRES, Luís Eduardo. Factores que afectan la toxicidad. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Unidad Académica Ingeniería Ambiental. 1996. p. 11

FACTOR	CARACTERÍSTICA
pH	<p>El mayor efecto del pH como factor modificante está dado para las sustancias que ionizan bajo la influencia del pH.</p> <p>Las moléculas no disociadas o el don menos disociado tienen mayor toxicidad. Sin embargo, esta situación es opuesta para el caso de los metales, en los cuales la forma disociada es más tóxica que la no disociada.</p>
Sales Disueltas (Dureza)	<p>La mayoría de los metales pesados se hacen menos tóxicos en aguas duras que en aguas blandas.</p> <p>La relación que existe entre toxicidad y dureza no se cumple si las pruebas se realizan en aguas en las cuales el pH y la alcalinidad no están asociadas con la dureza, como ocurren en la mayoría de las aguas naturales.¹²</p>

Fuente: Las autoras.

2.4.3. Métodos estadísticos para el análisis de toxicidad.

A la hora de realizar la estadística de los resultados obtenidos en los bioensayos, estos desempeñan un papel importante, no sólo para el cálculo, sino también para la planificación y ejecución de las pruebas de toxicidad y el análisis e interpretación de los resultados obtenidos en ellas.

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 estados vivo o muerto (variable cualitativa), y debe ser expresada como porcentaje de muertos antes de poder ser analizadas por métodos de regresión.¹³

¹² Ibid., p.16

¹³ CASTILLO, Gabriella. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. México. 2004. p.

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.¹⁴

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, según Castillo, 2004:

- Mecanístico: 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 o no estocástico: es un modelo en el que dado un dato en particular, la predicción que se obtiene del modelo es siempre el mismo valor.
- Probabilístico o estocástico: 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. La utilización de transformaciones no sólo altera la forma de la relación estudiada, sino que también modifica el comportamiento de las variables con respecto a los supuestos del método estadístico a ser aplicado.

Para cumplir con las exigencias de validez y precisión a la hora de realizar los análisis estadísticos de los resultados de los bioensayos, es necesario tener en cuenta las

¹⁴ Ibid., p.

siguientes metodologías, (según Castillo, 2004 y Martínez, 1996) para la planeación, ejecución y análisis:

2.4.3.1. 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.

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

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.

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.

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

1. Establecimiento de una relación dosis-respuesta.
2. Análisis de varianza (ANOVA).

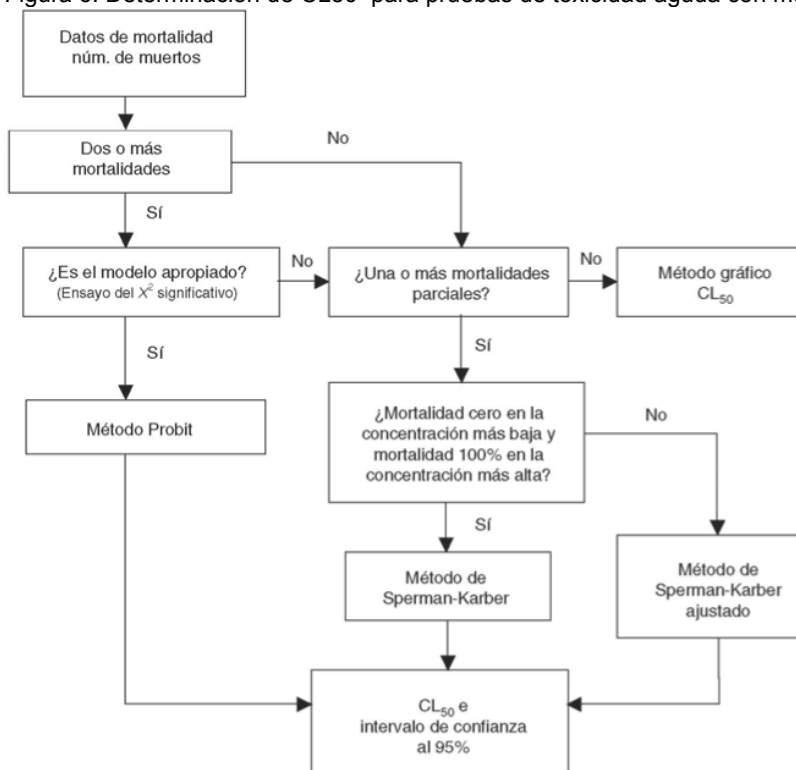
Como resultado del análisis de los datos de un diseño para estimar una relación dosis-respuesta, lo que se pretende obtener son las estimaciones de los parámetros del modelo seleccionado para relacionar las variables y, a continuación, utilizar el modelo con las

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 (CL_{50}), que es la concentración que produce la respuesta esperada sobre el 50% de los organismos expuestos.

2.4.3.2. Establecimiento de una relación dosis-respuesta de tipo mortalidad.

La selección del método a utilizar para estimar los valores de CL_{50} 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).

Figura 6. Determinación de CL_{50} para pruebas de toxicidad aguda con múltiples concentraciones.



Fuente: CASTILLO, Gabriela. 2004.

En general, se recomiendan cuatro métodos para la estimación de $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ los cuales son:

2.4.3.2.1. 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.

2.4.3.2.2. 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 $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ mediante este método, es necesario tener por lo menos, un porcentaje intermedio de efecto observado (valores entre 0 y 100% de efecto).

2.4.3.2.3. 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}).

2.4.3.2.4. 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 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 CL_{50} 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 CL_{50} .

2.4.3.3. 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; se contó con el software que fue suministrado por el área de bioensayos del Laboratorio Ambiental de la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca, 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).

2.5. METALES PESADOS

Los metales pesados se encuentran en forma natural en la tierra, haciendo parte de la corteza terrestre y disuelta en todos los sistemas acuáticos en diferentes grados de concentración. Sin embargo su concentración es variable y su circulación en la biosfera se realiza a través de diferentes ciclos biogeoquímicos.

A través de los procesos orogénicos (movimientos abruptos que originaron las montañas) se produce una entrada constante de compuestos metálicos a los ecosistemas. La actividad volcánica y la erosión son los que más contribuyen al aumento de las concentraciones de metales en el medio ambiente. Estos procesos forman depósitos terrestres superficiales o profundos donde están concentrados o son disueltos por el agua.

Los metales pesados no presentan ningún tipo posible de degradación biológica o química, como se presenta en el caso de la contaminación por compuestos orgánicos; estos pueden ser bioacumulados de diversas formas (inorgánica o como compuestos orgánicos), permanecer en los organismos por largos períodos y su efecto sobre los organismos vivos puede ser de diferentes formas.

Existen ciertas propiedades comunes entre los metales pesados, como lo son: la conductividad eléctrica, maleabilidad, ductilidad y brillo. Pueden encontrarse en forma libre o combinada, formando minerales. También se encuentran como átomos o moléculas y presentan efecto tóxico, cuando al ser consumidos o estar expuestos a él, se produce un efecto perjudicial ya sea para el crecimiento o, para el metabolismo celular de los diferentes organismos. Esto ocurre al exceder ciertas concentraciones o, cuando se mantienen en contacto por periodos prolongados o cuando el compuesto o el metal se presenta en una forma químicamente tóxica (Silvia, 1985).

Los factores que influyen en la toxicidad de los metales de acuerdo con Cairos & Pratt (1989) y Gadd and Griffiths (1978), (citado por Hoyos, 1995), se resume en:

1. Las características del ambiente acuático: dureza, pH, compuestos orgánicos disueltos, acidez, carbonatos, entre otros.
2. Las transformaciones que se pueden dar en el ambiente acuático por cambios en el estado de oxidación, etc., debido a la acción bacteriana, unión de metales con compuestos orgánicos, precipitación, formación de complejos e interacciones iónicas.
3. La forma en que se encuentre el químico en el agua como ión o como compuesto.
4. La concentración en que se encuentre.

Los metales pesados, como aluminio, arsénico, cadmio, cobre, plomo, mercurio, etc., se caracterizan por su alta conductividad eléctrica, por tener una densidad mayor a 6.0 g/cm³ y a medida que se desplazan hacia los metales preciosos (oro y plata) sus óxidos metálicos se hacen que los hidróxidos correspondientes forman complejos con diferentes moléculas. Su estado físico está definido por el tamaño y, la especie química lo estará por (Hoyos, 1995): Su estado de oxido-reducción, el tipo de uniones químicas (iónicas o covalentes) y el tipo de asociación de las diferentes especies físicas.

2.5.1. Cobre.

2.5.1.1. Características principales.

El cobre es el elemento químico de número atómico 29 y símbolo Cu, uno de los metales de transición e importante metal no ferroso. Es uno de los metales más importantes industrialmente. De coloración rojiza es, dúctil, maleable y presenta unas conductividades

eléctrica y térmica muy altas, sólo superadas a temperatura ambiente por la plata. Puede encontrarse en distintos minerales, y se halla nativo, en la forma metálica, en algunos lugares.

El cobre no es magnético. Es uno de los metales que puede tenerse en estado más puro, es moderadamente duro, es tenaz en extremo y resistente al desgaste. La fuerza del cobre está acompañada de una alta ductibilidad. Las propiedades mecánicas y eléctricas de un metal dependen en gran medida de las condiciones físicas, temperatura y tamaño de grano del metal.

Tabla 6. Características generales del cobre.

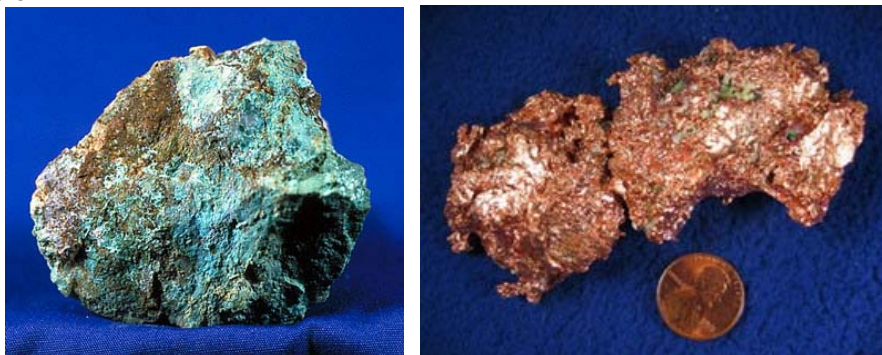
Nombre	Cobre
Número atómico	29
Valencia	1,2
Estado de oxidación	+2
Electronegatividad	1,9
Radio covalente (Å)	1,38
Radio iónico (Å)	0,68
Radio atómico (Å)	1,38
Configuración electrónica	[Ar]3d104s1
Primer potencial de ionización (eV)	7,77
Masa atómica (g/mol)	63,54
Densidad (g/ml)	8,96
Punto de ebullición (°C)	2595
Punto de fusión (°C)	1083

Fuente: <http://www.lenntech.com/espanol/tabla-peiodica/Cu.htm>

En la mayoría de sus compuestos presenta estados de oxidación bajos, siendo el más común el +2, aunque también hay algunos con estado de oxidación +1; la mayor parte del cobre del mundo se obtiene de los sulfuros minerales como la calcocita, covelita, calcopirita, bornita y enargita. Expuesto al aire, el color rojo salmón inicial se torna rojo violeta por la formación de óxido cuproso (Cu_2O) para ennegrecerse posteriormente por la formación de óxido cúprico (CuO). Expuesto largamente al aire húmedo forma una capa

adherente e impermeable de carbonato básico de color verde, característico de sus sales, denominada «cardenillo» («pátina» en el caso del bronce) que es venenoso.

Figura 7. Cobre.



Fuente: <http://www.estudiantes.info/tecnologia/metales/cobre.htm> y <http://avogadro.bitacorras.com/img/cobre.jpg>

Los halógenos atacan con facilidad al cobre especialmente en presencia de humedad; en seco el cloro y el bromo no producen efecto y el flúor sólo le ataca a temperaturas superiores a 500°C. Los oxiácidos atacan al cobre, aprovechándose dicha circunstancia para emplearlos como decapantes (ácido sulfúrico) y abrillantadores (ácido nítrico). Con el azufre forma un sulfuro (CuS) de color negro.

Entre sus propiedades mecánicas destacan su excepcional capacidad de deformación y ductilidad. En general sus propiedades mejoran con las bajas temperaturas lo que permite utilizarlo en aplicaciones criogénicas.

2.5.1.2. Efectos del Cobre.

El Cobre puede ser liberado en el ambiente por actividades humanas y por procesos naturales. Algunas fuentes naturales son: las tormentas de polvo, la descomposición de la vegetación, incendios forestales y aerosoles marinos. Las actividades humanas que contribuyen a la liberación del Cobre son: la minería, la producción de metal, la producción de madera y la producción de fertilizantes fosfatados.

El Cobre entra en el aire, mayoritariamente a través de la liberación durante la combustión de fuel. El Cobre en el aire permanecerá por un periodo de tiempo, antes de depositarse en el suelo, cuando empieza a llover.

Cuando el Cobre termina en el suelo este es fuertemente atado a la materia orgánica, arcilla, tierra o arena y minerales. Como resultado este no viaja muy lejos antes de ser liberado y es difícil que entre en el agua subterránea. En el agua superficial el cobre puede viajar largas distancias, tanto suspendido sobre las partículas de lodos como iones libres.

El Cobre no se rompe en el ambiente y por eso se puede acumular en plantas y animales cuando este es encontrado en suelos. En suelos ricos en Cobre sólo un número pequeño de plantas pueden vivir. Por esta razón no hay diversidad de plantas cerca de las fábricas de Cobres. El Cobre puede interrumpir la actividad en el suelo, su influencia negativa en la actividad de microorganismos y lombrices de tierra.

2.5.1.2.1. Seres humanos/ mamíferos¹⁵.

Como parte integrante de numerosas enzimas, el cobre es un elemento traza esencial. La intoxicación se produce fundamentalmente por inhalación de polvos y "humos" de cobre. Las intoxicaciones por ingesta son raras, dado que produce vómitos. La toxicidad de esta sustancia se basa en el enlace de los iones de cobre libres a ciertas proteínas, lo que afecta sus funciones fisiológicas por inhalación del polvo y humo de cobre. La inhalación de los "humos" o del polvo produce hemorragia nasal y de las mucosas, pudiendo conducir a la perforación del tabique nasal. Los niños menores están mucho más expuestos (peligro de muerte) cuando hay un alto contenido de cobre en el agua potable. La muerte se presenta por cirrosis hepática.

2.5.1.2.2. Plantas¹⁶.

El cobre produce lesiones en las raíces que comienzan en el plasmalemma y terminan con la destrucción de la estructura normal de la membrana; inhibe el crecimiento radicular y promueve la formación de numerosas raicillas (secundarias) cortas y de color pardo. El cobre se acumula en la corteza de las raíces y en las paredes celulares. Se produce clorosis porque el Fe es desplazado de los centros fisiológicos del metabolismo y

¹⁵ <http://ces.iisc.ernet.in/energy/HC270799/HDL/ENV/envsp/Vol318.htm#Cobre>

¹⁶ Ibid., p.1.

reemplazado por el Cu. En un mismo ecosistema, las plantas acuáticas asimilan tres veces más cobre que las plantas terrestres.

2.5.1.3. Comportamiento en el medio ambiente¹⁷.

2.5.1.3.1. Agua.

El cobre precipita en agua salada, lo que explica el escaso contenido de cobre en este tipo de agua en comparación con el agua dulce. La lluvia ácida aumenta la solubilidad de los minerales de cobre. El mayor contenido de cobre en el agua potable con pH bajo se debe, en la mayoría de los casos, a la corrosión de las cañerías. Esto puede modificar el color del agua y producir precipitados verdosos.

2.5.1.3.2. Aire.

Expuesto al aire húmedo normal, se forma una pátina verdosa que protege al cobre metálico de efectos químicos adicionales (corrosión).

2.5.1.3.3. Suelo.

El cobre queda fuertemente atrapado por intercambios inorgánicos y cuando aumenta el pH, se forman compuestos. La solubilidad del cobre en el suelo es mínima con pH 5-6. El cobre, adsorbido firmemente en la arcilla, se acumula en los estratos arcillosos. El contenido de cobre en el suelo disminuye a medida que aumenta la profundidad de los estratos. Las reacciones de intercambio y el contenido de nitrógeno del suelo constituyen factores muy importantes para el transporte pasivo del cobre inmóvil.

2.5.1.3.4. Cadena alimentaria.

Tanto el ser humano como los demás mamíferos asimilan el 30% del cobre contenido en los alimentos por vía estomacal, del cual aproximadamente del 5% es realmente resorbido. El resto se elimina nuevamente por vía biliar. Esta sustancia se acumula en el hígado, en el cerebro y en los riñones.

¹⁷ Ibid.,p.1.

2.5.2. Cromo.

2.5.2.1. Características principales.

El cromo es un elemento químico de número atómico 24 y símbolo Cr, que se encuentra en el grupo 6 de la tabla periódica. Es un metal que se emplea especialmente en metalurgia, en la producción de aleaciones anticorrosivas de gran dureza y resistentes al calor y como recubrimiento para galvanizados. Es de color blanco plateado, duro, brillante y quebradizo. Sin embargo, es relativamente suave y dúctil cuando no está tensionado o cuando está muy puro.

Tabla 7. Características generales del cromo.

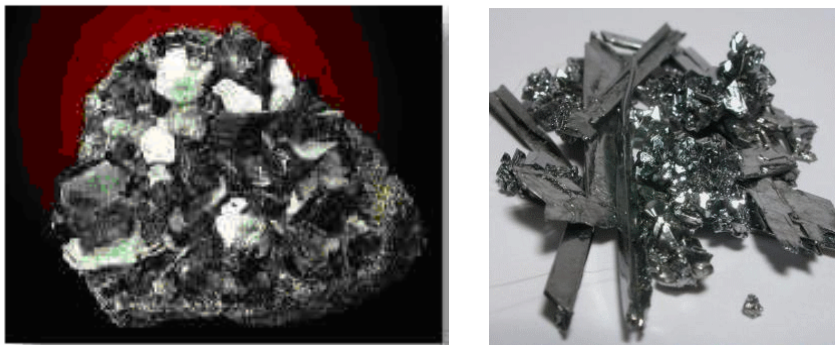
Nombre	Cromo
Número atómico	24
Valencia	2,3,4,5,6
Estado de oxidación	+3
Electronegatividad	1,6
Radio covalente (Å)	1,2
Radio iónico (Å)	0,69
Radio atómico (Å)	1,27
Configuración electrónica	[Ar] 3d ⁵ 4s ¹
Primer potencial de ionización (eV)	6,80
Masa atómica (g/mol)	51,996
Densidad (g/ml)	7,19
Punto de ebullición (°C)	2665
Punto de fusión (°C)	1875

Fuente: <http://www.lenntech.com/espanol/tabla-peiodica/Cr.htm>

El cromo elemental no se encuentra en la naturaleza. Su mineral más importante por abundancia es la cromita. Su estado de oxidación más alto es el +6, aunque estos compuestos son muy oxidantes. Los estados de oxidación +4 y +5 son poco frecuentes, mientras que los estados más estables son +2 y +3. También es posible obtener compuestos en los que el cromo presente estados de oxidación más bajos, pero son bastante raros. Forma tres series de compuestos con otros elementos; éstos se representan en términos de los óxidos de cromo: cromo con valencia dos, CrO, óxido de Cr (II) u óxido cromoso; con valencia tres, Cr₂O₃, óxido de Cr (III) u óxido crómico, y con

valencia seis, CrO_3 , anhídrido de Cr(VI) o anhídrido de ácido crómico. El cromo es capaz de formar compuestos con otros elementos en estados de oxidación (II), (III) y (VI).

Figura 8. Cromo.



Fuente: <http://www.lenntech.com/espanol/tabla-peiodica/Cr.htm> y <http://www.minerva.unito.it/chimica&industria/SistemaPeriodico/cromo.htm>

Sus propiedades mecánicas, incluyendo su dureza y la resistencia a la tensión, determinan la capacidad de utilización. El cromo tiene una capacidad relativa baja de forjado, enrollamiento y propiedades de manejo. Sin embargo, cuando se encuentra absolutamente libre de oxígeno, hidrógeno, carbono y nitrógeno es muy dúctil y puede ser forjado y manejado. Es difícil de almacenarlo libre de estos elementos.

2.5.2.2. Efectos del Cromo.

Hay varias clases diferentes de Cromo que difieren de sus efectos sobre los organismos. El Cromo entra en el aire, agua y suelo en forma de Cromo (III) y Cromo (VI) a través de procesos naturales y actividades humanas. El Cromo (III) es un elemento esencial para organismos que puede interferir en el metabolismo del azúcar y causar problemas de corazón, cuando la dosis es muy baja. El Cromo (VI) es mayoritariamente tóxico para los organismos. Este puede alterar el material genético y causar cáncer.

Las mayores actividades humanas que incrementan las concentraciones de Cromo (III) son el acero, las petroleras y las industrias textiles, pintura, eléctrica y otras aplicaciones industriales del Cromo (VI). A través de la combustión del carbón, el cromo, es emitido al agua y puede disolverse en ésta y así pasar a suelo más profundo y al agua subterránea.

Cuando la cantidad de Cromo en el suelo aumenta, esto puede aumentar las concentraciones en las plantas. Las plantas usualmente absorben sólo Cromo (III). Esta clase de Cromo probablemente es esencial, pero cuando las concentraciones exceden cierto valor, efectos negativos pueden ocurrir. No es conocido que el Cromo se acumule en los peces, pero altas concentraciones de Cromo, debido a la disponibilidad de metales en las aguas superficiales, pueden dañar las agallas de los peces que nadan cerca del punto de vertido. En animales el Cromo puede causar problemas respiratorios, una baja disponibilidad puede dar lugar a contraer las enfermedades, defectos de nacimiento, infertilidad y formación de tumores.

2.5.2.2.1. Seres humanos/ mamíferos¹⁸.

Debido a su insolubilidad, el cromo metálico no es tóxico en el agua. Los diversos compuestos del cromo hexavalente representan la mayor amenaza, especialmente debido a sus efectos genéticos. Los compuestos del cromo (VI) actúan en casi todos los sistemas de ensayo diseñados para determinar sus efectos mutagénicos. El hecho comprobado de que atraviesa la placenta significa un alto riesgo para los embriones y fetos. Se considera que el período de latencia correspondiente oscila entre 10 y 27 años. Contrariamente a lo que ocurre con los compuestos del cromo (VI), no fue posible demostrar en forma concluyente el efecto carcinógeno de los compuestos del cromo (III). Las intoxicaciones agudas con compuestos del cromo (VI) se manifiestan, por ejemplo, como lesiones renales. Las intoxicaciones crónicas pueden producir mutaciones en el tracto gastrointestinal así como acumulaciones en el hígado, en el riñón, en la glándula tiroidea y en la médula ósea. El índice de eliminación es lento.

2.5.2.2.2. Plantas¹⁹.

En las plantas se conocen, entre otras, lesiones en el sistema radicular, originadas principalmente por el cromo (VI). No sólo las distintas especies sino también las distintas partes internas de las plantas difieren considerablemente en el modo de asimilar el cromo y en el tipo de lesiones que acusan. Los efectos tóxicos que el cromo ejerce sobre las plantas han sido descritos, fundamentalmente, en base a ensayos vasculares.

¹⁸ Ibid.,p.3.

¹⁹ Ibid.,p.3.

Nota: El cromo de valencia III es un elemento traza importante para el metabolismo insulínico, tanto en el ser humano como en los animales.

2.5.2.3. Comportamiento en el medio ambiente²⁰.

2.5.2.3.1. Agua.

En los sistemas acuáticos, la toxicidad de los compuestos solubles del cromo varía según la temperatura, pH y dureza del agua, y según las especies de organismos que los pueblan. Los compuestos del cromo (VI) se disuelven con facilidad, pero en condiciones naturales y en presencia de materia orgánica oxidable, se reducen rápidamente a compuestos cromo (III) más estables y menos hidrosolubles.

2.5.2.3.2. Suelo.

La movilidad del cromo solamente puede evaluarse si se consideran la capacidad de adsorción y reducción de los suelos y de los sedimentos. Los hidróxidos de cromo (III), una vez sedimentados y fijados en el sedimento acuático, difícilmente vuelven a movilizarse, dado que la oxidación de los compuestos de cromo (III) para formar compuestos de cromo (VI) prácticamente no ocurre en forma natural. El cromo (VI), aun en concentraciones relativamente bajas, ya resulta tóxico, siendo el pH del suelo un factor fundamental. El uso de abonos fosfatados incrementa el ingreso de cromo al suelo.

