



**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL_{50-96}) DEL
CIANURO, POR MEDIO DE BIOENSAYOS SOBRE ALEVINOS DE
TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*).**

**LENNY JOHANA SÁNCHEZ SARMIENTO
AURA PAOLA ANDRADE AYALA**

**UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA
BOGOTÁ D.C.
2009**



**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL_{50-96}) DEL
CIANURO, POR MEDIO DE BIOENSAYOS SOBRE ALEVINOS DE
TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*).**

**LENNY JOHANA SÁNCHEZ SARMIENTO
AURA PAOLA ANDRADE AYALA**

**Trabajo de Grado para optar al título de
Ingenieras ambientales y sanitarias**

**Director
PEDRO MIGUEL ESCOBAR MALAVER
QUIMICO INDUSTRIAL
LIC. QUÍMICA Y BIOLOGÍA**

**UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA
BOGOTÁ D.C.
2009**



Nota de aceptación

Director

Jurado 1

Jurado 2

Bogotá D.C., julio de 2009

LENNY SÁNCHEZ – PAOLA ANDRADE



DEDICATORIA

*A Dios, que siempre me acompaña
porque nunca dejo que mi camino se
oscureciera y que aún me permite
alcanzar las alegrías más grandes e
inesperadas.*

*A mi madre, mi padre y a Hernando 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 Jesús Armando porque siempre creyó
en mí y estuvo ahí para impulsarme a dar
un paso más.*

*A mi hijo, por ser mi gran motivación de
superación.*

Lenny Johana

*A Dios por ayudarme a sobrepasar los obstáculos, por darme
las oportunidades, la guía, la protección y la entereza
para llegar a este punto en mi vida.*

*A mi madre, por su comprensión, por su apoyo incondicional,
por sus oraciones y por ser el pilar más fuerte que hay en mi existencia.*

*A mis hermanos, mi cuñado y mis sobrinos por la
confianza, la compañía en la distancia y todas las alegrías
que me brindaron y me dieron fuerza para culminar este largo camino.*

Aura Paola



AGRADECIMIENTOS

Al nuestro apreciado y respetado Director de Tesis, Licenciado Pedro Miguel Escobar Malaver, por su colaboración, confianza, paciencia y ayuda durante el desarrollo de este Proyecto de Grado.

Al laboratorio de Ingeniería Ambiental y Sanitaria, al Laboratorio de Bioensayos y Laboratorio de Química de la Universidad de La Salle, en especial a los monitores y al Señor Oscar Contenido, por ofrecernos la facilidad y los medios para el desarrollo de este Proyecto.

Al Centro de Desarrollo Productivo (Beneficio de Oro) ubicado en Suarez-Cauca, principalmente al Señor Hernán Trujillo y al Ingeniero de Minas José Rodríguez por su amable y eficiente colaboración para llevar a cabo nuestra investigación.

A los profesores, compañeros, amigos y familiares; todos aquellos que en algún momento de esta travesía apoyaron nuestro empeño y nos tendieron la mano para que lográramos hacer realidad esta meta.



GLOSARIO

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

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

Bioensayo acuático: al procedimiento por el cual la presencia o efectos de una o más sustancias, elementos, compuestos, desechos o factores ambientales solos o en combinación.

Biota: Conjunto de especies de animales, plantas y otros organismos que ocupa un área o lugar determinado.

Biomagnificación: incremento de la concentración de un contaminante en los tejidos vivos a través de la cadena alimenticia.

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.

Cianuración: Tratamiento termoquímico que se da a los aceros. Cuando se quiere obtener una superficie dura y resistente al desgaste, esto se logra empleando un baño de cianuro fundido, la cianuración se puede considerar como un tratamiento intermedio entre la cementación y la nitruración ya que el endurecimiento se consigue por la acción combinada del carbono y el nitrógeno a una temperatura determinada.

Concentración de una sustancia: elemento o compuesto en un líquido, la relación existente entre su peso y el volumen del líquido que lo contiene.

Concentración letal: es aquella a la cual una sustancia en su límite máximo produce la muerte.

Concentración letal (CL_{50- 96}): a la concentración de una sustancia, elemento o compuesto, solos o en combinación, que produce la muerte al cincuenta por ciento (50%) de los organismos sometidos a bioensayos en un período de noventa y seis (96) horas.



Contaminante: introducción en un medio cualquiera de un contaminante, es decir, la introducción de cualquier sustancia o forma de energía con potencial para provocar daños, irreversibles o no, en el medio inicial.

Contaminación ambiental: la presencia en el ambiente de cualquier agente (físico, químico o biológico) o bien de una combinación de varios agentes en lugares, formas y concentraciones tales que sean o puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o para el bienestar de la población, o que puedan ser perjudiciales para la vida vegetal o animal, o impidan el uso normal de las propiedades y lugares de recreación y goce de los mismos.

Dosis: Cantidad de sustancia que se absorbe en 24 horas expresada con relación a kilogramos de peso corporal.

Dosis Letal Media (DL_{50}): es la dosis única que, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte del 50% de los animales a los que se haya administrado. El valor de la DL_{50} se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal (miligramos por kilo, mg/kg).

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.

Ecotoxicidad: Capacidad que tiene un contaminante de producir daño sobre los organismos presentes en los componentes ambientales. Es decir; la consecuencia de la acción originada por el contaminante sobre los seres vivos que forman los ecosistemas.

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 o el grado de efecto (graduado) luego de la exposición a la muestra.

Industria aurífera: industria dedicada a la explotación del oro.

Intoxicación: Conjunto de perturbaciones fisiopatológicas y/o anatomopatológicas producido por los diversos principios activos.

LOEC: Concentración más baja a la que se observa efecto. Concentración experimental mayor para la que no se observan diferencias estadísticas o biológicas significativas respecto al grupo control.



NOEC: concentración más alta a la que no se observa efecto. Concentración experimental menor para la que se observan diferencias estadísticas o biológicas significativas respecto al grupo de control.

Objetivo de la prueba: control de calidad de efluentes, evaluación de compuestos específicos, toxicidad relativa, sensibilidad, etcétera.

Respuesta: Es la proporción de los problemas que manifiesta un determinado efecto definido.

Tiempo de exposición: tiempo de contacto de los organismos de prueba con la solución estudiada.

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

Toxicidad: la propiedad que tiene una sustancia, elemento o compuesto de causar daños en la salud humana o la muerte de un organismo vivo.

Toxicología: La toxicología es la ciencia que estudia el origen, naturaleza y propiedades de los tóxicos, su comportamiento cinético y sus efectos sobre los organismos vivos, las manifestaciones clínicas de la intoxicación la detección y cuantificación del TOXÓN, los procedimientos adecuados de prevención y tratamiento y las implicaciones médico-legales.

Toxicología ambiental: Rama que estudia los efectos tóxicos producidos por los contaminantes ambientales sobre la atmósfera, sobre el agua, y el suelo, y también el efecto de los residuos tóxicos de los alimentos.

Toxicidad aguda: la propiedad de una sustancia, elemento, compuesto, desecho, o factor ambiental, de causar efecto letal u otro efecto nocivo en cuatro (4) días o menos a los organismos utilizados para el bioensayo acuático.

Vertimiento líquido: cualquier descarga líquida hecha a un cuerpo de agua o a un alcantarillado.



TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	21
1. OBJETIVOS	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
2. MARCO TEÓRICO	24
2.1 ECOSISTEMAS ACUÁTICOS	24
2.1.1 ECOSISTEMAS ACUÁTICOS EN COLOMBIA	26
2.1.1.1 Clasificación por pisos altitudinales:	26
2.1.1.2 Clasificación por su origen geológico:	27
2.1.1.3 Clasificación por su tipo de cobertura:	27
2.2 BIOENSAYOS	28
2.2.1 BIOENSAYOS DE RESPUESTA DIRECTA	30
2.2.1.1 Bioensayos Agudos:	30
2.2.1.2 De tipo estático:	31
2.2.1.3 De flujo continuo:	31
2.2.1.4 Bioensayos Crónicos:	31
2.2.1.5 Bioestimulación:	31
2.2.1.6 Bioensayos de repelencia:	31
2.2.1.7 Bioacumulación:	32
2.2.2 ENSAYOS DE RESPUESTA INDIRECTA	32
2.2.2.1 Ensayos Organolépticos:	32
2.2.2.2 Ensayo de bioestimulación:	32
2.2.3 ÍNDICES DE TOXICIDAD	32
2.2.3.1 Concentración letal media (CL_{50-96}):	33
2.2.3.2 Dosis letal media (DL_{50}):	33
2.2.3.3 Concentración Efectiva Media (CE_{50}):	33
2.2.3.4 NEANO (nivel de efectos agudos no observados):	33
2.2.3.5 CENO (concentración de efectos no observables):	33
2.2.3.6 MCEO (menor concentración que produce efectos observables):	33
2.2.4 MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA EL ANÁLISIS DE TOXICIDAD	34
2.2.5 DISEÑOS DE EXPERIMENTOS	36
2.2.6 ESTABLECIMIENTO DE UNA RELACIÓN DOSIS RESPUESTA	36



2.2.6.1 Principio del modelo matemático	37
2.2.6.2 Método Probit (paramétrico):	38
2.2.6.3 Método de Litchfield-Wilcoxon (gráfico):	38
2.2.6.4 Método de Sperman-Karber (no paramétrico):	38
2.2.6.5 Método gráfico:	38
2.2.6.6 Análisis de varianza (ANOVA):	39
2.3 ESPECIE UTILIZADA EN LOS BIOENSAYOS, TRUCHA ARCO IRIS	
(ONCORHYNCHUS MYKISS)	39
2.3.1 RESEÑA HISTÓRICA	39
2.3.2 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE	40
2.3.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	41
2.3.4 ANATOMÍA DE LA TRUCHA	41
2.3.5 DESARROLLO DE LA TRUCHA	43
2.3.5.1 Fecundación:	44
2.3.5.2 Fertilización:	45
2.3.5.3 Incubación:	45
2.3.5.4 Eclosión:	45
2.3.5.5 Larvas:	45
2.3.5.6 Alevinaje:	45
2.3.5.7 Reproducción:	46
2.3.5.8 Engorde:	46
2.3.4.9 Alimentación:	46
2.3.6 DESCRIPCIÓN BREVE DE SU COMPORTAMIENTO	46
2.3.7 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA TRUCHA COMO ORGANISMO VIVO PARA LAS PRUEBAS TOXICOLÓGICAS	47
2.3.7.1 Ventajas y desventajas de peces como organismos de bioensayos	47
2.3.7 FICHA DE LA TRUCHA ARCO IRIS EN COLOMBIA	48
2.3.7.1 Distribución geográfica en Colombia:	48
2.3.7.2 Ecosistema:	49
2.3.7.4 Hábitat:	49
2.3.7.5 Impactos:	49
2.4 MARCADORES BIOLÓGICOS	49
2.4.1 MARCADORES BIOLÓGICOS DE LA EXPOSICIÓN DE LOS ORGANISMOS	50
2.4.2 MARCADORES BIOLÓGICOS DE EFECTO	50
2.4.3 MARCADORES BIOLÓGICOS DE SUSCEPTIBILIDAD	50
2.5 TOXICOLOGÍA	51
2.5.1 TOXICOLOGÍA AMBIENTAL	52
2.5.2 ECOTOXICOLOGÍA AMBIENTAL	53
2.5.3 EFECTOS ECOTOXICOLÓGICOS	53
2.5.4 SUSTANCIA ECOTÓXICA	54
2.5.5 VÍAS DE INGRESO DE LOS TÓXICOS AL ORGANISMO	54
2.5.6 CONTAMINACIÓN	56



2.5.7 EFECTO TÓXICO EN LOS ORGANISMOS	56
2.5.7.1 Magnitud de la exposición a sustancias tóxicas:	57
2.5.7.2 Nocividad, toxicidad y ecotoxicidad:	58
2.5.7.3 Exposición del agente tóxico:	59
2.5.7.4 Exposición aguda y crónica:	59
2.6 EL CIANURO	60
2.6.1 GENERALIDADES DEL CIANURO	60
2.6.1.1 Presencia del cianuro en la naturaleza:	61
2.6.1.2 Cianuro libre:	61
2.6.1.3 Producción y manipulación del cianuro:	63
2.6.2 QUÍMICA BÁSICA DEL CIANURO	64
2.6.2.1 Los compuestos simples del cianuro:	64
2.6.2.2 Los compuestos complejos de Cianuro:	65
2.6.3 USOS INDUSTRIALES DEL CIANURO	65
2.6.3.1 Uso del cianuro en la producción de oro:	66
2.6.3.2 El proceso producción del oro:	67
2.6.3.3 Reacciones químicas en el proceso de lixiviación del oro	68
2.6.4 ATENUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE CIANURO EN EL AMBIENTE	69
2.6.4.1 Tratamiento y reutilización de soluciones de cianuro:	70
2.6.5 TOXICOLOGÍA DEL CIANURO	72
2.6.5.1 Impactos del cianuro sobre la salud y el ambiente:	72
2.6.5.2 Información ecológica del cianuro de sodio (NaCN):	74
2.6.5.3 Epidemiología del cianuro en los seres humanos:	75
2.7 INDUSTRIA AURÍFERA EN COLOMBIA	76
2.7.1 GENERALIDADES	76
2.7.2 PROBLEMÁTICA DE LAS ALTERACIONES AMBIENTALES OCASIONADAS POR LAS ACTIVIDADES MINERAS	77
□ ALTERACIONES SOBRE LA ATMÓSFERA	78
□ ALTERACIONES SOBRE EL RECURSO HÍDRICO	78
□ ALTERACIONES SOBRE LA BIOTA	78
□ ALTERACIONES SOBRE EL SUELO	78
2.8 INDUSTRIA EVALUADA	82
2.8.1 GENERALIDADES	82
2.8.2 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ORO	85
2.8.3 PROCESO DE DETOXIFICACIÓN POR OXIDACIÓN DE ARENAS SECAS CIANURADAS, TRATAMIENTO DE ARENAS CIANURADAS	90
 3. MARCO LEGAL	 93
 3.1 DECRETO 1594 DEL 26 DE JUNIO DE 1984	 94
3.2 RESOLUCIÓN 2115 DE 2007	96



4. METODOLOGÍA	97
4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	97
4.2 MÉTODO DE EJECUCIÓN DE LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD AGUDA	98
Ensayos Preliminares:	98
Ensayos Definitivos:	98
4.2.1 FASE DE ACLIMATACIÓN	101
4.2.1.1 Preparación agua libre de cloro	105
4.2.2 FASE DE PRUEBAS DE TOXICIDAD	107
4.2.2.1 Preparación de soluciones	108
MATERIALES Y REACTIVOS	109
<input type="checkbox"/> Dicromato de Potasio	110
<input type="checkbox"/> VERTIMIENTO	111
4.2.2.2 Muestreo del vertimiento	112
Consideraciones básicas usadas para el muestreo	112
4.2.2.3 Fase de pruebas con Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)	114
4.2.2.4 Fase de pruebas preliminares del cianuro (CN^-) y del vertimiento	116
<input type="checkbox"/> Ensayos preliminares con el vertimiento antes de entrar al sistema de tratamiento	117
4.2.2.5 Fase de pruebas definitivas del cianuro (CN^-) y del vertimiento	118
<input type="checkbox"/> FASE DE PRUEBAS DE TOXICIDAD DEFINITIVAS CON EL VERTIMIENTO DEL BENEFICIO DEL ORO EN EL CENTRO DE DESARROLLO PRODUCTIVO CDP (SUÁREZ-CAUCA) QUE PERMITE OBTENER LA CL_{50-96} DEL VERTIMIENTO	119
<input type="checkbox"/> Ensayos definitivos con el vertimiento antes de entrar al sistema de tratamiento	120
5. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	124
5.1 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LAS PRUEBAS TOXICOLÓGICAS.	124
5.2 RESULTADOS PRUEBAS DE TOXICIDAD	126
5.2.1 RESULTADOS ENSAYOS DE SENSIBILIDAD CON DICROMATO DE POTASIO ($K_2Cr_2O_7$).	126
5.2.1.1 Análisis de varianza de las pruebas definitivas de sensibilidad Dicromato de Potasio $K_2Cr_2O_7$.	129
5.2.2 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD CON LA SUSTANCIA PURA DE CIANURO A PARTIR DEL CIANURO DE SODIO ($NaCN$).	129
5.2.2.1 Análisis de varianza de la prueba definitiva con cianuro.	133
5.2.3 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL VERTIMIENTO DE LA INDUSTRIA DE BENEFICIO DEL ORO EL CUAL CONTIENE CIANURO (CN^-).	133
5.2.3.1 Resultados de los ensayos con el vertimiento antes de entrar al sistema de tratamiento	133



5.2.3.1	Análisis de varianza de las pruebas definitivas del vertimiento sin tratamiento.	137
5.2.3.2	Resultados de los ensayos con el vertimiento a la salida del sistema de tratamiento	137
5.2.3.3	Análisis de varianza del vertimiento tratado.	140
5.3	PARAMETROS FISICOQUÍMICOS DEL VERTIMIENTO	140
5.3.1	ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DEL VERTIMIENTO EVALUADO	140
5.3.2	Análisis de los resultados de la caracterización	142
5.4	OBTENCIÓN DE LA CARGA TÓXICA E ÍNDICE TOXICOLÓGICO	144
5.4.1	OBTENCIÓN CARGA TÓXICA E ÍNDICE TOXICOLÓGICO DE LA MUESTRA DEL VERTIMIENTO INDUSTRIAL ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO.	145
5.4.1.1	Carga tóxica del vertimiento antes del tratamiento	145
5.4.1.2	Índice toxicológico del vertimiento antes del tratamiento	145
5.4.2	OBTENCIÓN CARGA TÓXICA E ÍNDICE TOXICOLÓGICO DE LA MUESTRA DEL VERTIMIENTO INDUSTRIAL DESPUÉS DEL TRATAMIENTO.	146
5.4.2.1	Carga tóxica del vertimiento después del tratamiento	146
5.4.2.2	Índice toxicológico del vertimiento después del tratamiento	146
6.	COMPARACIÓN DE RESULTADOS CON OTRAS PRUEBAS DE TOXICIDAD REALIZADOS EN EL EXTERIOR Y EN COLOMBIA	148
	CONCLUSIONES	150
	RECOMENDACIONES	153
	BIBLIOGRAFÍA	155
	ANEXOS	163



LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Problemática de las Alteraciones Ambientales Ocasionadas por las Actividades Mineras.	79
Tabla 2. Datos industria evaluada	84
Tabla 3. Valores límites permisibles para cianuro	93
Tabla 4. Sustancias de interés sanitario.	94
Tabla 5. Los criterios de calidad admisibles de Cianuro	94
Tabla 6. Normatividad de vertimiento	95
Tabla 7. Sustancias de interés sanitario.	95
Tabla 8. Características químicas que tienen reconocido efecto adverso en la salud humana	96
Tabla 9. Parámetros de control de las condiciones del agua	105
Tabla 10. Carta de control de Sensibilidad con Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$).	126
Tabla 11. Resultados CL_{50-96} de sensibilidad	127
Tabla 12. F calculado vs F teórico. Prueba de sensibilidad Dicromato de Potasio	129
Tabla 13. Carta de control del cianuro (CN^-)	130
Tabla 14. Resultados CL_{50-96} del cianuro de sodio	131
Tabla 15. F calculado vs F teórico. Prueba definitiva de cianuro de sodio.	133
Tabla 16. Resultados de las pruebas toxicológicas con el vertimiento sin tratar	134
Tabla 17. Resultados CL_{50-96} del vertimiento con presencia de NaCN	135
Tabla 18. F calculado vs F teórico de la prueba definitiva con el vertimiento sin tratar.	137
Tabla 19. Resultados definitivos del vertimiento tratado.	138
Tabla 20. Resultados CL_{50-96} del vertimiento después del tratamiento	138
Tabla 21. F calculado vs F teórico. Prueba definitiva con el vertimiento tratado	140
Tabla 22. Parámetros de campo. Aguas del proceso de extracción de oro, entrada y salida.	141
Tabla 23. Aforo de Caudal.	141
Tabla 24. Resultados Fisicoquímicos, Aguas Residuales Industriales de Extracción de Oro.	141
Tabla 25. Cargas Contaminantes Entrada y Salida de la PTARI.	142
Tabla 26. Eficiencias de remoción del sistema de tratamiento	142
Tabla 27. Rangos de índices toxicológicos.	146
Tabla 28. Datos de sensibilidad	148
Tabla 29. Datos Cianuro	149



LISTA DE ILUSTRACIONES

	Pág.
Ilustración 1. Clasificación ecológica de los organismos acuáticos _____	25
Ilustración 2. Curva de dosis respuesta de organismos expuesto a bioensayos _____	29
Ilustración 3. Trucha Arco Iris _____	40
Ilustración 4. Clasificación taxonómica de la trucha arco iris _____	41
Ilustración 5. Morfología interna de la trucha con una división abdominal – dorsal _____	43
Ilustración 6. Desarrollo dela trucha arco iris _____	44
Ilustración 7. Vías de ingreso y rutas de distribución de contaminantes en el cuerpo humano. _____	55
Ilustración 8. Vista microscópica de los cristales de cianuro en formación. _____	60
Ilustración 9. Equilibrio de CN-/HCN con el pH _____	62
Ilustración 10. Estructura molecular cianuro _____	64
Ilustración 11. Porción de la producción mundial de cianuro utilizada en minería _____	66
Ilustración 12. Producción de oro _____	67
Ilustración 13. El ciclo del cianuro _____	70
Ilustración 14. Ubicación del Centro de Desarrollo Productivo –CDP _____	82
Ilustración 15. Proceso de extracción de oro libre, proceso físico _____	85
Ilustración 16. Proceso De Extracción De Oro, Proceso Químico-Cianuración _____	88
Ilustración 17. Preparación de las pilas de arena para el proceso de detoxificación. _____	90
Ilustración 18. Tanque y red de dosificación de peróxido de hidrogeno e hipoclorito de sodio _____	91
Ilustración 19. Arenas limpias para la elaboración de ladrillos. _____	92
Ilustración 20. Montaje del test general de ensayos _____	99
Ilustración 21. Fases de las pruebas de toxicidad aguda _____	100
Ilustración 22. Acuarios utilizados en la aclimatación de los organismos de prueba _____	101
Ilustración 23. Tamaño de la trucha arco iris <i>Oncorhynchus mykiss</i> utilizada en los bioensayos. _____	102
Ilustración 24. Aclimatación de los organismos de prueba (Truchas arco iris <i>Oncorhynchus mykiss</i>) _____	103
Ilustración 25. Introducción de los peces a los acuarios _____	104
Ilustración 26. Preparación del agua de solución _____	106
Ilustración 27. Materiales _____	108
Ilustración 28. Reactivos utilizados en las pruebas toxicológicas _____	109
Ilustración 29. Soluciones de los vertimientos _____	112
Ilustración 30. Muestra para medición de parámetros fisicoquímicos _____	113
Ilustración 31. Pasos para la realización de un ensayo _____	122



LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fase de aclimatación de los organismos de prueba	107
Figura 2. Determinación de la sensibilidad del (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).	115
Figura 3. Preparación solución madre de CN.	116
Figura 4. Fase de pruebas preliminares	118
Figura 5. Diagrama general de la metodología para la determinación de la concentración letal media CL_{50-96} del cianuro	121

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Concentración letal media (cl_{50-96}) de la sensibilidad con dicromato de potasio ($k_2cr_2o_7$).	128
Gráfica 2. Concentración Letal media (CL_{50-96}) Del cianuro (CN).	132
Gráfica 3. Concentración letal media (CL_{50-96}) del vertimiento antes del tratamiento.	136
Gráfica 4. Concentración letal media (CL_{50-96}) del vertimiento después del tratamiento	139
Gráfica 5. Comparación Índice Toxicológico Vertimiento Tratado y Sin tratar	147



LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. FICHA DE SEGURIDAD CIANURO DE SODIO _____	164
ANEXO B. TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (<i>Oncorhynchus</i> <i>mykiss</i>). _____	168
ANEXO C. ANÁLISIS PROBIT _____	185
ANEXO D. REGISTROS PROGRAMA ANOVA _____	203
ANEXO E. PROTOCOLOS PRUEBAS TOXICOLOGICAS: <i>LBP01</i> , <i>LBP02</i> , <i>LBP03</i> , <i>LBP04</i> , Y <i>LBP05</i> _____	220
ANEXO F. REGISTRO FOTOGRÁFICO PRUEBAS DE TOXICIDAD _____	284
ANEXO G. PRESERVACION DE MUESTRAS _____	296



RESUMEN

La necesidad de evaluar y detectar el impacto de las actividades antrópicas sobre los organismos y su ecosistema, de forma mas clara, induce a considerar el uso de bioindicadores, los cuales proveen la posibilidad de obtener información sobre las moléculas contaminantes después de su vertido en el ambiente directamente sobre sus receptores biológicos.

Uno de los instrumentos metodológicos más desarrollados por el enfoque directo está representado por los ensayos de toxicidad aguda utilizando biomarcadores, los que se definen como variaciones inducidas cuantificables de tipo bioquímico celular, fisiológico o de comportamiento correlacionables a la exposición y/o efecto de uno o más contaminantes químicos como es el caso del cianuro (CN⁻). En este contexto el objetivo del estudio es evaluar la respuesta de un receptor biológico, como un biomarcador, expresada en la determinación de la concentración letal (CL₅₀) del Cianuro en un lapso de tiempo de 96 horas, empleando alevinos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

El desarrollo de esta investigación se llevo a cabo en el laboratorio de bioensayos de la Universidad de la Salle, donde se realizaron las diferentes pruebas de toxicidad para la determinación de la concentración letal media (CL₅₀₋₉₆).

La realización fue posible siguiendo cuatro fases. La primera fase consistió en la compra de alevinos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), con un tamaño aproximado de 2.5 a 3.5 cm y 15 días de nacidos, aclimatación de los alevinos en un periodo de 15 días, a las condiciones necesarias para su apropiado funcionamiento y subsistencia.

En la segunda fase se realizó la preparación de las soluciones de prueba para la determinación de la sensibilidad del organismo vivo, obtención de la sensibilidad de la trucha, empleando Dicromato de Potasio (K₂Cr₂O₇) como tóxico de referencia. En la tercera fase se realizaron pruebas preliminares que permiten establecer el intervalo de concentraciones a ser usados en las pruebas definitivas, tanto para la sustancia pura como para el vertimiento.



La cuarta fase consistió en la realización de los ensayos toxicológicos definitivos, toma y preservación de muestras de la industria aurífera, montaje para pruebas de toxicidad del vertimiento, obtención de la CL_{50-96} del vertimiento industrial, aceptabilidad de los resultados y estimación de la concentración letal media. Se emplearon métodos estadísticos como el Probit y el análisis de varianza, que son utilizados en pruebas de toxicidad para los ensayos agudos estáticos.

Al concluir la investigación se establecieron los valores de sensibilidad de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) encontrando un valor de CL_{50-96} de 52.3913 mg/L con unos límites de confianza de (41,4129 -62,2120 mg/L), un valor de de la CL_{50-96} del (CN⁻), el cual oscila entre (0.1733mg/l - 0.2519mg/l) y un promedio de 0,2039mg/L; además de esto se obtuvo la CL_{50-96} y los límites de confianza del vertimiento industrial que contiene trazas de cianuro de sodio, contando con un límite inferior de 4,2239 %V/V y superior de 6,9708%V/V y un valor promedio de CL_{50-96} de 5,6610%(V/V) para el vertimiento en el punto 1 (antes del sistema de tratamiento) y límite inferior de 21,7604 %V/V y superior de 33,2822 %V/V con un valor promedio de CL_{50-96} de 26,8302%(V/V) para el vertimiento en el punto 2 (a la salida del sistema de tratamiento).

Palabras claves: Concentración letal media (CL_{50-96}), cianuro, biomarcador, *Oncorhynchus mykiss*, ensayos de toxicidad, industria aurífera.



ABSTRACT

DETERMINATION OF THE HALF LETHAL CONCENTRATION (LC₅₀₋₉₆) of cyanide by bioassays on fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

The need to detect and assess the impact of human activities on the organisms and their ecosystems, more clearly, leads to the use of biomarkers, which provide the possibility to obtain information on the molecules of pollutants after discharge into the environment by addressing their biological receptors.

One of the methodological tools most developed by his direct approach is represented by acute toxicity tests using biomarkers, which are defined as induced measurable changes of cellular biochemical type, physiological or behavioral correlated with exposure and / or effect of one or more polluting chemicals such as cyanide (CN⁻). In this context the objective of the study is to evaluate the response of a biological receptor as a biomarker, in the determination of lethal concentration (LC₅₀) of cyanide in a time span of 96 hours, using juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

The development of this research was conducted in the bioassays laboratory of La Salle University, where were held various toxicity tests for determining the median lethal concentration (CL 50-96).

The achievement was made possible following four phases. The first step was the purchase of fingerlings of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), with an approximate size of 2.5 to 3.5 cm and 15 days of birth, acclimation of juveniles over a period of 15 days, to fulfill the necessary conditions for its proper functioning and survival.

The second phase was the preparation of test solutions for determining the sensitivity of the living organism, obtaining the sensitivity of the trout, using potassium dichromate (K₂Cr₂O₇) as a toxic standard. In the third phase were carried out preliminary tests for determining the range of concentrations to be used in evidence, for the pure substance and for the dumping.

The fourth phase consisted of the final toxicological testing, making and preserving samples of the gold industry, mounting evidence of toxic dumping, obtain the LC₅₀₋₉₆ of the industrial dumping, acceptability of the results and estimate the lethal median concentration. Statistical methods such as Probit and analysis of variance were used, which are used in toxicity tests for acute static tests.



At the conclusion of the investigation were the values of the sensitivity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) establish, finding a 50-96 CL value of 52.3913 mg / L with limits of confidence (41.4129 -62.2120 mg / L) , a value of the LC50-96 (CN-), which ranges from (0.1733mg / l - 0.2519mg / l) and an average of 0.2039 mg / L, plus this was the LC50-96 and the confidence limits of the industrial discharge which contains traces of sodium cyanide, with a lower limit of 4.2239% V / V and higher 6.9708% V / V and a mean value of LC50-96, 5.6610 % (V / V) for disposal at point 1 (before treatment system) and lower limit of 21.7604% V / V of 33.2822% and higher V / V with an average value of LC50-96 26.8302% (V / V) for disposal at point 2 (at the exit of the treatment system).

Keywords: median lethal concentration (LC50-96), cyanide, biomarker, *Oncorhynchus mykiss*, toxicity testing, gold mining industry



INTRODUCCIÓN

En Colombia el acelerado desarrollo industrial y tecnológico, ha generado en la sociedad moderna una dependencia en el uso de sustancias químicas. Gran parte de las actividades socioeconómicas se concentra en el sector industrial generando riesgos toxicológicos para la salud humana y el medio ambiente. El problema toxicológico de estas actividades radica fundamentalmente en el modo inadecuado como se producen y se usan las sustancias químicas y en la forma como se disponen sus residuos.

En la actualidad industrias tales como: la galvanoplastia, la extracción del oro, el endurecimiento del acero, las aplicaciones fotográficas y la producción de goma sintética utilizan cianuro de sodio ($NaCN$) en sus procesos. El cianuro de sodio ($NaCN$) es el compuesto lixivante más utilizado en la industria de recuperación del oro. Las arenas provenientes de los procesos se descargan al suelo en zonas urbanas o directamente a las quebradas sin ningún tratamiento previo y con altos contenidos de cianuro (CN) que superan hasta en 1.000 veces la cantidad establecida por ley, de una parte por millón (ppm); ello genera un problema de contaminación del suelo y de las quebradas.

El cianuro presenta efectos nocivos, entre los que se destacan su alta toxicidad y su efecto inhibitorio en la respiración celular. El componente más vulnerable del ecosistema a los impactos adversos de una exposición al cianuro lo constituye la vida acuática. Los organismos acuáticos son más sensibles a los efectos tóxicos de este reactivo, y físicamente no es posible evitar su ingreso a los cuerpos de agua.

La protección del medio ambiente es una tarea que requiere conocer cuál es el estado en el que se encuentran los diferentes ecosistemas, así como las medidas pertinentes para evitar su contaminación o degradación y para promover su remediación y conservación. Para ello es necesario contar con instrumentos que permitan medir los efectos de las diferentes actividades humanas sobre los elementos bióticos y abióticos de los ecosistemas. Una alternativa viable para determinar los efectos biológicos son los bioensayos de toxicidad.

Los ensayos de toxicidad permiten medir las respuestas de los organismos ante los contaminantes y complementan los análisis fisicoquímicos para tener



una visión integral de los daños que se ocasionan sobre los ecosistemas, adicionalmente se pueden utilizar como instrumentos de control para las descargas de sustancias tóxicas en los cuerpos de agua o en el ambiente en general. En los bioensayos se usa un tejido vivo, organismo, o grupo de organismos, como reactivo para evaluar los efectos de cualquier sustancia contaminante sobre los mismos.

Para este trabajo de investigación, se utilizó la Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) como organismo vivo para exponerlas a determinadas concentraciones y porcentajes de dilución del cianuro (CN^-), por un tiempo de 96 horas. Con dicha exposición, se busca determinar la Concentración Letal (CL_{50}) de Cianuro que produzca la muerte en el 50% de la población expuesta en un lapso de tiempo (96 horas), cabe resaltar que existen otros organismos aptos para la realización de las pruebas de toxicidad, se escogió esta especie ya que permite detectar con facilidad alteraciones causadas por la introducción de sustancias contaminantes al ambiente acuático.



1. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la concentración letal media (CL_{50-96}) del Cianuro en muestras ambientales y puras (Cianuro de Sodio NaCN como reactivo analítico) por medio de bioensayos sobre alevinos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ⊕ Determinar la sensibilidad de los alevinos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$).
- ⊕ Determinar la concentración letal CL_{50-96} de una muestra pura de Cianuro utilizando como reactivo analítico el cianuro de Sodio (NaCN).
- ⊕ Determinar la concentración letal CL_{50-96} del vertimiento de la industria minera de extracción o beneficio del oro en la que se corrobore la presencia de cianuro.
- ⊕ Determinar el efecto tóxico potencial del vertimiento de la industria minera de extracción o beneficio de oro.



2. MARCO TEÓRICO

2.1 ECOSISTEMAS ACUÁTICOS

Están formados por plantas y animales que viven en el agua. Estos ecosistemas, se diferencian en relación a la región geográfica donde existen (antártica, subantártica, tropical y subtropical) y respecto de su cercanía con la tierra (ecosistemas costeros, oceánicos y estuarinos).

Los ecosistemas acuáticos (al igual que los terrestres) pueden variar ampliamente de tamaño desde un océano hasta un charco de agua. Así mismo, existen ecosistemas acuáticos de agua salada y dulce. El agua dulce de los ríos presenta una enorme variedad de composición. Como esta composición química depende, en primer lugar, de lo que el agua pueda disolver del suelo por el que corre, o de los lugares a donde se dirige, es el suelo lo que determina la composición química del agua. Si el suelo es pobre en sales y minerales solubles, también el agua será pobre en sales y minerales. Y, a la inversa, si el suelo es rico en materias químicas solubles, gran parte de su riqueza la cederá al agua, con lo cual ésta contendrá muchas más sales minerales; eso es determinante para los tipos de vida animal y vegetal que allí se pueda desarrollar.

Las aguas dulces constituyen un hábitat donde viven y se desarrollan gran variedad de seres vivos, los cuales dependen del agua para su subsistencia. En cuanto a las masas de aguas continentales podemos distinguir dos tipos dentro de los cuales se encuentran: las aguas lénticas; a este grupo pertenecen los lagos, lagunas, charcas y pantanos. En estos sistemas, según su tamaño, pueden haber movimientos de agua: olas y mareas.

Las aguas lólicas o corrientes, incluyen todas las masas de agua que se mueven continuamente en una misma dirección. Este sistema comprende: los manantiales, barrancos, riachuelos y ríos.

Los organismos pelágicos viven libremente en el agua y se dividen, a su vez, en dos grupos: el plancton y el necton. (Ver Ilustración 1).

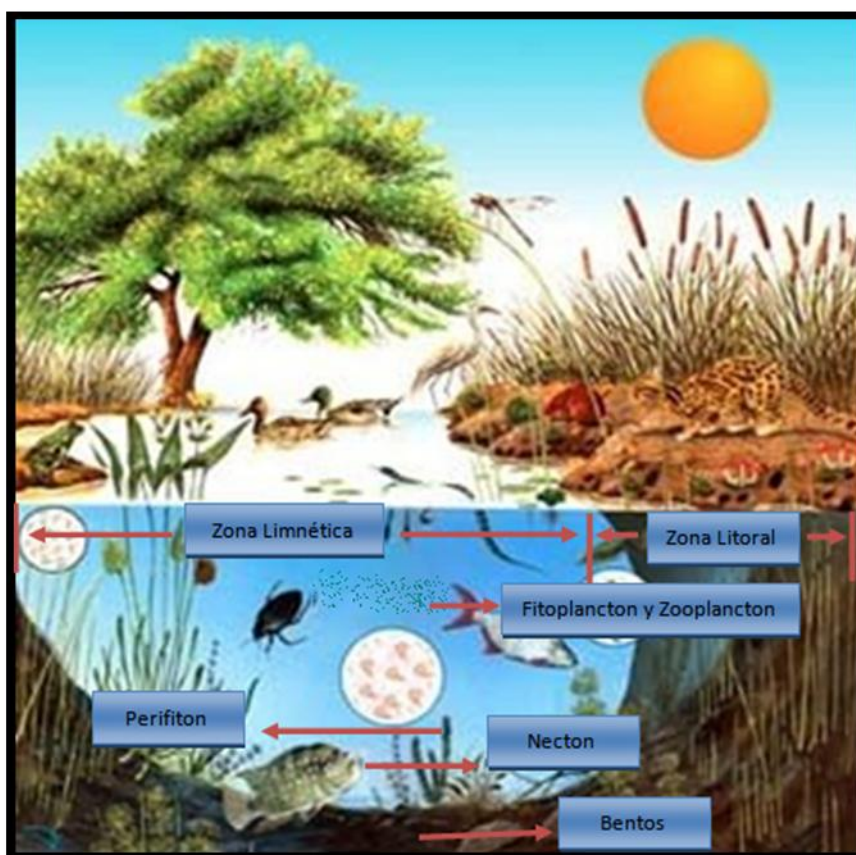
Se llama plancton a los diminutos seres que no tienen órganos natatorios activos y se desplazan a la deriva en las aguas superficiales. Al plancton



vegetal se le conoce como fitoplancton y al animal, como zooplancton. Necton son los organismos capaces de nadar y desplazarse libremente por el agua (peces, mamíferos acuáticos, etc.) y los bentos son los organismos que viven en el fondo o fijos a él, los organismos representativos del bentos son los invertebrados.

En el ecosistema de agua dulce (ríos, lagos, lagunas.) se establecen relaciones similares a las marinas, ya que existe plancton y necton¹.

Ilustración 1. Clasificación ecológica de los organismos acuáticos



Fuente: Ciencias Naturales y educación ambiental. ²

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 mayo de 2008. Disponible en Internet <http://www.jmarcano.com/nociones/fresh2.html>

² Ciencias Naturales y educación ambiental. Los ecosistemas de Colombia. Disponible en internet desde: http://4.bp.blogspot.com/_ZyogGTcmolo/SKRQAEqFj8I/AAAAAAAAAAc/gjuDH91-Uk4/s320/ecosistema+acuatico+2.jpg



2.1.1 Ecosistemas acuáticos en Colombia

El trópico colombiano denota exuberancia, variedad y complejidad, que se traducen en una gama de entornos y de organismos vivos influenciados en mayor o menor grado por el hombre. Los ecosistemas acuáticos figuran entre los más productivos de la Tierra, son fuente de biodiversidad y aportan el agua y la productividad primaria a las innumerables especies animales que de ellos dependen para su supervivencia. De unas 20.000 especies conocidas de peces, más del 40% vive en aguas dulces.

Entre las funciones de los ecosistemas acuáticos se pueden citar el abastecimiento y almacenamiento de agua, la mitigación de inundaciones, la recarga y descarga de acuíferos, la retención de nutrientes y sedimentos, la oferta de recursos hidrobiológicos y el refugio de especies. Por otro lado los ecosistemas acuáticos son receptores de los procesos de contaminación de las diferentes actividades de los sectores productivos, por lo que además se constituyen en un medio para la transmisión de enfermedades y de contenidos tóxicos. Los cuerpos de agua lénticos se pueden clasificar o zonificar de muchas formas, según el propósito que se busque y el número de variables que se seleccione. Los ecosistemas acuáticos en Colombia se clasifican de la siguiente manera:

2.1.1.1 Clasificación por pisos altitudinales: se pueden dividir en ecosistemas acuáticos de montaña o andinos y los basales. Los ecosistemas acuáticos andinos o de montaña son los pantanos, lagos y lagunas ubicadas desde 1000 msnm hasta donde aparecen las nieves perpetuas. Los pantanos de páramo situados en elevaciones considerables son grandes almacenadores de agua, poseen fondos lodosos y turbosos compuestos por grandes acumulaciones de restos vegetales y animales, los cuales se descomponen lentamente debido a las bajas temperaturas y a la acidez del suelo.

En muchas lagunas de páramo nacen importantes ríos dentro de los cuales se encuentran: La laguna de Siscunsi, donde nace el río Cusiana; la laguna de la Magdalena, donde nace el río Magdalena. Los lagos de Tota (Boyacá) con 67m de profundidad y la Cocha (Nariño) con 70 m, son lagos de tierra fría situados sobre cuencas tectónicas profundas. Los de tipo basal son cuerpos lénticos que se encuentran localizados entre 1000 msnm y el nivel del mar. La mayoría están ubicados en planos de inundación de los ríos, por lo que la superficie del espejo de agua puede cambiar hasta en un 100%



entre el periodo de aguas bajas y el de aguas altas. Por esta misma razón las condiciones limnológicas varían entre extremos.³

2.1.1.2 Clasificación por su origen geológico: dentro de esta clasificación se encuentran:

- **Los tectónicos** los cuales están formados por fallas, depresiones, hundimientos, doblamientos, fracturas y movimientos de la corteza.
- **Los glaciares** formados cuando las capas de hielo comenzaron a derretirse lentamente, arrastrando consigo rocas o residuos vegetales y generando depresiones que luego se llenaron de agua.
- **Por disolución del substrato** cuando el terreno tiene una composición calcárea, principalmente de carbonatos de calcio, la laguna de Guatavita tiene este origen.
- **Por la acción de los ríos** la acción de las corrientes de los ríos puede formar cuencas o depresiones por el depósito de sedimentos y la continua acción erosiva; se forman entonces cuerpos de agua conectados mediante canales y suelen tener formas muy ramificadas.
- **Eólicos** son aquellas zonas en donde los fuertes vientos azotan la costa nordeste de Colombia y han formado una serie de dunas longitudinales cuyos ejes son paralelos a la dirección de los vientos, causando depresiones las cuales se llenan durante el periodo de lluvias, son llamadas lagunas y reciben aportes del mar y de afluentes de agua dulce, formándose un ecosistema salobre o un estuario.⁴

2.1.1.3 Clasificación por su tipo de cobertura: dentro de esta clasificación se encuentran los pantanos y los humedales. Los humedales tienen la función ecológica de amortiguamiento en épocas de lluvias, además de servir de sitios de nidificación, dormitorios y fuente de alimento para aves migratorias, así como para algunos mamíferos, anfibios, reptiles e insectos. Actúan como esponjas que regulan los caudales de los ríos. Son depósitos y reservorios naturales para la recolección de aguas lluvias durante el invierno, regulan el nivel freático de los suelos y adicionalmente mejoran la calidad del agua porque funcionan como sistemas naturales de filtración y depuración.

³ LEYVA, Pablo. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, IDEAM. EL MEDIO AMBIENTE EN COLOMBIA. CAP. 7 Los Ecosistemas. pág. 278. 2a edición, Bogotá, agosto de 2001. (Libro en línea). Consultado mayo de 2008. Disponible en internet desde: <http://www.ideam.gov.co/publica/medioamb/cap7.pdf>

⁴ ROLDÁN, G. 1992. Fundamentos de limnología tropical. 1.ª ed. Edit. Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia, 529 pp.