2.5.2.3.3. Cadena alimentaria.

Los compuestos del cromo (III) asimilados junto con los alimentos resultan relativamente inocuos; los compuestos del cromo (VI), en cambio, tienen efectos altamente tóxicos. Tanto los animales como los seres humanos sólo incorporan a su organismo cantidades relativamente pequeñas de cromo por inhalación; la mayoría de las sustancias que contienen cromo ingresan al organismo a través de los alimentos y del agua que se bebe. La resorción en el intestino depende en gran medida de la forma química en que se presenta el cromo: se asimilan aproximadamente entre un 20-25% de los complejos de cromo orgánico y aproximadamente un 0,5% del cromo inorgánico.

²⁰ Ibid.,p.3.

2.6. INDUSTRIA GALVANICA.

Las industrias de galvanotecnia son un conjunto de industrias dedicadas a la fabricación de productos metálicos, que consiste en ciertas técnicas de obtención, por vía electrolítica, de un recubrimiento metálico sobre una superficie que puede ser o no metálica. El objetivo del recubrimiento es mejorar la apariencia del objeto base, protegerlo de la corrosión y mejorar alguna propiedad superficial, en algunos casos.

Los metales de uso más corriente son la plata, níquel, cromo y cobre para fines decorativos, siendo el cromado el revestimiento mas extendido debido a su duración así como a su resistencia a la abrasión y al empañado. En aplicaciones industriales especiales donde se requiere una mayor protección, los revestimientos más corrientes pueden ser de zinc, cadmio y estaño.

Existen dos tipos de procesos en la galvanotécnica: galvanoplastia y galvanostegeia. El primero se refiere al proceso en que los recubrimientos metálicos se hacen sobre las superficies de materiales no conductores; mientras que en le segundo, los recubrimientos siempre se realizan sobre elementos metálicos (acercar.org). A continuación se describen los procesos de galvanoplastia y galvanostegeia según La Unidad de Asistencia para la Pequeña y Mediana Industria (ACERCAR).

2.6.1. Galvanoplastia.

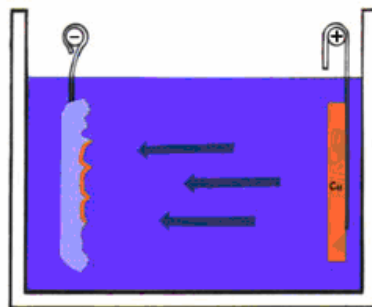
La galvanoplastia consiste en la electrodeposición de un metal sobre una superficie no metálica (principalmente plásticos) para mejorar sus características. Con ello se consigue proporcionar dureza, duración, o ambas.

En el proceso existen dos tipos de revestimiento: uno de capas conductoras y otro sobre matrices negativas de las que se separan posteriormente las capas metálicas. El primer proceso se emplea principalmente con fines decorativos para reproducir por medios electroquímicos objetos de muy finos detalles y en muy diversos metales. En el segundo proceso se obtienen piezas moldeadas como monedas, objetos de plástico, cilindros para impresión, entre otros.

En algunos casos las partes del plástico se metalizan directamente para lograr objetos con acabado metálico, como es el caso de la bistrería, tapas de recipientes para perfumes, algunas autopartes, placas para circuitos impresos, artículos para el hogar, griterías, etc. (acercar.org).

El proceso puede resumirse en el traslado de iones metálicos desde un ánodo (carga positiva) a un cátodo (carga negativa) en un medio líquido (electrolito), compuesto fundamentalmente por sales metálicas y ligeramente acidulado.

Figura 9. Traslado de iones metálicos desde un ánodo a un cátodo.



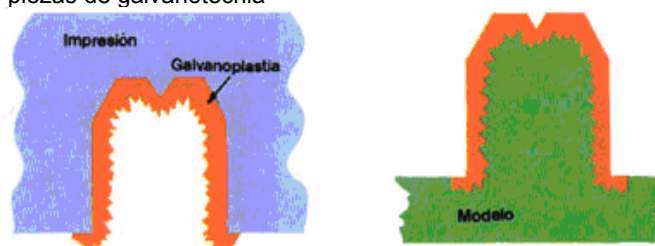
Fuente: GREGORIO G., Oscar R. Dpto. Galvanoplastia de Laboratorio. Técnico de Desarrollos Técnicos GETRI, S. I. (libro en línea). Disponible en Internet: <http://www.getri.es/librogalv.htm>

La deposición de los iones metálicos sobre la superficie preparada para recibirlos se efectúa siguiendo fielmente los detalles que componen dicha superficie, cohesionándose las moléculas al perder su carga positiva y adhiriéndose fuertemente entre ellas, formando así una superficie metálica, con características correspondientes al metal que la compone.

Este proceso, aplicado a una impresión (de silicona), permite una fiel y exacta reproducción de la superficie interior de dicha impresión, en una capa metálica, dura y consistente, que se corresponde perfectamente con el positivo original.

Una vez formada la capa metálica en el interior de la impresión y efectuado el vaciado, ya sea en escayola o resina, se advierte fácilmente que el metal electrodepositado ocupa entonces el lugar que normalmente sería del material del vaciado.

Figura 10. Molde de las piezas de galvanotecnia



Fuente: GREGORIO G., Oscar R. Dpto. Galvanoplastia de Laboratorio. Técnico de Desarrollos Técnicos GETRI, S. I. (libro en línea). Disponible en Internet: <http://www.getri.es/librogalv.htm>

En general el proceso de metalizado de plásticos comprende las siguientes etapas:

2.6.1.1. Desengrase.

Esta etapa tiene como objetivo eliminar todos los aceites y grasas desde la superficie y los elementos extraños presentes en la superficie de la pieza a tratar, que podrían interferir en las etapas siguientes. Para ello, se sumerge la pieza en una solución

alcalina como carbonato de sodio, de soda, de detergentes y de tensoactivos calentados a una temperatura de entre 60 y 80°C. Una vez desengrasadas, las piezas se enjuagan con agua para remover la solución desengrasante de la superficie del metal y evitar contaminación de los baños siguientes.

2.6.1.2. Decapado.

El decapado tiene por objeto aumentar la profundidad (a nivel microscópico) de las irregularidades de la superficie. De esta forma se producen dos efectos que son fundamentales para los procesos siguientes. La luz, al proyectarse en la superficie rebota en las cavidades entregando un reflejo opaco (objetivo que se persigue con el anodizado de una pieza). En segundo lugar, produce una superficie que presenta mejores características para anclar un sustrato diferente en los procesos siguientes. Esta etapa normalmente se efectúa con ácidos o álcalis, como lo es el ácido clorhídrico adicionado con un inhibidor. Al finalizar esta etapa, se enjuagan de nuevo las piezas con agua.

2.6.1.3. Activado.

El proceso de activado, también llamado neutralizado e inclusive decapado suave, se utiliza para eliminar la pequeña capa de óxido que se ha formado sobre la superficie del metal una vez que la superficie ha sido tratada o lavada en sucesivas etapas. Esa pequeña capa de óxido hace que la superficie sea pasiva y por lo tanto mal conductora. Las soluciones empleadas son por lo general ácidos muy diluidos. Los activados permiten asimismo eliminar manchas generadas por compuestos orgánicos y/o inorgánicos.

2.6.1.4. Sensibilización y activación de la superficie.

Consiste fundamentalmente en la adsorción en la superficie del plástico de un metal fácilmente oxidable. La superficie sensibilizada es expuesta a una solución de paladio u otros metales preciosos, para que a través de una reacción galvánica el paladio se deposite en la superficie del plástico y actúe como catalizador.

2.6.1.5. Post-nucleación.

Cuando la etapa de nucleación se hace inmediatamente después del acondicionamiento es necesario usar un agente reductor para formar el catalizador de paladio. Los agentes más comunes son: formaldehído, hipofosfito, hidracina.

2.6.1.6. Pre-metalizado.

Se realiza un pre-metalizado previo sin uso de corriente con soluciones que contienen cobre o níquel, donde se hace la superficie conductora mediante un proceso autocatalítico. El objetivo es lograr una superficie suficientemente conductora para el posterior proceso electrolítico.

2.6.1.7. Metalizado.

Cuando la superficie plástica se encuentra ya conductora, el metalizado se realiza como cualquier otro metal.

2.6.1.7.1. Cobrizado.

Frecuentemente, el cobre forma la primera capa en un sistema de capas de recubrimiento, ya que es fácil de depositar en metales y plásticos, ya que presenta una elevada conductividad; además, la capa de cobre es muy resistente, económica de aplicar y forma una buena base adhesiva para otros metales. El cobrizado puede aplicarse a partir de baños alcalinos cianurados y baños ácidos con ácido sulfúrico. Los dos procesos de cobrizado empleados con más frecuencia son el método de ácido sulfúrico (sulfatos) y el de cianuro (baño alcalino).

Figura 11. Pieza después del cobrizado.



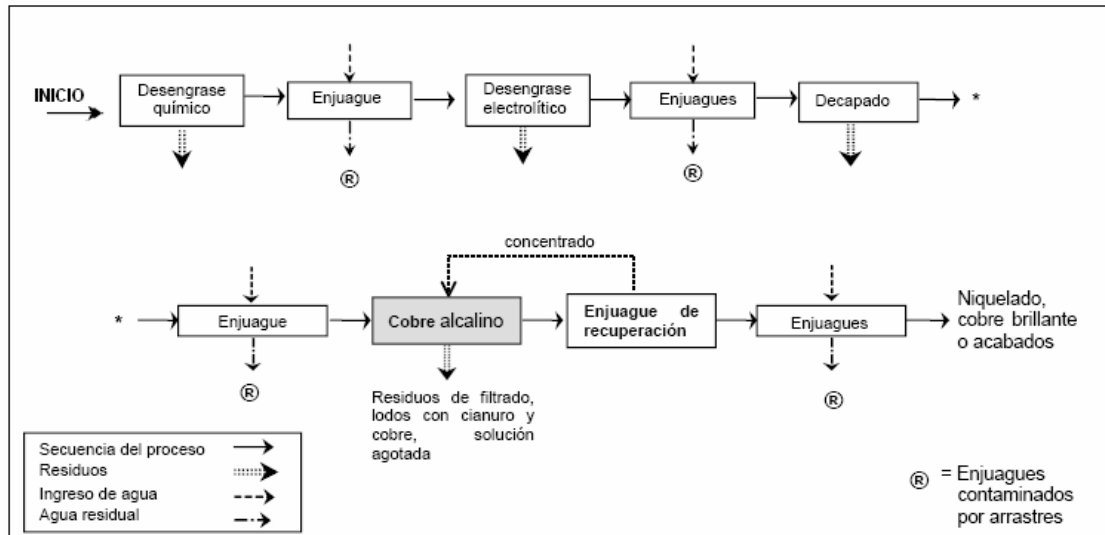
Fuente: www.richersa.com

El cobrizado ácido con sulfatos, generalmente requiere un control más estricto del baño a fin de mantener los parámetros en el rango óptimo, sin embargo, se evita el uso de cianuro. El baño ácido, también puede utilizarse como primer revestimiento metalizado en plásticos, por su gran ductilidad. En un baño ácido, el sulfato de cobre ($CuSO_4$) representa la fuente de iones de cobre que se deposita en la superficie a recubrir. Para este proceso se recomienda sulfato de cobre químicamente puro. El baño de cobre típico contiene sulfato de cobre, ácido sulfúrico, iones de cloruro y aditivos de brillo. El ácido sulfúrico sirve para aumentar la conductividad de la solución y para disolver el ánodo de cobre, este ánodo conduce la corriente eléctrica y proporciona los iones de cobre para formar sulfato de cobre.

El proceso de cobre ácido se realiza a una temperatura entre 20 y 30°C. Los electrolitos cúpricos de ácido sulfúrico contienen generalmente altas concentraciones de químicos orgánicos auxiliares, pues requieren un mayor control de los parámetros de operación del baño a fin de obtener ciertas características como dureza, nivelación y brillo. Sin embargo, en estos tipos de baños no se forman carbonatos en el baño. Los baños alcalinos de cobre cianurado operan a una temperatura elevada, de 40-60 °C, y contienen el cobre aglutinado en forma de complejos cianurados. Este tipo de baños generalmente contienen cianuro de cobre, cianuro libre, hidróxido de y aditivos de brillo. Normalmente, los baños no se cambian, sólo se filtran periódicamente ya sea con filtro de materiales textiles o usando carbón activado para retirar los aditivos o impurezas orgánicas que se han degradado.

Los residuos generados en el cobrizado son: residuos de filtración, concentrados provenientes del cambio de baño o del mantenimiento de los tanques (lodos) y enjuagues contaminados por los arrastres de los baños durante el transporte de las piezas de un tanque a otro.

Figura 12. Diagrama de flujo de un proceso de cobrizado alcalino.



Fuente: Manual de minimización, tratamiento y disposición. Concepto de manejo de residuos peligrosos para el giro de la galvanoplastia. 1998.

2.6.1.7.2. Cromado.

En el recubrimiento con cromo se distinguen dos procesos: el cromado brillante (cromado decorativo) y cromado duro. En el cromado brillante se depositan capas de cromo delgadas y brillantes de efecto decorativo o como protección anticorrosiva, sobre capas intermedias de níquel. El cromado duro se utiliza principalmente para aumentar la dureza de herramientas, así como para incrementar la resistencia al desgaste de moldes, válvulas, etc. En el cromo duro se depositan galvánicamente capas de cromo de mayor espesor a temperaturas elevadas.

En el cromado brillante, se utilizan soluciones electrolíticas que contienen: ácido crómico (Cr_2O_3), ácido sulfúrico (H_2SO_4) y cromo trivalente (Cr_2O_3); para aumentar la dureza pueden agregarse además ácido bórico.

Figura 13. Pieza de cromado brillante.



Fuente: www.navalchicolino.com

Durante el proceso de cromado ocurre un sobrepotencial en la capa superficial de la pieza a cromar, a causa de reacciones de oxido-reducción y diferencias de concentración, lo que genera una separación simultánea de hidrógeno que el baño emite como gas y que arrastra fracciones del baño. Algunas empresas que cuentan con equipos de control de emisiones a la atmósfera aspiran y condensan estas emisiones, y las devuelven al baño después de haberlas regenerado.

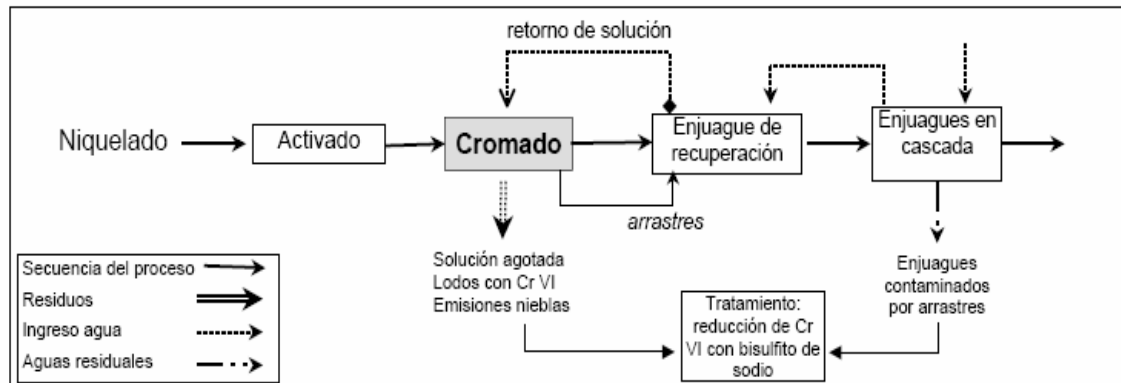
El proceso se realiza, a una temperatura aproximada de 50 °C. Con estas condiciones de operación en un proceso de cromado duro, se puede obtener en una hora una capa de cromo de un espesor de 500 μm .

Al agregar al electrolito agentes tensoactivos fluorados y espumantes, se evita que la solución salpique fuera del tanque y se reducen pérdidas por evaporación de la solución de cromado tóxica.

Después del cromado, las piezas se lavan, generalmente, en un enjuague permanente o de recuperación y después en uno o dos enjuagues en cascada. Como la concentración del electrolito en el enjuague permanente se incrementa, debido a los arrastres, este se emplea para rellenar el baño de cromo, a fin de recuperar el electrolito arrastrado y reponer el volumen del baño que se ha evaporado. Esto generalmente se hace diariamente, después de ajustar la concentración del enjuague de recuperación a los parámetros de operación del baño.

Los principales residuos que se generan son lodos de concentrado (lodos de la tina de baño), aguas de enjuague contaminadas por arrastres, emisiones y lodos del sistema de tratamiento.

Figura 14. Diagrama de un proceso de Cromado.



Fuente: Manual de minimización, tratamiento y disposición. Concepto de manejo de residuos peligrosos para el giro de la galvanoplastia. 1998.

2.6.1.8. Abrillantado.

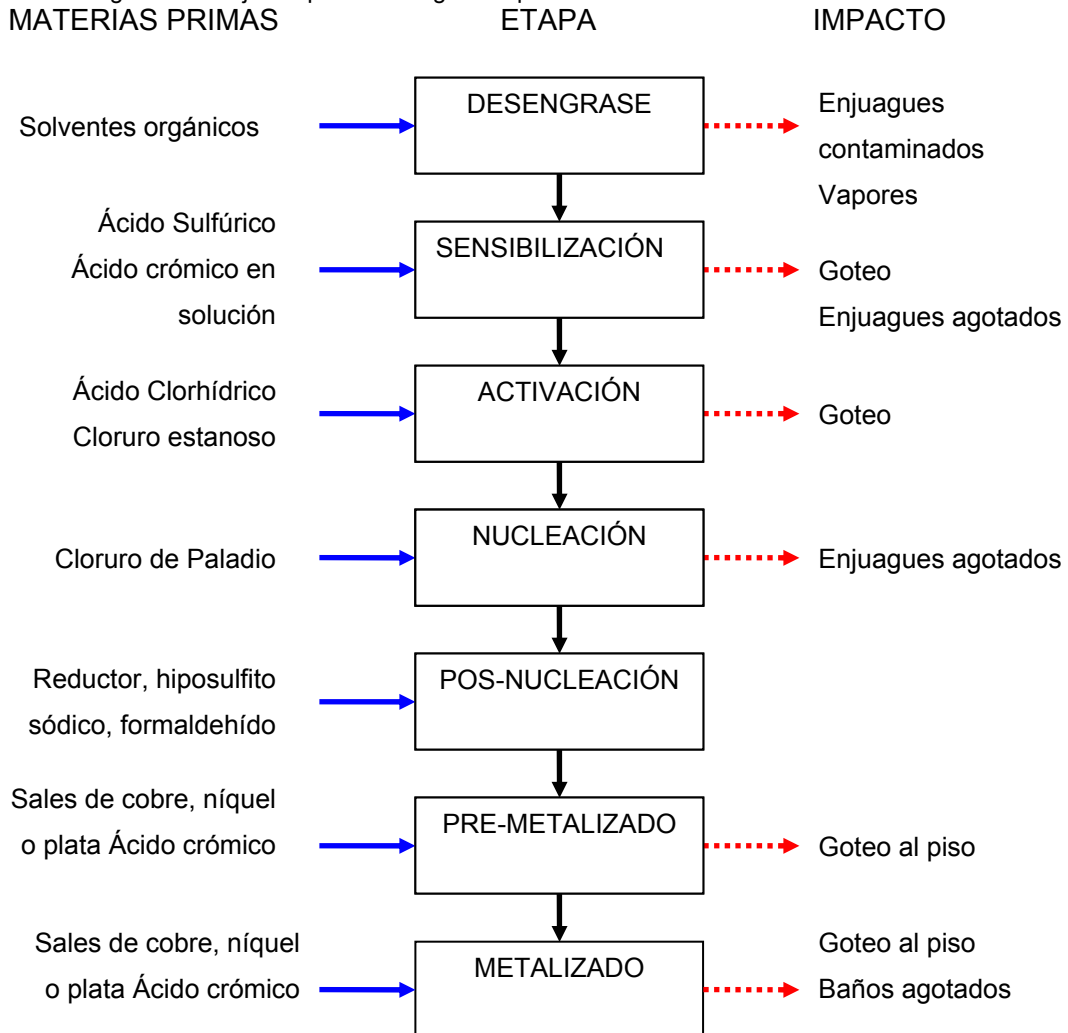
Este proceso se utiliza en forma separada proceso de decapado (nunca se aplican ambos) y tiene por finalidad dar un acabado a la pieza, tipo espejo. Es muy utilizado para la fabricación de luminarias, como por ejemplo, reflectores de semáforos. Dependiendo del nivel de brillo con que haya quedado la pieza en las etapas previas,

esta etapa puede ser omitida. Normalmente, se utiliza una combinación de ácidos fuertes (sulfúrico, fosfórico, clorhídrico, fluorhídrico).

2.6.1.9. Secado.

Las piezas son colocadas en una centrífuga la cual extrae el exceso de agua y luego son secadas al ambiente.

Figura 15. Diagrama de flujo del proceso de galvanoplastia



Fuente: Acercar. Unidad de asistencias para la pequeña y mediana industria. Manuales de buenas prácticas. Galvanotecnia (manuales en línea). Disponible en Internet: <http://www.acercar.org.co/industria/manuales/galvanotecnia.html>

2.6.2. Galvanoestegia.

Se refiere a los recubrimientos hechos electrolíticamente sobre superficies metálicas. Son realizados de dos maneras diferentes, en forma catódica o anódica, dependiendo de si la pieza se coloca para su tratamiento en el Terminal anódico o catódico del circuito.

La galvanostegeia catódica tiene tres objetivos fundamentales:

- Ejercer protección contra la corrosión,
- Mejorar el aspecto de las piezas,
- Incrementar las propiedades superficiales, como dar mayor dureza, mejorar la conductividad, ejercer lubricación, etc.

La galvanostegeia anódica conocida comúnmente como anodinado, implica la formación de películas de óxido del mismo metal para que aisle y proteja las piezas metálicas.

En general, los talleres de galvanotécnicos se pueden clasificar en dos categorías: talleres de servicio y talleres integrados. Los talleres de servicio a su vez se dividen en talleres de pulido y brillo y talleres de acabado.

2.6.2.1. Talleres de Pulido Y Brillo²¹.

Se encargan de convertir las superficies de las piezas metálicas rugosas en brillantes mediante un tratamiento mecánico. Existen dos tipos de talleres de pulido y brillo.

- Pulido y brillo mecánico: la operación consta de varias etapas, en las cuales la rugosidad es eliminada paulatinamente por la acción abrasiva de discos elaborados con diferentes materiales.
- Pulido electrolítico: la superficie pulida y brillada mecánicamente, puede ser sometida a un pulido electrolítico utilizando como ánodo la pieza y como electrolito una mezcla de ácido sulfúrico (40%), ácido fosfórico (40%), glicerina y agua en proporciones que dependen del metal base de la pieza.

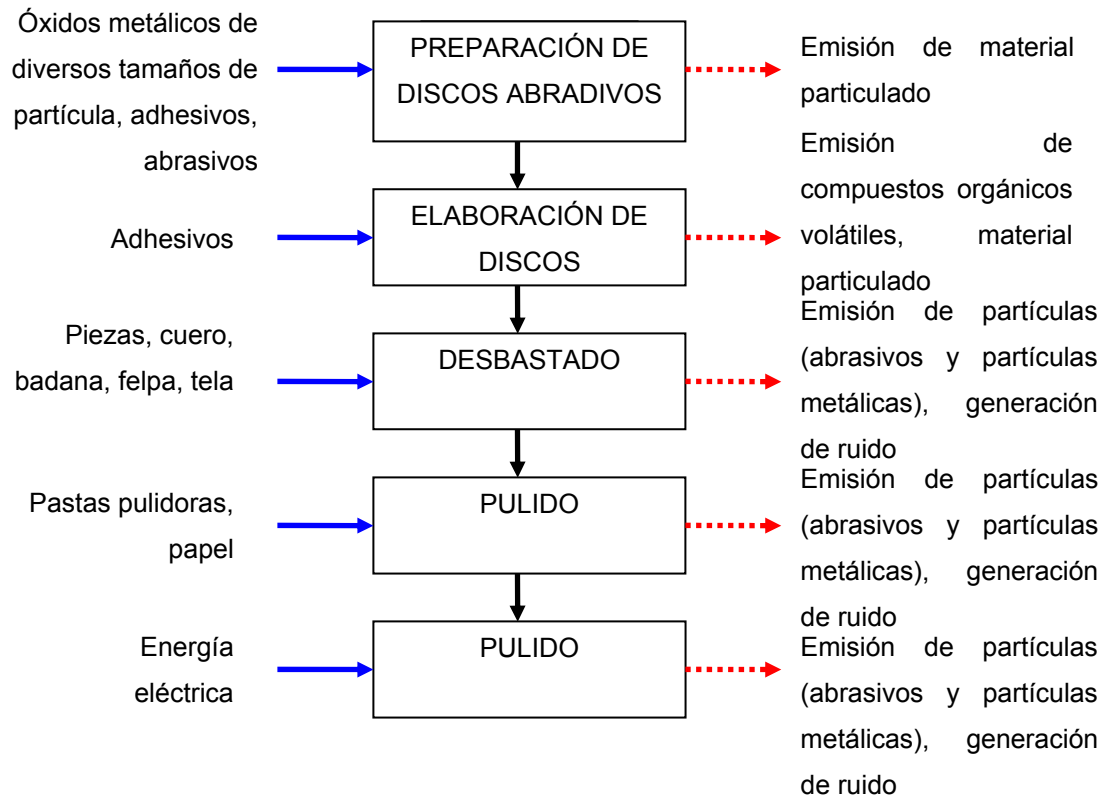
Un taller de pulido y brillo posee las siguientes etapas:

- Preparación de discos abrasivos: en éstos se emplean óxidos metálicos de diferente tamaño de partícula y adhesivos.
- Desbastado de la pieza: se eliminan las partes rugosas para obtener una superficie más lisa.

²¹ Guía de buenas prácticas para el sector de galvanotecnía. Ministerio del Medio Ambiente, Dirección general ambiental sectorial. FUNDES, la red de soluciones empresariales. p. 67

- Pulido: se utilizan pastas pulidoras para lograr una superficie definitivamente lisa y uniforme por todo el contorno.
- Brillado.

Figura 16. Diagrama de flujo de las etapas de taller de pulido y brillo en Galvanoestegia



Fuente: Acercar. Unidad de asistencias para la pequeña y mediana industria. Manuales de buenas prácticas. Galvanotecnia (manuales en línea). Disponible en Internet: <http://www.acercar.org.co/industria/manuales/galvanotecnia.html>

2.6.2.2. Talleres de Servicio De Acabado²².

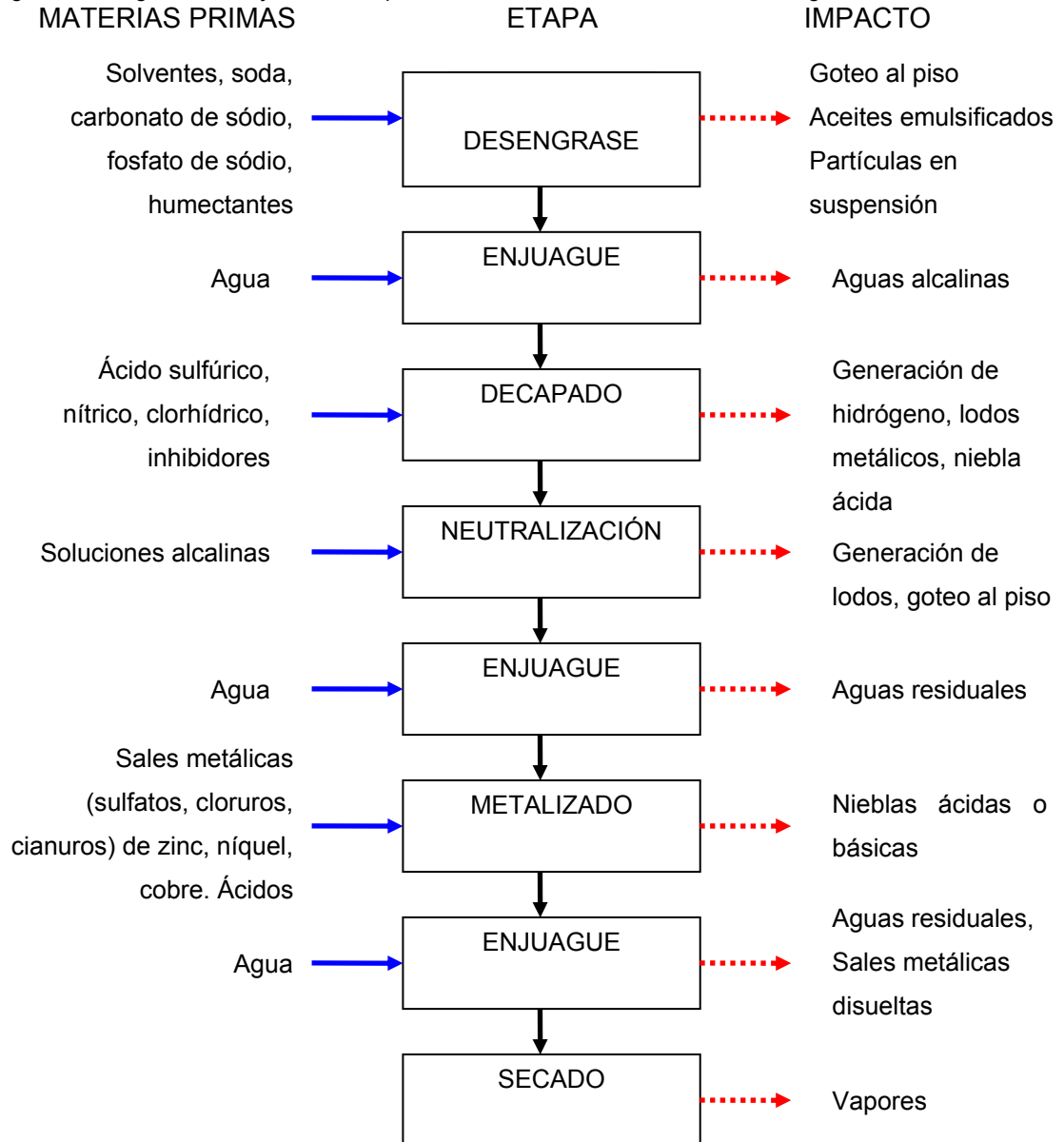
Las operaciones típicas son:

- Preparación de la superficie: la superficie pulida y brillada mecánicamente, puede ser sometida a un pulido electrolítico utilizando como ánodo la pieza y como electrolito una mezcla de ácido sulfúrico (40%), ácido fosfórico (40%), glicerina y agua en proporciones que dependen del metal base de la pieza.

²² Ibid., p.68

- Desengrase: se realiza para quitar los restos de grasa, aceite o suciedades que existen en las piezas producto de las operaciones de corte y se efectúa electrolíticamente o por inmersión de las piezas en soluciones alcalinas o solventes orgánicos. Estas operaciones se llevan a cabo a temperaturas superiores de 60 °C.
- Enjuague: entre cada una de las etapas es necesario realizar un enjuague con agua limpia, bien sea por inmersión o por aspersión para remover las trazas de soluciones que quedan adheridas a la pieza y de esta manera no contaminar los baños de la etapa posterior.
- Decapado: su objetivo es eliminar las capas de óxido formadas en la superficie de las piezas metálicas debido al contacto entre éstas y la atmósfera. Se realiza sumergiendo las piezas en una solución que puede ser ácida o alcalina según el proceso.
- Neutralización: después del decapado y a pesar del enjuague, pueden quedar restos de ácidos que dan lugar a la formación de hidrógeno nascente y a cambios en el pH de las soluciones de metalizado, utilizando la inmersión en soluciones alcalinas.
- Electrólisis: la pieza es colocada como ánodo o como cátodo dependiendo del tipo de proceso, conectada a un rectificador o generados de corriente y sumergida en el electrolito que contiene en solución los iones metálicos que se dan de depositar sobre su superficie. Previo a este proceso electrolítico se efectúa el enganche de las piezas en bastidores diseñados para tal efecto.
- Secado: puede permitirse secado al ambiente o realizarse utilizando aire caliente.

Figura 17. Diagrama de flujo de las etapas de taller de acabado en Galvanoestegia

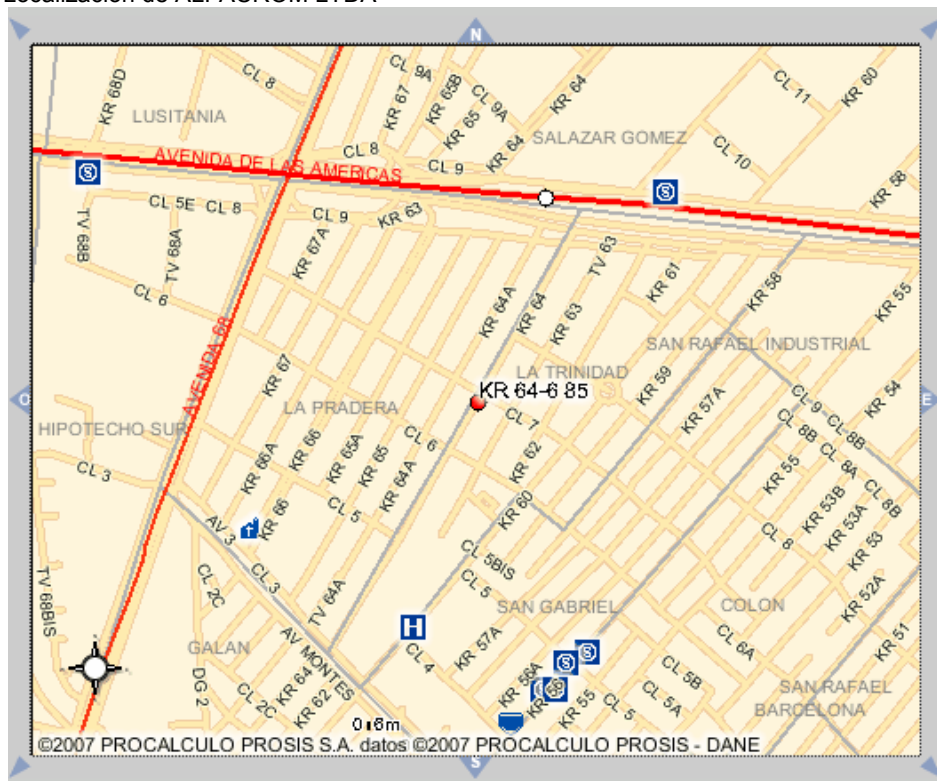


Fuente: Acercar. Unidad de asistencias para la pequeña y mediana industria. Manuales de buenas prácticas. Galvanotecnia (manuales en línea). Disponible en Internet: <http://www.acercar.org.co/industria/manuales/galvanotecnia.html>

3. INDUSTRIA EVALUADA

Para la realización de los cinco ensayos definitivos, se tomaron los vertimientos industriales de la empresa ALFACROM LTDA, la cual queda ubicada en la Cra 64 # 6 – 85, zona industrial de Bogotá, en el barrio La Pradera. Se contó con la colaboración del Ingeniero Químico Oscar Suárez.

Figura 18. Localización de ALFACROM LTDA



Fuente: <http://www.mapas.com.co/visor2007/colombia.visor/visor.jsp>

Alfacrom LTDA es una empresa del sector metalmecánico (Galvánico) que se dedica a la fabricación de diversos productos metálicos. Se encuentra dividida en tres plantas, ubicadas en diferentes sectores de la ciudad:

- Planta de Fundición. Se encuentra ubicada en Usme. Es donde se fabrican y pulen las piezas como: herrajes, hebillas, adornos, etc.

- Planta de Servicios de Acabado. Se encuentra ubicada en el barrio La Pradera. Es donde se realizan los recubrimientos metálicos de las piezas fabricadas por la empresa y las piezas suministradas por otros clientes.
- Planta de Cromado. Se encuentra ubicada en el barrio Ricaute. Se dedica, exclusivamente, al recubrimiento de las piezas con cromo.

Las muestras de agua fueron tomadas de la planta de servicios de acabado. Esta planta recibe piezas listas para el proceso de recubrimiento, es decir, pulidas y brilladas. Al llegar a la planta, se toman las medidas necesarias para armar las piezas en unas gancheras con alambre de cobre, en grupos de 5 a 20 piezas dependiendo de su tamaño, ver figura 19.

Figura 19. Gancheras



Fuente: Las autoras. 2007.

Esta empresa trabaja los siguientes acabados: cobre brillante y antiguo, níquel brillante, plata brillante y antigua, oro brillante y latón. Para ello se cuenta con los baños electrolíticos de estos metales, que contienen ácidos, cianuros, aditivos y metales pesados.

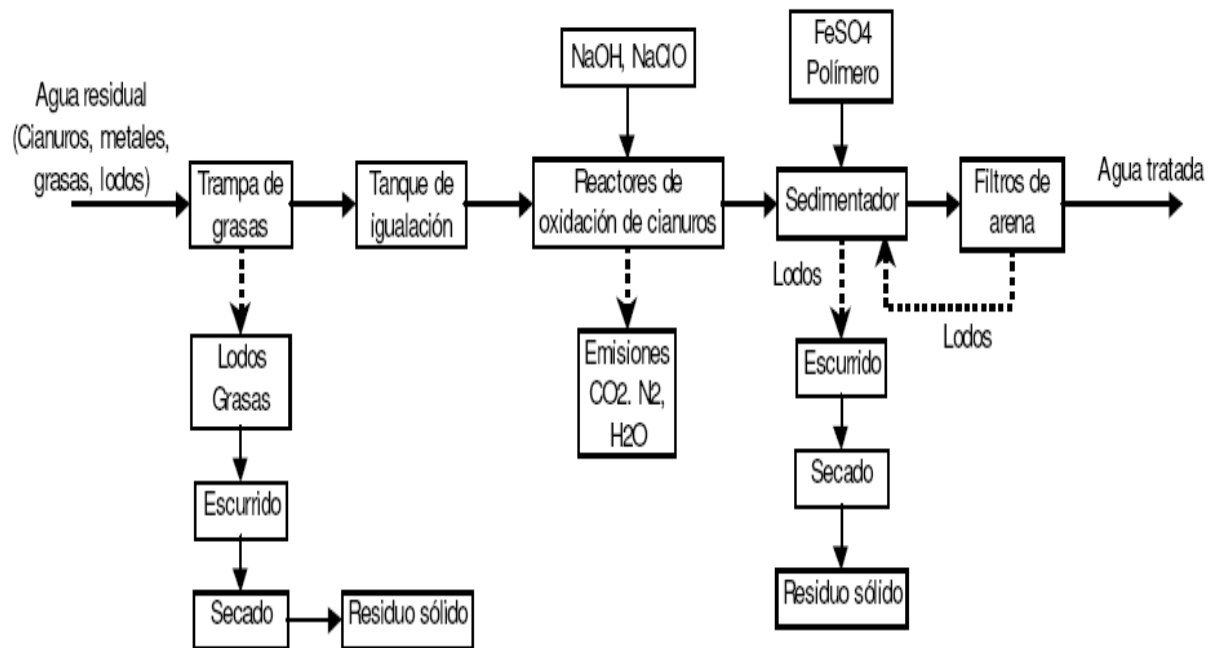
Dentro de la generación de contaminantes en las diferentes etapas productivas, se presentan los siguientes:

- Aguas de lavado: cianuros, lodos de metales pesados, ácidos y bases, sales de metales Cr, Cu, Ni, etc.
- Emisiones Gaseosas: se dan en los baños electrolíticos y de desengrase.

- Residuos: se genera el alambra utilizado para amarrar las piezas, solventes, trapos, papel y recipientes usados.

Alfacrom LTDA, hace parte del “Convenio Marco de Concentración para la Producción Más Limpia y Competitividad, entre el subsector de la Galvanotecnia y el Departamento Técnico Administrativo del Medio Ambiente DAMA”, que entre sus convenios está reducir los contaminantes por efluentes líquidos; por ello se cuenta con una PTAR en la planta de la pradera. La PTAR cuenta con: trampa grasa, tanque de igualación, reactores de oxidación, sedimentador, filtro de arena.

Figura 20. Diagrama de flujo de la PTAR, Alfacrom LTDA.



Fuente: GIOVANNETTI SANCHEZ, Silvia Lorena. Lineamientos para la aplicación de un sistema de gestión ambiental en la empresa Alfacrom LTDA. pag. 62.

Figura 21. PTAR, Alfacrom LTDA. Reactores de oxidación de cianuros



Fuente: Las autoras. 2007.

Figura 22. PTAR, Alfacrom LTDA. Sedimentador



Fuente: Las autoras. 2007.

Figura 23. PTAR, Alfacrom LTDA. Filtros de carbón activado



Fuente: Las autoras. 2007.

Figura 24. PTAR, Alfacrom LTDA. Tolva de lodos y secado de lodos.



Fuente: Las autoras. 2007.

4. METODOLOGÍA

4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

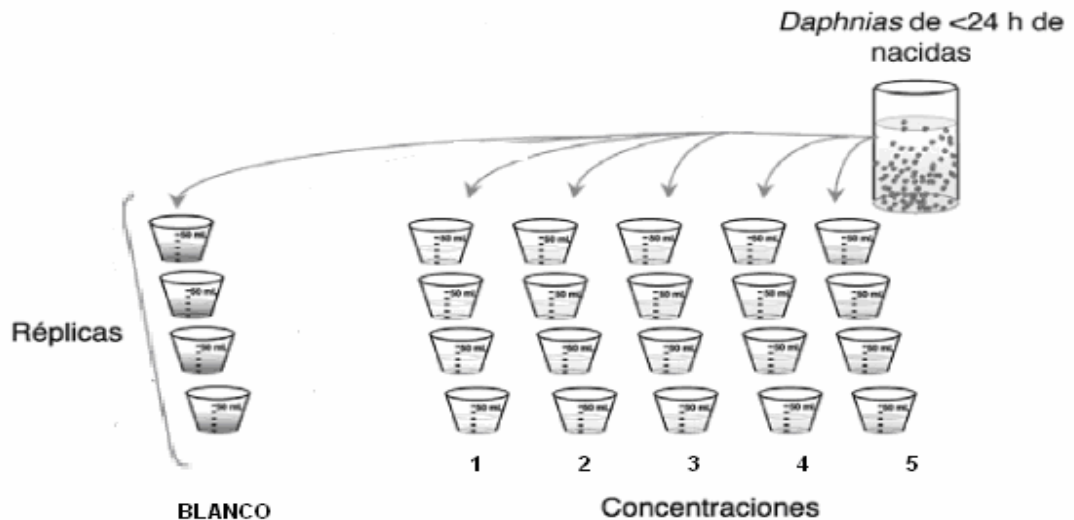
En esta investigación se controlaron y midieron las siguientes variables:

- Variable independiente: La variable que se manejó como independiente en las pruebas de toxicidad fue la concentración de las sustancias de prueba o de interés (Dicromato de Potasio y Sulfato de Cobre) y el porcentaje de dilución del vertimiento, buscando establecer un efecto sobre una determinada población en donde todas las unidades experimentales son homogéneas.
- Variable dependiente: La variable que se manejó fue la obtención de la concentración letal media del cromo y cobre 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 cromo y el cobre, le ocasiona a los organismos de 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 grupo anterior (Janneth Bernal y Andrea Rojas, Determinación de la concentración letal media (CL_{48}^{50}) del mercurio por medio de bioensayos de toxicidad acuática sobre Daphnia Pulex.).

En este diseño inicialmente se realizaron pruebas preliminares, utilizando rangos entre concentraciones 0.01 - 0.20 ppm para cromo y 0.5 – 3.0 ppm para cobre. Posteriormente con los datos de los rangos obtenidos en el ensayo preliminar, se realizaron las diez pruebas definitivas, utilizando cinco (5) organismos por tubo de ensayo, basándose 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, 120 organismos por montaje y 20 organismos por concentración correspondiendo cada uno al 5%. Como se muestra a continuación:

Figura 25. Montaje de pruebas de toxicidad.



Fuente: CASTILLO, Gabriella. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. pag. 61

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 posible, determinar si ciertos factores producen resultados significativos diferentes de las variables ensayadas. En este caso, se realizó para determinar si existían o no, diferencias significativas en las mortalidades de los tratamientos.

Estos protocolos hacen parte del proyecto de investigación de bioensayos 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 reconstituida fue realizada según metodología CETESB, protocolo L5.017 y Escobar Malaver con el fin simular las condiciones de sales disueltas encontradas en el hábitat natural de este tipo de microorganismos por medio de la dureza, la cual se debe encontrar en un intervalo entre 40 – 48 mg/l $CaCO_3$, preparada a partir de agua desionizada grado analítico. Para ello se prepararon las soluciones de los reactivos con las siguientes concentraciones:

- 10 g/L de $NaHCO_3$,
- 13.5 g/L de $CaCl_2$,
- 10g/L de KCl,
- 20,5 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

El agua se prepara con los siguientes volúmenes de las soluciones:

Tabla 8. Forma de preparación de agua reconstituida.

No.	Reactivo	Cantidad a preparar (L)	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, y Protocolo L5.017/ 1992.

Una vez preparada el agua reconstituida, se debe oxigenar por un período mínimo de 48 horas antes de adicionar los organismos de prueba. Se realizaron las pruebas de viabilidad para garantizar las óptimas condiciones del agua reconstituida. La concentración de oxígeno disuelto debe permanecer por encima de los 6 mg/L. De igual manera se estableció un formato de control para llevar el control de: pH, dureza y oxígeno disuelto, el cual se muestra a continuación:

Tabla 9. Formato de control del agua reconstituida.

ACUARIO No	pH	OXIGENO DISUELTO		DUREZA	OXIGENO DISUELTO	
		OD i	Fecha		OD f	Fecha

Fuente: Las autoras. 2007.

En este formato se registraban todos los datos, los cuales deben estar dentro de los siguientes rangos.

Tabla 10. Parámetros de control a evaluar en el agua reconstituida.

Parámetros de Control	Rango	Rango Ideal
Dureza	40 – 48 mg/l	45 mg/l
Oxígeno Disuelto	5 – 7 mg/l	6 mg/l
pH	7.3 – 7.5	7.4
Temperatura	18 – 22 ° C	20 °C

Fuente: Las autoras. 2007.

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 como factor de mortalidad y se procede a preparar una nueva con las anteriores características.

4.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CENTRIFUGACIÓN DE ALGAS VERDES, SCENEDESMUS Y CHLORELLA.

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, 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 11.

Tabla 11. Preparación del medio Bristol

No.	COMPUESTO	STOCK	ml de Stock para 1L/ 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, más un (1) mL de los elementos traza (ver tabla 11) y completar el volumen de la probeta (1L). Posteriormente se lleva la solución ya preparada a la autoclave a una presión de 15 PSI y 250 °F, por 15 minutos, luego se saca de la autoclave y se deja enfriar a temperatura ambiente antes de agregar los dos (2) mL del alga concentrada.

Para ello se maneja el montaje que se muestra en la fotografía a continuación, por un período de 15 días, con ayuda de una lámpara luminiscente prendida las 24 horas y oxigenadas para su constante movimiento y garantizar el proceso de fotosíntesis.

Figura 26. Montaje medio Bristol para algas verdes



Fuente: Las autoras. 2007.

Al estar listas las algas, se deben centrifugar para obtener algas concentradas. Según el protocolo la centrifugación se debe realizar de 3000 – 5000 rpm por 5 minutos; pero debido a que la centrifuga que se encuentra en el laboratorio solo llega a 4000 rpm, y a la ausencia de tubos DINAC II Centrifuge (Brand), se debe realizar a 2000 rpm por un tiempo de diez (10) minutos, para evitar la ruptura de los tubos de ensayo y asegurar el concentrado de las algas. Las algas deben estar siempre refrigeradas y rotuladas con la fecha de preparación y centrifugación para tener un control sobre estas.

Para mayor información, se encuentra el protocolo LB02 “Preparación del medio Bristol y centrifugación de algas *Selenastrum*”, donde se describe la metodología para la

realización del medio Bristol. Este protocolo hace parte del proyecto de investigación de bioensayos, y se encuentra en los archivos del laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, para su consulta.