2.2 BIOENSAYOS

Los bioensayos de toxicidad permiten medir las respuestas de los organismos ante los contaminantes y complementan los análisis fisicoquímicos para tener una visión integral de los daños que se ocasionan sobre los ecosistemas, adicionalmente se pueden utilizar como instrumentos de control para la descargas de sustancias tóxicas en los cuerpos de agua o en el ambiente en general.

Los bioensayos son experimentos donde tejidos y organismos vivos son empleados para determinar el potencial tóxico de una sustancia fisiológicamente activa. Estos ensayos consisten específicamente en la exposición de grupos de organismos a determinadas concentraciones de tóxico en un tiempo determinado. Los organismos empleados deben encontrasen en buenas condiciones de salud y ser aclimatados previamente; Además se dispone de grupos de control (que no se exponen al tóxico). Luego se miden y registran los efectos biológicos observados en cada uno de los grupos de control y tratados y, posteriormente, se efectúa un análisis estadístico de los datos obtenidos.

Los bioensayos son herramientas que se utilizan en la ecotoxicología, con la que se estudia el efecto y destino de los contaminantes antropogénicos, los tóxicos en ecosistemas acuáticos y terrestres, mediante mediciones experimentales bajo condiciones controladas en laboratorio, descubriendo en ciertos casos concentraciones muy bajas de contaminantes.⁵

Los ensayos de toxicidad con organismos vivos son métodos reconocidos por la comunidad científica internacional y empleados en muchos países, para el monitoreo y control de la contaminación hídrica, ya que frecuentemente el medio acuático es quien recibe las consecuencias de las actividades humanas, incluyendo las actividades industriales en donde se encuentran grandes cantidades de sustancias químicas contaminantes que ponen en riesgo la salud del ecosistema.

Los bioensayos de laboratorio posibilitan tener un primer acercamiento al posible impacto que producen estos efluentes. Los bioensayos toxicológicos tienen por finalidad determinar las concentraciones de un tóxico dado que

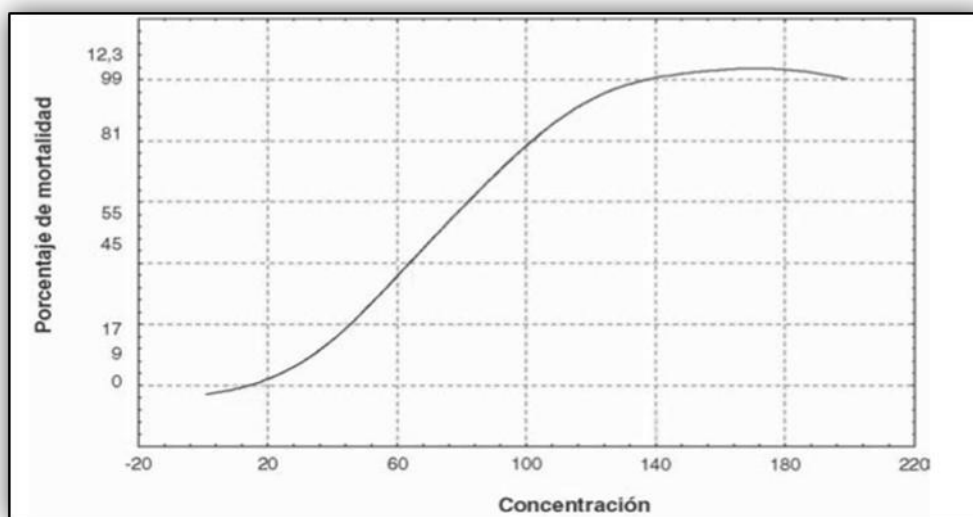
⁵ FAO. 1981. Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 4ª. Bases para la elección de ensayos biológicos para evaluar la contaminación marina. FAO, Doc. Tec. Pesca. (164): 34pp. Esclapés, M. 1999. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas y terrestres. Versión 2.0. PDVSA. INTEVEP. 213pp



ocasionen efectos dañinos o nocivos en un organismo modelo. Estos efectos se dan con afectación del término de vida, alteración de la tasa de crecimiento, cambios de los parámetros reproductivos.⁶

Los ensayos de toxicidad permiten establecer los límites permitidos para los distintos contaminantes, evaluar el impacto de mezclas sobre las comunidades de los ambientes que las reciben y comparar la sensibilidad de una o más especies a distintos tóxicos o a diferentes condiciones para el mismo tóxico. Mediante los ensayos de toxicidad se estudian las relaciones dosis o concentración, efecto y dosis o concentración - respuesta (efecto: cambio biológico evaluable por una escala de intensidad o severidad; respuesta: proporción de la población expuesta que manifiesta un efecto definido).⁷ Ver ilustración 2.

Ilustración 2. Curva de dosis respuesta de organismos expuesto a bioensayos



Fuente: Ensayos Toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas⁸

Los organismos empleados para los ensayos deben tener alta sensibilidad a los tóxicos, ya que al establecer las concentraciones seguras para ellos se espera proteger a todo el ecosistema, pero hay que tener en cuenta que

⁶ ALCÁZAR, F. Documento guía del curso Regional CPPS/PNUMA/COI, Sobre Bioensayos y pruebas de toxicidad en organismos marinos del pacífico Sudeste.

⁷ BULUS ROSSINI, Gustavo Daniel; DÍAZ BAEZ, María Consuelo; PICA GRANADOS, Yolanda, Ensayos Toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas, intercalibración, resultados y aplicaciones. Capítulo 5. Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad. En línea. Diciembre de 2006 < http://www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html. 2004>

⁸ *Ibíd*, Figura 4.



distintas especies tienen diferente sensibilidad a distintas sustancias químicas.

Los organismos de prueba deben cumplir con los siguientes requisitos:

- Las funciones biológicas por estudiar deben ser susceptibles y de fácil definición y observación.
- Abundantes y disponibles todo el año
- De fácil mantenimiento en el laboratorio
- De tamaño adecuado a las facilidades de instalación y manejo
- De biología y comportamiento conocido
- De importancia recreacional, económica y ecológica, local y nacional
- De amplia distribución geográfica
- Incluir especies que representen diferentes niveles de la cadena alimentaria
- que sean uniformes en las características morfológicas⁹

Al obtener la relación dosis respuesta se puede obtener la concentración letal media (CL_{50-96}) mediante el uso de métodos estadísticos. La concentración letal es la concentración que, administrada en el medio ambiente de la población de animales en estudio, causa la muerte al 50 por ciento de los individuos, se expresa en mg de sustancia por litro de aire y un tiempo determinado de exposición (en horas).

Al realizar la implementación de pruebas de toxicidad, es importante realizar la estandarización de las mismas, con el fin de establecer la sensibilidad de las especies y su secuencia de efecto mediante un tóxico de referencia. Esto con el fin de certificar que la respuesta de la población se debe al efecto del tóxico de referencia y no a variaciones de sensibilidad en el organismo o a fallas en la ejecución 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. Los ensayos de toxicidad se pueden clasificar de dos formas según su respuesta y según se técnica. A continuación se describe cada una de ellas según la FAO (1981).

2.2.1 Bioensayos de respuesta directa

2.2.1.1 Bioensayos Agudos: Cuantifican las concentraciones letales de un xenobiótico a una especie en particular. El valor calculado se denomina

⁹ Ibid., pág. 2,3.



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).

2.2.1.2 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 organismos 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.

2.2.1.3 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.

2.2.1.4 Bioensayos Crónicos: Estiman la concentración efecto media (CE_{50}), 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 estado de vida considerado o del ciclo de vida del organismo empleado.

2.2.1.5 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.

2.2.1.6 Bioensayos de repelencia: Trata de medir en el laboratorio las reacciones de escape 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.

2.2.1.7 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.

2.2.2 Ensayos de respuesta indirecta

2.2.2.1 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.

2.2.2.2 Ensayo 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.

2.2.3 Índices de toxicidad¹⁰

Los índices de toxicidad expresan los resultados de varios ensayos de toxicidad como un valor único, que indica el nivel de toxicidad de la muestra. La elaboración de índices de toxicidad debe tener en cuenta cuidadosos criterios para dar peso a los componentes. Entre ellos se debe considerar: a)

¹⁰ BUSTOS LOPEZ, Martha Cristina; DIAZ BAEZ, María Consuelo; ESPINOZA RAMIREZ, Adriana Janneth. Pruebas de toxicidad acuática. Fundamentos y métodos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería, sección de Ingeniería Ambiental. Bogotá D.C.; 2004 P 36.



el interés de ponderar con mayor o menor peso a determinado punto final o especie, b) el número de especies que indican respuesta y c) la intensidad de la respuesta. Los índices de toxicidad son los parámetros toxicológicos que se utilizan en la evaluación de riesgos y se obtienen de los estudios de dosis-respuesta.

Los parámetros empleados para determinar la toxicidad son los siguientes:

2.2.3.1 Concentración letal media (CL_{50-96}): es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado. El valor de la CL_{50} se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen de aire normal (miligramos por litro, mg/L).

2.2.3.2 Dosis letal media (DL_{50}): es la dosis única que, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte del 50% de los animales a los que se haya administrado. El valor de la DL_{50} se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal (miligramos por kilo, mg/kg).

2.2.3.3 Concentración Efectiva Media (CE_{50}): es la concentración, calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, que se espera que produzca un determinado efecto en el 50% de los organismos de experimentación de una población dada, bajo un conjunto de condiciones definidas.

2.2.3.4 NEANO (nivel de efectos agudos no observados): es la mayor concentración del efluente para la cual la mortalidad registrada es del 10 % o menor.

2.2.3.5 CENO (concentración de efectos no observables): es la mayor concentración continuada medida de un efluente para la cual no se observa reacción crónica alguna en las especies ensayadas.

2.2.3.6 MCEO (menor concentración que produce efectos observables): es la menor concentración del efluente para la que puede observarse algún efecto sobre la especie ensayada. Se determina con técnicas de análisis de varianzas.



2.2.4 Métodos estadísticos para el análisis de toxicidad

Uno de los aspectos importantes en toxicología y ecotoxicología es la relación entre la concentración de un compuesto químico a la cual se expone un organismo y el consecuente efecto nocivo que le produce. Esta relación, conocida como la relación dosis-respuesta, constituye la base para la evaluación del peligro y el riesgo generado por las sustancias químicas en el medio ambiente.

Existen muchas formas de determinar la toxicidad, y aunque los efectos bioquímicos, fisiológicos, reproductivos y de comportamiento son de gran utilidad, el indicador comúnmente más utilizado es la muerte del organismo de prueba. La mayoría de las pruebas de toxicidad suministran una estimación de la dosis (o concentración en el alimento, aire o agua) que produce una respuesta tóxica a un nivel del 50%.

Las variables se clasifican en cualitativas y cuantitativas, encontramos las cuantitativas discretas que 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.¹¹

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.

Una prueba de toxicidad típica involucra un agente o estímulo (por ejemplo, un pesticida, un metal pesado o una muestra ambiental con contaminantes

¹¹ ibíd. pág. 243



químicos), el cual se aplica a un organismo o grupo de organismos (por ejemplo, un cultivo bacterial o de un alga, animales, o plantas) al que denominaremos genéricamente sujeto, sobre el que se evalúa una cierta respuesta preseleccionada. La magnitud del estímulo o dosis puede medirse como un peso, un volumen o una concentración.

La respuesta del sujeto se valora mediante la cuantificación final de alguna características (peso del cuerpo, peso del hígado, ritmo cardiaco, etcétera), el cambio de ella (aumento en el peso corporal, disminución en la presión sanguínea) o por la ocurrencia o no de un determinado fenómeno (muerte, inhibición del crecimiento, una contracción muscular, etcétera). Es importante destacar que la respuesta a una dosis en particular se verá afectada en mayor o menor medida por factores no controlados durante el experimento.

Para el análisis de las relaciones cuantitativas entre la dosis y la respuesta, es necesario recurrir a modelos matemáticos que describan dicha relación.¹²

Éstos se clasifican en:

- 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 las pruebas de toxicidad los modelos matemáticos mas empleados 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. Para poder dar cumplimiento a los requerimientos de validez y precisión de las pruebas es necesario utilizar una metodología estadística desde la planificación hasta la ejecución y, luego, el posterior análisis de los resultados. El criterio básico recomendado es seleccionar un método estadístico sencillo, que se ajuste a las condiciones experimentales y que permita obtener resultados válidos.¹³

¹² BULUS ROSSINI, Gustavo Daniel; DIAZ BAEZ, María Consuelo; PICA GRANADOS, Yolanda, Capítulo 5. Métodos Estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. En línea. mayo de 2009< http://www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html.2004>

¹³ CETESB, 1992, L50.17, *Análise estatística de resultados de testes de Toxicidade Aguda*, Sao Paulo, Brasil.



2.2.5 Diseños de experimentos

En la mayoría de las pruebas se trabaja con un diseño completamente aleatorio, del tipo clásico, para ser analizado a través del análisis de la varianza o del análisis de regresión, con unidades experimentales homogéneas y condiciones ambientales controladas. Sin embargo, en algunos casos es necesario recurrir a análisis de covarianza o ANOVA en bloques para controlar la heterogeneidad de las unidades experimentales.

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 células al momento de la inoculación o tamaño inicial de los organismos en pruebas de crecimiento, número de repeticiones, número de tratamientos/grupos de dosis o concentraciones, intervalo de las dosis y la selección de controles.

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

1. Establecimiento de una relación dosis-respuesta.
2. Pruebas para evaluar la diferencia entre organismos tratados o expuestos a distintas dosis contra un control negativo (dosis 0).

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, efectiva o inhibitoria 50 ($CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$), que es la concentración que produce la respuesta esperada sobre el 50% de los organismos expuestos.

2.2.6 Establecimiento de una relación dosis respuesta

La selección del método a utilizar para estimar los valores de $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ de este tipo de pruebas de toxicidad aguda con múltiples concentraciones dependerá de la forma de la distribución de tolerancias, y que tan bien las concentraciones o dosis seleccionadas la caracterizan (por ejemplo, el



número de mortalidades parciales). Se recomiendan los siguientes cuatro métodos para la estimación de CL₅₀/CE₅₀/CI₅₀:

2.2.6.1 Principio del modelo matemático¹⁴: En un experimento típico de pruebas de toxicidad se tiene la siguiente ecuación:

- Concentración de la sustancia o dosis (d).
- Número de individuos (n).
- Número de organismos muertos o afectados (r).
- Porcentaje de efecto (p).

$$p = \left(\frac{r}{n} \right) \times 100$$

La representación gráfica de p vs. d , o relación dosis-respuesta, genera una curva parabólica que muchas veces presenta dificultades en la construcción de un modelo lineal. Una forma de abordar este problema es transformando d a una escala logarítmica ($X = \log_{10}(d)$), lo cual mostrará una relación dosis-respuesta de forma S o sigmoidea normal, como se muestra en la grafica 1; de esta manera la distribución de p vs. X será de tipo normal

Posteriormente, mediante las tablas de Probit se transforma p (porcentaje de efecto) a unidades Probit (buscando en una tabla de distribución normal el valor de z correspondiente a una probabilidad acumulada igual a p y sumándole a continuación cinco unidades), se obtiene una distribución de puntos en un sistema bivariado de tipo lineal, los cuales se procesan según un análisis de regresión típico. Vale la pena enfatizar que el Probit es una transformación sobre la tasa de efecto (p), y la ecuación generada es de la forma:

$$y = a + bx$$

Donde:

y (expresado en unidades Probit) = $z + 5$

z = Variable normal estándar = z_0 tal que la Prob ($z \leq z_0$) = p

a y b son los estimadores de los parámetros de la recta de regresión

Así, cuando $p = 50\%$ entonces $y = 5$, por lo tanto:

$X_5 = \log_{10} CL_{50}$, entonces $CL_{50} = 10^5$

¹⁴ Philip Gill, Walter Murray, Michael Saunders and Margaret Wright. Análisis Probit



Para facilitar los cálculos, simplemente se puede usar un *software* como el suministrado por la *US Environmental Protection Agency* (US EPA): *Probit Analysis Program*. El procedimiento Probit permite encontrar estimadores *m*-verosímiles de parámetros de regresión y de tasas naturales (por ejemplo, tasas de mortalidad) de respuesta para ensayos biológicos, analizando porcentajes de efecto vs dosis dentro del marco de la regresión.

2.2.6.2 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.

2.2.6.3 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).

2.2.6.4 Método de Sperman-Karber (no paramétrico): El método de Spearman-Kärber 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 ($CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$).

2.2.6.5 Método gráfico: 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 $CL_{50}/CE_{50}/CI_{50}$ del estímulo o agente estudiado.



2.2.6.6 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. Como resultado del análisis de los datos de un diseño para estimar una relación dosis-respuesta, lo que se pretende obtener son las estimaciones de los parámetros del modelo seleccionado para relacionar las variables y, a continuación, utilizar el modelo con las estimaciones de los parámetros encontrados para determinar los valores de la variable *concentración de tóxico* que causan un grado de efecto, en particular sobre los organismos expuestos.

Entre estas concentraciones, la más utilizada es la que se conoce como concentración letal 50 (CL₅₀), que es la concentración que produce la respuesta esperada sobre el 50% de los organismos expuestos.¹⁵

2.3 ESPECIE UTILIZADA EN LOS BIOENSAYOS, TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

2.3.1 Reseña Histórica

La Trucha arco iris, (*Oncorhynchus mykiss*), es un salmónido propio de los ríos de la cuenca del Pacífico de América del Norte que habita desde Alaska hasta el sur de Oregon y California. En Colombia esta especie fue introducida en 1939 con ejemplares provenientes del río Sacramento. Se cultivó por primera vez en la Estación de las Cintas en el lago de Tota (Boyacá). Esta estación al igual que la de los pozos fue construida por el Ministerio de Economía.¹⁶

¹⁵ BULUS ROSSINI, Gustavo Daniel; DIAZ BAEZ, María Consuelo; PICA GRANADOS, Yolanda, Capítulo 5. Métodos Estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. En línea. Diciembre de 2006<http://www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html.2004>

¹⁶ PIÑEROS, Renán y CALA, Plutarco. Motilidad, Morfología, concentración y número de espermatozoides en reproductores de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*. En: Revista de la Academia Colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales. Vol. 18, N68 (mayo, 1991); p. 1.



2.3.2 Descripción de la especie

La trucha arco iris es un salmónido, que se caracteriza por presentar cuerpo alargado, fusiforme y cabeza relativamente pequeña que termina en una boca grande puntiaguda, hendida hacia el nivel de los ojos y con una fila de dientes fuertes en cada una de las mandíbulas que le permiten aprisionar las presas capturadas. (Ver ilustración 3).

Ilustración 3. Trucha Arco Iris



Fuente: Las autoras, 2009

Hacia la mitad del cuerpo se encuentra una primera aleta dorsal formada únicamente por radios blandos, posteriormente a esta aparece una pequeña aleta de carácter adiposo. Opuesta a esta y ventralmente se halla la aleta anal; estas aletas tienen función de dirección actuando como timón en el desplazamiento. Las aletas pares son las pectorales, ubicadas en la parte más anterior como una función estabilizadora y las pélvicas o ventrales, que actúan como remos y están ubicadas en la sección media posterior del pez.

El cuerpo remata posteriormente en una aleta caudal de función propulsora. El nombre genérico *oncorhynchus* significa “nariz ganchuda”, característica que se acentúa mas en los machos en la época de reproducción, cuando se desarrolla en la mandíbula inferior un abultamiento o gancho (prognatismo).




El nombre común de arco iris esta dado por la presencia de numerosos puntos negros y una banda iridiscente en los flancos del pez. Esta coloración cambia ligeramente en las épocas de madurez siendo notorio el oscurecimiento que se presenta en los machos. El color de la musculatura es variable encontrándose desde casi blanco hasta el salmonado intenso, aunque en estas diferencias intervienen factores genéticos; la coloración final de la carne está íntimamente ligada al tipo de alimentación a la que haya tenido acceso el pez.¹⁷

2.3.3 Clasificación Taxonómica

La trucha arco iris presenta la siguiente clasificación taxonómica. Ver Ilustración 4.

Ilustración 4. Clasificación taxonómica de la trucha arco iris

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	NOMBRE BINOMIAL
Phylum: <i>cordata</i> Subphylum: <i>vertebrata</i> Clase: <i>osteichthyes</i> Subclase: <i>actinopterygii</i> Superorden: <i>teleostei</i> Orden: <i>clupeiformes</i> Familia: <i>salmonidae</i> Subfamilia: <i>salmoninae</i> Género: <i>oncorhynchus</i> Especie: <i>Oncorhynchus mykiss</i> Nombre común: trucha arco iris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>, <i>Salmo gairdneri</i> (Teleostei, Salmonidae) (Richardson 1836)  fuente: Las autoras, 2009

Fuente: AMAYA, Rafael. ANZOLA, E. 1988.¹⁸

2.3.4 Anatomía de la trucha

El cuerpo de la trucha tiene una forma aerodinámica fusiforme. Por lo general posee de 28 a 29 vértebras unidas por tejido conjuntivo. Las primeras vértebras están unidas con la parte posterior del cráneo lo mismo que las aletas pectorales. (Ver ilustración 5).

¹⁷ ERASO K, Andrés. Et al. Fundamentos de agricultura continental. Bogotá: Horacio Rodríguez Gómez, 1993. P. 223.

¹⁸ AMAYA, Rafael. ANZOLA, E. Generalidades sobre el cultivo de la trucha. INDERENA. Bucaramanga: 1988. P. 7-10.



La piel está constituida por la dermis y la epidermis, esta última segrega el mucus, sustancia que hace que la superficie sea lisa y escurridiza, la piel está cubierta por escamas. Los músculos están representados por las 3/5 partes del volumen de la trucha que constituyen la parte comestible. La trucha como todos los peces es poiquiloterma, es decir, que su cuerpo no tiene una temperatura propia sino que toma la del ambiente.

El sistema digestivo está formado por la boca que posee dientes; esófago, estómago en forma de U dilatado; el intestino delgado con los ciegos pilóricos, el intestino grueso y el ano. Su intestino en general es corto propio de los animales carnívoros.