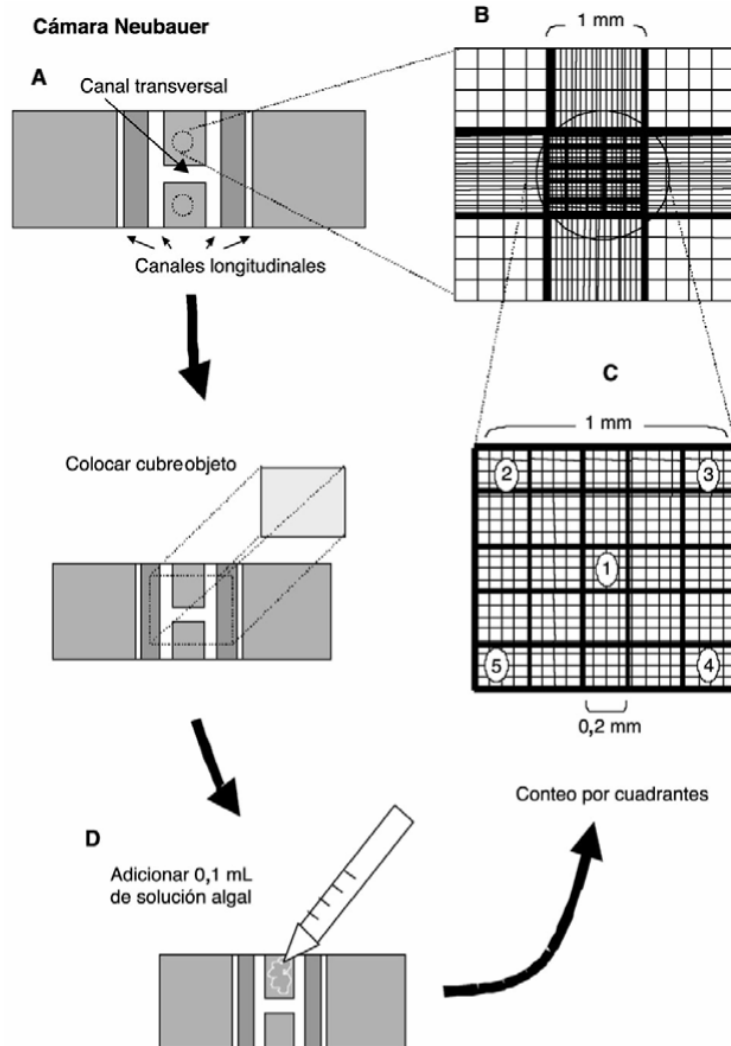
4.4. ALIMENTACIÓN DE ORGANISMOS PRUEBA.

El cultivo de *Daphnia Pulex* se alimentó con un concentrado de algas verdes, compuesta por *Scenedesmus* y *Chlorella*, las cuales fueron cultivadas en el laboratorio mediante el montaje del medio Bristol descrito anteriormente. Se tubo en cuenta que cada organismo en su mantenimiento, necesita una dosis de 3.0×10^6 células por *Daphnia Pulex* /día., según la metodología CETESB y la Universidad Nacional de Colombia.

La cantidad de alimento necesaria fue calculada con ayuda de la cámara de 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) mm^2 ; los cuatro cuadrados grandes de las esquinas señalados con una L están en 16 cuadrados con aristas de 0.25 mm.

La realización de este procedimiento se encuentra estableció el protocolo LB03 “Conteo 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 bioensayos y se encuentra en los archivos del laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, para su consulta.

Figura 27. Cámara de Neubauer.



Fuente: CASTILLO, Gabriella. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. pag. 91

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.

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 (Bernal y Rojas, 2007).

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 (Bernal y Rojas, 2007).

Los microorganismos fueron capturados el 30 de noviembre de 2006 en el humedal de Guaymaral al lado del colegio Nueva York en la autopista norte, kilómetro 15 (Calle 227 No 49 – 64) por el profesor Pedro Miguel Escobar Malaver y las tesisistas de ese entonces Alba Janneth Bernal Paredes y Andrea Paola Rojas Avella; ellas se encargaron de su aclimatación y mantenimiento.

La identificación y corroboración de la especie, fue realizada por:

- Juan Pablo Álvarez Suárez. Biólogo de la Universidad Nacional de Colombia. Laboratorio de Invertebrados.
- Carmen Reyes Blandom. Biólogo de la Universidad Nacional de Colombia. Docente.
- Pedro Miguel Escobar Malaver. Químico Industrial. Universidad de la Salle. Investigador principal en el grupo de investigación de bioensayos.
- Con ayuda de la tesis de la Universidad de la Salle, por González Gómez, Henry Bernardo; Gutiérrez Álvarez, Sandra del Pilar. Clasificación y ciclo de vida de una especie de *Daphnia* nativa de la Sabana de Bogotá.

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 reconstituida anteriormente preparada, cuya dureza se encuentra entre 40 a 48 mg/L de $CaCO_3$. Se colocaron los organismos

en cristalizadores (recipientes de vidrio) de 70mm con 50% de agua de agua natural y reconstituida; 48 horas después se pasan a cristalizadores con el 100% de agua reconstituida completándose su aclimatación a esta condiciones de iniciándose la frecuencia de alimentación. Al realizar el cambio de grupo, se procedió de forma gradual a la adaptación de los microorganismos a nueva manipulación para evitar que estos fueran a sufrir estrés y se produjera alguna mortalidad del cultivo.

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 28.

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.

Figura 28. Mantenimiento de cultivos de *Daphnia pulex*

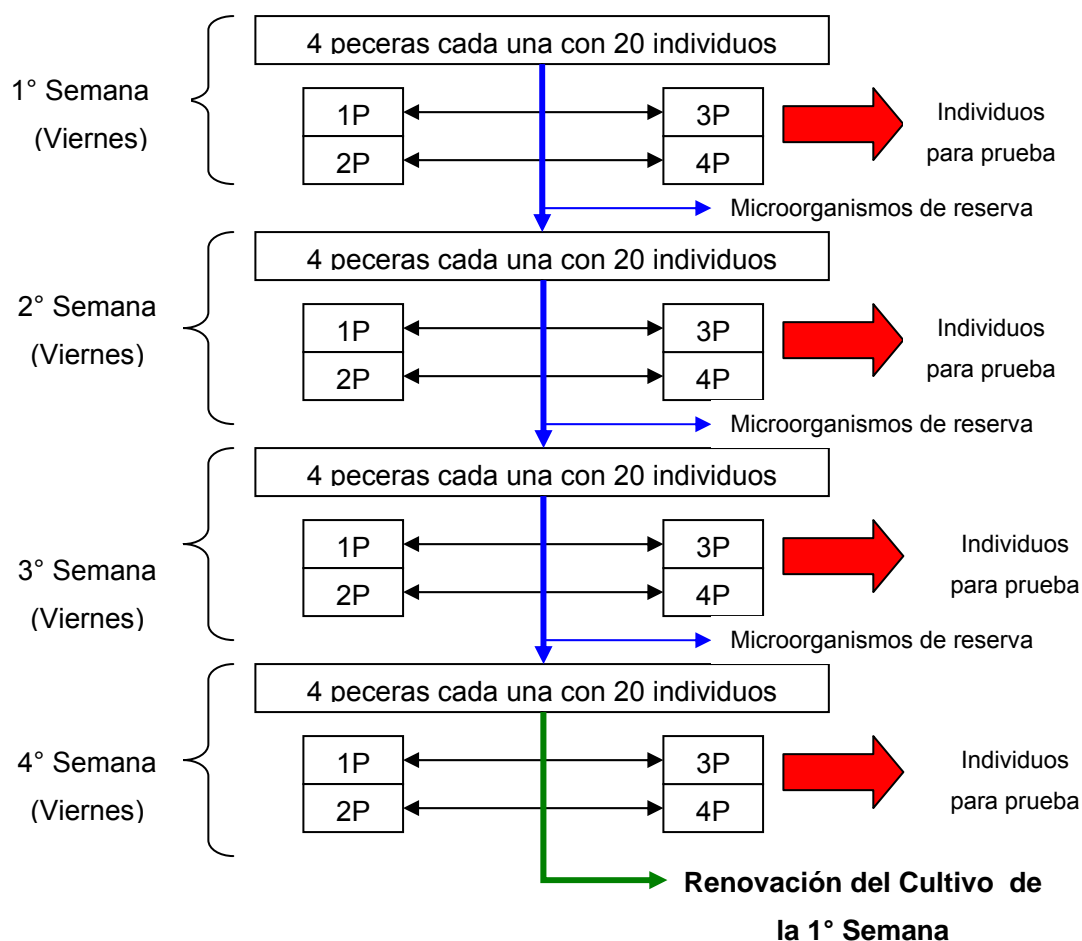


Fuente: Las autoras. 2007.

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 semanas, hasta cuatro semanas, eliminando los organismos mayores a cinco semanas y renovando el cultivo con neonatos que se obtuvieran 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.

Figura 29. Separación y mantenimiento de organismos prueba.



Fuente: Modificación de la tesis de BERNAL y ROJAS (2007)

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

Tabla 12. Registro de la Temperatura en el área de mantenimiento del cultivo.

Fecha	Temperatura ($^\circ\text{C}$)

Fuente: Las autoras. 2007.

Adicionalmente con el fin de mantener condiciones óptimas para el crecimiento de los individuos, estuvieron con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, controlado con un temporizador, el cual apagaba la luz a las 9:00 p.m. y la volvía a prender a las 5:00 a.m., (ver fotografía), y una intensidad lumínica de alrededor de 1000 lux.

Figura 30. Temporizador.



Fuente: Las autoras. 2007.

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 del agua reconstituida, pruebas de sensibilidad y realización de las pruebas preliminares y definitivas de toxicidad.

A continuación se presenta un resumen de las condiciones recomendadas para el mantenimiento de cultivos de *Daphnia Pulex*:

Tabla 13. Resumen de las condiciones recomendadas para el mantenimiento de cultivos de *Daphnia Pulex*.

PARÁMETRO	CONDICIÓN IDEAL
Temperatura	20± 2 °C

PARÁMETRO	CONDICIÓN IDEAL
Calidad de luz	Fluorescente, blanco-frío
Intensidad luminosa	600-1000 lux (luz blanca fría)
Fotoperiodo	16 horas luz/8 oscuridad
Densidad poblacional	10 individuos/L
Alimentación	Cultivos puros de Selenastrum u otras algas verdes unicelulares
Recipientes de mantenimiento	Los cultivos se mantienen en recipientes de 2 L de vidrio transparentes y deben permanecer tapados
Limpieza	Diariamente se deben retirar las mudas y los restos que se encuentren en el fondo de los recipientes. Cada lunes se cambia el 50% del agua de las peceras. Estas deben lavarse con abundante agua, asegurándose de retirar bien del vidrio las algas adheridas a este, enjuagar varias veces con agua desionizada y purgar con agua reconstituida. No se deben emplear jabón ni otros detergentes
Recolección de neonatos	Diariamente se retiran los neonatos con una micropipeta de plástico, con una abertura lo suficientemente ancha como para no ocasionar daños a los neonatos ni a las madres.
OD	Mayor a 6 mg/L
pH	7.3 – 7.5
Dureza	40 – 48 mg/L $CaCO_3$

Fuente: Modificado de CASTILLO, Gabriela. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. pag. 55

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 cromo y cobre.

4.8.1. Preparación de soluciones.

Las soluciones para todas las pruebas de toxicidad fueron preparadas con agua reconstituida, 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 mortalidad de los organismos de prueba debido a un cambio brusco 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 y copas de plásticas de aguardiente, distribuidos en cinco (5) concentraciones de las respectivas soluciones (para las pruebas de sensibilidad ($K_2Cr_2O_7$), sustancia pura (cromo y cobre) y muestra ambiental (vertimiento de una galvanotecnia), 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 o copas 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 papel craff, y se guarda en el área de mantenimiento de cultivos a una temperatura de 20 ± 2 °C, sin luz y por un periodo de 48 horas. Al término de este tiempo, con ayuda de una lámpara, se realizó 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”.

Figura 31. Lectura de organismos muertos.



Fuente: Las autoras. 2007.

4.8.3. Pruebas de toxicidad de sensibilidad con el tóxico de referencia dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$).

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*, pues se considera que en esta etapa aun se alimenta de las reservas del huevo²³ y no los afecta la falta de alimento.

Se prepararon cinco concentraciones (0.5, 0.3, 0.2, 0.1 y 0.05 ppm), las cuales venían siendo utilizadas por el grupo de investigación del mercurio, 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 el rango obtenido por el grupo anterior, 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 1, 0.7, 0.5, 0.3 y 0.1 ppm sobre los organismos; y las 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}), la cual disminuyó con respecto al grupo anterior, lo que nos indica que la sensibilidad de los microorganismos ha aumentado dando así mejores resultados a las pruebas a realizar con los metales.

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.

²³ REYES BLANDON, Carmen. Efectos subletales del cromo y cobre hexavalente y un carbonato sobre el ciclo de vida de dos especies de cladóceros. Santafé de Bogotá, 1997. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.

4.8.4. Pruebas preliminares de toxicidad con cromo y cobre.

4.8.4.1. Pruebas preliminares de toxicidad con cromo.

La solución madre fue preparada a partir del Dicromato de Potasio, $K_2Cr_2O_7$, (r.a. reactivo analítico Merck, Número K25331164-828 UN3288), a una concentración de 1000 mg/L; todas las concentraciones se registraron en concentraciones nominales del ión cromo (+6).

Se preparan 5 concentraciones iniciales, con base a la concentración letal media del cromo que se encuentra en el decreto 1594 de 1984 que es 0.01 ppm (Art. 45), y se realizan las pruebas por cuadruplicado, se mira como es la mortalidad de estas y de acuerdo a los resultados se procedo a aumentar o disminuir las concentraciones

4.8.4.2. Pruebas preliminares de toxicidad con cobre.

La solución madre fue preparada a partir del Sulfato de cobre pentahidratado, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, (r.a. reactivo analítico Merck, Número A354690-223 UN 3077) a una concentración de 1000 mg/L; todas las concentraciones se registraron en concentraciones nominales del ión cobre (+2).

Se preparan 5 concentraciones iniciales, con base a la concentración letal media del cobre que se encuentra en el decreto 1594 de 1984 que es 0.1 ppm (Art. 45), y se realizan las pruebas por cuadruplicado, se mira como es la mortalidad de estas y de acuerdo a los resultados se procedo a aumentar o disminuir las concentraciones

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 bioensayos 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 cromo y cobre.

4.8.5.1. Pruebas definitivas con cromo.

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 cromo.

Esta etapa se estableció mediante la metodología descrita en el protocolo LB05 “Pruebas de Toxicidad” obteniendo la concentración letal media (CL_{48}^{50}) del cromo con sus límites de confianza manejando la metodología descrita en el protocolo LB06 Análisis de Regresión y Análisis Probit y validando 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 del grupo de Bioensayos y se encuentran en los archivos del laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, para su consulta.

4.8.5.2. Pruebas definitivas con cobre.

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 cobre.

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 del grupo de Bioensayos 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, tomando 3 muestras por metal. Las muestras fueron tomadas de la siguiente manera, para cromo, se tomó de la parte del proceso del enjuague de

sellado cromato, y para cobre de la parte del proceso del enjuague de cobre ácido. Estos sitios se seleccionaron, dado que allí es donde se presenta la mayor concentración de éstos metales en todo el proceso productivo de la empresa.

Figura 32. Toma de las muestras. Cromo.



Fuente: Las autoras. 2007.

Figura 33. Toma de las muestras. Cobre.



Fuente: Las autoras. 2007.

Las pruebas fisicoquímicas se realizaron dentro de las primeras 24 horas, después de la toma de las muestras, evitando así las posibles alteraciones de sus características. Se transportaron de forma inmediata al laboratorio ASAFRANCO, para realizar allí parte de las pruebas: cromo, cobre y sólidos suspendidos, y luego fueron llevadas al laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de La Salle para evaluar: pH, dureza, conductividad y DQO. Todas las muestras fueron refrigeradas para garantizar el resultado de los análisis.

4.8.7. Análisis fisicoquímicos a los vertimientos.

A las muestras se le realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos.

- Cromo y Cobre: Para la investigación era necesario conocer el valor exacto de la cantidad de cromo y cobre presente en las muestras de agua; para ello la muestra fue analizada por el laboratorio ASAFRANCO, ubicado en Cll 39 # 29-50 barrio la Soledad, a través del método de absorción atómica y utilizando el Standard Methods Edición 19, 1995, SM 3111B-Cr para cromo y SM 3111B-Cu para cobre. Éste laboratorio fue escogido por estar acreditado por el IDEAM (ver anexo), además de llevar alrededor de 30 años de funcionamiento.
- Sólidos Totales: La muestra fue analizada por el laboratorio ASAFRANCO, utilizando el método Standard Methods Edición 19, 1995, SM 2540-D.
- DQO: El análisis se realizó en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de la Salle. La muestra fue preservada con Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) hasta obtener un $pH \geq 2$. Se utilizó el método de reciclo cerrado, la lectura se realizó en el espectrofotómetro (Hach), Standard Methods Edición 19, 1995, 5220D-2B.
- Dureza: El análisis se realizó en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de la Salle. Se utilizó el método titulométrico de EDTA Standard Methods Edición 19, 1995, SM 2340-C.
- Conductividad: El análisis se realizó en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de la Salle. Se utilizó el método Standard Methods Edición 19, 1995, SM 2510-B.
- pH: El análisis se realizó en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de la Salle. Se utilizó el método Standard Methods Edición 19, 1995, SM 4500H. $\pm B$

4.8.8. Pruebas definitivas con el vertimiento de cromo y cobre de ALFACROM LTDA.

Para la realización de estas pruebas se manejaron diferentes porcentajes de volumen de muestra diluidos con agua reconstituida. En la preparación de las soluciones se tuvo en cuenta que el intervalo de concentración debía reflejar valores de 0 y 100% de mortalidad.

Las primeras concentraciones por poseer porcentajes muy altos de los metales, en las primeras horas de las pruebas se presentó una mortalidad del 100%, procediendo a disminuir las concentraciones por medio de diluciones hasta obtener un rango efectivo para realizar las pruebas definitivas. Se prepararon las muestras ambientales, y procedió a sembrar en las copas plásticas, agregando a cada copa 10mL de muestra con sus respectivas replicas y el control (agua reconstituida).

4.9. RESULTADOS FISICOQUÍMICOS FINALES.

Las pruebas finales tienen la misma metodología que las pruebas preliminares. Se debe proceder a realizar la lectura de los microorganismos muertos después de las 48 horas siguientes a la siembra, adicionalmente se procede a medir el oxígeno disuelto, la dureza y el pH, en las dos concentraciones extremo de la batería, para corroborar que el efecto tóxico fue producido por un agente químico, en este caso el metal, 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, se descarta 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 4mg/L.

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} son sus respectivos límites de confianza para ello se utilizó 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 bioensayos 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).

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

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

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. INDICE 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:

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

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

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:

Tabla 14. Rangos de índices toxicológicos.

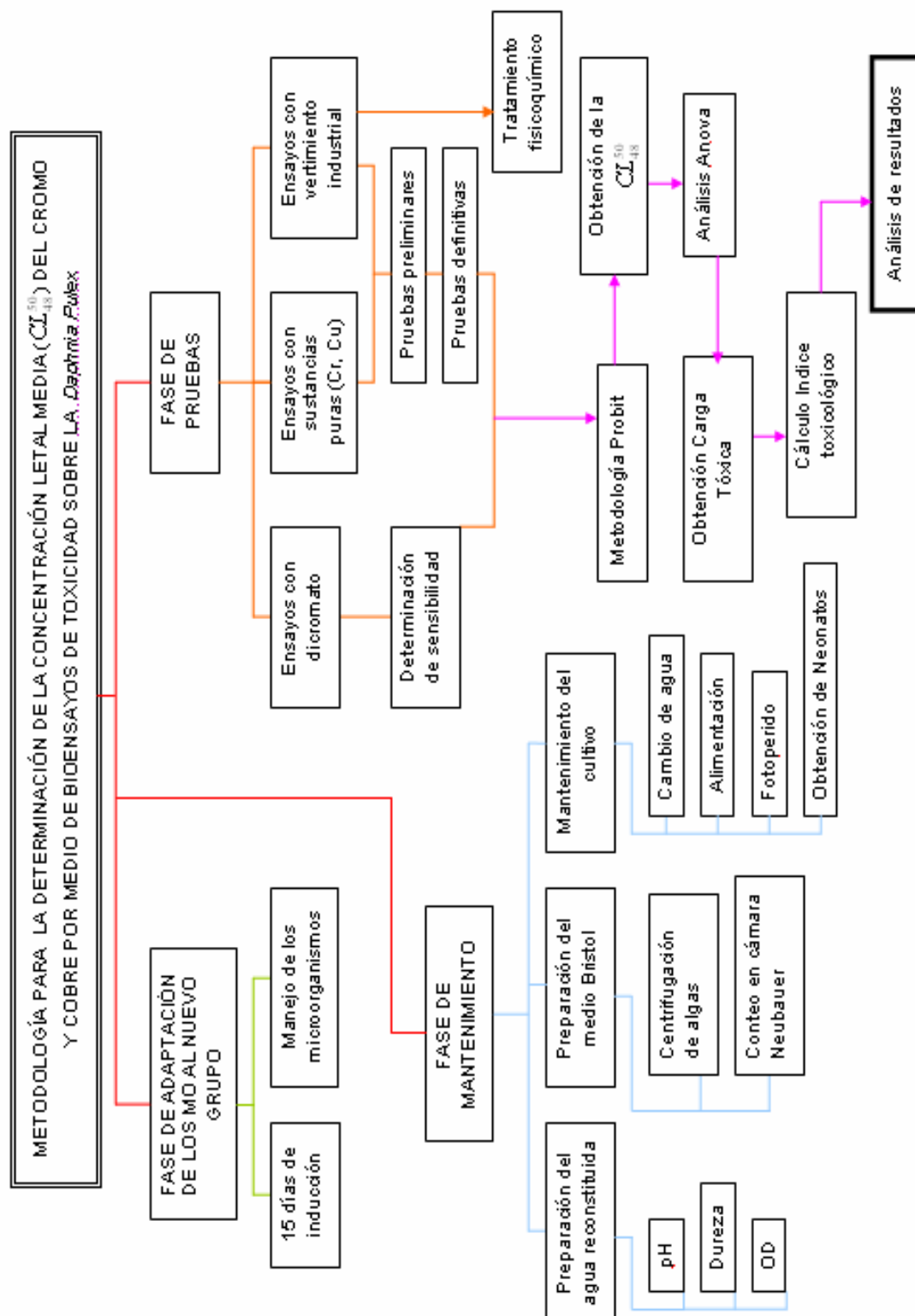
Rangos	Carga Tóxica
1 - 1.99	Despreciable
2 - 2.99	Reducida
3 - 3.99	Moderada
4 - 4.99	Considerable
> 5	Elevada

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 de cromo y cobre, que se obtuvieron durante esta investigación, se compararon con otros resultados encontrados en pruebas de toxicidad realizados en laboratorios de investigación de Colombia y el exterior, para validar los resultados obtenidos.

Figura 34. Metodología para la determinación de la concentración letal media.



Fuente: Las autoras. 2007.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

La metodología seguida y trabajada fue la presentada en las Guías CETESB (Brasil), la cual ha venido siendo trabajada por los grupos de investigación de Bioensayos de la Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de La Salle. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

5.1. ADAPTACIÓN DE LOS ORGANISMOS PRUEBA DAPHNIA PULEX, AL NUEVO GRUPO DE INVESTIGACIÓN.

El empalme se realizó con el grupo que venía trabajando anteriormente, Janneth Bernal y Andrea Rojas. Se realizó una inducción durante 15 días, en los cuales:

- Se leyeron los protocolos,
- Se aprendió a separar los microorganismos, preparar: agua de dureza, alimento, soluciones para los bioensayos, metodología para realizar las pruebas y la lectura de estas, manejo del programa Probit, entre otros.

Los microorganismos se empezaron a trabajar lentamente, para evitar posibles alteraciones en el cultivo por el cambio de mano. El cambio fue gradual, comenzando a sembrar las peceras semanales para que desde un principio los microorganismos se adaptaran al nuevo grupo. Con las Daphnias adultas se realizó el cambio en una semana, empezando a manipularlas de tal modo que estas no fueran a sentir un cambio muy brusco.

5.2. PREPARACIÓN DEL AGUA RECONSTITUIDA

El agua se preparó en dos acuarios con una capacidad de 20 litros cada uno, y era aireada para garantizar que el oxígeno disuelto fuera mayor de 6 mg/L. Los acuarios eran tapados con plástico para evitar cualquier tipo de contaminación del agua por material particulado o sustancias que pudieran caer sobre ellos.

Las soluciones preparadas se realizaban con agua desionizada, y sus cantidades para los reactivos fueron:

- 10 g/L de $NaHCO_3$
- 13.5g/L de $CaCl_2$
- 10g/L KCl
- 20,5 g/L de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$.

Fuente: CAR, Convenio CAR y Universidad Nacional de Colombia, 1996.

A partir de estas soluciones se manejaron los siguientes volúmenes para su preparación del agua reconstituida y garantizar una dureza entre 40 – 48 mg/L $CaCO_3$ necesaria para la supervivencia de las *Daphnia Pulex* :

- 100 ml/L de $NaHCO_3$,
- 75 ml/L de $CaCl_2$,
- 38 ml/L KCl
- 30 ml/L de $MgSO_4$

Fuente: CAR, Convenio CAR y Universidad Nacional de Colombia, 1996.

Durante toda la investigación se llevó el control del pH, OD, dureza, del agua reconstituida, cuyos valores máximos se encuentran en la tabla 10; este control fue consignado en el formato mostrado en la tabla 9, cada vez que el agua era preparada.

Figura 35. Montaje de los acuarios y preparación del agua de dureza.