El sistema reproductor está compuesto por los ovarios en las hembras y testículos en los machos, localizados en la parte superior de la cavidad abdominal.

El sistema nervioso de las truchas está constituido por el encéfalo, la médula espinal y los nervios los cuales regulan su conducta. El órgano de los sentidos mas importante es la vista, posee ojos poco móviles, no presenta párpados, el cristalino sólo realiza pequeños movimientos, utiliza los ojos para buscar el alimento, sus hábitos son diurnos, tienen poca actividad en la oscuridad.

El órgano principal de la trucha arco iris son las branquias. Están formadas por unas laminillas cubiertas por un fino epitelio por el cual se produce el intercambio gaseoso; la toma de oxígeno y la eliminación de dióxido de carbono. Este epitelio si fuese extendido tendría una superficie 10 veces mayor que la del cuerpo del pez.

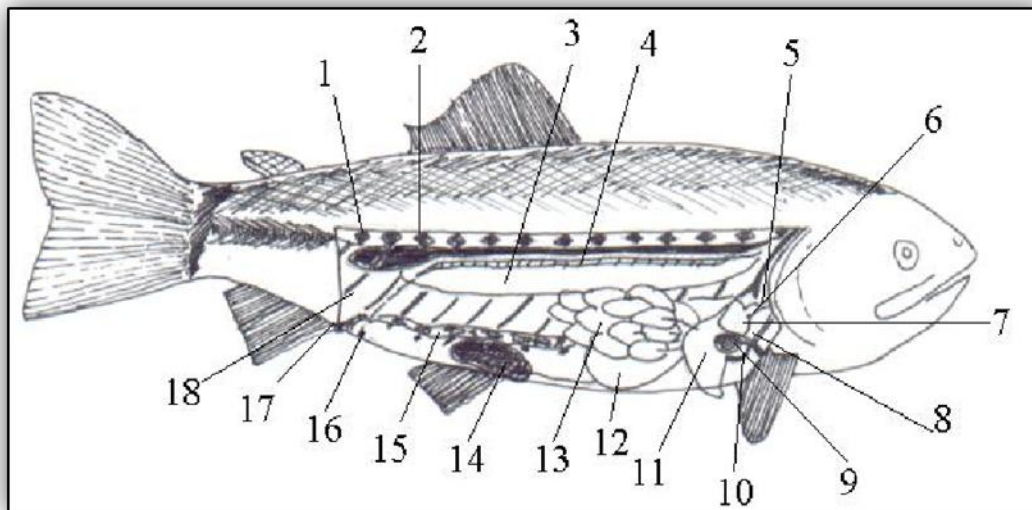
Las branquias de la trucha consisten en dos conjuntos de cuatro arcos branquiales. Debido a la gran fragilidad de las branquias están protegidas por el opérculo.

El flujo de agua a las branquias es continuo, establecido por un sistema de bombeo. El resultado es que agua entra por la boca y sale por el opérculo pasando a través de las branquias, donde se produce el intercambio gaseoso.¹⁹

¹⁹ AMAYA, Rafael. y ANZOLA, E. Generalidades sobre el cultivo de la trucha. INDERENA. Bucaramanga: 1988. P. 7-10.



Ilustración 5. Morfología interna de la trucha con una división abdominal – dorsal



Fuente: PIÑEROS, P & P. Cala. 1991 ²⁰

1, riñón; 2, vértebras; 3, vejiga natatoria; 4, ovarios; 5, bulbo; 6, ventrículo; 7, aurícula; 8, cavidad pericárdica; 9, vesícula; 10, esófago; 11, hígado; 12, estómago; 13, ciegos pilóricos; 14, vaso; 15, intestino; 16, gonoporo; 17, ano; 18, costillas.

2.3.5 Desarrollo de la trucha

La temperatura ideal es de 16°C, normalmente se encuentra a altitudes de 2.000 y 2.500 m. La temperatura es determinante ya que los requerimientos de oxígeno de las truchas es muy alta y de la temperatura presente en el medio va a depender la cantidad de oxígeno disuelto en el agua. El desarrollo de la trucha se realiza siguiendo los siguientes pasos: (ver ilustración 6).

²⁰ PIÑEROS, P & P. Cala. Motilidad, morfología, concentración y número de espermatozoides en reproductores de trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces: Salmonidae). Revista Acad. Colomb. Cienc. 17 (68): 75-81. 1991



Ilustración 6. Desarrollo de la trucha arco iris



Fuente: Imágenes tomadas del video Piscicultura de la Trucha arco iris.²¹

2.3.5.1 Fecundación: se realiza en forma artificial, mediante método húmedo y seco. El primero consiste en la recolección de los huevos en una vasija con agua a la cual posteriormente se le añade el semen. Este proceso debe realizarse rápidamente para obtener altos porcentajes de fecundación ya que la motilidad del espermatozoide en medio acuoso es de 30 a 90 segundos; por otro lado el huevo absorbe agua hidratándose y el micrópilo se cierra impidiendo la entrada del esperma.

²¹ Imágenes tomadas del video Piscicultura de la Trucha arco iris. (video en línea). Disponible en internet desde: http://video.google.com/videosearch?hl=es&q=trucha+arco+iris&um=1&ie=UTF-8&ei=KalpSuHzJcGktgex3pHECA&sa=X&oi=video_result_group&resnum=9&ct=title#. Derechos Reservados. Discovery Chanel. Consultado en junio 2009.



2.3.5.2 Fertilización: ocurre cuando el espermatozoide penetra en el óvulo por el micrópilo. Una vez extraídos los productos sexuales tanto de la hembra como del macho, se mezclan homogéneamente con una pluma durante un minuto, luego se adiciona agua de tal manera que la totalidad de los huevos queden cubiertos y se continúa con la mezcla.

2.3.5.3 Incubación: es el periodo durante el cual el pez se desarrolla dentro del huevo y desde este momento hasta el nacimiento del alevín, se distinguen dos fases; la primera consiste desde la fecundación hasta la aparición de los ojos donde el huevo se denomina ova verde. La segunda desde la aparición de los ojos hasta la eclosión, llamándose ova embrionada. La duración de este periodo se expresa en grados día, lo que indica el número de días que tarda el proceso de incubación de los huevos a la temperatura de un grado centígrado. Para la trucha arco iris esta definido en un rango de 290 a 330 grados/día.

2.3.5.4 Eclosión: cuando el nacimiento está próximo se vuelve ligeramente ovalado, su membrana exterior pierde consistencia y luego por una acción de una enzima proteolítica (diastasa), se disuelve ayudando al nacimiento de la larva. La eclosión dura alrededor de 50 grados/día, esto quiere decir que las primeras larvas nacen a los 290 grados/día y las últimas a los 330 aproximadamente. Para óptimos resultados del proceso de incubación se debe mantener una temperatura del agua entre los 9 y 12 °C, el pH entre 7.0 – 8.5 y el oxígeno disuelto en 7 ppm.

2.3.5.5 Larvas: este periodo comprende desde la eclosión hasta la reabsorción del saco vitelino. Los peces recién eclosionados presentan una gran bolsa de forma ovalada en su región ventral. La cual contiene un material de reserva que es utilizado en la finalización de su desarrollo.

Su talla inicial es de 15 mm aproximadamente y cuando termine esta fase será de 20 mm. Cuando el 10% de los alevinos empieza a nadar, se inicia la alimentación aunque el alimento todavía no lo necesita pues mantiene unas $\frac{3}{4}$ de reservas en el saco vitelino. El tiempo transcurrido durante esta época es de 180 a 200 grados/día.

2.3.5.6 Alevinaje: una vez las larvas han absorbido su vesícula vitelina, nadan libremente y reciben el alimento sin ninguna dificultad. Se denomina



alevinos hasta que alcanzan una talla aproximada de 8 cm, momento en el cual se llaman dedinos o juveniles y se comienza con la etapa de engorde.

2.3.5.7 Reproducción: la maduración de las hembras, en las condiciones relativamente estables del trópico, se inicia a partir del décimo octavo mes de vida llegando a su madurez total alrededor del segundo año. En las regiones templadas la maduración se da una vez al año. Por las condiciones tropicales del país ocurre cada 6 – 8 meses. La fecundidad de la especie es de 1500 a 2000 huevos por cada kilogramo de peso. La vida útil de una hembra reproductora se estima en unos cuatro años contados a partir desde que alcanza su primera madurez. Los machos son más precoces y logran la madurez alrededor de su primer año de vida y son utilizados como reproductores hasta que alcanzan los 5 años.

2.3.5.8 Engorde: cuando los alevinos adquieren una longitud entre los 7-9cm, se inicia el proceso de engorde o ceba, que finaliza con el sacrificio cuando alcanzan la talla comercial, con un peso entre los 270 – 300 gr, de acuerdo a los requerimientos del mercado. La duración de esta etapa está condicionada a las calidades del agua, en especial a la temperatura y al tipo de manejo que se mantenga durante el proceso.

2.3.4.9 Alimentación: en su estado natural la trucha es un pez carnívoro que consume crustáceos, moluscos, insectos y pequeños peces, es decir que su dieta está compuesta principalmente por proteína, grasas, carbohidratos, sales minerales y vitaminas. El alimento es capturado por medio de la vista ayudado siempre por el olfato. La coloración de su carne está ligada a los carotenos que presentan los organismos que consume²².

2.3.6 Descripción breve de su comportamiento

Por naturaleza, es un animal que se encuentra en constante movimiento dentro del agua. Cuando el agua queda estancada y no corre o llega a estar sucia, se notan intranquilas y saltan constantemente, lo que les puede ocasionar rozaduras en el cuerpo y maltratar su carne. En su medio natural las truchas se desarrollan en pequeños lagos cristalinos, y una vez llegada su edad reproductiva remontan los riachuelos en contracorriente hasta que logran arribar a pequeños remansos de paz propicios para colocar sus

²² ERASO K, Andrés. Et al. Fundamentos de agricultura continental. Bogotá: Horacio Rodríguez Gómez, 1993. P. 229-233,239.



huevos, y después morir, aportando al río los nutrientes de su cuerpo. Viven en estanques o arroyos que se construyen o forman en aguas corredizas que provienen de manantiales y que nacen en regiones de bosque templado. Estos seres tienen una gran capacidad de adaptación, de ahí que puedan soportar temperaturas frías o templadas. Las truchas no pueden pasar mucho tiempo sin estar en agua limpia, oxigenada y corriente, y quizá esa sea una de las causas de su extraordinario poder alimenticio: es imposible encontrar en ellas toxinas o contaminantes, ya que se desarrollan sólo en aguas frescas de manantial; inclusive cuando alguna sustancia extraña se agrega al agua, por ejemplo pesticidas, simplemente la trucha muere.²³

2.3.7 Criterios de selección de la trucha como organismo vivo para las pruebas toxicológicas

Los peces todavía están considerados por muchos toxicólogos acuáticos como los organismos de prueba más apropiados porque tienen la importancia más directa a los seres humanos. Los peces ofrecen la ventaja adicional de permitir análisis biológicos más sofisticados tales como estudios histológicos y patológicos. Además, debido a que los peces son consumidos directamente por los seres humanos, la información acerca de la concentración de las sustancias tóxicas en sus tejidos es un componente importante de un programa toxicológico. Existen muchos protocolos de bioensayos para peces en diferentes etapas de su ciclo de vida, incluyendo pruebas para su primera edad, para huevos y larvas, así como para su crecimiento a largo plazo y su reproducción.²⁴

2.3.7.1 Ventajas y desventajas de peces como organismos de bioensayos²⁵

Ventajas

- ☞ El nivel más alto de la cadena alimenticia y el predictor más directo de la salud de una comunidad acuática. La selección de una especie de peces de importancia económica clave como organismo para bioensayos permite una extrapolación directa de toxicidad al impacto. Mientras que, si el objetivo del bioensayo es proteger los peces, el uso

²³ Colaboradores de Wikipedia. *Oncorhynchus mykiss* [en línea]. Wikipedia, La enciclopedia libre, 2009 [fecha de consulta: 13 de mayo del 2009]. Disponible en <http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Oncorhynchus_mykiss>.

²⁴ CEPIS, Publicaciones. Manual de evaluación y manejo de sustancias tóxicas en aguas superficiales. Anexo 5.A.I. Recomendaciones concernientes a la selección de organismos para bioensayos acuáticos. (Documento en línea). Consultado en junio 2009. Actualizado: 08/09/2001 09:47:00. Disponible en internet desde: <http://www.cepis.ops-oms.org/eswww/fulltext/publica/orimuest/omnanx51.html#organ>.

²⁵ BUIKEMA, A.L.; NEIDERLEHNER, B.B. y CAIRNS, J. Jr. 1982. Biological monitoring. Part IV - Toxicity testing. Water Research, Vol. 16, pp. 239-262.



de algas o invertebrados siempre conllevará un alto grado de incertidumbre.

- ☞ Puede usarse para estudios toxicológicos más sofisticados que los invertebrados o algas. La toxicología de los peces es extensa porque los efectos, tales como la química de la sangre, los tejidos corporales y los órganos, puede fácilmente ser estudiada, mientras que estos tipos de estudios no son posibles en invertebrados.

Desventajas

- ☞ Requieren un laboratorio de temperatura controlada y un abastecimiento inmediato de grandes volúmenes de agua de prueba.
- ☞ Requieren de un conocimiento muy profundo de las técnicas de cultivo y de prueba.
- ☞ Sus características de largo plazo de reproducción e historia de crecimiento de vida reprimen este tipo de pruebas

La trucha arco iris desde el siglo XX ha sido utilizada para la realización de pruebas de toxicidad, para la determinación de la concentración tóxica de sustancias puras, vertimientos industriales, agua potable, entre otros. Existen gran variedad de peces que podrían haber sido utilizados para la determinación de la CL_{50-96} , como es el caso de:

Pez Cebra (*brachydanio rerio*)

Fathead noniw (*pimephales promelas*)

Lebistes (*poecilia reticulata*)

Pero es importante mencionar que la trucha arco iris es la que mejor se presentaba para las condiciones de clima frío, además de esto por que esta especie reúne condiciones de disponibilidad de individuos durante el transcurso de todo el año, es de fácil mantenimiento en el laboratorio, y es sensible ante los contaminantes.

2.3.7 Ficha de La trucha arco iris en Colombia²⁶

2.3.7.1 Distribución geográfica en Colombia: Antioquia, Boyacá, Caldas, Cauca, Cesar, Cundinamarca, Huila, Norte de Santander, Putumayo, Quindío, Risaralda, Santander, Tolima, Valle del Cauca.

²⁶ BAPTISTE M. P., FRANCO A. M. 2007. *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792. Catálogo de la Biodiversidad de Colombia. Actualización: 13 agosto de 2007 Disponible en internet desde:
<http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=582&method=displayAAT>. Consultada en junio 2009.



2.3.7.2 Ecosistema: nativos; aguas dulces corrientes y lagos. En Colombia; se puede encontrar en sistemas montañosos con ríos, quebradas y sistemas lénticos y en áreas naturales como el Parque Nacional Natural los Nevados. Su distribución altitudinal es restringida a alturas superiores a 1200m en zonas tropicales.

2.3.7.4 Hábitat: Principalmente un pez de quebradas de montaña sin embargo puede vivir en lagos y sistemas lénticos. Prefiere aguas oxigenadas con temperaturas de alrededor de 12 C. tiene una dieta generalista basada principalmente en invertebrados como larvas de diferentes organismos y peces de otras especies de menor tamaño. Es una especie invasora con tipo de introducción de voluntaria alimentación y pesca deportiva. Se menciona que los primeros registros de introducción de la especie a Sur América fueron en Chile y Colombia en 1840.

2.3.7.5 Impactos: debido a sus características y dieta sus impactos incluyen desplazamiento de especies de peces nativos, reducción de poblaciones, persistencia a largo plazo y cambios en la estructura de las comunidades de anfibios. Algunas de estas especies incluyen peces nativos de quebradas alto andinas de géneros como *tricomycerus*, *astroblepus*, *eremophilus*, los cuales se han visto afectadas por la introducción de la trucha arcoiris, se cree que esta especie fue incluso la responsable de la extinción del pez graso o runcho *rhizosomichthys totae* endémica de Colombia y que no ha sido reportada desde 1958. Especie nominada como una de las especies invasoras más problemáticas en el mundo, de acuerdo a la base de datos global de especies invasoras. Algunas de las alternativas que se proponen para el control de esta especie incluyen, pesca eléctrica o el uso de trampas o barreras excluyentes.

2.4 MARCADORES BIOLÓGICOS

El término marcador biológico o biomarcador se utiliza en un sentido amplio, incluye casi todas las mediciones que reflejen una interacción entre un sistema biológico y un agente ambiental que puede ser químico, físico biológico. El hombre actúa como un aparato que pone en evidencia la presencia, el efecto o bien características individuales de la exposición a sustancias tóxicas presentes en el ambiente o en el trabajo. La detección biológica del tóxico, es de gran valor y se constituye en una forma de evidenciar el efecto de las sustancias químicas sobre el organismo humano a través del uso de los marcadores biológicos. La utilización de marcadores



biológicos o de fluidos corporales, células o tejidos se da para indicar, en términos moleculares o bioquímicas, la presencia y magnitud de la exposición a los tóxicos a través de la respuesta del organismo receptor.

Los marcadores biológicos se pueden clasificar en tres grupos:

- 1) Marcadores biológicos de exposición.
- 2) Marcadores biológicos de efecto.
- 3) Marcadores biológicos de sensibilidad.

2.4.1 Marcadores biológicos de la exposición de los organismos

Son mediciones dentro de un compartimiento del organismo de una sustancia exógena o de sus productos de biotransformación o el producto de interacción entre el agente y alguna molécula blanco o célula indican si la exposición a un tóxico ha tenido lugar y en qué grado.

La utilización de biomarcadores de exposición se divide en dos categorías:

- ✓ Medición de los niveles del agente y sus metabolitos en células, tejidos, fluidos corporales o excretas.
- ✓ Medición de respuestas biológicas, tal como citogenética y cambios fisiológicos reversibles en los individuos expuestos.

Los biomarcadores de respuesta indican un cambio (bioquímica, genética, fisiología...) de importancia toxicológica real o potencial aparecido como consecuencia de la exposición a un tóxico. Idealmente debería detectar posibles efectos adversos antes de que estos sean irreversibles.

2.4.2 Marcadores biológicos de efecto

Son alteraciones bioquímicas, fisiológicas o de otro tipo que se pueden medir en un organismo y se pueden reconocer como asociadas a una enfermedad o una deficiencia en la salud.

2.4.3 Marcadores biológicos de susceptibilidad

Son las mediciones que reflejan la sensibilidad de un individuo, dentro de una población expuesta a un agente tóxico específico. Además, estos marcadores indican los factores que pueden aumentar o reducir el riesgo de que un individuo desarrolle una respuesta tóxica, después de la exposición



aun agente. Por lo general, esto es resultado de las diferentes tasas de la actividad enzimática que controla la activación o la detoxificación de los agentes tóxicos entre los individuos y en muchos casos esta genéticamente determinada.

La bioacumulación es la absorción y retención de un contaminante por parte de un organismo respecto al medio en el que vive; es decir que es una característica de los organismos vivos que se presenta cuando la tasa de entrada de una sustancia es mayor que la excreción. El resultado es un incremento de la concentración de esta sustancia en los tejidos, que depende de la exposición de esta. Y la bioconcentración es la absorción y retención de un contaminante por parte de un organismo respecto al medio en el que vive, sin que intervengan las rutas dietarias de exposición. Generalmente aplicado a organismos acuáticos. La hidrofobicidad es el principal factor determinado de la bioconcentración. El agua es el mejor disolvente que hay. Existen sustancias poco tóxicas pero que tienen una bioconcentración muy alta. La biomagnificación es el incremento de la concentración de un contaminante en los tejidos de los organismos en sucesivos niveles tróficos superiores.

“Biomarcadores son las mediciones que reflejan una interacción entre un sistema biológico y un agente tóxico que puede ser de naturaleza física, química o biológica.”

Los marcadores biológicos se utilizan para:

- Detectar la presencia de una exposición.
- Determinar las consecuencias biológicas de la exposición (intoxicaciones agudas, crónicas, efectos a largo plazo).
- Detectar los procesos iniciales e intermedios de un proceso patológico.
- Identificar a los individuos sensibles de una población.
- Fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental.

2.5 TOXICOLOGÍA

La toxicología es la ciencia que estudia los agentes tóxicos de cualquier naturaleza, sus propiedades, su cinética y comportamiento, sus mecanismos



de acción, las lesiones que ellos ocasionan y los tratamientos adecuados para proteger los organismos afectados.²⁷

En la toxicología es fundamental conocer el potencial tóxico de la sustancia que esté generando el efecto adverso, para poder evaluar el peligro que representa.

El efecto tóxico es el producido por uno o varios agentes tóxicos sobre un organismo, población o comunidad que se manifiesta por cambios biológicos. Su grado se evalúa por una escala de intensidad o severidad y su magnitud está relacionada con la dosis (cantidad de sustancia administrada, expresada generalmente por unidad de peso corporal) o la concentración (sustancia aplicada en el medio) del agente tóxico.²⁸

Dosis letal (DL) es la cantidad de la sustancia toxica que causa la muerte a la totalidad de la población expuesta. La dosis letal cincuenta (DL) 50 es la cantidad del tóxico que al ser administrada una sola vez, en un determinado tiempo produce una mortalidad del 50% de los organismos que son expuestos, ésta es expresada en miligramo de la sustancia por Kilogramo del animal (ml/Kg).

2.5.1 Toxicología ambiental

Es un campo de acción de la toxicología que estudia el origen, fuentes y propiedades de los contaminantes ambientales, los efectos nocivos que causan en el hombre y los ecosistemas, su interacción con otros componentes presentes en los componentes ambientales, su cinética, la evaluación del daño, y los mecanismos de prevención y control. El objetivo principal de la toxicología ambiental es el conocimiento de los efectos nocivos que sobre la salud humana y el medio ambiente pueden producir los contaminantes ambientales, ya que las enfermedades son la respuesta del individuo a su ambiente y la estructura de estas es un reflejo de las condiciones ambientales de su entorno.²⁹

²⁷ VALLEJO, María. BAENA, Carlos. Toxicología Ambiental. Capítulo 2. Conceptos básicos de toxicología ambiental. Pág. 152.

²⁸ CAMPO MARTI, Miguel. Principios de ecotoxicología. Diagnostico tratamiento y gestión del medio ambiente. McGraw Hill. Interamericana de España. Barcelona; 2002. p 2

²⁹ VALLEJO, María. BAENA, Carlos. Toxicología Ambiental. Capítulo 2. Conceptos básicos de toxicología ambiental. Pág. 154.



2.5.2 Ecotoxicología ambiental

Estudia los efectos tóxicos de los agentes físicos y químicos sobre las poblaciones y comunidades de los ecosistemas; abarca las formas de transferencia de estos agentes y sus interacciones con el ambiente, estudia el origen de la contaminación, su evolución e interacción con las moléculas que integran dinámicamente los ecosistemas, su evaluación y profilaxis biológica y socioeconómica.

Al hablar de los contaminantes ambientales se puede afirmar que todos ellos tienen la capacidad de causar el efecto tóxico cuando la dosis llega a cierto nivel. Esto indica la existencia para cada contaminante de un *nivel sin efecto*, es decir, que no produce efectos adversos, conocido con la sigla de *NOEL* (*no effect level*), y otro nivel que produce efectos adversos, llamado *nivel tóxico*. Así, por ejemplo, el agua si se toma en exceso producirá una intoxicación hídrica mortal. Estos dos niveles de dosis posibilitan conocer los *niveles permisibles*, es decir, aquellas concentraciones que no producen efectos tóxicos por exposición a contaminantes durante toda la vida de un individuo.

Las *concentraciones máximas permisibles o admisibles (MAC)*, son las máximas concentraciones de los contaminantes que no deben ser sobrepasadas en ningún momento.³⁰

2.5.3 Efectos ecotoxicológicos

La ecotoxicología se vale de dos herramientas básicas para realizar sus investigaciones: el monitoreo ambiental y el monitoreo biológico. El monitoreo ambiental permite establecer las formas mediante las cuales se liberan los compuestos y determinar cuál es su destino en ambiente.

Es un procedimiento para detectar la presencia y cuantificar las concentraciones de los contaminantes en los diferentes compartimentos, incluyendo al aire, agua, suelo y sedimentos. Un buen monitoreo ambiental debe considerar un muestreo representativo, técnicas adecuadas para la colecta y preservación de las muestras, así como métodos apropiados de extracción y análisis, siguiendo prácticas estandarizadas en el laboratorio.

³⁰ Ibid., pág., 141.



En este tipo de ensayos la población en estudio es aislada de las interacciones con otros organismos, compuestos y factores ambientales, es decir, se utiliza un sistema simplificado que permite conocer con mayor facilidad los efectos atribuibles a una sustancia. Sin embargo, no es sencillo extrapolar los resultados obtenidos a las condiciones que se presentan en la naturaleza.³¹

2.5.4 Sustancia ecotóxica

Es aquella que al ser liberada en el ambiente produce un impacto ambiental significativo de naturaleza reversible o irreversible, debido a procesos de toxicidad, bioacumulación, persistencia y residualidad.

En el momento se afirma que la salud humana depende del papel que juega la herencia y el medio ambiente, de allí la importancia del estudio e investigación de la contaminación ambiental en los últimos 30 años. Cada día aumentan las evidencias de sus repercusiones tan serias en la salud.

Aunque los fenómenos de contaminación son tan antiguos como el planeta, la industrialización, que en los últimos siglos se ha desarrollado en forma notable, causando el desplazamiento y la concentración de ciertas sustancias naturales y la proliferación de otras nuevas, así la contaminación ambiental en la época contemporánea se caracteriza por el desplazamiento, la concentración, el proceso y la emisión a las diferentes partes del ecosistema, tanto de sustancias naturales como sintéticas.

2.5.5 Vías de ingreso de los tóxicos al organismo

La sustancia tóxica puede ingresar al organismo, siguiendo una vía de exposición. La cantidad de tóxico que ingresa en la sangre en un tiempo dado depende de la vía de ingreso. (Ver ilustración 7)

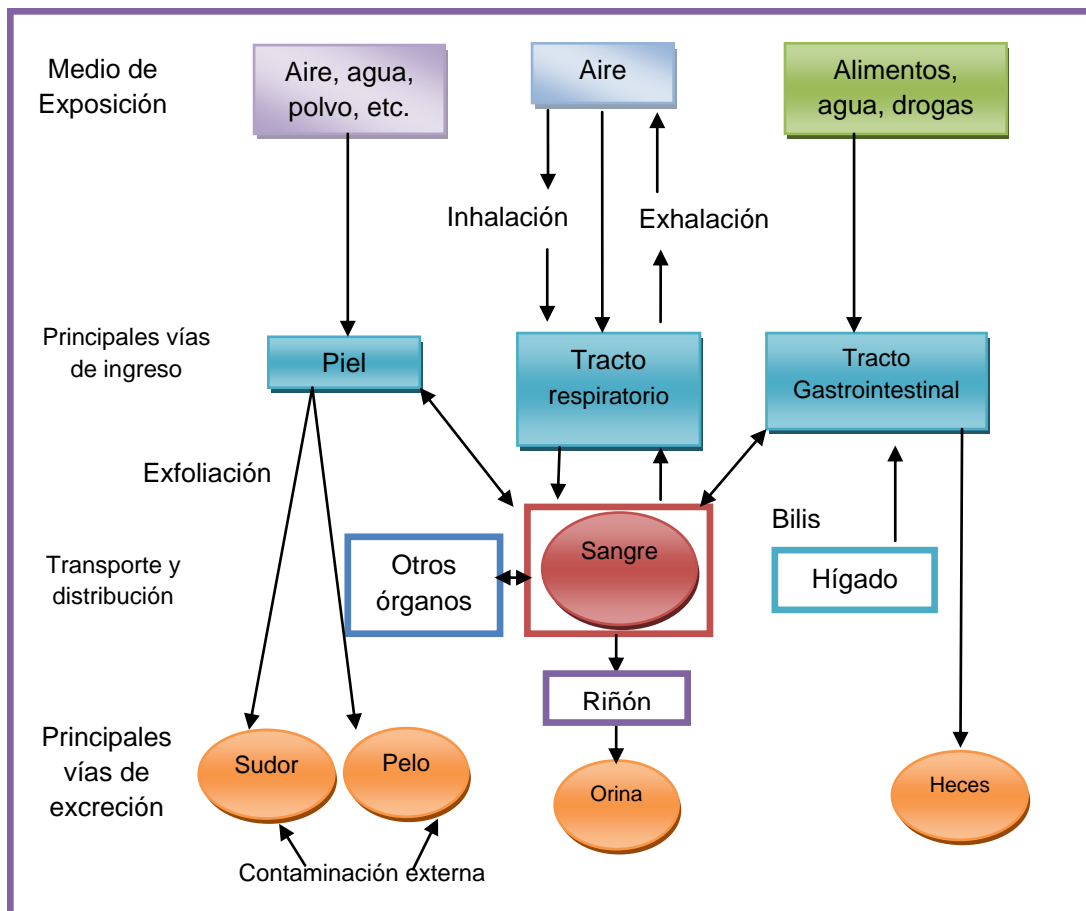
Las principales vías de ingreso de los tóxicos son las siguientes:

- ☞ Vía oral o por ingestión
- ☞ Vía respiratoria o inhalatoria
- ☞ Vía dérmica o por contacto cutáneo
- ☞ Vía parental o por perforación de la piel

³¹ VALLEJO ROSERO, María del Carmen. Toxicología Ambiental. Fondo Nacional Universitario. Santafé de Bogotá. 1997. P15. CAMPO MARTI, Miguel. Principios de ecotoxicología. Diagnostico tratamiento y gestión del medio ambiente. Mcgraw Hill. Interamericana de España. Barcelona; 2002. p 2



Ilustración 7. Vías de ingreso y rutas de distribución de contaminantes en el cuerpo humano.



Fuente: Control de la Contaminación.³²

El comportamiento del tóxico en el organismo está determinado por los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME), es decir, la toxicocinética se ocupa del movimiento de las sustancias desde su ingreso hasta su eliminación en el organismo. La vía respiratoria es la vía de ingreso más rápida que tiene el organismo y por ello los efectos de la sustancias inhalables son inmediatos.

³² Control de la Contaminación. Curso dictado para estudiantes de Ingeniería en Materiales del Instituto Tecnológico de Saltillo, Coahuila, México. Imagen tomada del libro Industrial pollution in Japan (Imagen en línea) disponible en internet desde: <http://www.unu.edu/unupress/unupbooks/uu35ie/uu35ie00.htm#Contents>.



2.5.6 Contaminación

La contaminación se puede definir como la presencia o el exceso en la cantidad de una sustancia dentro de un determinado medio con consecuencias nocivas. Así, en el agua potable se encuentran ciertos compuestos en pequeñas cantidades, sin que por esto se diga que el agua está contaminada; cuando su concentración sobrepasa una cierta medida, con un posible riesgo, se habla de contaminación. Así, la contaminación es un fenómeno relativo, que depende de muchas variables, tales como el grado de nocividad implícita, las cantidades de la instancia contaminante presente en un medio determinado.

Para establecer una tipología de las normas de contaminación, es útil considerar los diversos comportamientos del ecosistema como medios susceptibles de ser afectados, el aire, el agua, el suelo y la biota, incluido el hombre.

El ser humano absorbe los contaminantes macroambientales a través del aire, del agua y le los alimentos. Además, la cultura moderna ha creado otra serie de contaminantes del organismo, denominados microambientales, entre los que se encuentran el humo del tabaco, las drogas, los aditivos alimentarios. Cuando estos compuestos están en el interior del organismo se pueden acumular en algún tejido por largo tiempo o pueden ser metabolizados y eliminados velozmente. Tanto los que se acumulan como los que se eliminan con rapidez pueden producir efectos tóxicos. Es posible afirmar que, a través del tiempo, el organismo humano cada vez está más contaminado. Además de los contaminantes macro y microambientales, es preciso mencionar la importancia que el sitio de trabajo tiene como factor de la contaminación.

2.5.7 Efecto tóxico en los organismos

El efecto tóxico es la reacción o la respuesta de un organismo después de la exposición al agente tóxico. Dicho efecto depende ante todo de la toxicidad de la sustancia, la vía de ingreso al organismo, la dosis y la toxicocinética (velocidad de absorción, distribución, metabolismo y eliminación), y otros factores ambientales (temperatura, humedad, hora, stress).

Hoy se entiende el estado de salud como un perfecto equilibrio dinámico entre el hombre y su ambiente. La evaluación de los efectos que la



contaminación puede tener sobre la salud humana suele ser difícil, pues se requiere de métodos toxicológicos y epidemiológicos relativamente complicados y no siempre disponibles. Estos efectos pueden tener manifestaciones variables de tipo agudo, crónico o a largo plazo. De gran interés actual son los efectos al largo plazo como la mutagénesis, la teratogénesis y la carcinogénesis.

2.5.7.1 Magnitud de la exposición a sustancias tóxicas: Exposición es el contacto de una población, un individuo o un componente ambiental con un agente tóxico. Cuando una persona entra en contacto con una sustancia tóxica se dice que está expuesta.

La exposición a sustancias tóxicas puede ser de mayor o menor grado dependiendo de su magnitud; En la magnitud de la exposición hay involucrados varios factores, entre los principales están:

- ☞ Concentración del agente tóxico en el medio de exposición.
- ☞ Duración y frecuencia de la exposición
- ☞ Características de la población expuesta (edad, estado de salud, nutrición)

La magnitud de la exposición depende en gran parte de la concentración del agente tóxico en el medio de exposición, se determina midiendo o estimando la cantidad (concentración) del agente que está presente en el medio de contacto. Igualmente depende de la duración del contacto y del mecanismo por el que ingresa en el cuerpo el tóxico, y en parte de la cantidad de sustancia tóxica que puede eliminar el organismo durante ese tiempo.

La exposición puede ser única o producirse de manera repetida. Por exposición aguda se entiende un simple contacto que dura segundos, minutos u horas, o bien una sucesión de exposiciones durante un día como máximo.

Por exposición crónica se entiende un contacto que dura días, meses o años. Puede ser continua o estar interrumpida por intervalos en los que no se produce ese contacto. La exposición que sólo se produce en el trabajo, por ejemplo, no es continua.

La exposición crónica a pequeñas cantidades de una sustancia tóxica puede no dar al principio ningún síntoma o signo de intoxicación. A veces pasan muchos días o meses antes de que el cuerpo albergue suficiente cantidad de sustancia química para que haya intoxicación. Para medir las interacciones



entre el organismo y el agente tóxico, se utilizan a nivel mundial los marcadores biológicos o biomarcadores, llamados también indicadores biológicos de la exposición.

2.5.7.2 Nocividad, toxicidad y ecotoxicidad: en el área de la Toxicología Ambiental, los componentes químicos se estudian más por el reflejo de la peligrosidad potencial que por su toxicidad relativa, aplicándolo más bien a determinadas condiciones de exposición, puesto que, de lo contrario, no tiene significado. Por ello, al hablar de *nocividad*, aparte del concepto semántico de toxicidad (propiedad inherente un compuesto químico de producir efectos indeseables, cuando alcanza una concentración determinada en un lugar del organismo vivo), se debe tener en cuenta el concepto de *toxicidad*, es decir, la probabilidad de que se produzcan efectos tóxicos, así como el riesgo o peligrosidad, determinado por la probabilidad de ocurrencia de una acción tóxica.

La *ecotoxicidad* es la consecuencia de la acción originada por el contaminante sobre los seres vivos que forman los ecosistemas, no enfocada a que dicho contaminante haga desaparecer a la mitad de los individuos de una especie, sino a determinar el impacto ecológico que produce, ya que muchos contaminantes no tienen efecto sobre los organismos individualmente, pero su consecuencia ecológica es digna de tenerse en cuenta.

Hay que considerar que los ecosistemas naturales son un conjunto armónico consecuente con sus propios equilibrios biológicos, y las sustancias químicas pueden, en ocasiones, perturbar estos equilibrios y trastornar la citada armonía no solo originando muertes, sino alterando la capacidad de sobrevivir en las condiciones ecológicas producidas. Eso hace que en la ecotoxicología no sea suficiente la evaluación de la toxicidad que se realiza en la toxicología convencional, ya que los efectos tóxicos tienden siempre a ser remotos. Indudablemente se necesita conocer los datos usuales en la toxicología convencional, como la toxicidad aguda de una sustancia representada por su *Dosis Letal Cincuenta (DL50)*, las alteraciones producidas por dosis subletales como representación de la capacidad de originar toxicidad diferida, su interferencia con el proceso de reproducción en el ámbito de fecundidad o su influencia en la inducción de cambios en el DNA celular.

Los estudios toxicológicos no deben hacerse sobre poblaciones simples, ya que se ha comprobado que éstas no responden a las sustancias químicas de



una manera natural en régimen de aislamiento, sino sobre poblaciones complejas.

Las interacciones de poblaciones requieren conductas y respuestas fisiológicas, que no son puestas en evidencia en el aislamiento, e incluso se ha demostrado que el rango de las respuestas a dichas sustancias es superior en los sistemas multiespecies que en los sistemas de especie única, ya que en los primeros se refuerzan dichas respuestas y son de más fácil evaluación. Además, está comprobado que los posibles efectos de los compuestos químicos sobre los ecosistemas, en lo que se refiere a sus interacciones específicas, dinámica comunitaria y dominio, no pueden ser detectados por pruebas de especie única. Por ello la Toxicología Ambiental tiene una metodología propia para la evaluación de los efectos de los contaminantes, aunque en realidad no es perfectamente confirmado que los microsomas experimentales demuestren importantes respuestas a las sustancias químicas, pero se consideran que son orientativos.

2.5.7.3 Exposición del agente tóxico: La exposición es una medida del contacto entre el agente tóxico y la superficie interior o exterior de un organismo vivo o de un ecosistema. Al exponer un organismo a una sustancia, solo habrá un efecto biológico o tóxico cuando hay absorción de la sustancia, exceptuando el caso de exposición a sustancias radiactivas. Durante la exposición de contaminantes ambientales, será de gran influencia sobre la absorción, y por lo tanto también en su toxicidad la forma en que la sustancia se presente. Para esto son importantes las propiedades de la sustancia, como el tamaño de sus partículas, su liposolubilidad, al igual que otras circunstancias, como la intensidad de la respiración.

2.5.7.4 Exposición aguda y crónica: Hay *exposición aguda* cuando una sola dosis del tóxico (generalmente una gran dosis) regresa al organismo por cualquier vía (oral, inhalatoria, dérmica) con efectos nocivos inmediatos. La *exposición crónica* se produce cuando pequeñas dosis del tóxico ingresan al organismo por cualquier vía de ingreso, durante largo tiempo y con efectos retardados.

Es corriente utilizar *indicadores biológicos* para medir la exposición, necesarios no sólo como alertadores de las perturbaciones de los ecosistemas, sino como indicadores de la situación o carga de dicho medio ambiente, incluso de manera precoz cuando se utilizan especies sensibles. Desde el enfoque humano, la ecotoxicología tiene como misión alertar,



informar o prevenir respecto de las alteraciones del desarrollo y de la degradación del medio ambiente, sobre la base de la peligrosidad, con el fin de aportar datos para tomar decisiones con arreglo al cociente beneficio/riesgo, que siempre está en relación con la calidad de vida.³³

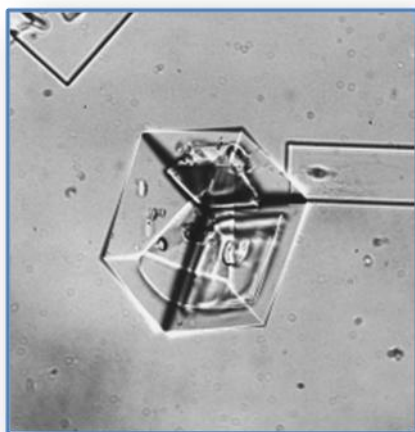
2.6 EL CIANURO³⁴

2.6.1 Generalidades del cianuro

Cianuro es un término general que se aplica a un grupo de sustancias químicas que contienen carbono y nitrógeno. Los compuestos de cianuro contienen sustancias químicas (antropogénicas) que se encuentran presentes en la naturaleza o que han sido producidas por el hombre.

Existen más de 2000 fuentes naturales de cianuro, entre ellos, distintas especies de artrópodos, insectos, bacterias, algas, hongos y plantas superiores. Las principales formas de cianuro producidas por el hombre son el cianuro de hidrógeno gaseoso y el cianuro sólido de sodio y de potasio.

Ilustración 8. Vista microscópica de los cristales de cianuro en formación.



Fuente: El Manejo del Cianuro en la Extracción de Oro.³⁴

En la naturaleza, el cianuro es formado, excretado y degradado por miles de animales, plantas, insectos, hongos y bacterias. Los niveles de cianuro potencialmente liberado por la digestión o inadecuada preparación de plantas cianogénicas pueden llegar a concentraciones de cientos de partes por millón. La ingesta de estos vegetales puede originar la muerte en animales y el envenenamiento del ser humano.

En la naturaleza se encuentran

³³ VALLEJO ROSERU, María del Carmen. Toxicología ambiental. Efectos de los contaminantes ambientales. Pág.185.

³⁴ El Manejo del Cianuro en la Extracción de Oro, de Mark J. Logsdon, Karen Hagelstein y Terry I. Mudder. Traducido de la publicación en inglés titulada The Management of Cyanide in Gold Extraction. Traducción al español: Ana María Paonessa. Disponible en Web: http://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/137911-CIANURO_DE_SODIO.pdf.



presentes bajas concentraciones de cianuro, por ejemplo, en muchos insectos y plantas, entre las que se incluyen una amplia variedad de especies vegetales. El cianuro se encuentra en almendras, albaricoques, bambúes, frijoles germinados, cerezas, aceitunas, papas, sorgo, soya, y nueces, a las que brinda protección contra los depredadores.

2.6.1.1 Presencia del cianuro en la naturaleza: El carbono y el nitrógeno, los dos elementos que forman el cianuro, están presentes a nuestro alrededor. Juntos forman casi el 80% del aire que respiramos y ambos están presentes en las moléculas orgánicas que son la base de todas las formas de vida. Básicamente, el cianuro se presenta como cianuro de hidrógeno (HCN), o el cloruro de cianógeno (ClCN), que son gases, o en forma de cristales como el cianuro de sodio (NaCN) o el cianuro de potasio (KCN).

El cianuro de hidrógeno se formó en las primeras etapas del desarrollo de nuestro planeta como precursor de los aminoácidos, a partir de los cuales evolucionó la vida sobre la tierra. El cianuro se forma naturalmente, las plantas y los animales lo producen y utilizan como un mecanismo de protección que los convierte en una fuente alimenticia poco atractiva. Muchos organismos pueden adaptarse a la presencia del cianuro o eliminar su toxicidad.

2.6.1.2 Cianuro libre: es el término utilizado para describir tanto el ion de cianuro (CN^-) que se disuelve en el agua del proceso como cualquier cianuro de hidrógeno (HCN) que se forma en la solución. Las briquetas sólidas de cianuro de sodio se disuelven en el agua para formar el ion de sodio y el anión de cianuro (CN^-).

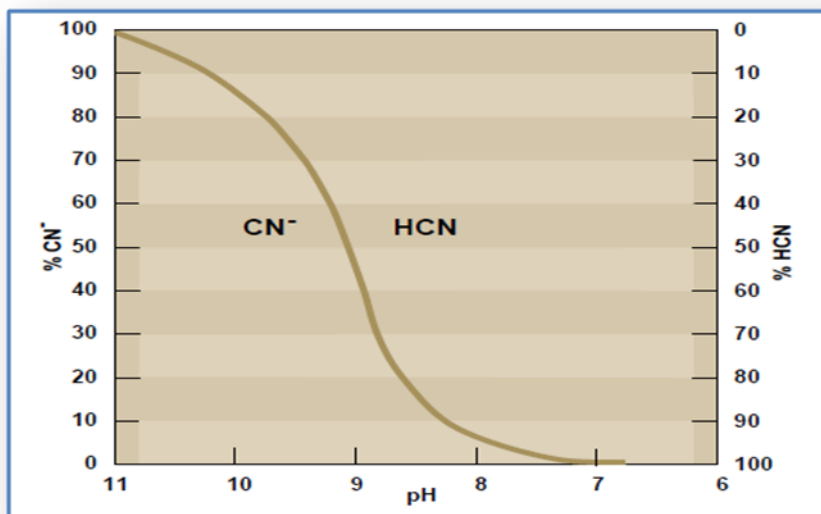
El anión de cianuro se combina luego con el ion de hidrógeno para formar HCN molecular. La concentración del ion de hidrógeno en el agua del proceso se expresa mediante el conocido parámetro pH. Cuando el pH de una solución es 7, se dice que la solución es neutra.