Fuente: Las autoras. 2007.

5.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO BRISTOL Y CENTRIFUGACIÓN DE ALGAS VERDES

Las algas verdes utilizadas como alimento para las *Daphnia Pulex* fueron *Scenedesmus* y *Chlorella*. (Identificadas por: Jorge Otero, Bacteriólogo Universidad Pontificia Javeriana)

Para iniciar el cultivo, eran colocadas en el medio Bristol, ya esterilizado, 2mL de algas concentradas, luego eran tapadas, aireadas e iluminada con una lámpara las 24 horas del día para garantizar el proceso de fotosíntesis, por un periodo entre 10 a 15 días. Transcurrido este tiempo el medio Bristol se tornaba de color verde oscuro, indicando que ya se encuentran listas para centrifugar.

Figura 36. Medio Bristol inicial y final.

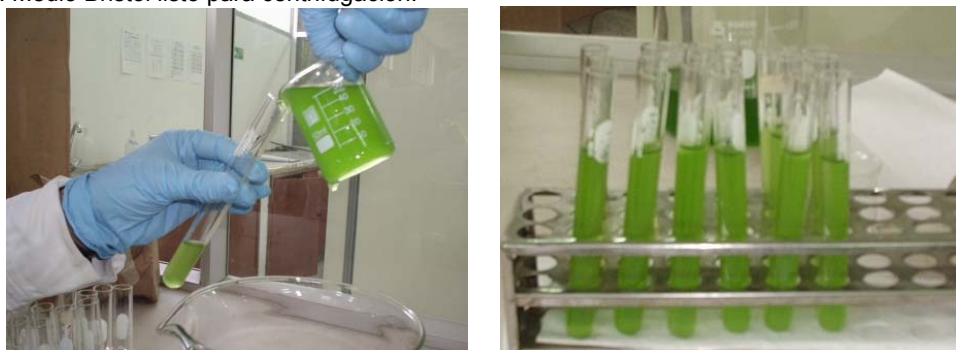


Fuente: Las autoras. 2007.

Es importante tener en cuenta que no se debe pasar del tiempo indicado, ya que las algas comienzan con el proceso de putrefacción, se precipitan y su color se torna marrón.

Las algas al estar listas, eran centrifugadas a unas 2000rpm por un tiempo de 10 minutos como se explicó en la metodología, numeral 4.3.

Figura 37. Medio Bristol listo para centrifugación.



Fuente: Las autoras. 2007.

Figura 38. Centrifuga.



Fuente: Las autoras. 2007.

Al terminar de centrifugar, se procede a retirar el exceso de Medio Bristol (sobrenadante) y dejar al final del tubo, únicamente, el alga concentrada; luego esta se retira con una pipeta Pasteur y se almacena en frascos de vidrio preferiblemente (ver fotografías).

Figura 39. Retiro del sobrenadante.



Fuente: Las autoras. 2007.

Figura 40. Diferencia de tubos de ensayo antes y después de la centrifugación.



Fuente: Las autoras. 2007.

Figura 41. Extracción de las algas del tubo de ensayo y almacenamiento.



Fuente: Las autoras. 2007.

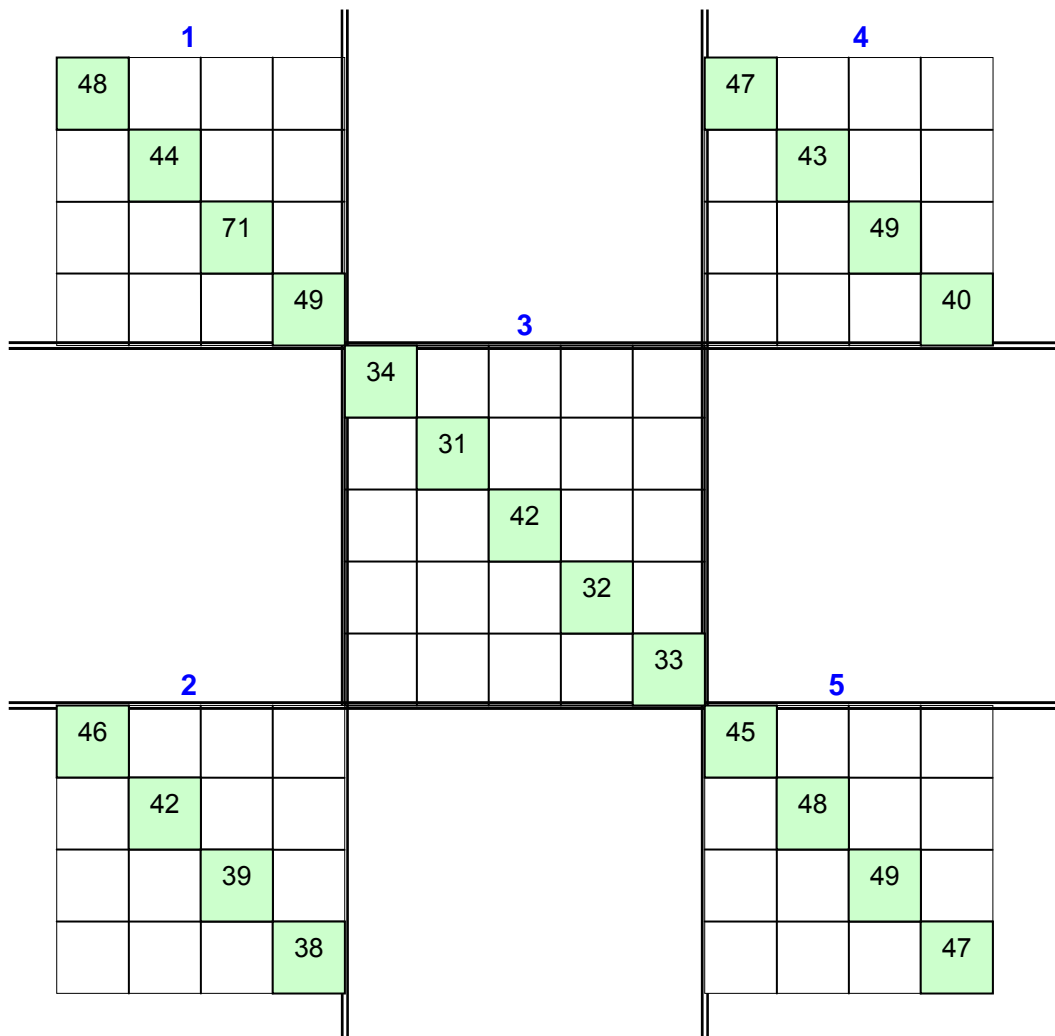
5.4. ALIMENTACIÓN DE ORGANISMOS PRUEBA

A continuación se presentan el modo de lectura de las algas en la cámara de Neubauer para determinar la cantidad de alimento que se debe suministrar a las peceras con los microorganismos. Este procedimiento se debe realizar cada vez que se obtenga un nuevo concentrado de algas.

El conteo se debe realizar de la siguiente forma:

1. Se realiza una dilución de las algas concentradas. Esta debe ser 0.1 ml de algas concentradas y 2.9 o 3.9 mL de agua, dependiendo de lo concentradas que estén las algas.

2. Con una pipeta Passteur se coloca una gota en la cámara; la cual se debe encontrar limpia y con el portaobjetos colocado, como se muestra en la figura 26.
3. Se debe dejar en la cámara por 2 minutos antes de realizar la lectura.
4. Leer en el microscopio de la siguiente forma (lectura del 23-06-07): se deben contar las colonias que hay en los cuadros haciendo una línea diagonal. Solo se tienen en cuenta las algas que se encuentran dentro del cuadro, no se cuentan las que están fuera o que tocan las líneas.



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.

$$Lectura1 = 48 + 44 + 71 + 49 = 212 \times 4 = 848$$

$$Lectura2 = 46 + 42 + 39 + 38 = 165 \times 4 = 660$$

$$Lectura3 = 34 + 31 + 42 + 32 + 33 = 172 \times 5 = 860$$

$$Lectura4 = 47 + 43 + 49 + 40 = 179 \times 4 = 716$$

$$Lectura5 = 45 + 48 + 49 + 47 = 189 \times 4 = 756$$

$$\sum Lecturas = 3840$$

$$\bar{X} = 768 \text{ células}$$

Ésta es la cantidad de células que existen en un 1 ml de algas, partiendo que la cámara tiene una capacidad de 1×10^{-4} ml, entonces:

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

$$\text{No. células} = \frac{(1 \text{ mL}) * (768)}{1 \times 10^{-4} \text{ mL}}$$

$$\text{No. células} = 7.68 \times 10^6$$

Este valor se multiplica por el factor de dilución, que en este caso es 20 (0.1 mL de algas * 1.9 mL de agua), dado así el valor real de células que existe en 1 ml de algas.

$$\text{No. células} = (7.68 \times 10^6)(20)$$

$$\text{No. células} = 153.6 \times 10^6$$

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.

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

$$V = \frac{20org. * (3 \times 10^6 \text{ cél} / org)}{153.6 \times 10^6 \text{ cel} / mL} = 0.39 \frac{ml}{día}$$

Con base en los resultados obtenidos en el conteo de la cámara Neubauer y al número de organismos por pecera, el volumen de alimento se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 15. Volumen de alimento administrado a cada pecera.

Días MO	1	2	3
22	0.429	0.859	1.287
20	0.390	0.781	1.172
15	0.273	0.547	0.820
5	0.097	0.195	0.292

Fuente: Las autoras. 2007.

5.5. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO DE LOS ORGANISMOS PRUEBA DAPHNIA PULEX

Dentro del laboratorio de Ingeniería Ambiental y Sanitaria se dispuso un área exclusiva para el laboratorio de bioensayos. Esta se encuentra aislada y separada del resto del laboratorio, como se muestra en la siguiente figura.

Figura 42. Laboratorio de bioensayos dentro del Laboratorio de Ingeniería Ambiental y Sanitaria.



Fuente: Las autoras. 2007.

A pesar de tener un sitio aislado, los microorganismos tenían épocas de mortandad, dadas las condiciones externas a la parte aislada, y dependiendo de los análisis y pruebas que se hacían en el laboratorio de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Para evitar estas condiciones desfavorables en el cultivo, la facultad adaptó un laboratorio de uso exclusivo para bioensayos, el cual cuenta con las condiciones necesarias para el mantenimiento del cultivo y es libre de gases u olores nocivos para las Daphnias.

Figura 43. Laboratorio exclusivo para bioensayos.



Fuente: Las autoras. 2007.

En este nuevo laboratorio se encuentra una zona aislada para las Daphnias, con estantes que poseen una lámpara conectada a un temporizador para garantizar el fotoperíodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad), donde se colocaron las diferentes peceras con los

organismos para su mantenimiento; estas están tapadas y rotuladas con la fecha en que fueron separadas y sembradas. Adicionalmente el mueble es tapado con un plástico para evitar que entre polvo y que se conserve una temperatura adecuada durante todo el día.

Figura 44. Área del mantenimiento del cultivo de *Daphnia Pulex*.



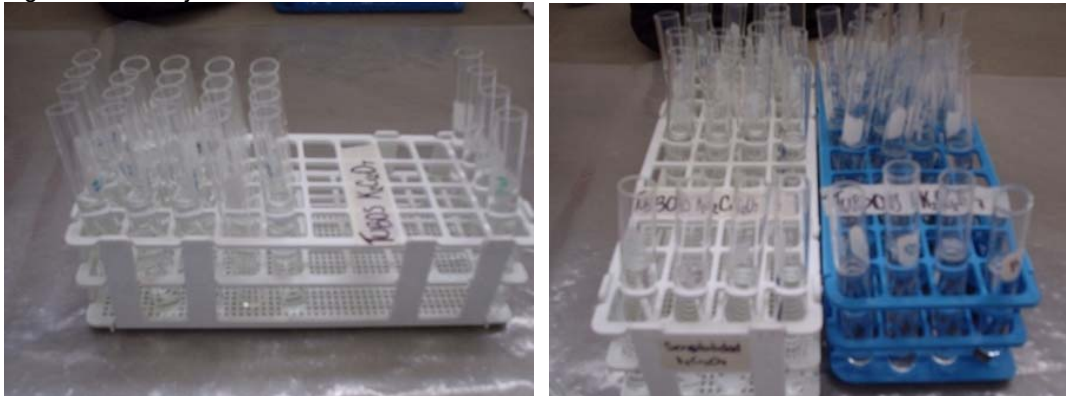
Fuente: Las autoras. 2007.

5.6. PRUEBAS DE TOXICIDAD DE SENSIBILIDAD CON EL TÓXICO DE REFERENCIA DICROMATO DE POTASIO $K_2Cr_2O_7$

Las pruebas de sensibilidad se realizaron con dicromato de potasio, utilizando una gradilla con 24 tubos de ensayo para la realización de las pruebas.

En la primera fila, de cuatro tubos de ensayos, se ubicó el blanco (agua reconstituida), de la segunda a la quinta fila se van colocando las diferentes concentraciones empezando de la más baja a la concentración más alta.

Figura 45. Montaje de Pruebas de toxicidad con Dicromato de Potasio.



Fuente: Las autoras. 2007.

Las concentraciones iniciales fueron 1.0, 0.7, 0.5, 0.3 y 0.1 mg/L, que es el rango hallado por el grupo anterior. Al realizar las pruebas con estas concentraciones, se observó que la sensibilidad había variado, disminuyendo la toxicidad. Por lo cual se procedió a disminuir las concentraciones y quedando unas definitivas así: 0.5, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 mg/L de dicromato de potasio.

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 a partir de las concentraciones definitivas suministradas por el grupo de investigación anterior. Los resultados se introdujeron en el programa estadístico Probit, determinando la CL_{48}^{50} con sus respectivos límites de confianza al 95%. Con ellos se construyó la carta de control con el valor promedio, que se observa en la tabla a continuación donde se presentan los resultados obtenidos de la evaluación, durante los meses de julio a septiembre de 2007:

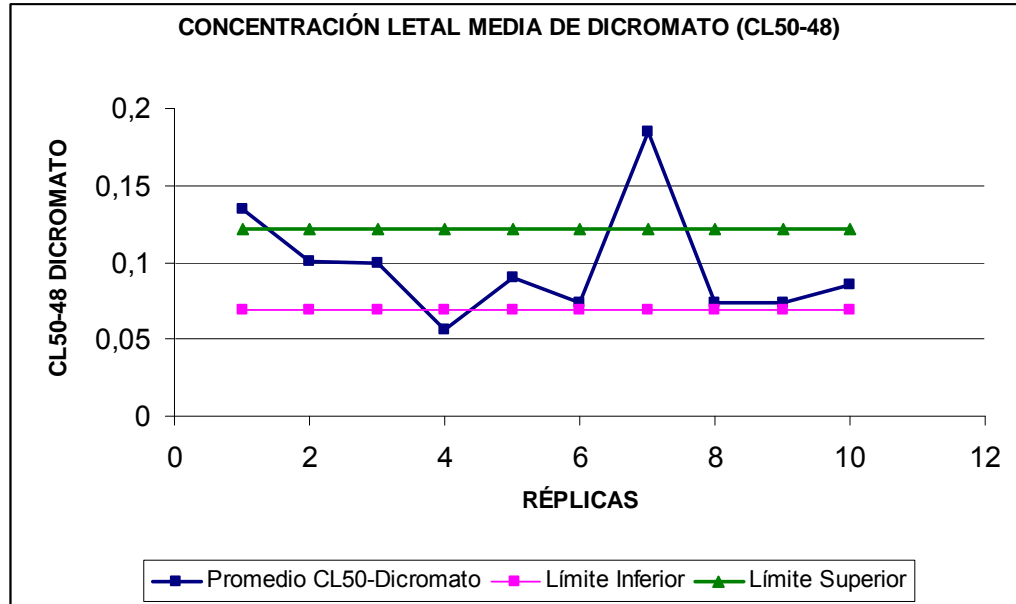
Tabla 16. Carta de Control de Sensibilidad del cultivo de Daphnia Pulex.

FECHA	CL50	LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR
03/07/07	0,1346	0,0983	0,1660
03/07/07	0,1007	0,0664	0,1332
09/07/07	0,0995	0,0688	0,127
09/07/07	0,0558	0,0317	0,076
23/07/07	0,0903	0,068	0,1128
23/07/07	0,0740	0,0562	0,0912
30/07/07	0,1843	0,1296	0,2152
06/08/07	0,0740	0,0534	0,0933
10/09/07	0,0731	0,0502	0,0940
10/09/07	0,0849	0,0654	0,1044
PROMEDIO	0,09712	0,0688	0,1213

Fuente: Las autoras. 2007.

En la Gráfica 1, se muestra la distribución de las sensibilidades obtenidas durante el tiempo de las pruebas, así como su promedio como sus respectivos límites.

Grafica 1. Sensibilidad del cultivo al toxico de referencia.



Fuente: Las autoras. 2007.

Estas pruebas se realizaron con el fin de establecer 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 a la sustancia que se desea analizar y 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 exposición²⁴.

Inicialmente en los ensayos preliminares se trabajo con el intervalo de concentraciones hallado por el grupo de investigación anterior 1.0, 0.7, 0.5, 0.3 y 0.1 mg/L a medida que se avanzaba en la investigación este intervalo fue disminuyendo hasta llegar al rango definitivo utilizado (0.5, 0.3, 0.2, 0.1 y 0.05 mg/L).

La concentración letal media (CL_{48}^{50}) promedio obtenida en las pruebas de sensibilidad es 0,09712 mg/L y sus límites de confianza son 0,0688 y 0,1213 mg/L expresados como Dicromato de Potasio.

²⁴ BERNAL Y ROJAS, Op.cit.,p. 91.

A continuación se muestra la tabla de comparación de resultados obtenidos anteriormente con los hallados en esta investigación.

Tabla 17. Comparación de resultados de Sensibilidad con Dicromato de Potasio (CL_{48}^{50}).

Año	Cl^{50} mg/L	Límite superior mg/L	Límite inferior mg/L	Referencia
1997	0.1175	0.1969	0.0381	ESCOBAR, 1997
2007	0.394	0.563	0.221	BERNAL Y ROJAS, 2007
2007	0.097	0.121	0.068	OROZCO Y TORO, 2007

Fuente: Las autoras. 2007.

Los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad muestran el buen estado fisiológico del cultivo garantizando la confiabilidad de los resultados obtenidos de la sustancia pura y de la muestra ambiental.

5.8. PRUEBAS DE TOXICIDAD PRELIMINARES CON CROMO Y COBRE

5.8.1. Pruebas de toxicidad preliminares con cromo

Se expusieron neonatos de *Daphnia Pulex*, a soluciones de diferentes concentraciones de la sustancia pura del ión tóxico del cromo (VI), la cual, fue preparada a partir del Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$) a una concentración de 1000 mg/L; todas las concentraciones se registraron en concentraciones nominales del ión cromo (VI). Para determinar las concentraciones de cromo, se tomó como referencia la concentración letal media de este metal que se encuentra en el decreto 1594 de 1984 que es 0.01 ppm (Art. 45).

Se prepararon cinco concentraciones iniciales (0.001, 0.005, 0.01, 0.05 y 0.1 ppm) y un blanco (agua reconstituida), cada una de ellas por cuadruplicado. De estas se obtuvo los siguientes resultados:

Tabla 18. Resultados preliminares de las concentraciones iniciales de cromo.

Concentración Nominal (ppm)	No de organismos muertos			
	1	2	3	4
Blanco	0	0	0	0
0.001	0	0	0	0
0.005	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0
0.05	4	4	4	4
0.1	3	3	4	3

Fuente: Las autoras. 2007.

Después de ello se procedió a eliminar las 2 concentraciones más bajas ya que se presentó un 0% de mortalidad. Luego se prepararon dos nuevas concentraciones (0.15 y 0.2 ppm), al realizarse las pruebas con estas, se encontró el resultado esperado, la concentración más baja presentó todos los microorganismos vivos, y a medida que la concentración aumentaba, aumentaba el número de muertes, hasta llegar al 100% de mortandad en la concentración más alta.

5.8.2. Pruebas de toxicidad preliminares con cobre.

Se expusieron neonatos de *Daphnia Pulex*, a soluciones de diferentes concentraciones de la sustancia pura del ión tóxico del cobre (+2), la cual, fue preparada a partir del Sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) a una concentración de 1000 mg/L; todas las soluciones se registraron en concentraciones nominales del ión cobre (+2). Para determinar las concentraciones de cobre, se tomó como referencia la concentración letal media de este metal que se encuentra en el decreto 1594 de 1984 que es 0.1 ppm (Art. 45).

Se prepararon cinco concentraciones iniciales (0.01, 0.05, 0.2, 0.3 y 0.4 ppm) y un blanco (agua reconstituida), cada una de ellas por cuadruplicado. Se obtuvo los siguientes resultados:

Tabla 19. Resultados preliminares de las concentraciones iniciales de cromo.

Concentración Nominal (ppm)	No de organismos muertos			
	1	2	3	4
Blanco	0	0	0	0
0.01	0	0	0	0
0.05	0	0	0	0
0.2	0	0	0	0
0.3	0	0	0	0
0.4	0	0	0	0

Fuente: Las autoras. 2007.

Después de ello se procedió realizar concentraciones mas altas y se prepararon las nuevas concentraciones (1, 2, 3, 4 y 5 ppm), al realizarse las pruebas con estas nuevas concentraciones las tres últimas concentraciones dieron una mortalidad del 100%, así que fueron eliminadas las 2 últimas y se realizaron 2 nuevas concentraciones: una más baja y otra intermedia entre 1 y 2ppm (0.5 y 1.5 ppm). Con este cambio, se encontró el resultado esperado, la concentración más baja presentó todos los microorganismos vivos, y a medida que la concentración aumentaba, aumentaba el número de muertes, hasta llegar al 100% de mortandad en la concentración más alta.

5.9. ENSAYOS DEFINITIVOS CON CROMO Y COBRE, Y OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CL_{48}^{50} DEL CROMO Y COBRE CON SUS LÍMITES DE CONFIANZA

5.9.1. Ensayos definitivos de cromo y obtención de la concentración letal media CL_{48}^{50} del cromo con sus límites de confianza.

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.

Se realizaron 10 pruebas definitivas con el metal, con el fin de garantizar los resultados. De igual manera se cumplió con los protocolos internacionales, que exigen un mínimo de 10 pruebas con la sustancia pura.

De las 10 pruebas de toxicidad que se realizaron, se obtuvo la CL_{48}^{50} con sus límites de confianza inferior y superior, utilizando el software de la metodología Probit; para hallar la concentración letal media definitiva del cromo, se promediaron los resultados, como se muestra a continuación en la tabla:

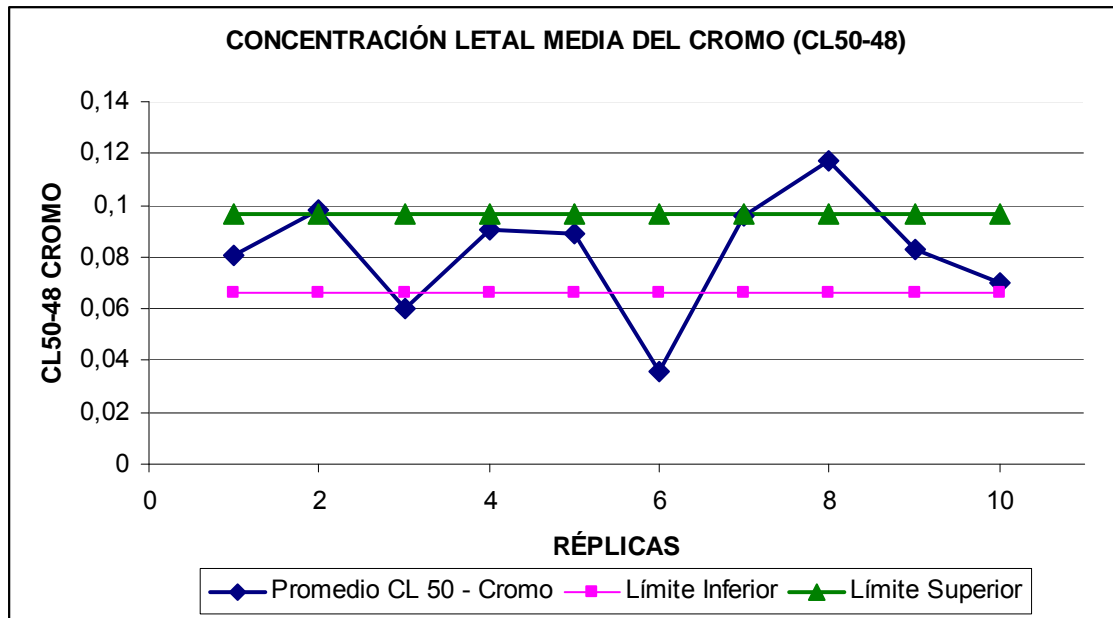
Tabla 20. Promedio de la CL_{48}^{50} de cromo

FECHA	CL50	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
18/09/2007	0,0807	0,0655	0,0947
11/09/2007	0,0981	0,0824	0,1132
11/09/2007	0,0602	0,0393	0,0761
05/09/2007	0,0906	0,0754	0,1048
05/09/2007	0,0893	0,0757	0,102
06/08/2007	0,0358	0,0237	0,0484
04/07/2009	0,0961	0,0809	0,1105
04/09/2007	0,1172	0,097	0,1325
27/06/2007	0,0828	0,0673	0,097
20/06/2007	0,0699	0,0528	0,0856
PROMEDIO	0,08207	0,066	0,09648

Fuente: Las autoras. 2007.

En la gráfica 2, se representan las distribuciones de las pruebas realizadas para determinar la concentración letal media CL_{48}^{50} con la utilización del cromo como sustancia pura, así como su promedio y sus respectivos límites.

Grafica 2. Concentración Letal media (CL_{48}^{50}) de cromo.



Fuente: Las autoras. 2007.

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

- Límite inferior: 0.066 mg/L de Cromo.
- CL_{48}^{50} : **0.082 mg/L de Cromo.**
- Límite Superior: 0.096 mg/L de Cromo.

5.9.2. Ensayos definitivos con cobre y obtención de la concentración letal media CL_{48}^{50} del cobre con sus límites de confianza

De las 10 pruebas de toxicidad que se realizaron, se obtuvo la CL_{48}^{50} con sus límites de confianza inferior y superior, utilizando el software de la metodología Probit; para hallar la concentración letal media definitiva del cobre; se promediaron los resultados, como se muestra a continuación en la tabla:

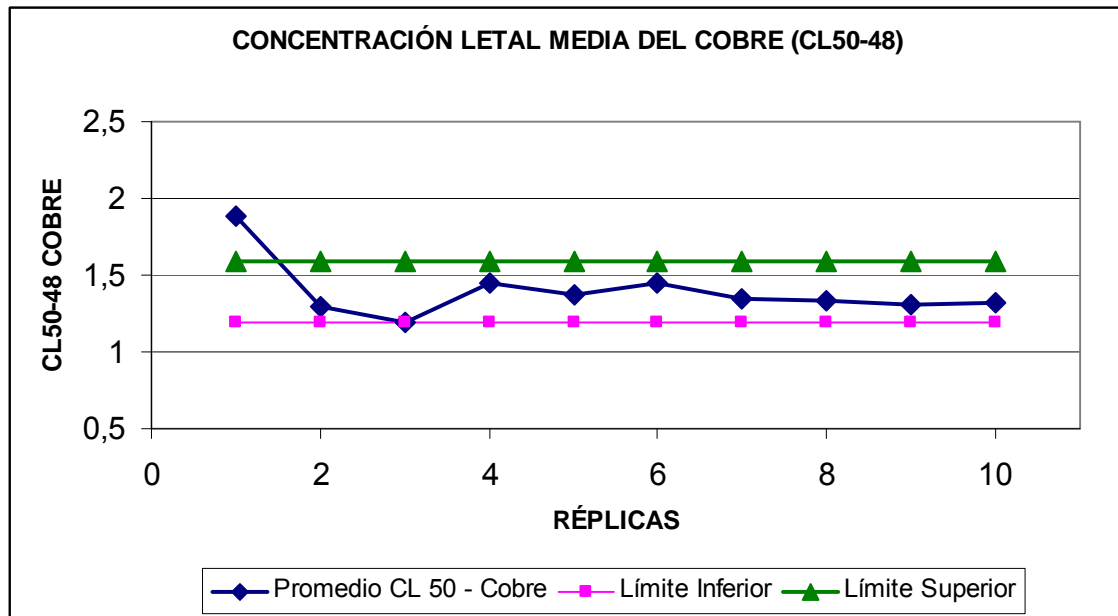
Tabla 21. Promedio de la CL_{48}^{50} de cobre.

FECHA	CL50	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
21/08/07	1,8803	1,6403	2,1884
04/09/07	1,2971	1,1218	1,4731
04/09/07	1,1905	1,0249	1,3573
11/09/07	1,4520	1,2252	1,6308
12/09/07	1,3737	1,2103	1,5318
12/09/07	1,4514	1,2160	1,6385
19/09/07	1,3523	1,1271	1,5373
25/09/07	1,3303	1,1545	1,5036
25/09/07	1,3021	1,0927	1,4766
26/09/07	1,3243	1,1419	1,4982
PROMEDIO	1,3954	1,1955	1,5836

Fuente: Las autoras. 2007.

En la gráfica 3, se representa las distribuciones de las pruebas realizadas para determinar la concentración letal media CL_{48}^{50} con la utilización del cobre como sustancia pura, así como su promedio y sus respectivos límites

Grafica 2. Concentración Letal media (CL_{48}^{50}) de cobre.



Fuente: Las autoras.2007.

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

- Límite inferior: 1.1955 mg/L de cobre
- CL_{48}^{50} : **1.3954 mg/L de Cobre**
- Límite Superior: 1.5836 mg/L de Cobre.

5.10. ENSAYOS DEFINITIVOS CON EL VERTIMIENTO DE ALFACROM LTDA, Y OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA CL_{48}^{50} DEL CROMO Y COBRE CON SUS LÍMITES DE CONFIANZA

5.10.1. Ensayos preliminares con el vertimiento de cromo.

Estas pruebas fueron realizadas utilizando las concentraciones en porcentaje de volumen de la muestra sin tratar.

Se utilizaron los siguientes rangos hasta encontrar los definitivos para las pruebas y adicionalmente se midió el pH y la dureza a las concentraciones extremo (la mayor y la menor) para garantizar que las condiciones fueran ideales y que no murieran por características ajenas al metal (cromo):

Tabla 22. Rango pruebas definitivas cromo.

CONCENTRACIONES EN % V/V	RESULTADO	CONTROL	
		DUREZA mg/L $CaCO_3$	pH
20, 40, 60, 80, 100	100% Mortalidad		
0.5, 1, 2, 3, 4	100% Mortalidad	0.5	40.08
		4	44.88
0.03, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5	Ajuste de rango	0.03	7.34
		0.5	7.43
0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.3	Ajuste de rango	0.01	7.21
		0.3	7.43
0.01, 0.03, 0.08, 0.1, 0.3	RANGO DEFINITIVO	0.01	7.21
		0.3	7.43

Fuente: Las autoras. 2007.

En las primeras concentraciones utilizadas se presentó la mortalidad total de los microorganismos en un tiempo de 60 minutos, teniendo en cuenta que la lectura de la prueba se debe realizar 48 horas después de la siembra; se procedió a realizar el ensayo con concentraciones mucho mas bajas.

5.10.2. Ensayos definitivos con el vertimiento de cromo y obtención de la concentración letal media CL_{48}^{50} del cromo con sus límites de confianza.

De las 5 pruebas de toxicidad que se realizaron, se obtuvo para cada una la CL_{48}^{50} con sus límites inferior y superior, utilizando el software de la metodología Probit para hallar la concentración letal media definitiva en el vertimiento industrial, se promedia cada resultado como se muestra a continuación en la tabla:

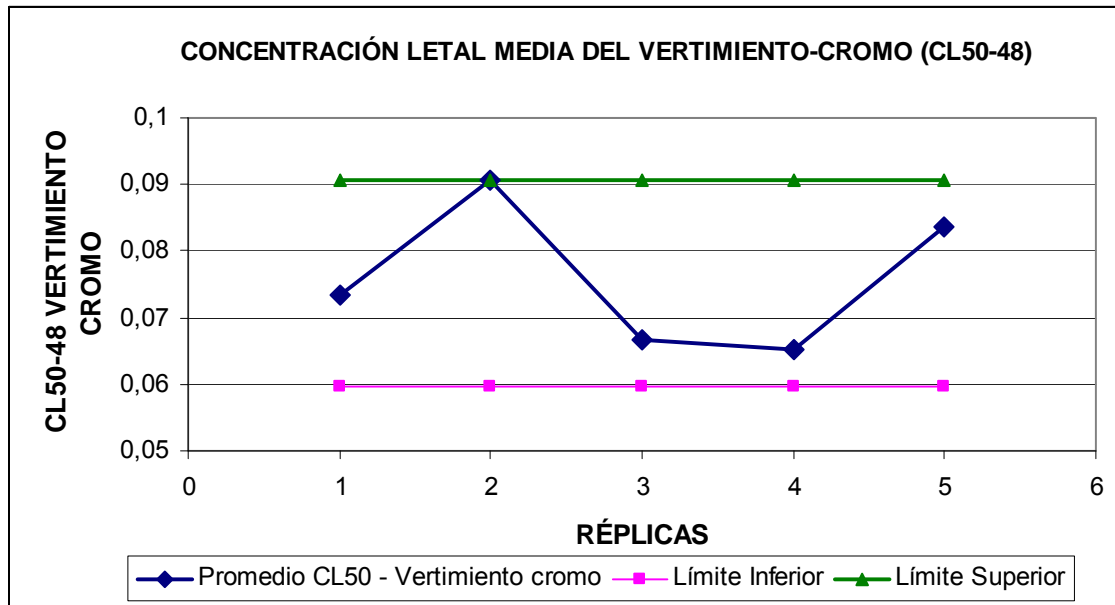
Tabla 23. Promedio de la CL_{48}^{50} del Vertimiento de cromo.

FECHA	CL50	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
17/10/2007	0,0733	0,0447	0,0901
17/10/2007	0,0906	0,0822	0,0995
18/10/2007	0,0666	0,0529	0,0797
18/10/2007	0,0652	0,0519	0,0788
20/10/2007	0,0837	0,0664	0,1052
PROMEDIO	0,07588	0,05962	0,09066

Fuente: Las autoras. 2007.

En la gráfica 4 se representan las distribuciones de las diferentes concentraciones letales medias (CL_{48}^{50}) del vertimiento, durante el periodo experimental de las *Daphnia Pulex*, así como su promedio y sus límites superior e inferior.

Grafica 3. Concentración Letal media (CL_{48}^{50}) del vertimiento de cromo.



Fuente: Las autoras. 2007.

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

- Límite inferior: 0.05962 % del volumen de la muestra.
- $CL_{48}^{50} = 0.07588$ % del volumen de la muestra.
- Límite Superior: 0.09066 % del volumen de la muestra.

5.10.3. Ensayos preliminares con el vertimiento de cobre.

Estas pruebas fueron realizadas utilizando las concentraciones en porcentaje de volumen de la muestra.

Se utilizaron los siguientes rangos hasta encontrar los definitivos para las pruebas y adicionalmente se midió el pH y la dureza a las concentraciones extremo (la mayor y la menor) para garantizar que las condiciones fueran ideales y que no murieran por características ajenas al metal cobre:

Tabla 24. Rango pruebas definitivas.

CONCENTRACIONES EN % V/V	RESULTADO	CONTROL	
		DUREZA mg/L $CaCO_3$	pH
20, 40, 60, 80, 100	100% Mortalidad		
0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1	100% Mortalidad	0.1 1	64.13 64.13
0.01, 0.03, 0.05, 0.08, 0.1	100% Mortalidad	0.01 0.1	40.08 64.13
0.001, 0.003, 0.005, 0.008, 0.01	100% Mortalidad	0.001 0.01	40.08 40.08
0.0005, 0.0008, 0.001, 0.002, 0.003	Ajuste de rango	0.0005 0.003	40.08 40.08
0.0002, 0.0005, 0.0008, 0.001, 0.002	RANGO DEFINITIVO	0.0002 0.002	40.08 40.08

Fuente: Las autoras. 2007.

En las primeras concentraciones utilizadas se presentó la mortalidad total de los microorganismos en un tiempo de 35 minutos, teniendo en cuenta que la lectura de la prueba se debe realizar 48 horas después de la siembra; se procedió a realizar el ensayo con concentraciones mucho mas bajas.

5.10.4. Ensayos definitivos con el vertimiento de cobre y obtención de la concentración letal media CL_{48}^{50} del cobre con sus límites de confianza.

Estas pruebas fueron realizadas utilizando las concentraciones en porcentaje de volumen de la muestra.

De las 5 pruebas de toxicidad que se realizaron, se obtuvo para cada una la CL_{48}^{50} , con sus límites inferior y superior, utilizando el software de la metodología Probit; para hallar la concentración letal media definitiva en el vertimiento industrial, se promedia cada resultado como se muestra a continuación en la tabla:

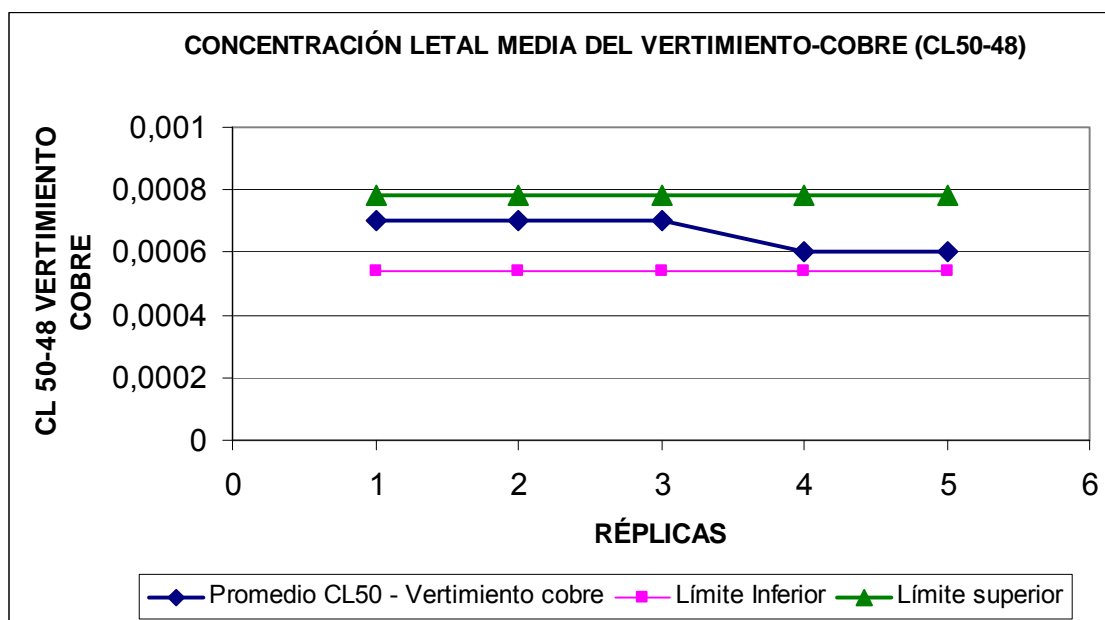
Tabla 25. Promedio de la CL_{48}^{50} del Vertimiento de cobre.

FECHA	CL50	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
20/10/07	0,0007	0,0006	0,0009
22/10/07	0,0007	0,0005	0,0008
22/10/07	0,0007	0,0006	0,0008
24/10/07	0,0006	0,0005	0,0007
24/10/07	0,0006	0,0005	0,0007
PROMEDIO	0,00066	0,00054	0,00078

Fuente: Las autoras. 2007.

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

Grafica 4. Concentración Letal media (CL_{48}^{50}) del vertimiento de cobre.



Fuente: Las autoras. 2007.

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

- Límite inferior: 0.00054 % del volumen de la muestra.
- $CL_{48}^{50} = 0.00066$ % del volumen de la muestra.
- Límite Superior: 0.00078 % del volumen de la muestra.

5.11. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LAS PRUEBAS DEFINITIVAS DEL CROMO Y COBRE Y EL VERTIMIENTO DE ALFACROM LTDA.

El análisis de varianza se realizó siguiendo la metodología del protocolo LB07 “Análisis de Varianza”, que se encuentra en el Laboratorio de Bioensayos, Facultad de Ingeniería Ambiental, para su consulta.

Para la realización de la ANOVA de cada una de la pruebas, se postuló la hipótesis nula y la hipótesis alternativa de la siguiente forma:

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

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

Para el análisis del resultado se debe tener en cuenta la siguiente condición:

$F_c > F_t$: se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

$F_c < F_t$: se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa.

5.11.1. Análisis de varianza de las pruebas definitivas del cromo ($K_2Cr_2O_7$).

A continuación se presenta la tabla de los resultados del F calculado y el F teórico para las 10 pruebas definitivas de cromo realizadas.

Tabla 26. F calculado vs F teórico. Prueba definitiva de cromo.

FECHA	F CALCULADO (FC)	F TEORICO (FT)
20/06/2007	34,662	2,77
27/06/2007	47,477	
04/07/2007	33,227	
06/08/2007	91,800	
04/09/2007	32,686	
05/09/2007	179,8	
05/09/2007	50,08	

FECHA	F CALCULADO (FC)	F TEORICO (FT)
11/09/2007	30,2	
11/09/2007	60,861	
18/09/2007	105,942	

Fuente: Las autoras. 2007.

Como lo muestra la tabla 26, $F_c > F_t$, en las 10 pruebas definitivas, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se garantiza la validez de los datos, mostrando que todos los datos hallados cumplen con la ecuación descrita en el numeral 5.11.

5.11.2. Análisis de varianza de las pruebas definitivas del cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$).

A continuación se presenta la tabla de los resultados del F calculado y el F teórico para las 10 pruebas definitivas de cobre realizadas.

Tabla 27. F calculado vs F teórico. Pruebas definitivas cobre.

FECHA	F CALCULADO (FC)	F TEORICO (FT)
21/08/2007	22,69565217	2,77
04/09/2007	33,67692308	
04/09/2007	58,9826087	
11/09/2007	47,35862069	
12/09/2007	98,12	
12/09/2007	50,95384615	
19/09/2007	47,4	
25/09/2007	44,64	
25/09/2007	58,8	
26/09/2007	30,6	

Fuente: Las autoras. 2007.

Como lo muestra la tabla 27, $F_c > F_t$, en las 10 pruebas definitivas, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se garantiza la validez de los datos, mostrando que todos los datos hallados cumplen con la ecuación descrita en el numeral 5.11.

5.11.3. Análisis de varianza de las pruebas definitivas del vertimiento de cromo.

A continuación se presenta la tabla de los resultados del F calculado y el F teórico para las 5 pruebas definitivas realizadas con el vertimiento de cromo.

Tabla 28. F calculado vs F teórico. Vertimiento de cromo.

FECHA	F CALCULADO (FC)	F TEORICO (FT)
17/10/2007	68,368	2,77
17/10/2007	43,055	
18/10/2007	107,314	
18/10/2007	59,446	
20/10/2007	34,729	

Fuente: Las autoras. 2007.

Como lo muestra la tabla 28, $F_c > F_t$, en las 5 pruebas definitivas con el vertimiento de cromo, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se garantiza la validez de los datos, mostrando que todos los datos hallados cumplen con la ecuación descrita en el numeral 5.11.

5.11.4. Análisis de varianza de las pruebas definitivas del vertimiento de cobre.

A continuación se presenta la tabla de los resultados del F calculado y el F teórico para las 5 pruebas definitivas realizadas con el vertimiento de cobre.

Tabla 29. F calculado vs F teórico. Vertimiento de cromo.

FECHA	F CALCULADO (FC)	F TEORICO (FT)
20/10/2007	34,447	2,77
22/10/2007	46,252	
22/10/2007	94,28	
24/10/2007	27,025	
24/10/2007	56,28	

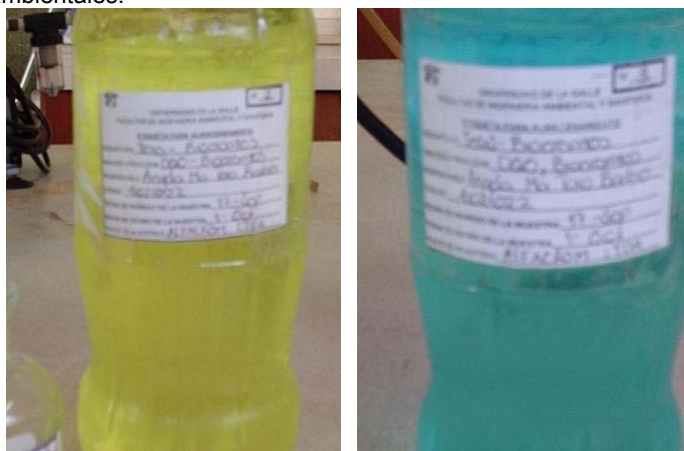
Fuente: Las autoras. 2007.

Como lo muestra la tabla 29, $F_c > F_t$, en las 5 pruebas definitivas con el vertimiento de cobre, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se garantiza la validez de los datos, mostrando que todos los datos hallados cumplen con la ecuación descrita en el numeral 5.11.

5.12. CARACTERIZACIÓN DEL VERTIMIENTO

La toma de la muestra ambiental para el cromo y cobre, se realizó en los tanques de enjuague de sellado de cromato (cromo) y en el de cobre ácido (cobre).

Figura 46. Muestras ambientales.



Fuente: Las autoras. 2007.

5.12.1. Análisis fisicoquímico del vertimiento.

En los análisis fisicoquímicos que se realizaron a las muestras en el laboratorio ASAFRANCO y en el laboratorio de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Según el Standard Methods, se hallaron los siguientes resultados:

Tabla 30. Análisis fisicoquímicos realizados a la muestra de cromo.

Parámetro	Método según el Standard Método, edición 19. 1995	Valor	Unidades
pH	4500-H ⁺ B Electrométrico	8.42	unidades
Dureza	2340 C Titulométrico EDTA	52.10	mg/L de CaCO ₃
Conductividad	2510-B Conductímetro	0.2	µmhos/cm
DQO	5220D-2B. Reflujo Cerrado, método espectrofotómetro	162	mg/L
Sólidos Totales	2540D. Sólidos totales	4.9	mg/L
Cromo	3500 Cr-B Absorción atómica	117	mg/L Cr

Fuente: Las autoras. 2007.

Tabla 31. Análisis fisicoquímicos realizados a la muestra de cobre.

Parámetro	Método según el Standard Métodos, edición 19. 1995	Valor	Unidades
pH	4500-H ⁺ B Electrométrico	1.71	unidades
Dureza	2340 C Titulométrico EDTA	176.4	mg/l de

<i>Parámetro</i>	<i>Método según el Standard Métodos, edición 19. 1995</i>	<i>Valor</i>	<i>Unidades</i>
			CaCO ₃
Conductividad	2510-B Conductímetro	6.6	µmhos/cm
DQO	5220D-2B. Reflujo Cerrado, método espectrofotómetro	342	mg/L
Sólidos Totales	2540D. Sólidos totales	22.2	mg/L
Cobre	3500 Cu-B Absorción atómica	2583	mg/L Cu

Fuente: Las autoras. 2007.

5.13. ALTERNATIVA DE TRATAMIENTO PARA LA REDUCCIÓN DE TOXICIDAD POR CROMO Y COBRE

A las muestras ambientales se les realizó, a cada una, un tratamiento fisicoquímico para la eliminación de los respectivos metales pesados presentes en ellas. El tratamiento que se realizó a cada muestra fue: precipitación química y neutralización.

Figura 47. Precipitación química.



Fuente: Las autoras. 2007.

Para tratar los metales, se usó precipitación química con NaOH, llevando el pH entre 9 – 10.3 (Romero, 2002) y una neutralización al finalizar el tratamiento con HCl.

5.13.1. Alternativa de tratamiento para la reducción de toxicidad por cromo.

Dado que la muestras de cromo se encontraban en forma hexavalente y no es posible precipitar el Cr^{+6} , se llevó por medio de un reductor, Sulfato Ferroso granular ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), a su forma trivalente Cr^{+3} (Romero, 2002). Para poder agregar el reductor, el pH fue llevado a 3 con H_2SO_4 . Se realizaron 2 pruebas para garantizar la validez del

ensayo. A continuación se presenta la reacción química del vertimiento de cromo con el sulfato ferroso:

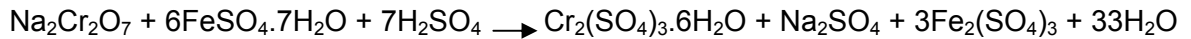


Figura 48. Precipitación química del cromo. Tess de Jarras.



Fuente: Las autoras. 2007.