Se dice que las soluciones cuyo pH es inferior a 7 son ácidas, mientras que aquellas cuyo pH es superior a 7 son alcalinas. Casi todo el cianuro libre está presente como HCN cuando hay abundantes iones de hidrógeno presentes, es decir, a un valor de pH de 8 o menos. Este HCN, entonces, puede volatilizarse y dispersarse en el aire. Cuando el pH es superior a 10.5, hay pocos iones de hidrógeno presentes y casi todo el cianuro libre está presente como CN^- . En condiciones normales de temperatura y presión, las



concentraciones de HCN y CN^- son iguales a un valor de pH de aproximadamente 9.4.

Ilustración 9. Equilibrio de CN^- /HCN con el pH



Fuente: Scott, J. S., Status.1993³⁵

Estas formas de cianuro libre son importantes porque se consideran como los cianuros más tóxicos. Sin embargo, también son las formas que se eliminan más fácilmente de las soluciones mediante elaborados procesos de tratamiento y mecanismos naturales de atenuación. Una de las reacciones más importantes que afectan a la concentración de cianuro libre es la volatilización de HCN, que, al igual que la mayoría de los gases, se separa del agua y escapa al aire.

El cianuro libre no es persistente en la mayoría de las aguas superficiales porque el pH de dichas aguas generalmente es de 8, de modo que el HCN se volatiliza y dispersa. La volatilidad del cianuro de hidrógeno y su posterior transformación en compuestos benignos en el aire son importantes porque actúan como un mecanismo natural que controla las concentraciones de cianuro libre en los efluentes residuales y de los procesos en las minas.

³⁵ Scott, J. S., Status of Gold Mill Waste Effluent Treatment, Informe para CANMET, Recursos Naturales Canadá, Marzo de 1993.



Los procesos naturales pueden reducir por sí solos a valores muy bajos la concentración de cianuro libre de las soluciones en lugares al aire libre en las instalaciones de producción de oro, tales como estanques para procesamiento y depósitos de relaves, a menudo a niveles por debajo de lo establecido en los reglamentos o incluso por debajo de los límites de detección. Sin embargo, en la extracción de oro, se debe mantener el pH de la solución a valores cercanos a 10.5 con el fin de impedir la volatilización. Esto preserva el cianuro en el sistema de extracción de oro, donde es necesario y, al mismo tiempo, limita el riesgo de inhalación por parte de los trabajadores de altas concentraciones de HCN gaseoso en un espacio cerrado.

2.6.1.3 Producción y manipulación del cianuro: El cianuro se produce industrialmente de dos maneras: como subproducto de la fabricación de fibras acrílicas y de ciertos plásticos o mediante la combinación de gas natural y amoníaco a altas temperaturas y presiones para producir cianuro de hidrógeno (HCN) gaseoso.

Posteriormente, el cianuro de hidrógeno gaseoso se puede combinar con hidróxido de sodio (NaOH) para producir cianuro de sodio (NaCN) y agua (H_2O). Luego se elimina el agua mediante secado y filtrado y el cianuro de sodio se convierte en briquetas blancas y sólidas de aproximadamente 10 centímetros cuadrados. Las briquetas sólidas de cianuro de sodio se mantienen a temperatura y humedad controladas.

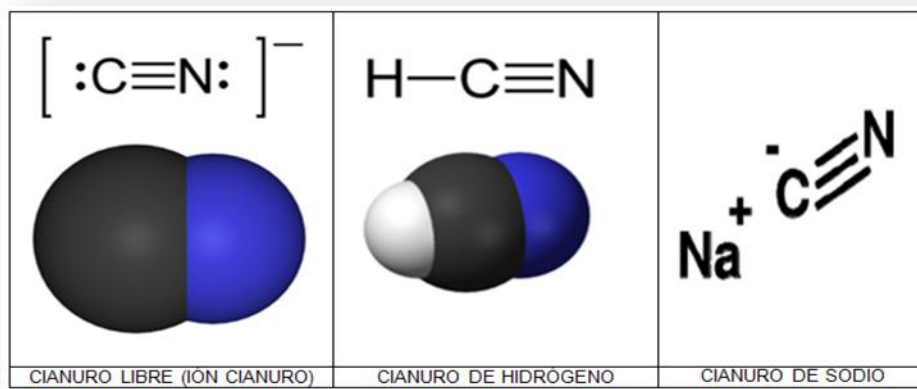
Todos los embarques de cianuro de sodio se acompañan de las Hojas de Seguridad donde figuran los datos químicos y de toxicidad del cianuro de sodio, instrucciones en caso de accidentes, número de teléfono para solicitar ayuda en casos de emergencia e información adicional del fabricante (ver anexo 1). En el mundo hay tres productores primarios de cianuro sólido, líquido y gaseoso: Dupont, en los Estados Unidos, ICI, en Inglaterra y Degussa Corporation, en Alemania. La producción anual mundial es de aproximadamente 1.4 millón de toneladas de HCN. FMC Corporation también produce cianuro de sodio en los Estados Unidos.



2.6.2 Química Básica del Cianuro³⁶

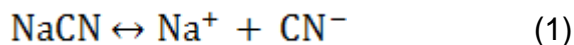
El cianuro es un grupo químico que consiste de un átomo de carbono conectado a un átomo de nitrógeno por tres enlaces (C≡N). Los compuestos orgánicos que contienen este grupo se denominan nitrilos. El HCN molecular es una molécula neutra a la que se denomina ácido cianhídrico o cianuro de hidrógeno. (Ver ilustración 10).

Ilustración 10. Estructura molecular cianuro

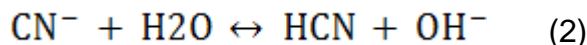


Fuente: Colaboradores de Wikipedia.³⁷

2.6.2.1 Los compuestos simples del cianuro: son sales o compuestos iónicos que se disocian directamente en el agua liberando un catión y un ion cianuro, son sales que provienen de reacciones ácido – base (por ejemplo el cianuro de sodio).



El CN⁻ puede entonces hidrolizarse para formar HCN y OH⁻, de la siguiente manera:



³⁶ PEREZ, Julio. HIGUERA, Oscar. COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DEL CIANURO. Grupo CP2-ECP ECOPEPETROL. REVISTA, Ingeniería y Desarrollo. Número 24. Julio-diciembre, 2008 ISSN: 0122-3461. Consultado junio 2009. (en línea desde): http://ciruelo.uninorte.edu.co/pdf/ingenieria_desarrollo/24/5_Comportamiento%20electroquimico.pdf.

³⁷ Colaboradores de Wikipedia. *Cianuro* [en línea]. Wikipedia, La enciclopedia libre, 2008 [fecha de consulta: 13 de junio del 2009]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Cianuro>



Los cianuros simples con cationes de los metales del Grupo I y II como el calcio y el sodio, son por lo general muy solubles y se hidrolizan espontáneamente en agua, mientras que los cianuros simples con cationes del Grupo de Transición (como el cobre, cadmio y plata) muestran baja solubilidad.

Los cianuros libres y simples pueden convertirse en cianatos (compuestos que contienen el grupo CNO-) cuando se les somete a procesos de oxidación, como ocurre con el tratamiento de efluentes. Además pueden formar tiocianato por efecto de la reacción entre compuestos reducidos de azufre y cianuro.

2.6.2.2 Los compuestos complejos de Cianuro: son compuestos que se disocian en el agua liberando un catión y un anión que contiene ion cianuro. El Cianuro Libre comprende tanto al HCN molecular como al ion de cianuro. Esta terminología se emplea tanto para la descripción analítica del cianuro como para evaluar su toxicidad. El Cianuro Total (TCN): Se denomina así a todos los compuestos de cianuro existentes en una solución acuosa. Este es un término que se emplea en los procedimientos analíticos. El Cianuro Disociable con Acido Débil (DAD) en inglés (WAD CN): Es un término analítico utilizado para designar a los compuestos de cianuro que se disocian bajo reflujo, con un ácido débil, normalmente a un pH de 4.5. El grado de formación de complejos solubles está determinado por la concentración del ion cianuro libre. El grado al cual se disocian estos complejos depende en gran medida del pH de la solución.

Los complejos débiles de cianuro, con frecuencia denominados cianuros “disociables en ácidos débiles” o cianuros DAD (WAD), pueden disociarse en solución y producir concentraciones ambientalmente significativas de cianuro libre. Los complejos débiles incluyen complejos de cianuro de cadmio, cobre, níquel, plata y zinc.

2.6.3 Usos industriales del cianuro³⁸

El cianuro es uno de los principales compuestos utilizados por la industria química debido a su composición de carbono y nitrógeno, ambos elementos

³⁸ El Manejo del Cianuro en la Extracción de Oro, de Mark J. Logsdon, Karen Hagelstein y Terry I. Mudder. Traducido de la publicación en inglés titulada The Management of Cyanide in Gold Extraction. Traducción al español: Ana María Paonessa. Disponible en Web: http://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/137911-CIANURO_DE_SODIO.pdf.



comunes, y a la facilidad con la cual reacciona con otras sustancias. Anualmente se utiliza más de un millón de toneladas de cianuro, que representan alrededor del 80% de la producción total, en la producción de químicos orgánicos como el nitrilo, el nylon y los plásticos acrílicos. Otras aplicaciones industriales incluyen la galvanoplastia, el procesamiento de metales, el endurecimiento del acero, las aplicaciones fotográficas y la producción de goma sintética. Los cianuros de hierro se utilizan con frecuencia como aditivo antiaglutinante en la sal usada para derretir el hielo en los caminos. El cianuro de hidrógeno gaseoso se ha utilizado ampliamente para exterminar a los roedores y depredadores grandes, y en la práctica hortícola, para controlar las plagas de insectos que han desarrollado resistencia a otros pesticidas.

El 20% restante de la producción de cianuro se utiliza para fabricar cianuro de sodio, una forma sólida de cianuro cuya manipulación es relativamente fácil y segura. De este porcentaje, el 90%, es decir, el 18% de la producción total, se utiliza en minería en todo el mundo, mayormente para la recuperación de oro. (Ver ilustración 11)

Ilustración 11. Porción de la producción mundial de cianuro utilizada en minería

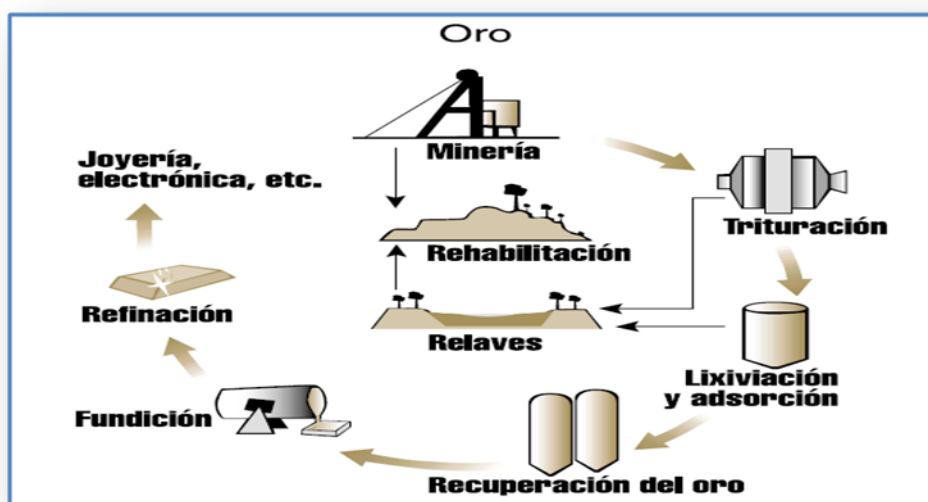


Fuente: El Manejo del Cianuro en la Extracción de Oro, de Mark J. Logsdon.

2.6.3.1 Uso del cianuro en la producción de oro: El cianuro se utiliza en minería para extraer oro (y plata) del mineral, en particular mineral de baja ley y mineral que no puede tratarse fácilmente mediante procesos físicos simples como la trituración y la separación por gravedad. La industria moderna del oro utiliza el cianuro casi exclusivamente como agente lixivianador del oro. El cianuro ha sido utilizado en minería desde hace más de un siglo. Una vieja técnica para la recuperación del oro, que ha dejado de utilizarse en las modernas plantas de extracción de oro, es la amalgama con mercurio líquido.

En algunos países en desarrollo, los mineros artesanales siguen utilizando el mercurio líquido para complejar el oro proveniente de pequeñas explotaciones mineras. Sin embargo, se ha desalentado esta práctica debido a que el deficiente manejo del mercurio líquido y del vapor que surge al volatizar el mercurio provoca serios problemas de salud a los mineros artesanales.

Ilustración 12. Producción de oro



Fuente: El Manejo del Cianuro en la Extracción de Oro, de Mark J. Logsdon.

2.6.3.2 El proceso producción del oro: El uso de soluciones a base de agua para extraer y recuperar metales como el oro se denomina hidrometalurgia. Las operaciones de minería del oro utilizan soluciones muy diluidas de cianuro de sodio ($NaCN$), típicamente entre 0.01% y 0.05% de cianuro (100 a 500 partes por millón). El proceso de disolución de metales se denomina lixiviación. El cianuro de sodio se disuelve en agua donde, en condiciones ligeramente oxidantes, disuelve el oro contenido en el mineral. La solución resultante que contiene oro se denomina “solución cargada”. Luego se agrega zinc o carbón activado a la solución cargada para recuperar el oro extrayéndolo de la solución. La solución residual o “estéril” (es decir, carente de oro) puede recircularse para extraer más oro o enviarse a una instalación para el tratamiento de residuos.

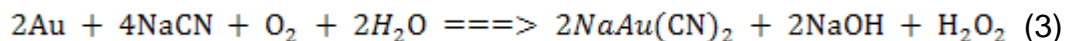
Existen dos enfoques generales para la lixiviación del oro de un mineral mediante el cianuro: la lixiviación en tanque y la lixiviación en pila (por percolación). La lixiviación en tanque es el método convencional por el cual



el mineral aurífero se tritura y se muele hasta reducirlo a menos de un milímetro de diámetro. En algunos casos se puede recuperar parte del oro de este material finamente molido como partículas discretas de oro mediante técnicas de separación por gravedad. En la mayoría de los casos, el mineral finamente molido se lixivia directamente en tanques para disolver el oro en una solución de cianuro.

Los recientes avances técnicos permiten la lixiviación en pila de algunos minerales auríferos. Con este método, el mineral se tritura y se reduce a unos pocos centímetros de diámetro y se lo coloca en grandes pilas o montones. Una solución de cianuro se hace pasar lentamente a través de estas pilas para disolver el oro. Cuando se utiliza la tecnología de lixiviación en pila para extraer oro, la solución estéril se recoge en un estanque que generalmente se recarga con cianuro y se recicla de regreso al sistema de lixiviación.

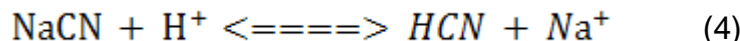
2.6.3.3 Reacciones químicas en el proceso de lixiviación del oro³⁹: Los complejos de cianuro son más estables y eficaces y no necesitan otras sustancias químicas agresivas para realizar la recuperación del oro. Habashi (1967) revisó los estudios efectuados acerca de los mecanismos de cianuración y propuso la ecuación para la reacción de disolución:



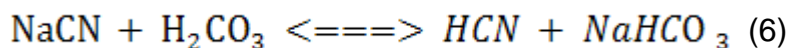
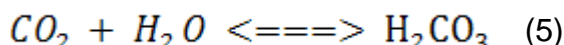
La ecuación 3 describe el comportamiento durante la cianuración de algunos minerales denominados "directamente cianurables" en los que el oro, por lo general, se encuentra como metal u ocasionalmente aleado con plata. Con respecto a otros minerales, los constituyentes que no son metales preciosos pueden reaccionar o interactuar con la solución de cianuro, causando dificultades en el proceso. Estos constituyentes, que pueden estar presentes en concentraciones mucho mayores que los metales preciosos pueden ser el cobre, zinc, níquel, arsénico, antimonio, sustancias carbonatadas y un gran número de sulfuros.

Las soluciones de cianuro para la lixiviación de metales preciosos, se preparan por lo general con cianuro de calcio o cianuro de sodio de uso comercial. La estabilidad de estas soluciones depende de su pH; un pH más bajo favorece la pérdida de cianuro por formarse HCN:

³⁹ Ministerio de Energía y Minas del Perú. Guía ambiental para el manejo del cianuro en relaves mineros. [en línea]. consultado en mayo de 2009. Disponible en internet desde: <http://www.minem.gob.pe/archivos/dgaam/legislacion/guias/cianuro.pdf>. pág. 4-13.



Un ejemplo significativo de esta reacción tiene lugar cuando el ion hidrógeno es generado por la absorción del CO₂ atmosférico por parte de la solución:



Con el fin de retener el cianuro en la solución y controlar las emisiones de cianuro de hidrógeno en el lugar de trabajo, se agrega cal para que reaccione con los iones de hidrógeno. Las adiciones de cal también pueden contribuir a sedimentar las partículas del mineral en la solución de lixiviación cuando se concluye las reacciones.

Durante el proceso de cianuración de minerales que contienen metales preciosos, se producen varias reacciones secundarias, los productos de estas reacciones aparecen en los efluentes de la planta, con importantes consecuencias para el medio ambiente. Los constituyentes del mineral que participan en estas reacciones consumiendo cianuro, se denominan cianicidas.

2.6.4 Atenuación de las concentraciones de cianuro en el ambiente⁴⁰

Después de haber extraído el oro por medio de procesos siderometalúrgicos, pueden estar presentes tres tipos principales de compuestos de cianuro en los efluentes residuales o en las soluciones de los procesos: cianuro libre, cianuro débilmente complejo y cianuro fuertemente complejo. Juntos, los tres compuestos de cianuro constituyen el “cianuro total”. Al conocer la química de estos tres tipos de cianuro se puede comprender su comportamiento respecto de la seguridad y el ambiente.

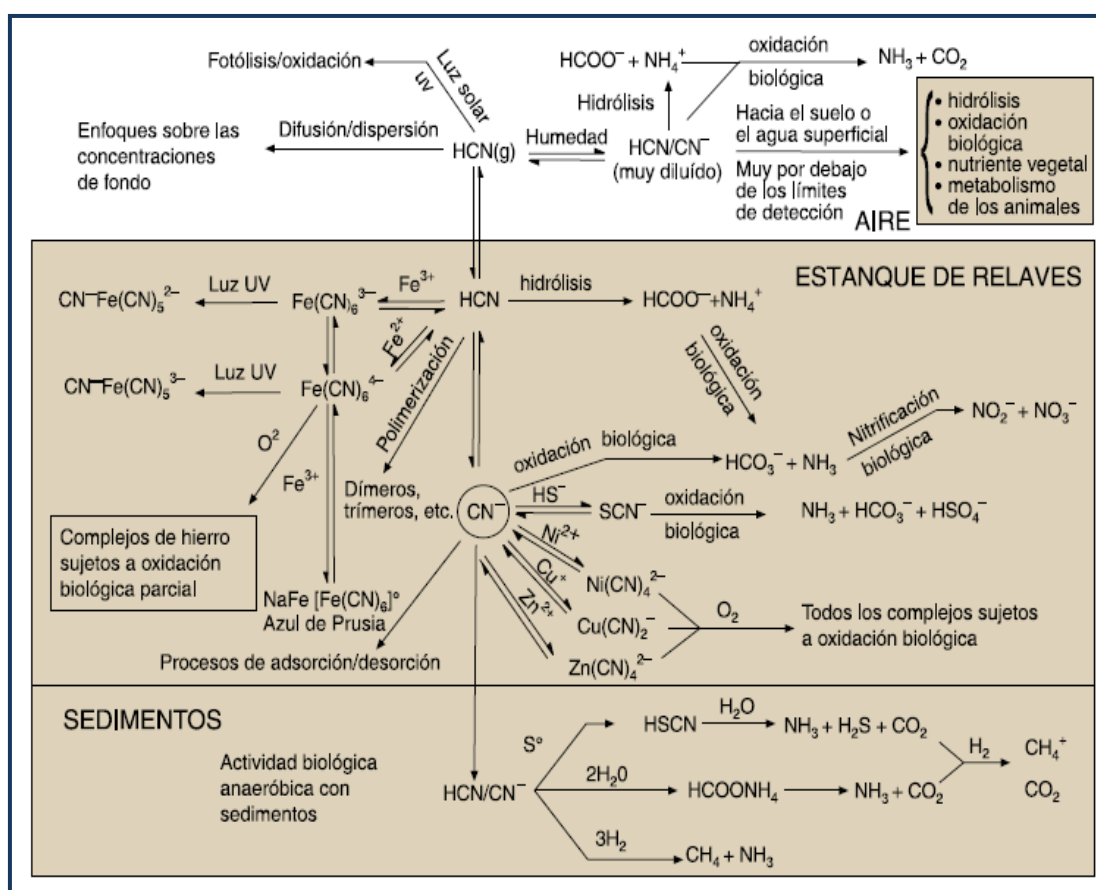
La evaluación de la cantidad y los tipos de cianuro es importante para todos los aspectos del uso del cianuro. Es particularmente importante poder distinguir tanto con exactitud como con precisión entre los distintos compuestos de cianuro para asegurar la elección de una metodología eficaz de detoxificación. Una vez que se ha recuperado el oro, la solución queda

⁴⁰ El Manejo del Cianuro en la Extracción de Oro, de Mark J. Logsdon, Karen Hagelstein y Terry I. Mudder. Traducido de la publicación en inglés titulada The Management of Cyanide in Gold Extraction. Traducción al español: Ana María Paonessa. Disponible en Web: http://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/137911-CIANURO_DE_SODIO.pdf. pág., 19-23.



desprovista de oro pero sigue conteniendo cianuro. El proceso que disminuye la concentración de cianuro en solución, ya sea en el ambiente natural o en instalaciones creadas para tal fin, se denomina “atenuación”. La volatilización de HCN, que reduce la concentración de cianuro libre en solución, es el principal proceso de atenuación natural. La ilustración 13 muestra una representación esquemática de las relaciones entre las formas del cianuro y los procesos que las controlan.

Ilustración 13. El ciclo del cianuro



Fuente: Smith, A. C. S. y T. I. Mudder, 1991. ⁴¹

2.6.4.1 Tratamiento y reutilización de soluciones de cianuro: Existen varios métodos para degradar el cianuro, pero el que menor demanda ambiental tiene es el tratamiento por degradación biológica, ya que emplea

⁴¹ Smith, A. C. S. y T. I. Mudder, 1991. The Chemistry and Treatment of Cyanidation Wastes. [Química y tratamiento de residuos de la cianuración], Mining Journal Books, Londres, Reino Unido. El manejo del cianuro en la extracción del oro.



un menor número de sustancias químicas. Unas de las formas de degradación del cianuro son:

✓ Degradación natural: El principal mecanismo de degradación natural es la volatilización con posteriores transformaciones atmosféricas a sustancias químicas menos tóxicas. Otros factores como la oxidación biológica, la precipitación y los efectos de la luz solar también contribuyen a la degradación del cianuro. En los suelos, las bacterias asimilan el cianuro mediante diversas reacciones aeróbicas y anaeróbicas. En algunos casos, la combinación de estos procesos de degradación natural son suficientes para satisfacer los requisitos que reglamentan la descarga de soluciones que contienen cianuro.

✓ Los procesos de oxidación química: para el tratamiento del cianuro incluyen el proceso con SO₂/Aire y el proceso de tratamiento con H₂O₂ (peróxido de hidrógeno). En el proceso se utiliza SO₂ y aire en presencia de un catalizador de cobre para oxidar el cianuro libre y el cianuro DAD en sustancias menos tóxicas. El peróxido de hidrógeno, un potente oxidante, oxida el cianuro libre y el cianuro DAD y los convierte en amonio y carbonato. Se aplica para tratamiento de complejos de zinc y de cadmio. El sistema con peróxido no se adapta bien al tratamiento de lodos debido a los irregulares requerimientos de peróxido de hidrógeno cuando hay sólidos presentes.

✓ La precipitación: la precipitación de cianuros estables se puede obtener mediante el agregado deliberado de complejantes tales como el hierro. Esto reduce la concentración de cianuro libre y también es eficaz para controlar los elevados niveles de otros metales que pueden estar presentes. Los cianuros de hierro pueden reaccionar con otras sustancias químicas en solución y producir precipitados sólidos, que pueden contener una docena de sales insolubles de cianuro, removiendo de esta manera el cianuro de la solución. Parte del cianuro de las soluciones de los procesos reaccionará con otros componentes químicos que se encuentren dentro del sistema y formarán concentraciones mucho menos tóxicas de compuestos tales como el amoníaco, el nitrato y el dióxido de carbono.

✓ La biodegradación: es la base de los sistemas de tratamiento de los efluentes residuales industriales. Las condiciones aeróbicas son mucho más favorables para la degradación del cianuro que las condiciones anaeróbicas, aunque los organismos anaeróbicos pueden ser eficaces para tratar el cianuro en concentraciones de hasta varios miligramos por litro. Se han creado tanto sistemas activos como sistemas pasivos de tratamiento biológico; estos sistemas remueven el cianuro empleando microorganismos aeróbicos o anaeróbicos.



La degradación biológica de cianuro aprovecha de la capacidad de ciertos grupos de microorganismos, mayormente bacterias, de utilizar compuestos cianurados como fuente de carbono y nitrógeno convirtiendo el compuesto tóxico en sustancias inocuas. La biodegradación de cianuro, como también se le conoce, resulta en la formación de amonio. Los microorganismos involucrados poseen varios sistemas enzimáticos específicos que les permite desarrollar en ambientes con alta concentración de cianuro.

Entre los microorganismos se conoce de la capacidad degradadora de muchos hongos (*fusarium*, *hasenula*) y bacterias (*e. coli*, *pseudomonas fluorescens*, *citrobacter*, *bacillus subtilis* y otros) quienes asimilan cianuro y lo usan como fuente de nitrógeno y/o carbono, teniendo como intermediario NH₃.⁴²

✓ Reciclado: Aunque las tecnologías para el manejo del cianuro se han centrado en la destrucción del cianuro en sistemas de paso único, es posible recuperar y reutilizar el cianuro, y de este modo reducir al mínimo la cantidad total de cianuro utilizado y disminuir los costos operativos para algunas minas. El reciclado reduce las concentraciones de cianuro en las soluciones residuales y disminuye el costo de la destrucción del cianuro.

2.6.5 Toxicología del cianuro

La inadecuada manipulación o empleo del cianuro lo convierte en un compuesto potencialmente tóxico. Las evaluaciones completas del riesgo exigen especificaciones detalladas de las condiciones inherentes al sitio. En el caso del cianuro, su uso varía tanto que el riesgo puede evaluarse significativamente sólo si se consideran los procedimientos operativos inherentes a un sitio en particular. No obstante, es posible describir los peligros que representa el cianuro y las posibles exposiciones.

2.6.5.1 Impactos del cianuro sobre la salud y el ambiente: Los materiales peligrosos afectan no sólo a los seres humanos, sino también a los receptores ecológicos. En los ambientes mineros, hay tres grupos importantes de receptores ecológicos o ambientales: los mamíferos, los reptiles y los anfibios; las aves (especialmente las aves silvestres migratorias); los peces y otros integrantes de la vida acuática. Existe una justificable preocupación pública por el uso del cianuro en ambientes

⁴²CIANURO. Toxicidad y Destrucción Biológica. Biólogo. José J. Guerrero Consultoría en Biotecnología Minera y Ambiental Minera. [en línea]. Consultado septiembre 2008. Disponible en internet desde: <http://www.ilustrados.com/documentos/cianurotoxdestrucbiologica.pdf>



industriales. El cianuro es una sustancia tóxica que puede ser letal si se la ingiere o se la inhala en cantidades suficientes.

Peces jóvenes de agua fría, como los salmónidos, parecen ser una de las especies acuáticas más sensibles al cianuro. Los insectos acuáticos como las moscas piedra, las frigáneas, las moscas de mayo o cachipollas y los escarabajos, generalmente son menos sensibles a la sustancia. Son las formas débiles disociables ácidas del cianuro las que se consideran como las más “significativas toxicológicamente”. Estudios de laboratorio y de campo han demostrado que incluso las especies acuáticas, como la trucha, pueden tolerar bajos niveles de cianuro DAD (Cianuro Disociable con Acido Débil).⁴³

El cianuro impacta la biota y los seres humanos a bajas, medias y altas dosis. El cianuro es fitotóxico e interfiere en la fotosíntesis de las plantas verdes. Este impacto es muy grave, pues las bajas temperaturas implican en general metabolismos más bajos, y por lo tanto menor velocidad de recuperación. No es lo mismo un impacto por cianuro en ambientes con tasas de renovación biótica intensa que en ambientes con severas restricciones ambientales.

A nivel de organismos animales el cianuro puede ser absorbido por piel, ingerido e ingresar al aparato digestivo, o inhalado. Concentraciones de cianuro de hidrógeno de 200 ppm son letales para muchos animales. En ambiente acuático concentraciones tan bajas como 0,1 miligramo por litro afectan la biota acuática más sensible. Peces y aves son muy sensibles. En 1980 la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, EPA, estableció un valor máximo permisible de cianuro libre, para la protección de la vida acuática, de 3,5 ug/l para un promedio de 24 horas, y un límite máximo, en todo momento, de 52 ug/l.

El cianuro y sus derivados pueden por lo tanto afectar la biodiversidad y la biomasa activa del ecosistema, creando grandes crisis a nivel de ambientes acuáticos. Si bien los efectos de los tóxicos disminuyen con la temperatura del medio que los contiene, la alta sensibilidad de los peces al cianuro hace que su recuperación poblacional sea más lenta a bajas temperaturas.⁴⁴

⁴³ El Manejo del Cianuro en la Extracción de Oro, de Mark J. Logsdon, Karen Hagelstein y Terry I. Mudder. Traducido de la publicación en inglés titulada The Management of Cyanide in Gold Extraction. Traducción al español: Ana María Paonessa. Disponible en Web: http://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/137911-CIANURO_DE_SODIO.pdf. pág., Pág.28.

⁴⁴ Montenegro, Raúl A. Efectos de sustancias empleadas en el método de lixiviación con cianuro. Fundación para la defensa del ambiente. 2006.



El cianuro impide a las células utilizar el oxígeno, lo cual causa hipoxia de los tejidos y “cianosis” (decoloración azulada de la piel). El sistema respiratorio deja de nutrir a las células con oxígeno, un estado que, si no se trata, causa respiración rápida y profunda seguida por convulsiones, pérdida del conocimiento y asfixia. El antídoto más común es el nitrito de amilo, que puede administrarse en forma oral o por inyección. Aunque hay muchas fuentes diarias de exposición al cianuro (escapes de los automóviles, humo de tabaco, incendios), el cianuro no se acumula en los tejidos porque el cuerpo transforma esas pequeñas cantidades en un compuesto menos tóxico llamado tiocianato, que luego se excreta. No es conocido que el cianuro cause cáncer o defectos congénitos o que pueda afectar adversamente la reproducción.

La forma más tóxica del cianuro es el HCN gaseoso. La Conferencia Norteamericana de Higienistas Industriales Gubernamentales (ACGIH) establece el límite de umbral tope de HCN en 4.7 ppm.⁷ En concentraciones de 20 a 40 ppm de HCN en el aire, se puede observar cierto malestar respiratorio después de varias horas. La muerte ocurre en pocos minutos con concentraciones de HCN por encima de aproximadamente 250 ppm en el aire. Para el cianuro libre, la dosis letal en humanos por ingestión o inhalación varía entre 50 y 200 mg (1 a 3 mg de cianuro libre por kg. de masa corporal). La dosis letal por absorción dérmica es considerablemente mayor, alrededor de 100 mg por kg de peso corporal.

2.6.5.2 Información ecológica del cianuro de sodio (NaCN): La sustancia es muy tóxica para los organismos acuáticos.

☀ Ecotoxicidad⁴⁵:

Crustáceos (*asellus communis*) EC₅₀ = 2,33 mg/l (96 horas)
Peces (*salvelinus fontinalis*) LC₁₀₀ = 1 mg/l (7 días)

96 horas LC₅₀ – *fathead minnows*: 0, 43 – 0, 66 mg/L.
96 horas LC₅₀ – *trucha arco iris*: 0,46 – 0,75 mg/L.
96 horas LC₅₀ – *bluegill sunfish*: 0, 28 mg/L.

☀ Movilidad: Los cianuros son relativamente móviles en el suelo, de éste pueden pasar hacia el agua subterránea.

⁴⁵ Barrick Gold Corporation. Hoja de datos de seguridad de materiales. cianuro de sodio. 2006. [documento en línea]. disponible en internet desde:
http://www.barrick.cl/operaciones/rrpp/terceros_creibles/MSDS%20CIANURO%20DE%20SODIO.pdf. consultada enero 2009.



☀ **Persistencia y degradabilidad:** El cianuro en el suelo puede ser eliminado a través de varios procesos. Algunos compuestos de cianuro pueden formar cianuro de hidrógeno y evaporarse, mientras que otros serán transformados a otras sustancias químicas por los microorganismos en el suelo. Por consecuencia de esto, los cianuros generalmente no se filtran hacia el agua subterránea. Sin embargo, se ha detectado cianuro en aguas subterráneas de algunos vertederos y en sitios para disposición de residuos industriales. La vida media (el tiempo necesario para eliminar la mitad del material) del cianuro de hidrógeno en la atmósfera es alrededor de 1 a 3 años. La vida media del cianuro en el agua no se conoce.⁴⁶

2.6.5.3 Epidemiología del cianuro en los seres humanos: a nivel tisular (tejidos), el cianuro actúa sobre el sistema respiratorio, impidiendo el uso del oxígeno mediante la inhibición de la acción de las enzimas respiratorias. Una vez que se encuentra en el torrente sanguíneo, el cianuro forma un complejo estable con la citocromo oxidasa, una enzima que promueve el traspaso de electrones a las mitocondrias de las células durante la síntesis de adenosin trifosfato (ATP). Si la citocromo oxidasa no funciona correctamente las células no consiguen aprovechar el oxígeno del torrente sanguíneo, lo que causa hipoxia citotóxica o asfixia celular. La falta de oxígeno provoca que el metabolismo cambie de aerobio a anaerobio, lo que conlleva a la acumulación de lactato en la sangre.

Así mismo, la exposición por cualquier medio a una cantidad grande de cianuro puede también causar otros efectos en la salud como: convulsiones; presión sanguínea baja; ritmo cardíaco lento; pérdida de la conciencia; lesión en el pulmón y falla respiratoria que lleva a la muerte. El cuerpo posee diversos mecanismos para expulsar el cianuro de forma efectiva. El cianuro reacciona con el tiosulfato y produce tiocianato en reacciones catalizadas por enzimas de azufre como la rodanasa. El tiocianato es liberado por la orina en cuestión de días. Si bien el tiocianato es siete veces menos tóxico que el cianuro, en concentraciones altas provenientes de una exposición crónica al cianuro puede afectar la glándula tiroides. El cianuro tiene más afinidad por la metahemoglobina que por la citocromo oxidasa, y juntos forman cianometahemoglobina.⁴⁷

⁴⁶ Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). 2006. Reseña Toxicológica de Cianuro (versión actualizada) (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública. [en línea]. [Atlanta, USA]: julio 2006; [citado septiembre de 2008]. Cianuro. Disponible en World Wide Web: http://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/137911-CIANURO_DE_SODIO.pdf

⁴⁷ CAMARA ARGENTINA DE EMPRENARIOS MINEROS. Efectos del cianuro en la salud humana y en el medio ambiente", [en línea]. Consultado en septiembre 2008. Disponible desde: <http://mineriasudaca.blogspot.com/2007/02/efectos-del-cianuro-en-la-salud-humana.html>



2.7 INDUSTRIA AURÍFERA EN COLOMBIA

2.7.1 Generalidades

La minería aurífera es una actividad económica dedicada a la explotación y beneficio del oro, que a lo largo del tiempo ha ido cambiando de lugar e intensidad. La extracción del oro emplea procedimientos rudimentarios para su extracción. Usualmente, los depósitos de oro necesitan de un constituyente inorgánico no metálico (cianuro) para un buen recobro del mismo.

La extracción de minerales es uno de los subsectores que constituyen el denominado sector primario del aparato productivo. En este nivel de la estructura económica, se generan impactos ambientales de diversa índole, determinando procesos masivos y amplios de intervención y transformación de los elementos y de los procesos naturales.

Los métodos de extracción y beneficio de oro se desarrolla a través de varias etapas diferenciadas de acuerdo con la escala tecnológica, y al tipo de depósito predominante en cada región, pero en general se pueden resumir así: descapote del terreno, arranque del material, transporte del material, beneficio de los materiales valiosos y purificación de los mismos.

La minería en Colombia se adelanta en cuatro escalas, minería de subsistencia (trabaja principalmente aluviones), pequeña y mediana minería (trabaja sobre depósitos de aluvión y de filón), y la gran minería (trabaja depósitos aluviales).

En la pequeña minería de veta se desarrolla un trabajo muy artesanal, donde la principal energía o fuerza utilizada es la producida por el minero. Para el arranque del material se emplean taladros y martillos manuales, barras para hacer las perforaciones donde se coloca la dinamita y se hacen las voladuras. El transporte interno del material se hace por medio de coches de tracción humana o carretillas de mano; el transporte externo muchas veces se hace por cable aéreo.

La trituración primaria del material se efectúa con trituradoras de quijadas, seguida de la molienda que se hace con molinos de pisones tipo antioqueño californiano y molinos de bolas. Los procesos de beneficio extraen el oro libre



por concentración en mesas concentradoras, separándolo posteriormente con batea o por amalgamación en barriles.

El proceso final se hace con cianuración por percolación, y eventualmente por agitación. Este nivel de tecnología productiva utiliza entre 10 y 30 obreros. Puede estar presente un técnico minero y en ocasiones pueden tener asesoría de profesionales del sector. Generalmente la cantidad de mineral procesado es de 30 toneladas de mineral por día. En estas condiciones la producción unitaria por mina varía entre 10 y 100 gramos de oro al día.

Por su parte la mediana Minería de filón emplea el mismo equipo nombrado anteriormente, pero con mayor capacidad de procesamiento. La molienda incluye el uso de molinos de bolas y el beneficio se realiza por cianuración con agitación y en algunas minas se emplea amalgamación y cianuración. La planta de empleados es variable entre 30 y 300 personas, donde se incluyen profesionales y técnicos especializados en minería.

La escala de procesamiento es variable entre 30 y 600 toneladas de material por día. En esta escala se encuentran varias empresas, la Frontino Gold Mines en Segovia, El Limón y La Bramadora en Remedios, la Bodega y Reina de Oros en Santander, en la zona baja de Marmato y El Tamboral en la región de Suárez Cauca, son explotadas por Mineros Nacionales.⁴⁸

2.7.2 Problemática de las alteraciones ambientales ocasionadas por las actividades mineras

La explotación de los recursos mineros conlleva una serie de alteraciones negativas sobre el medio ambiente, las cuales son diferenciadas en cada una de las etapas por las cuales pasa una mina durante su vida útil, es decir, cada una de las operaciones que se requieren para realizar la extracción y el beneficio del mineral. En general, entre las alteraciones asociadas a la explotación minera se pueden mencionar:⁴⁹

⁴⁸ GÓMEZ CARDENAS, Jeremías. Riesgo potencial de alteración de la calidad ambiental derivado de actividades de extracción y beneficio de oro en la cuenca magdalena – cauca. Universidad Nacional de Colombia. Consultado en junio 2009. (Documento en línea). Disponible en internet desde: <http://www.ideam.gov.co/biblio/paginaabierta/Proyecto%20Miner%EDa.pdf>

⁴⁹ CACERES, I & RAMIREZ, Y. Estudio para la Formulación de un Plan Nacional de Desarrollo Minero. Informe Interno. Bogotá, Instituto de Estudios Colombianos. Ministerio de Minas y Energía. INGEOMINAS. 1987. Disponible en: www.ideam.gov.co



- ✘ Alteraciones sobre la atmósfera: involucra las emisiones de partículas sólidas, gases y vapores y formas de energía tales como el ruido.
- ✘ Alteraciones sobre el recurso hídrico: se pueden presentar cambios en las características físicas, químicas y biológicas, reflejándose una reducción en la oferta del recurso tanto para los ecosistemas acuáticos como para las actividades antrópicas, así como la desviación de los cursos de agua y/o la colmatación de los cuerpos lénticos.
- ✘ Alteraciones sobre la biota: se considera la alteración de ecorregiones (ecosistemas naturales y antrópicos), pérdida de biodiversidad, migración, cambios en las pautas de comportamiento de la fauna debidas a la alteración del hábitat natural.
- ✘ Alteraciones sobre el suelo: pérdida de la capa vegetal, desestabilización de los suelos, erosión, derrumbes, desertificación, cambio en los usos del suelo, y por consiguiente, deterioro en la calidad física, química y biológica de este compartimento ambiental, modificación del paisaje.

Adicionalmente, los procesos de deterioro ambiental derivados de la minería del oro, están íntimamente relacionados con la falta de tecnologías apropiadas para la extracción y el procesamiento del mineral, lo cual causa pérdidas económicas y daños graves al ambiente, con mayor incidencia por parte de los pequeños mineros que no están en disponibilidad de invertir en el cuidado del ambiente.

La explotación de oro en minas frecuentemente origina reacciones químicas. Los compuestos que entran en contacto con el agua generando una reacción química dan como resultado final la acidificación del agua. Por otra parte, los drenajes mineros arrastran partículas de otros compuestos que aumentan la turbidez de las aguas receptoras alterando los procesos fotosintéticos de las plantas acuáticas especialmente en ambientes lacustres⁵⁰.

⁵⁰ PRIESTER, M. Heavy Metals Contents of Stream Sediments in a Gold Mining Area Near Los Andes, Southern Colombia. Technical and Ecological Perspectives. Pasto, CORPONARIÑO. 1992.



Tabla 1. Problemática de las Alteraciones Ambientales Ocasionadas por las Actividades Mineras.

Fuente: INGEOMINAS. 1999. ⁵¹

COMPONENTE AMBIENTAL	EFEECTO	INDICADORES
Atmósfera	-Alteración de la calidad del aire. -Generación de ruido ambiental	Olores, gases (SO ₂ , CO ₂), partículas sólidas, metales pesados en la atmósfera. Variación en el nivel de ruidos.
Aguas Superficiales	-Alteración de la calidad (pH, T, conductividad). -Sólidos en suspensión -Alteración de los caudales y cauces naturales	pH, O.D., DBO, DQO, metales pesados, componentes orgánicos, T, Sólidos en suspensión. Evapotranspiración, infiltración, escorrentía.
Aguas Subterráneas	Depresión acuífera, Calidad	Variación del nivel piezométrico pH, metales pesados y componentes orgánicos
Suelo	Destrucción directa Cambio usos suelo Contaminación Alteración de calidad edáfica Ocupación suelo con estériles y colas de beneficio	Superficie afectada ponderada por su calidad Rentabilidad potencial valorada monetariamente pH, sales Cambios en la categoría de la clase agrológica Metales pesados por lixiviación de minerales Cambios en el P ₂ O ₅ , H ₂ O, N ₂ , etc.
Hombre	Intoxicación Acumulación	No. consultas médicas Tiempo de incapacidad/Año No. pacientes con síntomas de intoxicación aguda o crónica por CN y MP No. pacientes con malformaciones genéticas por contaminación con MP Concentración de MP en sangre, cabello, riñones, hígado No. pacientes con altas concentraciones de MP (superan los límites permisibles)

Por lo anterior se debe realizar medidas de control y mitigación de los posibles efectos causados por las aguas residuales generadas durante la explotación aurífera y de esta manera evitar y/o minimizar los impactos ambientales generados por el inadecuado manejo de los vertimientos industriales en estas actividades y conseguir un tratamiento técnico adecuado de los mismos para lo cual es necesario desarrollar un plan de manejo ambiental teniendo en cuenta cada uno de los impactos ambientales potenciales identificados con énfasis en las aguas residuales generadas durante el proceso⁵².