Al agregar el reductor y tener el cromo en su forma trivalente, se agregaron aproximadamente 30 mL NaOH 1N, y se llevó el pH hasta 10,11. En ese momento se empezó a formar el floc y se disminuyeron las rpm, pasando de 100 a 30 rpm; al cabo de 5 minutos se apagó el equipo y se dejó que el metal se precipitara. A continuación se muestra la reacción química con el NaOH:

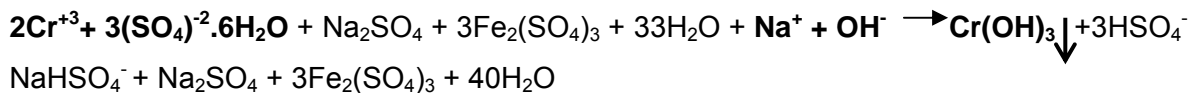


Figura 49. Precipitación química del cromo. Inicio de la Precipitación.



Fuente: Las autoras. 2007.

Después de 24 horas de dejar la muestra en reposo, para garantizar la mayor precipitación de los metales, se procedió a leer la cantidad de cromo precipitado y a realizar la filtración, como se muestra en la figura 48. Se realizó nuevamente la caracterización de la muestra ya con el tratamiento para verificar su efectividad.

Figura 50. Precipitación química del cromo. Filtración.



Fuente: Las autoras. 2007.

Los datos de la muestra tratada fueron los siguientes:

Tabla 32. Análisis fisicoquímicos realizados a la muestra tratada de cromo.

Parámetro	Método según el Standard Método, edición 19. 1995	Valor	Unidades
pH	4500-H ⁺ B Electrométrico	7.15	unidades
Dureza	2340 C Titulométrico EDTA	64.13	mg/L de CaCO ₃
Conductividad	2510-B Conductímetro	0	µmhos/cm
DQO	5220D-2B. Reflujo Cerrado, método espectrofotómetro	86	mg/L
Sólidos Totales	2540D. Sólidos totales	2.4	mg/L
Cromo	3500 Cr-B Absorción atómica	0.1	mg/L Cr
Sólidos Sedimentables	Beaker 1: 50 mL Beaker 2: 100mL	Promedio:75	mL Cr

Fuente: Las autoras. 2007.

Como se puede observar al comparar los resultados del agua antes del tratamiento (ver tabla 30) y después de este, el tratamiento fisicoquímico realizado a la muestra de agua proveniente del enjuague de sellado de cromato, muestra que las características del vertimiento después del tratamiento son mas favorables a la hora de realizar una descarga y que este cumple con los valores de descarga descritos en el decreto 1594/84.

Figura 51. Precipitación química del cromo. Sólidos Sedimentables.



Fuente: Las autoras. 2007.

5.13.2. Alternativa de tratamiento para la reducción de toxicidad por cobre

Para la precipitación química de la muestra de cobre se agregaron aproximadamente 80 mL NaOH, y se llevó el pH hasta 10,07. Se realizaron 2 pruebas para garantizar la validez del ensayo. A continuación se presenta la reacción química del vertimiento de cobre:

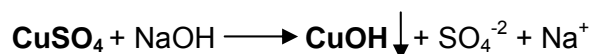


Figura 52. Precipitación química del cobre. Tess de Jarras.



Fuente: Las autoras. 2007

En el momento que se empezó a formar el floc, se disminuyeron las rpm, pasando de 100 a 30 rpm; al cabo de 5 minutos se apagó el equipo y se dejó que el metal se precipitara.

Figura 53. Precipitación química del cobre. Inicio de la Precipitación.



Fuente: Las autoras. 2007.

Después de 24 horas de dejar la muestra en reposo, para garantizar la mayor precipitación de los metales, se procedió a leer la cantidad de cobre precipitado y a realizar la filtración, como se muestra en la figura 52, y se realizó nuevamente la caracterización de la muestra ya con el tratamiento para verificar su efectividad.

Figura 54. Precipitación química del cromo. Filtración.



Fuente: Las autoras. 2007.

Los datos de la muestra tratada fueron los siguientes:

Tabla 33. Análisis fisicoquímicos realizados a la muestra tratada de cobre.

Parámetro	Método según el Standard Método, edición 19. 1995	Valor	Unidades
pH	4500-H ⁺ B Electrométrico	7.38	unidades
Dureza	2340 C Titulométrico EDTA	160.32	mg/L de CaCO ₃

Parámetro	Método según el Standard Método, edición 19. 1995	Valor	Unidades
Conductividad	2510-B Conductímetro	0	µmhos/cm
DQO	5220D-2B. Reflujo Cerrado, método espectrofotómetro	88	mg/L
Sólidos Totales	2540D. Sólidos totales	2.5	mg/L
Cobre	3500 Cr-B Absorción atómica	0.4	mg/L Cr
Sólidos Sedimentables	Beaker 1: 50 mL Beaker 2: 100mL	Promedio:215	mL Cr

Fuente: Las autoras. 2007.

Como se puede observar al comparar los resultados del agua antes del tratamiento (ver tabla 31) y después de este, el tratamiento fisicoquímico realizado a la muestra de agua proveniente del enjuague de cobre ácido, muestra que las características del vertimiento después del tratamiento son mas favorables a la hora de realizar una descarga y que este cumple con los valores de descarga descritos en el decreto 1594/84.

5.14. OBTENCION DE LA CARGA TÓXICA E INDICE TOXICOLÓGICO

Se obtuvo la carga e índice toxicológico de la muestra con el fin de clasificar y evaluar el vertimiento que contiene metales.

La muestra de agua fue tomada de los tanques de enjuague de cobre ácido y sellado de cromato. Cada tanque tiene un volumen de 100 L y el agua es cambiada dependiendo de la producción de la empresa.

El caudal que maneja la empresa es un promedio de 10m³/mes, pero este no es constante, pues depende de la producción mensual de ALFACROM.

5.14.1. Obtención Carga Tóxica e índice toxicológico de la muestra de cromo.

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

$$CargaTóxica(UT) = \frac{100}{0.08} \times 10 = 12500$$

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

$$IT = \text{Log}(1 + 12500)$$

$$IT = 4.097$$

5.14.2. Obtención Carga Tóxica e índice toxicológico de la muestra de cobre.

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

$$CargaTóxica(UT) = \frac{100}{1.39} \times 10 = 719.424$$

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

$$IT = \text{Log}(1 + 719.424)$$

$$IT = 2.858$$

Comparando estos resultados con los rangos del índice toxicológico que se presentan en la tabla 14 (Rangos de Índices Toxicológicos); el vertimiento industrial de ALFACROM LTDA, presenta una carga tóxica reducida para cobre, y considerable para cromo. Esto nos indica que la empresa presenta un riesgo significativo en los vertimientos que realiza con el metal cromo. Cabe anotar que antes de renovar el agua de los estanque de enjuague, se realiza una recuperación de los metales para su utilización en los procesos futuros. El agua sobrante es llevada al tanque de igualación y tratada en la PTAR.

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

Para validar los resultados obtenidos con Daphia Pulex durante la investigación, se compararon con datos logrados en otras investigaciones realizadas en el exterior y en Colombia. A continuación se muestra esta comparación con cada metal:

5.15.1. Comparación de resultados con otras pruebas de toxicidad por cromo realizadas en el exterior y en Colombia.

Tabla 34. Valores comparativos de la CL_{48}^{50} con especies de Daphnias expuestos al cromo Cr^{+6} en el exterior.

Especie de crustáceo	CL^{50} µg/L	Tiempo de exposición	Estado	Ambiente	Referencia
<i>Daphnia Pulex</i>	36.3	48	Neonatos	Dulce	Mount (1982)
<i>Daphnia Pulex</i>	48	48	Neonatos	Dulce	Mount and Norberg (1984)
<i>Daphnia Magna</i>	24.2	48	Neonatos	Dulce	Mount (1982)
<i>Daphnia Magna</i>	22	48	Neonato	Dulce	Mount and Norberg (1984)

Fuente: Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a cromo. Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente Cromo. República Argentina. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación. Diciembre de 2003. Documento en línea: <http://www.hidricosargentina.gov.ar/pdfs/cromo.pdf>.

Tabla 35. Valores comparativos de la CL_{48}^{50} con especies de Daphnias expuestos al cromo en Colombia.

Especie de crustáceo	CL^{50} mg/L	Tiempo de exposición	Estado	Ambiente	Referencia
<i>Daphnia magna</i>	0.35	48	Neonato	Dulce	Reyes (1997)
<i>Daphnia magna</i>	0.29	48	Neonato	Dulce	Hoyos (1995)
<i>Daphnia Obtusa</i>	0.04	48	Neonatos	Dulce	Reyes (1997)

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

5.15.2. Comparación de resultados con otras pruebas de toxicidad por cobre realizadas en el exterior y en Colombia

Tabla 36. Valores comparativos de la CL_{48}^{50} con especies de Daphnias expuestos al cobre en el exterior.

Especie de crustáceo	CL^{50} µg/L	Tiempo de exposición	Estado	Ambiente	Referencia
<i>Daphnia Pulex</i>	5	48	Neonatos	Dulce	Ingersoll and Winner (1982)

Especie de crustáceo	CL ⁵⁰ µg/L	Tiempo de exposición	Estado	Ambiente	Referencia
<i>Daphnia Magna</i>	9.5	48	Neonatos	Dulce	Chapman et al., Manuscript
<i>Daphnia Magna</i>	13.6	48	Neonato	Dulce	Chapman et al., Manuscript

Fuente: Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a cobre. Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente Cobre. República Argentina. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación. Diciembre de 2005. Documento en línea: <http://www.hidricosargentina.gov.ar/pdfs/cobre.pdf>.

Tabla 37. Valores comparativos de la CL_{48}^{50} con especies de Daphnias expuestos al cobre Cu^{+2} en Colombia.

Especie de crustáceo	CL ⁵⁰ mg/L	Tiempo de exposición	Estado	Ambiente	Referencia
<i>Daphnia magna</i>	0.005 – 0.076	48	Neonato	Dulce	Hoyos (1995)

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

Como se puede observar, en Colombia, no se han realizado investigaciones en un organismo nativo como *Daphnia Pulex*, sobre la concentración letal media del cromo y cobre. Se aprecia que la *Daphnia* nativa presenta mayor sensibilidad al cromo (0.08207 mg/L) y al cobre (1.3243 mg/L). Esto es debido a las características morfológicas de cada especie y a las condiciones fisicoquímicas de los ecosistemas en las que ellas se encuentran. La especie Magna habita en el hemisferio norte, en aguas duras; mientras la especie Pulex, habita en el trópico y es de aguas blandas, como las que presenta nuestro país. Las branquias de las *Daphnia Pulex* son más permeables y por ende el tóxico entre más rápido y fácil a su cuerpo provocando de manera casi inmediata la muerte de estas.²⁵

²⁵ BERNAL Y ROJAS, Op. Cit., p. 107

CONCLUSIONES

- La concentración letal media (CL_{48}^{50}) del cromo y cobre sobre *Daphnia Pulex*, se encuentra por encima de los valores establecidos en el Decreto 1594 de 1984, expresada en el artículo 45 para la Preservación de Flora y Fauna. La concentración letal media (CL_{48}^{50}) del cromo hallada en esta investigación es 0.08 mg/L; mientras que la presente en la norma es 0.01 mg/L. Así mismo la concentración letal media (CL_{48}^{50}) del cobre hallada en esta investigación es 1.39 mg/L; mientras que la presente en la norma es 0.1 mg/L. Es de anotar que la concentración que esta en la norma es para 96 horas y peces, mientras que la hallada es de 48 horas y *Daphnia*.
- Al realizar las comparaciones bibliográficas sobre investigaciones realizadas en el exterior y en Colombia acerca del valor de la concentración letal media (CL_{48}^{50}) del cromo y cobre; estas nos muestran que la *Daphnia Pulex* presenta mayor sensibilidad a estos metales que la especie Magna. En *Daphnia Pulex*, el valor encontrado para cromo oscila entre 36 – 48 µg/L y para cobre el valor va entre 5 µg/L, mientras para la especie Magna tolera concentraciones de cromo entre 0.35 - 0.29 mg/L y cobre que van de 9.5 a 13 µg/L. Se pudo evidenciar que la especie Magna es más resistente, debido a que esta posee características morfológicas diferentes y habita en aguas duras.
- Se determinó que la sensibilidad *con* dicromato de Potasio para el cultivo *Daphnia Pulex* cambió con respecto al grupo de investigación anterior. Esto debido al cambio en las condiciones ambientales del laboratorio, a la no presencia de olores, sustancia químicas, aguas residuales, entre otros. La sensibilidad aumentó en un 405.68%, pasando de 0.394 a 0,09712 mg/L, lo que nos garantiza una mayor confiabilidad en los resultados obtenidos y nos muestra que las condiciones del cultivo eran optimas.

- La precipitación química realizada para la remoción de los metales pesados presentes en los vertimientos fue efectiva, mostrando que hubo una reducción del 99.985% del metal cobre en el vertimiento de enjuague cobre ácido, y una reducción del 99.91% del metal cromo en el vertimiento del sellado de cromato. Dando las concentraciones de estos metales por debajo de la CL_{48}^{50} hallada en esta investigación, y garantizando la preservación de los ecosistemas.
- Para garantizar una mayor protección de la fauna y flora de nuestro país, se deben tener en cuenta los resultados no solo de los análisis fisicoquímicos como: DBO, DQO, sólidos suspendidos, pH, oxígeno disuelto, temperatura, metales pesados, entre otros, sino también los de los análisis toxicológicos, los cuales garantizan la supervivencia de las especies acuáticas presentes en los ecosistemas para así tener mayor cobertura de los posibles daños causados por los vertimientos.
- Al cambiar las condiciones del ambiente (laboratorio) de preservación de los cultivos, se evidenció una reducción en la mortalidad de los microorganismos, lo que nos muestra que estos son muy susceptibles a los factores ambientales y antrópicos, como: los cambios bruscos de temperatura, pH, olores fuertes, oxígeno disuelto, sustancias químicas, dureza del agua, alteración del alimento, cambios de luz, etc.
- 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, fácil y práctica para la incorporación de estos resultados y estos métodos de investigación en la normatividad colombiana.
- Los resultados obtenidos al realizar el análisis de varianza con una confiabilidad del 95%, nos muestra la veracidad de las pruebas y el rechazo de la hipótesis nula, mostrando que las diferentes concentraciones producen efectos distintos en los organismos prueba.

RECOMENDACIONES

- Los análisis de toxicidad para la determinación de la concentración letal media se deben realizar con diferentes microorganismos de la cadena trófica para garantizar la validez de los bioensayos.
- Los bioensayos se deben realizar con todas las sustancias de interés sanitario presentes en el decreto 1594 de 1984 para garantizar la supervivencia de los ecosistemas acuáticos en el país.
- Buscando la aplicabilidad de los resultados obtenidos en diferentes áreas, se sugiere la validación de los resultados obtenidos durante esta investigación, y futuras, para garantizar la veracidad de los datos.
- Se debe hallar un nuevo rango de sensibilidad de dicromato de potasio, dado que en los últimos ensayos de toxicidad realizados se evidenció que este disminuyó nuevamente.
- Se debe garantizar que el laboratorio sea de uso exclusivo para bioensayos, ya que cualquier cambio en el ambiente puede causar alteraciones en los cultivos así como en los resultados de los experimentos.
- El material debe ser lavado sin jabón, con abundante agua y de uso exclusivo para cada sustancia a manejar. Así se garantiza que no existirá contaminación por sustancias ajenas en los cultivos, algas, agua de dureza, entre otros.
- Los reactivos que se utilicen durante el proceso de bioensayo, deben ser reactivos analíticos y de marca reconocida, para garantizar que las soluciones sean de calidad y que no varíen los resultados por fallas de reactivos.

BIBLIOGRAFÍA

ALCAZAR, F. Documento guía del Curso Regional CPPS/PNUMA/COI, sobre Bioensayos y pruebas de toxicidad en organismos marinos del Pacífico Sudeste. 1988. Cartagena - Colombia.

BERNAL PAREDES, Alba Janneth y ROJAS AVELLA, Andrea Paola. Determinación de la concentración letal media (CL_{48}^{50}) del mercurio por medio de bioensayos de toxicidad acuática sobre Daphnia Pulex. Bogotá. 2007. Tesis de grado (Ingeniera Ambiental y Sanitaria). Universidad de La Salle. Ingeniera Ambiental y Sanitaria

CAMPOS, Hernando. Contaminación Ambiental No 17: Los Metales Pesados, la Contaminación y sus Efectos Tóxicos. Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Julio-Diciembre 1987 (Año 9). Prof. Universidad Nacional de Colombia Santa Marta. (ISSN 0120674).

CASTILLO, Gabriella. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. Primera Edición. México. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), 2004.

COMISIÓN AMBIENTAL METROPOLITANA – GTZ Manual de minimización, tratamiento y disposición. Concepto de manejo de residuos peligrosos para el giro de la galvanoplastia. Mexico D.F., Septiembre de 1998.

CRUZ TORRES, Luís Eduardo. Factores que afectan la toxicidad. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Unidad Académica Ingeniería Ambiental. 1996.

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.

DEL VALLS, T. y CONRADI M. Avances en ecotoxicología marina: comparación entre test de laboratorio y estudios in situ para la evaluación de la calidad ambiental de los sedimentos. Ciencias Marinas. 2000

DÍAZ BÁEZ, María Consuelo. y Dutka, B.J. Práctica de Laboratorio-Toxicidad con Bacterias, Daphnia Magna. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Unidad Académica Ingeniería Ambiental. 1996.

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.

ESPINOSA RAMÍREZ, Adriana Janneth y JARRO FAJARDO, Edna María Carolina. Determinación del intervalo de sensibilidad con cromo hexavalente en dos especies de cladóceros bajo condiciones de alimentación controladas. Santafé de Bogotá, 1999. Trabajo de grado (Biologas). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.

GIOVANNETTI SANCHEZ, Silvia Lorena. Liniamientos para la aplicación de un sistema de gestión ambiental en la empresa Alfacrom LTDA. Bogotá. 2004. Tesis de grado (Ingeniería Química). Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Ingeniería Química.

GONZÁLEZ GÓMEZ, Henry Bernardo y GUTIÉRREZ ÁLVAREZ, Sandra del Pilar. Clasificación y ciclo de vida de una especie Daphnia nativa de la sabana de Bogotá. Santafé de Bogotá, 1995. Trabajo de grado (Licenciado en química y biología). Universidad de La Salle. Facultad de Ciencias de la Educación. Departamento de Química y Biología.

HOYOS OCAMPO, Liliana Gisel. Estandarización de ensayos con Daphnia Magna para la evaluación de toxicidad en aguas contaminadas con metales pesados. Santafé de Bogotá, 1995. Trabajo de grado (Posgrado en Microbiología). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias de Posgrado. Interfacultades de Microbiología.

INSTITUTO COLOMBIANO DE GEOLOGÍA Y MINERÍA, Ingeominas. Recursos Minerales en Colombia 2ª ed. Tomo 1: Metales Preciosos, Minerales Metálicos. Bogotá D.C. 1987.

LARRAIN, A. Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad. Cienc. Tec. Mar, CONA (Nº especial). 1995.

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 junio de 2007. Disponible en Internet <http://www.jmarcano.com/nociones/fresh2.html>

MARTÍNEZ B, Ricardo. Metodología estadística para análisis de toxicidad. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Unidad Académica Ingeniería Ambiental.

MATUK VELASCO, Vivian. El impacto biológico de las aguas residuales del lavado del beneficio húmedo de café tratadas anaerobiamente. Santa Fe de Bogotá, 1996. Tesis de grado (Bióloga). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Microbiología Industrial

Ministerio del Medio Ambiente – FUNDES. Guía de buenas prácticas para el sector de galvanotecnia., la red de soluciones empresariales. Bogotá D.C

REYES BLANDON, Carmen. Efectos subletales del cromo y cobre hexavalente y un carbonato sobre el ciclo de vida de dos especies de cladóceros. Santafé de Bogotá, 1997. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.

REYES BLANDON, Carmen. Fundamentación y metodología de los ensayos de toxicidad con microcrustáceos. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Facultad de Ingeniería. Unidad Académica Ingeniería Ambiental. 1996.

ROMERO ROJAS, Jairo Alberto. Tratamiento de aguas residuales. Teoría y principio de diseño. Segunda Edición. Bogotá. Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería. 2002.

SÁNCHEZ RIVAS, Guadalupe y VERA DIEGO, Giovanna. Callas. Manual Introductorio de Ecotoxicología Acuática. Perú. Instituto del Mar del Perú. Informe No 161, Junio 2001.

SERRANO GÓMEZ, Marlon. Estudio ecotoxicológico de la influencia del campo de producción la Cira-Infantas sobre dos cuerpos receptores. Santa Fe de Bogotá, 1998 Tesis de grado (Biólogo). Pontificia Universidad Javeriana. Microbiología Industrial.

TORRENTERA BLANCO, Laura y TACON, Albert G.J. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis. VI Cultivo de micro crustáceos de agua dulce. FAO. Brasil Abril, 1989 (proyecto en línea). Disponible en Internet: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB473S06.htm#chVI>.

TORTORELLI, María. Ensayos toxicológicos con organismos acuáticos para la evaluación de la contaminación ambiental. Argentina, 1990. Universidad Nacional Lujan. Departamento de Ciencias Básicas.

ULLMANN, Fritz. Enciclopedia de Química Industrial: Editorial Gustavo Pili, S.A. Tomo VI y XI. Sección 6. Segunda Edición. Barcelona. 1950.

http://www.rbgsyd.nsw.gov.au/_data/assets/image/48235/Scenedesmus.gif

http://100cia.com/monografias/ecologia/descripcion_de_un_protocolo_estandarizado_de_toxicidad_aguda_para_cladoceros.html

<http://hidricos.obraspublicas.gov.ar/documentos/calidad/cromo.pdf>

<http://hidricos.obraspublicas.gov.ar/documentos/calidad/cobre.pdf>

<http://www.elacuarista.com/alimentos/daphnias.htm>

http://www.cib.uaem.mx/agebiol/Invertebrados1_archivos/frame.htm#slide0059.htm

http://100cia.com/monografias/biologia/bioensayos_de_toxicidad_aguda_en_neonatos_de_moina_macrocopa.html

<http://www.ancystrus.com.ar/Articulos/daphnia.htm>

<http://www.perros-purasangre.com.mx/pps19/DAPHNIA0PULEX.html>

<http://www.fao.org/docrep/008/v7283s/V7283S04.htm>

<http://es.wikipedia.org/wiki/Cobre>

<http://es.wikipedia.org/wiki/Cromo>

<http://www.utp.edu.co/~publio17/cobre.htm>

<http://www.estudiantes.info/tecnologia/metales/cobre.htm>

<http://avogadro.bitacoras.com/img/cobre.jpg>

<http://www.ces.iisc.ernet.in/energy/HC270799/HDL/ENV/envsp/Vol320.htm>

<http://www.prodigyweb.net.mx/degcorp/Quimica/Cromo.htm>

<http://www.ces.iisc.ernet.in/energy/HC270799/HDL/ENV/envsp/Vol318.htm#Cobre>


<http://www.acercar.org.co/industria/manuales/galvanotecnia/>


<http://www.getri.es/librogalv.htm#pto1>


<http://www.science.oas.org/ENVIRO/sector%20de%20recubrimiento%20de%20metales.pdf>









http://www.red-de-autoridades.org/cds/disco04/residuos/manuales_minimizacion/mgalvano.pdf


ANEXOS

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB08
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETERMINACION DE DUREZA TOTAL	Página 1 de 6 Versión 0
<p>CONTENIDO</p> <ol style="list-style-type: none"> Objetivo Materiales Reactivos Principio del método Definiciones Procedimiento Bibliografía Anexo A – Formato de control del agua reconstituida <p>1. OBJETIVO</p> <p>Determinar la dureza total del agua reconstituida, mediante un test de dureza total con el fin de mantener las condiciones optimas del ecosistema en el laboratorio, para el desarrollo de los microorganismos prueba</p> <p>2. MATERIALES</p> <ul style="list-style-type: none"> Kit de dureza 1.08039.00001 –Aquamerk- (Foto 1 y 2) Jeringa de plástico graduada de 5 mL (Foto 3) Recipiente de ensayo (Foto 3) Pipeta de valoración (Foto 4) <p>3. REACTIVOS</p> <ul style="list-style-type: none"> Reactivo H-1 (Solución indicadora) Reactivo H-2 (Solución valorante) 		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB08
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETERMINACION DE DURAZA TOTAL	Página 2 de 6 Versión 0
<p>4. PRINCIPIO DEL METODO</p> <p>El calcio juega un papel fundamental, ya que determina dos diferentes tipos de agua: aguas duras, cuando la concentración de calcio es inferior a 25 mg por litro; b) aguas blandas, cuando la concentración de calcio es inferior a 9 mg por litro. Muchos moluscos, crustáceos y otros invertebrados, tienen necesidad de calcio para formar sus caparazones o conchas y por tanto puede ser factor limitante para algunas especies.</p> <p>La concentración de sales minerales en las aguas dulces, tienen relación con los procesos de osmorregulación de los seres vivos. Estos, presentan en muchos casos mecanismos de regulación de la presión osmótica, lo cual les permite subsistir en medio de diferente concentración a la del medio interno.</p> <p>Los iones calcio y magnesio forman con un indicador un complejo de color rojo. A partir de este se libera el indicador al valorar con una solución de dihidrato de la sal disódica del ácido etilendinitrilotetraacético (Titriplex III). En el punto final de la valoración tiene lugar un viraje a verde. La dureza total se deduce del consumo de solución valorante.</p> <p>5. DEFINICIONES</p> <p><u>Agua Reconstituida:</u> Agua Preparada con reactivos establecidos, con el fin de generar condiciones ambientales presentes en ecosistemas; sus funciones son: mantenimiento el cultivo de organismos prueba, preparación de soluciones y realización de bioensayos</p> <p><u>Dureza:</u> Medida de la concentración de iones de calcio y magnesio en el agua, expresada como mg/l de carbonato de calcio</p> <p><u>Constantes de laboratorio:</u> variables que tienen un valor fijo dentro de las pruebas de toxicidad, para no producir alguna alteración en el cultivo del organismo prueba. Entre ellas esta: dureza, temperatura, oxígeno disuelto y pH.</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB08
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETERMINACION DE DUREZA TOTAL	Página 3 de 6 Versión 0
<p>6. PROCEDIMIENTO</p> <p>6.1. Enjuagar varias veces el recipiente de ensayo con la muestra de agua reconstituida.</p> <p>6.2. Con la jeringa plástica Tomar 5 mL de muestra e introducirlos en el recipiente de ensayo.</p> <p>6.3. Añadir 3 gotas del reactivo H-1 (Foto 5) y agitar por balanceo. En presencia de formadores de dureza la muestra se colorea de rojo (Foto 6).</p> <p>6.4. Colocar la pipeta de valoración suelta sobre el frasco de reactivo H-2 (Foto 7) abierto. Tirar lentamente del émbolo de la pipeta de valoración desde la posición más baja, hasta que el borde inferior de la junta negra del émbolo coincida con la raya de marcado cero de la escala. (Aquí se llena solamente el tubo cuentagotas con solución valorante.)</p> <p>6.5. Sacar la pipeta de valoración y rozar brevemente la punta del tubo cuentagotas para eliminar el exceso de liquido adherido. Lentamente y agitando por balanceo gotear luego la solución de valoración a la muestra, hasta que su color vire de rojo a verde (Foto 8) pasando por violeta grisáceo (poco antes del viraje). Poco antes de llegar al viraje de color esperar unos segundos después de cada gota.</p> <p>6.6. En el borde inferior de la junta negra de émbolo leer el valor de medición en °d o en mmol/l en la correspondiente escala de la pipeta de valoración.</p> <p>6.7. Después de acabado el análisis hacer retroceder, presionando, la restante solución de valoración desde la pipeta de valoración al frasco de reactivo H-2 y enroscar firmemente la pipeta, en lugar de la tapa roscada, sobre el frasco de reactivo.</p> <p>6.8. Cerrar los frascos inmediatamente después de la toma de los reactivos.</p> <p>6.9. Enjuagar el recipiente de ensayo solamente con agua destilada.</p> <p>6.10. En determinaciones volumétricas el consumo de solución valorante depende de la concentración de la sustancia a determinar.</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB08
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETERMINACION DE DUREZA TOTAL	Página 4 de 6 Versión 0
		
Foto 1. Kit de Dureza	Foto 2. kit de Dureza	
		
Foto 3. Jeringa de plástico graduada de 5 mL, Recipiente de ensayo	Foto 4. Pipeta de Valoración	
		
Foto 5. Reactivo H-1, solución indicadora	Foto 6. Muestra con reactivo H-1	
		
Foto 7. Reactivo H-2, solución valorante	Foto 8. Muestra titulada con reactivo H-2	
Fuente: Autoras; Grupo de Investigación en BIOENSAYOS		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB08																																																	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETERMINACION DE DUREZA TOTAL	Página 5 de 6																																																	
		Versión 0																																																	
<p>6.11.Realizar la conversión del valor obtenido de acuerdo a la siguiente tabla:</p> <table><tr><th>Buscado Dado</th><th>Mmol/l de (Ca +Mg)</th><th>Mg/l (ppm)de Ca</th><th>Grado aleman °d</th><th>Grado ingles °e</th><th>Grado frances °f</th><th>Mg/l (ppm) de CaCO3</th></tr><tr><td>1 mmol/l de (Ca + Mg)</td><td>1</td><td>40,08</td><td>5,61</td><td>7,00</td><td>10,01</td><td>100,1</td></tr><tr><td>1 mg/l (ppm) de Ca</td><td>0,025</td><td>1</td><td>0,140</td><td>0,175</td><td>0,250</td><td>2,50</td></tr><tr><td>1 grado aleman °d</td><td>0,178</td><td>7,15</td><td>1</td><td>1,25</td><td>1,78</td><td>17,85</td></tr><tr><td>1 grado ingles °e</td><td>0,143</td><td>5,72</td><td>0,800</td><td>1</td><td>1,43</td><td>14,29</td></tr><tr><td>1 grado frances °f</td><td>0,100</td><td>4,00</td><td>0,560</td><td>0,700</td><td>1</td><td>10,00</td></tr><tr><td>1 mg/l (ppm) de CaCO3</td><td>0,010</td><td>0,400</td><td>0,056</td><td>0,070</td><td>0,100</td><td>1</td></tr></table>			Buscado Dado	Mmol/l de (Ca +Mg)	Mg/l (ppm)de Ca	Grado aleman °d	Grado ingles °e	Grado frances °f	Mg/l (ppm) de CaCO3	1 mmol/l de (Ca + Mg)	1	40,08	5,61	7,00	10,01	100,1	1 mg/l (ppm) de Ca	0,025	1	0,140	0,175	0,250	2,50	1 grado aleman °d	0,178	7,15	1	1,25	1,78	17,85	1 grado ingles °e	0,143	5,72	0,800	1	1,43	14,29	1 grado frances °f	0,100	4,00	0,560	0,700	1	10,00	1 mg/l (ppm) de CaCO3	0,010	0,400	0,056	0,070	0,100	1
Buscado Dado	Mmol/l de (Ca +Mg)	Mg/l (ppm)de Ca	Grado aleman °d	Grado ingles °e	Grado frances °f	Mg/l (ppm) de CaCO3																																													
1 mmol/l de (Ca + Mg)	1	40,08	5,61	7,00	10,01	100,1																																													
1 mg/l (ppm) de Ca	0,025	1	0,140	0,175	0,250	2,50																																													
1 grado aleman °d	0,178	7,15	1	1,25	1,78	17,85																																													
1 grado ingles °e	0,143	5,72	0,800	1	1,43	14,29																																													
1 grado frances °f	0,100	4,00	0,560	0,700	1	10,00																																													
1 mg/l (ppm) de CaCO3	0,010	0,400	0,056	0,070	0,100	1																																													
<p>6.12.La dureza total del agua reconstituida debe encontrarse en un rango de 40 a 48 mg/l CaCO₃</p> <p>6.13.Consignar esta información en el formato de control del agua reconstituida (Anexo A).</p> <p>6.14.Cuando, se tiene la certeza absoluta que el agua reconstituida cumple los parámetros establecidos y no provoca la muerte de los individuos, esta puede ser utilizada para el mantenimiento del cultivo.</p>																																																			
<p>7. BIBLIOGRAFIA</p> <ul style="list-style-type: none">Manual de manejo. Kit de dureza 1.08039.00001 –Aquamerk-SAWYER, Clair N. Química para ingeniería ambiental. Cuarta edición. Colombia. Mc Graw Hill, 2000.																																																			
Elaboró:	Angela Maria Toro Barbier Juliana Orozco Holguín	41021024 41021156																																																	
Primera Revisión:	Pedro Miguel Escobar Malaver																																																		
Segunda Revisión:																																																			





8. ANEXOS


ANEXO A

FORMATO DE CONTROL DEL AGUA RECONSTITUIDA


[illegible]

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB09
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETERMINACION DE pH	Página 1 de 6 Versión 0
<p>CONTENIDO</p> <ol style="list-style-type: none"> Objetivo Materiales Reactivos Definiciones Principio del método Procedimiento Bibliografía Anexo A – Formato de control de agua reconstituida <p>1. OBJETIVO</p> <p>Determinar el valor de pH del agua reconstituida, mediante el medidor portátil METTLER TOLEDO con el fin de mantener las condiciones optimas del ecosistema en el laboratorio, para el desarrollo de los microorganismos prueba</p> <p>2. MATERIALES</p> <ul style="list-style-type: none"> Medidor portátil, METTLER TOLEDO SevenGo pH (Foto 1) Recipiente de ensayo <p>3. REACTIVOS</p> <ul style="list-style-type: none"> Solución buffer pH 7.00 (Foto 2) Solución buffer pH 4.00 (Foto 3) Cloruro de Potasio, KCl 3.0 M 		


FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB09
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETERMINACION DE pH	Página 2 de 6 Versión 0
<p>4. DEFINICIONES</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Calibración:</u> Es el procedimiento de comparación entre lo que indica un instrumento y lo que "debiera indicar" de acuerdo a un patrón de referencia con valor conocido' • <u>pH:</u> Es un valor que se usa para indicar la acidez o alcalinidad de una sustancia. La escala de pH es una escala logarítmica de crecimiento exponencial. Oscila entre los valores de 0 (más ácido) y 14 (más básico), 7 es Neutro. El "factor pH" se define como el potencial de Hidrógeno calculado como el logaritmo de la actividad o concentración molar de los iones Hidrógeno (H^+ ó hidronio H_3O^+). $pH = -\log[H^+]$. • <u>Tampón o Solución Buffer:</u> Las soluciones amortiguadoras, también conocidas como disoluciones buffer o tampón, son disoluciones que están compuestas por el ion común de un ácido débil o una base débil. Y el mismo ion común en una sal conjugada, ambos componentes deben de estar presentes. Buffer es una o varias sustancias químicas que afectan la concentración de los iones de hidrógeno (o hidrogeniones) en el agua. Siendo que pH no significa otra cosa que potencial de hidrogeniones (o peso de hidrógeno), un "buffer" (o "amortiguador") lo que hace es regular el pH. Cuando un "buffer" es adicionado al agua, el primer cambio que se produce es que el pH del agua se vuelve constante. De esta manera, ácidos o bases (álcalis = bases) adicionales no podrán tener efecto alguno sobre el agua, ya que esta siempre se estabilizará de inmediato. 		


FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB09
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETERMINACION DE pH	Página 3 de 6 Versión 0
<p>5. PRINCIPIO DEL METODO</p> <p>El agua está disociada en iones H^+ y OH^-. Las sales minerales disueltas en el agua se disocian en iones positivos y esta ionización varía de unos compuestos a otros. Hay organismos que viven en aguas con un pH ácido; otros viven en medios acuáticos alcalinos. Las aguas dulces tienen el pH entre 6.5 y 8.7; las aguas marinas entre 8 y 8.5. Los efectos directos de pH sobre los organismos son graduales empiezan más severos a medida que el pH se aparta de la zona neutral.</p> <p>6. PROCEDIMIENTO</p> <p>6.1. CALIBRACION</p> <p>6.1.1. Se coloca el electrodo en un tampón de calibración (solución buffer pH 7.00) y presiona Cal. Cuando el valor se estabiliza aparece en la pantalla el porcentaje de calibración.</p> <p>6.1.2. Lavar el electrodo con agua desionizada.</p> <p>6.1.3. Colocar el electrodo en el siguiente tampón de calibración (solución buffer pH 4.00) y presiona Cal. El valor se estabiliza y nuevamente muestra un porcentaje de calibración.</p> <p>6.2. MEDICIÓN DE MUESTRAS</p> <p>6.2.1. Colocar el electrodo en la muestra y presiona Read para iniciar la medición: el decimal parpadeara. Cuando la señal se estabiliza, la pantalla se congela automáticamente y aparece \sqrt{A} (deja de parpadear) en ese momento se oprime nuevamente Read, este procedimiento se repite hasta que el valor de pH no varía mas.</p> <p>6.2.2. Consignar esta información en el formato de control de agua reconstituida (Anexo A).</p> <p>6.2.3. Mientras el electrodo no esté en uso debe encontrarse sumergido en una solución de cloruro de potasio 3.0M (Foto 4)</p>		



FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB09
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETERMINACION DE pH	Página 4 de 6 Versión 0
		<div>Foto 1. pH meter SG2</div> <div>Foto 2. Solución buffer pH 7.00</div>
		<div>Foto 3. Solución buffer pH 4.00</div> <div>Foto 4. Cloruro de potasio 3.00M</div>
Fuente: Autoras; Grupo de Investigación en Bioensayos.		


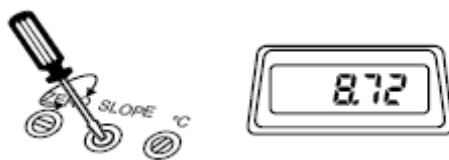
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB09
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETERMINACION DE pH	<i>Página 5 de 6</i>
		<i>Versión 0</i>
<p>7. BIBLIOGRAFIA</p> <ul style="list-style-type: none"> • METTLER TOLEDO, Instrucciones de manejo pH meter SG2 • SAWYER, Clair N. Química para ingeniería ambiental. Cuarta edición. Colombia. Mc Graw Hill, 2000. 		
Elaboro: Angela Maria Toro Barbier 41021024 Juliana Orozco Holguín 41021156		
Primera Revisión: Pedro Miguel Escobar Malaver		
Segunda Revisión:		

[illegible]


FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB10
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETERMINACION DE OXIGENO DISUELTO	<i>Página 1 de 8</i>
		<i>Versión 0</i>
<p>CONTENIDO</p> <ol style="list-style-type: none"> Objetivo Materiales Reactivos Definiciones Principio del método Procedimiento Bibliografía Anexo A – Formato de control de agua reconstituida Anexo B - Corrección de las mediciones para diferentes alturas <p>1. OBJETIVO</p> <p>Determinar el valor de OD del agua reconstituida, mediante el medidor portátil de oxígeno disuelto HI 8043; con el fin de mantener las condiciones optimas del ecosistema en el laboratorio, para el desarrollo de los microorganismos prueba</p> <p>2. MATERIALES</p> <ul style="list-style-type: none"> Medidor de oxígeno disuelto portátil, HANNA HI 8043 (Foto 1) Recipiente de ensayo <p>3. REACTIVOS</p> <ul style="list-style-type: none"> Solución HI 7040 Solución HI 7041 		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB10
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETERMINACION DE OXIGENO DISUELTO	<i>Página 2 de 8</i> <i>Versión 0</i>
<p>4. DEFINICIONES</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>Calibración:</u> Es el procedimiento de comparación entre lo que indica un instrumento y lo que "debiera indicar" de acuerdo a un patrón de referencia con valor conocido' • <u>OD:</u> Son todos los gases de la atmósfera que son, en alguna forma, solubles en el agua. El oxígeno y el nitrógeno son catalogados esencialmente solubles en el agua. La cantidad de oxígeno disuelto presente en el agua depende de variables como la presión y la temperatura. • <u>Tampón o Solución Buffer:</u> Las soluciones amortiguadoras, también conocidas como disoluciones buffer o tampón, son disoluciones que están compuestas por el ion común de un ácido débil o una base débil. Y el mismo ion común en una sal conjugada, ambos componentes deben de estar presentes. Buffer es una o varias sustancias químicas que afectan la concentración de los iones de hidrógeno (o hidrogeniones) en el agua. Siendo que pH no significa otra cosa que potencial de hidrogeniones (o peso de hidrógeno), un "buffer" (o "amortiguador") lo que hace es regular el pH. Cuando un "buffer" es adicionado al agua, el primer cambio que se produce es que el pH del agua se vuelve constante. De esta manera, ácidos o bases (álcalis = bases) adicionales no podrán tener efecto alguno sobre el agua, ya que esta siempre se estabilizará de inmediato. 		


FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB10
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETERMINACION DE OXIGENO DISUELTO	Página 3 de 8 Versión 0
<p>5. PRINCIPIO DEL METODO</p> <p>Los animales acuáticos necesitan oxígeno para vivir. Los peces, los invertebrados, las plantas y las bacterias aeróbicas requieren oxígeno para respirar. El oxígeno de la atmósfera se disuelve con facilidad en el agua hasta que ésta se satura. Una vez disuelto en el agua, el oxígeno se difunde muy lentamente y su distribución depende del movimiento del agua aireada.</p> <p>El nivel de oxígeno disuelto puede ser un indicador de cuán contaminada está el agua y cuán bien puede dar soporte esta agua a la vida vegetal y animal. Generalmente, un nivel más alto de oxígeno disuelto indica agua de mejor calidad. Si los niveles de oxígeno disuelto son demasiado bajos, algunos peces y otros organismos no pueden sobrevivir.</p> <p>6. PROCEDIMIENTO</p> <p>6.1. CALIBRACION</p> <p>Procedimiento para la calibración en el nivel del mar: Si se encuentra a partir de la posición "OFF", cambiar a "STB" y esperar 30 minutos para completar la polarización de la sonda antes de proceder a la calibración</p> <p>6.1.1. Pase de la posición "STB" a la posición "O₂"</p> <p>6.1.2. Quite la capsula protectora y sumerja la sonda en la solución cero oxigeno HI 7040 y esperar 5 minutos. En el instrumento deben estabilizarse los niveles.</p> <p>6.1.3. Usando un pequeño destornillador, gire a la calibración zero, hasta que la pantalla lee cero.</p> <div data-bbox="641 1591 1133 1791">  </div>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB10
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETERMINACION DE OXIGENO DISUELTO	Página 4 de 8 Versión 0
<p>6.1.4. Si el punto cero es pasado en la pantalla aparecerá "1". Si no se puede obtener cero en la lectura, es probable que la sonda se encuentre defectuosa, en este caso debe revisarse la membrana.</p> <p>6.1.5. Después de la calibración de cero enjuagar la sonda con agua normal de grifo.</p> <p>6.1.6. Si la calibración no se realiza a nivel del mar debe efectuarse una corrección de la diferencia en la altitud de acuerdo a la tabla 2 (Anexo B) ; por ejemplo, si esta calibrado en 20,5 °C, a una altura de 300m sobre el nivel del mar, la pantalla se debe ajustar a $9,08 \times 0,96 = 8,72$</p> <div data-bbox="682 808 1128 966">  </div>		
<p>6.2. MEDICIÓN DE MUESTRAS</p> <p>Asegúrese que el medidor ha sido calibrado y la cápsula protectora ha sido retirada.</p> <p>Girando el conmutador colocado en el panel frontal del instrumento, se selecciona la modalidad de lectura de la concentración de oxígeno, leyéndose el valor medido por la sonda, directamente en la pantalla del instrumento. El modo STB permite mantener la sonda constantemente polarizada y lista para su uso en el curso de las labores de medida.</p> <p>6.2.1. Sumerja la punta de la sonda en la muestra de la prueba.</p> <p>6.2.2. Para comprobar rápidamente si la velocidad del agua es suficiente, Espere que la lectura sea estable y luego pase la sonda O.D. Si la lectura sigue siendo estable, las condiciones de medición son correctas, mientras que si la lectura aumenta el movimiento del agua es demasiado bajo. Durante las mediciones, esta condición se puede cumplir agitando manualmente la sonda. Las lecturas no son posibles en tanto que el Líquido está en reposo.</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB10
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETERMINACION DE OXIGENO DISUELTO	<i>Página 5 de 8</i> <i>Versión 0</i>
<div data-bbox="423 472 1369 976" data-label="Image"> </div> <div data-bbox="423 976 1369 1047" data-label="Caption"> <p>Foto 1. Medidor portátil OD</p> <p>Fuente: Autoras; Grupo de Investigación en Bioensayos.</p> </div>		
Elaboro:		
Angela Maria Toro Barbier Juliana Orozco Holguín		41021024 41021156
Primera Revisión: Pedro Miguel Escobar Malaver		
Segunda Revisión:		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB10
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETERMINACION DE OXIGENO DISUELTO	<i>Página 6 de 8</i> <i>Versión 0</i>
<p>7. BIBLIOGRAFIA</p> <ul style="list-style-type: none"> • ESCOBAR MALAVER, Pedro Miguel. Implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando <i>Daphnia Pulex</i> para la evaluación de muestras ambientales. Santafé de Bogotá; 1997. • CETESB. Mantenimiento del cultivo. Protocolo L5.018, 1992 • Proyecto CAR – BID – Contrato 298–94. Estudio de evaluación de toxicidad relativa de sustancias tóxicas en vertimientos y cuerpos receptores. • HANNA INSTRUMENTS, manual de instrucciones HI 8043. 		
Elaboro:	Angela Maria Toro Barbier	41021024
	Juliana Orozco Holguín	41021156
Primera Revisión: Pedro Miguel Escobar Malaver		
Segunda Revisión:		

[illegible]

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	LB10																																																																					
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	DETRMINACION DE OXIGENO DISUELTO	<i>Página 8 de 8</i> <i>Versión 0</i>																																																																					
<p style="text-align: center;">ANEXO B</p> <p style="text-align: center;">CORRECCION DE LAS MEDICIONES PARA DIFERENTES ALTURAS</p> <p style="text-align: center;">Table 2 Correction for measurements at different altitude</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>ALTITUDE (METERS)</th><th>ATMOSPHERIC PRESSURE KPa</th><th>CORRECTION FACTOR</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>Sea level</td><td>101.3</td><td>1.00</td></tr> <tr><td>50</td><td>100.7</td><td>0.99</td></tr> <tr><td>100</td><td>100.1</td><td>0.99</td></tr> <tr><td>150</td><td>99.4</td><td>0.98</td></tr> <tr><td>200</td><td>98.8</td><td>0.98</td></tr> <tr><td>300</td><td>97.6</td><td>0.96</td></tr> <tr><td>400</td><td>96.4</td><td>0.95</td></tr> <tr><td>500</td><td>95.2</td><td>0.94</td></tr> <tr><td>600</td><td>94.0</td><td>0.93</td></tr> <tr><td>700</td><td>92.8</td><td>0.92</td></tr> <tr><td>800</td><td>91.7</td><td>0.90</td></tr> <tr><td>900</td><td>90.5</td><td>0.89</td></tr> <tr><td>1000</td><td>89.4</td><td>0.88</td></tr> <tr><td>1100</td><td>88.3</td><td>0.87</td></tr> <tr><td>1200</td><td>87.2</td><td>0.86</td></tr> <tr><td>1300</td><td>86.1</td><td>0.85</td></tr> <tr><td>1400</td><td>85.0</td><td>0.84</td></tr> <tr><td>1500</td><td>84.0</td><td>0.83</td></tr> <tr><td>1600</td><td>82.9</td><td>0.82</td></tr> <tr><td>1700</td><td>81.9</td><td>0.81</td></tr> <tr><td>1800</td><td>80.9</td><td>0.80</td></tr> <tr><td>1900</td><td>79.9</td><td>0.79</td></tr> </tbody> </table>			ALTITUDE (METERS)	ATMOSPHERIC PRESSURE KPa	CORRECTION FACTOR	Sea level	101.3	1.00	50	100.7	0.99	100	100.1	0.99	150	99.4	0.98	200	98.8	0.98	300	97.6	0.96	400	96.4	0.95	500	95.2	0.94	600	94.0	0.93	700	92.8	0.92	800	91.7	0.90	900	90.5	0.89	1000	89.4	0.88	1100	88.3	0.87	1200	87.2	0.86	1300	86.1	0.85	1400	85.0	0.84	1500	84.0	0.83	1600	82.9	0.82	1700	81.9	0.81	1800	80.9	0.80	1900	79.9	0.79
ALTITUDE (METERS)	ATMOSPHERIC PRESSURE KPa	CORRECTION FACTOR																																																																					
Sea level	101.3	1.00																																																																					
50	100.7	0.99																																																																					
100	100.1	0.99																																																																					
150	99.4	0.98																																																																					
200	98.8	0.98																																																																					
300	97.6	0.96																																																																					
400	96.4	0.95																																																																					
500	95.2	0.94																																																																					
600	94.0	0.93																																																																					
700	92.8	0.92																																																																					
800	91.7	0.90																																																																					
900	90.5	0.89																																																																					
1000	89.4	0.88																																																																					
1100	88.3	0.87																																																																					
1200	87.2	0.86																																																																					
1300	86.1	0.85																																																																					
1400	85.0	0.84																																																																					
1500	84.0	0.83																																																																					
1600	82.9	0.82																																																																					
1700	81.9	0.81																																																																					
1800	80.9	0.80																																																																					
1900	79.9	0.79																																																																					