⁵¹ INGEOMINAS. Atlas Nacional de Efectos ambientales Generados por la Actividad Minera con Énfasis en el Medio Físico. Bogotá, 1999.

⁵² GONZALEZ, L.M. & PRIETO G. Diagnóstico del Impacto Ambiental Ocasionado por la Minería del Oro en Colombia. INGEOMINAS. 1993.



En la industria aurífera, las fuentes potenciales de contaminación ambiental incluyen los siguientes sitios⁵³:

Tajos (open pits) y galerías.

- Pilas de lixiviación
- Escombros
- Colas

Estas áreas no son necesariamente controladas y en las mismas se encuentran contaminantes tóxicos que pueden filtrarse al medio ambiente. Los productos tóxicos asociados a estas áreas incluyen: cianuro, complejos metal-cianuro, metales pesados y drenajes ácidos de las rocas. A continuación se describen las principales problemáticas derivadas del proceso minero⁵⁴.

☀ Aguas superficiales y subterráneas²: el primer problema es la contaminación física y química durante la operación de la mina. La generación de drenajes ácidos, en cambio es un problema a largo plazo. Además de los desechos se pueden liberar a las aguas superficiales y subterráneas, reactivos químicos, como el cianuro de sodio. Las masas de roca explotada, las zonas deforestadas, los caminos abiertos, contribuyen a la generación de sedimentos y aumentan los sólidos totales en los cuerpos de aguas de superficie.

☀ Drenajes ácidos: se definen como los drenajes que se generan por la oxidación de los sulfuros contenidos en los minerales, a través de la exposición al aire y al agua, efecto que se produce naturalmente (drenaje ácido de las rocas: DAR), pero que se agrava y magnifica por el grado de molienda y remoción de cantidades enormes de rocas (drenaje ácido de las minas: DAM). Las soluciones ácidas pueden alcanzar las aguas superficiales o subterráneas de acuerdo a la hidrología del lugar. El potencial para la generación de ácido y la liberación de otros constituyentes (metales pesados) aumenta por la exposición de las rocas a la atmósfera (ambiente oxidante). El nivel de acidez también es influenciado por la presencia o ausencia de bacterias. *thiobacillus ferrooxidans* puede oxidar los metales que contienen sulfuros, conduciendo a una aceleración en la generación de

⁵³ EPA (U.S. Environmental Protection Agency) Technical Resource Document, Extraction and Beneficiation of Ores and Minerals, vol.2, GOLD, 1994.

⁵⁴ González, Silvia. Impactos ambientales y en la salud humana de la minería a cielo abierto para la extracción de oro utilizando lixiviación con soluciones de cianuro. 2005. Disponible en www.sospatagonia.net/firms.com



ácido. El potencial de generar ácido, así como la liberación de otros componentes, se incrementa en las unidades mencionadas en comparación a los minerales en su lugar original, debido a que las rocas son finamente molidas y presentan una gran superficie de partícula, y se encuentran además en un ambiente oxidante.

☀ Desagote en las minas: para permitir la extracción del mineral las minas superficiales o subterráneas requieren del bombeo de agua para desagotarlas, sin embargo al final de las operaciones el bombeo se interrumpe y las galerías y/o tajos se llenan de agua, produciendo una liberación no controlada de las aguas de la mina que pueden ser ácidas y contener metales, así como sólidos suspendidos y disueltos.

☀ Derrames de cianuro durante la operación: este tipo de incidente puede ocurrir durante el transporte o en las instalaciones de la mina por factores climáticos, movimiento de suelos o fallas en los equipos.

☀ Liberación de sustancias tóxicas luego del cierre: en los desechos de las minas, cuando concluyen las operaciones, permanecen una variedad de constituyentes que incluyen: cianuro residual, productos de su descomposición, principalmente cianatos y tiocianatos, metales pesados y sulfuros. La generación de ácido (DAM) puede movilizar metal pesado y arsénico que causan degradación del suelo y contaminan las aguas. Los perjuicios son tanto causados por los residuos regulados por la legislación como por los excluidos de la misma y se dan a través de todas las regiones, en una dilatada variedad de zonas climáticas, así como de zonas geológicas, y en medio rurales.



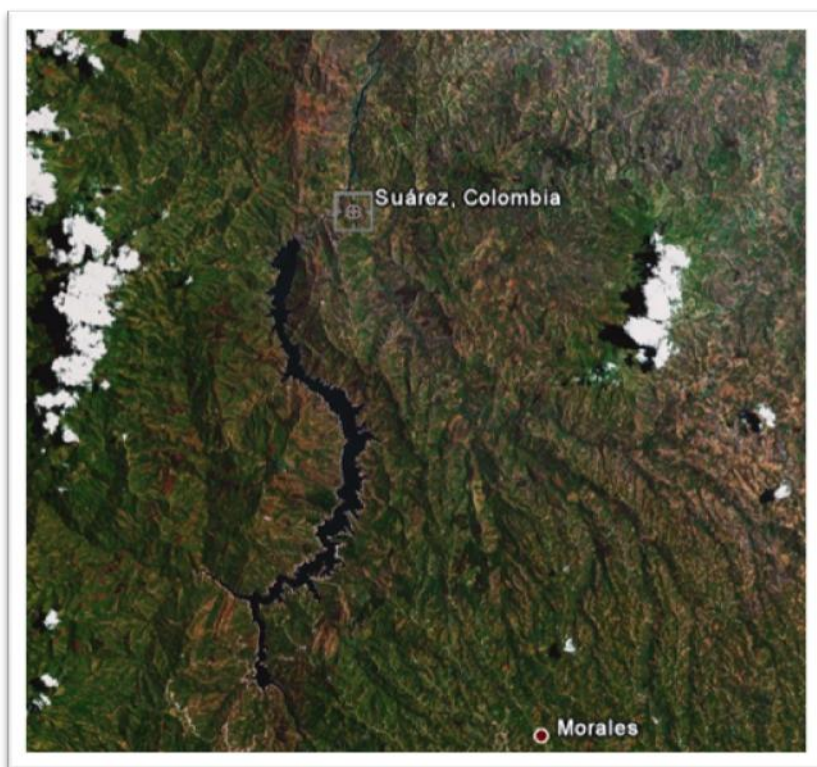
2.8 INDUSTRIA EVALUADA

2.8.1 Generalidades

Para la realización de los cinco ensayos definitivos, se tomaron los vertimientos industriales de la empresa Centro de Desarrollo Productivo - CDP-. Ver tabla 2.

El Centro de Desarrollo Productivo -CDP- se encuentra ubicado en el Municipio de Suárez, Departamento del Cauca. En este lugar, se adelanta el proceso de beneficio de oro, el cual se hace mediante cianuración del material extraído en minas como: El Tamboral y La carolina, entre otras, ubicadas en del sector de la Vereda Gelima. Ver ilustración 14.

Ilustración 14. Ubicación del Centro de Desarrollo Productivo –CDP



Fuente: Google Earth, 2009.



Ronda del Rio Cauca y a la altura del Municipio de Suárez.

Fuente: Autoras, 2009.



Centro de Desarrollo Productivo -CDP- lugar donde se lleva a cabo Beneficio de Oro

Fuente: Autoras, 2009.



Embalse de la Salvajina- Río Cauca (alimentado aguas arriba del Beneficiadero de Oro)

Fuente: Autoras, 2009.

Tabla 2. Datos industria evaluada

Nombre y razón social	Centro de Desarrollo Productivo -CDP-
Propietario	Petrocol Holding
Representante Legal	Yara Martínez Mor
Ubicación	Vereda Gelima Corregimiento de la Toma Municipio de Suárez- Cauca
Actividad Desarrollada en la Planta	Beneficio de oro
Tiempo de funcionamiento	12 horas/día
Sistema de abastecimiento de agua	Concesión micro cuenca los Tumbacos

Fuente: autoras, 2009



2.8.2 Descripción del proceso de extracción de oro

Una vez recolectado el material minero se procede a la realizar el proceso de extracción de oro. A continuación se establecen los procesos a los cuales son sometidos los materiales mineros para el respectivo aprovechamiento: (ver ilustración 15 y 16)

- ✓ Proceso de extracción de oro libre, proceso físico
- ✓ Proceso de extracción de oro libre, proceso químico – Cianuración

Ilustración 15. Proceso de extracción de oro libre, proceso físico



El material o “mina”, explotado en la zona de minería, es seleccionado y luego, en lonas, es transportado al Centro de desarrollo Productivo - CDP -



Se estima que cada lona contiene material suficiente para extraer entre 1.0 a 1.5 gr de oro, dependiendo de la mina donde se haga la explotación



el material es sacado de las lonas y dispuesto en la trituradora de martillo para hacerlo más fino



Trituradora de martillo, el material es pasado por este dispositivo para reducir , aun más, su tamaño



Material triturado. Por carreteo es dispuesto en los barriles de molienda.



Los barriles presentan una dimensión de 50 cm de diámetro con 45 cm de altura equivalente a 0.353 m^3 cada uno. El centro minero cuenta con diez de estos barriles los cuales suman un total para triturado de 3.5 m^3



Dentro de los barriles se encuentran bolas de manganeso que ayudan al proceso de molienda del material seco previamente triturado



Para la trituración, en cada barril de molienda, se adicionan 10 litros de extracto de limón concentrado con 30 litros de agua. El extracto de limón se adiciona para eliminar las grasas del material de minería. La frecuencia de llenado de los barriles es de 3 a 4 veces por día



De vez en cuando se utiliza un triturador primario que cumple una función similar a la de 10 barriles de molienda. La trituración en estos barriles se realiza por un tiempo de 2 a 3 hora y se usa también las bolas de manganeso



Una vez realizada la molienda, descrita anteriormente, se adiciona el material hacia un lavador automático o pachuca cuyo sistema alimenta constantemente con agua para generar presión y de esta manera restirar sólidos inertes y recuperar material rico conocido como oro libre



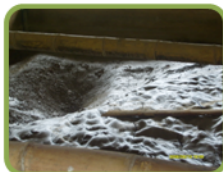
El mineral inerte, arenas y lodos, con agua y ácido residual se conduce hacia el canal de carreteo el cual cuenta con varios retenedores o vertederos que retienen sedimentos para ser extraídos y retornados al proceso de molienda lo anterior con el fin de aprovechar cualquier extracción de oro adicional de los residuos generados



Luego de pasar por los canales de de carreteo el agua es conducida a tanques sedimentadores para recolectar lodos y arenas con material rico para aprovechamiento mediante el proceso de cianuración. Este proceso es realizado en tres tanques ubicados en línea



En el cuarto y quinto tanque construido, se recolecta sedimentos que son utilizados para la elaboración de ladrillo.



Los lodos recolectados de los primeros tres tanques de sedimentación son almacenados en un sitio para ser procesados para la extracción de oro mediante el método de cianuración.



El lavado automático también es remplazado por la mesa concentradora. Esta mesa es un aparato de concentración gravimétrica con flujo laminar sobre una superficie inclinada. Aquí se habla principalmente de los tipos con movimiento longitudinal vibratorio donde las partículas de mineral se diferencian formando bandas en abanico según su peso específico y granulometría.

Fuente: Visita técnica realizada por las auroras al Centro de Desarrollo Productivo -CDP-, junio de 2009.

Una vez obtenida la filtración completa como primer paso y almacenadas en los tanques con cianuro, se procede a la titulación para determinar la concentración de cianuro en el tanque.

Debido a que existen reacciones en la primera etapa del oro con el cianuro, la concentración del cianuro se reduce y es necesario aumentarla a los rangos óptimos para la lixiviación respectiva; así mismo es necesario siempre verificar que el pH se encuentre entre 10 y 11 unidades para evitar que el cianuro se convierta en HCN, el cual afectaría el proceso. Una vez realizado el chequeo de concentraciones óptimas y niveles de pH adecuados, mediante bombeo se descargan nuevamente las aguas del tanque con cianuro hacia las cuatro pilas con las arenas ricas.

El proceso continua siendo el mismo. La recirculación de la solución de cianuro termina cuando la concentración de éste se mantiene constante después de haberlas pasado por las arenas. Indicando que ya no existe oro. Las aguas cianuradas quedan almacenadas en los tanques para realizar una segunda agitación. No se realizan descargas de aguas cianuradas hacia el sistema de tratamiento de aguas residuales.



Ilustración 16. Proceso De Extracción De Oro, Proceso Químico-Cianuración



Luego de la recolección de sedimentos de los tres primeros tanques de tratamiento, estos son extraídos hacia la zona de secado y almacenaje de arenas.

el material recolectado de los primeros tanques de sedimentación es dispuesto en una tina o tanque de agitación en forma de cilindro y el fondo de manera conica. El tanque presenta un volumen de 4500 Litros.



En la tina o tanque de agitación se adicionan 3000 litros de agua, 5 toneladas de arena recolectada de los tanques sedimentadores, y se añade 1 litro de peróxido de hidrogeno con 20 kilogramos de cal; lo anterior con el fin de oxidar compuestos cianídicos y sulfuros, preparando las arenas para que el proceso de cianuración se realice adecuadamente. La cal es necesaria con el fin de lograr las reacciones de oxidación apropiadas, en este caso es recomendable que el pH, se encuentre entre 9 y 11 unidades.



Se realiza la respectiva agitación continua durante dos horas y se retiene en el tanque tres horas más para que el proceso de decantación se realice completamente. Una vez terminada la decantación en la tina, se procede a la descarga del agua residual hacia los tanques sedimentadores o sistema de tratamiento de aguas residuales, reteniéndose las arenas para cianurar.



Se procede al juagado, una vez descargadas las aguas residuales con subproductos oxidados por el peróxido de hidrogeno. Se adiciona agua limpia, se realiza nuevamente una agitación de duración aproximada de 40 minutos y estas son descargadas en su totalidad con todas las arenas sobre las pilas de cianuración que en total son cuatro. Lo anterior con previa titulación para verificación que el peróxido de hidrogeno no continúe en las arenas con el fin de que no afecte el proceso.



Las pilas de cianuración presentan un fondo de arena con placa en guadua, encargados de retener el material rico y filtrar aguas del juagado del tanque de agitación. Las aguas filtradas son conducidas al sistema de tratamiento. Estas no presentan ninguna sustancia de interés sanitario.

Las arenas retenidas en los tanques para cianurar una vez secadas se preparan para la cianuración



Una vez titulada los tanques de cianuro y verificados los rangos de concentración adecuados para la extracción del oro, se procede al bombeo de cianuro a las cuatro pilas con arenas que contienen material rico. La altura a la cual se llenan las pilas corresponde a 70 cm con un largo por ancho de 3 m por 3 m. Los tanques de cianuro deben encontrarse en una concentración de 1.7 a 3 kg/m³ y un pH de 10 a 11 unidades para procedes a la dosificación en las arenas.



Esta solución se deja filtrar sobre las arenas, por el cual empiezan a existir reacciones químicas del cianuro con el oro.



El agua filtrada es conducida hacia un canal el cual presenta viruta de zinc, el cual se encarga de precipitar los compuestos obtenidos de la reacción del oro y cianuro. Sin embargo, debido a que las precipitaciones no pueden ser realizadas totalmente con el primer paso del agua filtrada, estas son almacenadas nuevamente en los tanques con cianuro.

Fuente: Fuente: Visita técnica realizada por las auroras al Centro de Desarrollo Productivo -CDP-, junio de 2009.



Las arenas secas con material inerte que se encuentran en las pilas antes de ser descargadas hacia una zona de almacenamiento, son tratadas mediante el método de detoxificación por oxidación mediante peróxido de hidrogeno e hipoclorito de sodio.

2.8.3 Proceso De Detoxificación Por Oxidación De Arenas Secas Cianuradas, Tratamiento De Arenas Cianuradas

Con el fin de evitar que el almacenamiento de las arenas secas con material inerte que han pasado por el proceso de cianuración para extracción del oro, mediante las aguas lluvias, arrastren aguas con cianuro, se procede a realizar el método de detoxificación por oxidación mediante peróxido de hidrogeno e hipoclorito de sodio.

Ilustración 17. Preparación de las pilas de arena para el proceso de detoxificación.



Fuente: autoras, 2009

Luego de terminar con el proceso de cianuración, las aguas residuales son filtradas y almacenadas en el tanque para el repetir el proceso, mientras las arenas inertes son secadas en las pilas por un tiempo de retención de 12 a 24 horas.



A parte, en un tanque de capacidad de 2000 litros, se realiza la dosificación respectiva de peróxido de hidrogeno e hipoclorito de sodio. Solución que, mediante bombeo, es evacuada, por aserción, hacia las cuatro pilas de cianuración por el cual se inicia el proceso de detoxificación de arenas, tal como se puede observar en la ilustración 18.

Ilustración 18. Tanque y red de dosificación de peróxido de hidrogeno e hipoclorito de sodio



Fuente: autoras, 2009

Los oxidantes, son filtrados por las arenas y conducidos nuevamente hacia el tanque de 2000 litros.

Una vez almacenado el volumen total dosificado de peróxido de hidrogeno e hipoclorito de sodio, se procede a la titulación para la detección de cianuro. Una vez que no se encuentre concentración de dicho compuesto se termina el proceso, en caso contrario, se realiza la respectiva recirculación. Es de anotarse que no existen descargas de aguas residuales o de subproductos de los oxidantes con el cianuro.

La transformación del cianuro es completa mediante el método de oxidación por lo anterior los subproductos obedecen a nitratos, nitritos, y amoniacos, y en algunos casos el ion cianurato. El agua con oxidantes queda retenida en el tanque para una posterior limpieza de arenas.

Siempre se verifica que el peróxido de hidrogeno e hipoclorito de sodio mantengan las concentraciones óptimas para el proceso de oxidación. Una vez que no se encuentre cianuro en el tanque de 2000 litros, se termina el proceso, y las arenas quedan retenidas para el proceso de secado antes de ser evacuadas a la zona de almacenamiento.



Ilustración 19. Arenas limpias para la elaboración de ladrillos.



Las arenas limpias son almacenadas para la
elaboración de ladrillo



Fuente: autoras, 2009



3. MARCO LEGAL

En la concepción clásica del problema de la contaminación del agua, se considera a los ríos como los receptores naturales de las aguas residuales y de los contaminantes que estos acarrearán. Las cargas o concentración de contaminantes y nutrientes constituyen el objeto de regulación por parte de leyes, decretos y normas, para establecer la calidad del agua adecuada para los diferentes usos. La legislación colombiana pertinente está en el decreto 1594 de 1984.

En el artículo 20 del decreto 1594/84 se considera el cianuro como sustancia de interés sanitario. El valor de la concentración de cianuro en los requerimientos de pre tratamiento de aguas residuales industriales es de 100 mg/L El Decreto 1594 de 1984, establece criterios de calidad para clasificación de fuentes de aguas de acuerdo con su uso. En el caso del cianuro se encuentra: ⁵⁵

- ✚ Consumo humano y doméstico con tratamiento convencional: 0.2 mg CN/L
- ✚ Consumo humano y doméstico con desinfección: 0.2 mg CN/L

Tabla 3. Valores límites permisibles para cianuro

Condición	Valor máximo permisible(mg/L)
Agua para consumo humano y domestico (art.38, 39)	0.2
Preservación de flora y fauna (art. 45)	0.05
Vertimientos (art. 72)	1.0

Fuente. Decreto 1594/1984. Ministerio de Agricultura

⁵⁵ROMERO ROJAS, Jairo Alberto. Tratamiento de aguas residuales por lagunas de estabilización. Primera Edición. Bogotá. Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería. 1999.



3.1 Decreto 1594 del 26 de junio de 1984

El Decreto 1594 de 1984, reglamenta los usos del agua y el manejo de los residuos líquidos. Este decreto se designa como vertimiento líquido a cualquier descarga líquida hecha a un cuerpo de agua o a un alcantarillado, como sustancias de interés sanitario a diferentes contaminante entre los que se encuentran el cianuro.

ARTICULO 20. Considérense sustancias de interés sanitario las siguientes:

Tabla 4. Sustancias de interés sanitario.

Arsénico	Cobre
Plomo	Cromo
Bario	Benceno
Selenio	Mercurio
Cadmio	Bencidina
Acenafteno	Níquel
Cianuro	Tetracloruro de Carbono
Acroleína	(Tetraclorometano)

Fuente: Decreto 1594/84, artículo 20

ARTICULO 45. Los criterios de calidad admisibles para la destinación del recurso para preservación de flora y fauna, en aguas dulces, frías o cálidas y en aguas marinas o estuarinas son las siguientes:

Tabla 5. Los criterios de calidad admisibles de Cianuro

Referencia	Expresado como	VALOR		
		Agua fría dulce	Agua cálida dulce	Agua marina y estuarina
Cianuro	CN ⁻	0.05 CL ⁹⁶ ₅₀	0.05 CL ⁹⁶ ₅₀	0.05 CL ⁹⁶ ₅₀

Fuente: Artículo 45, decreto 1594 de 1984



ARTICULO 72. Todo vertimiento a un cuerpo de agua deberá cumplir, por lo menos, con las siguientes normas:

Tabla 6. Normatividad de vertimiento

Parámetro	Norma
pH	5 a 9 unidades
Temperatura	< 40° C.
Material flotante	Ausente
Grasas y aceites	Remoción >80% en carga
Sólidos suspendidos, domésticos o industriales	Remoción >80% en carga
DBO ₅ para desechos domésticos	Remoción >80% en carga
DBO ₅ para desechos industriales	Remoción >80% en carga

Fuente: Artículo 72, Decreto 1594 de 1984.

ARTICULO 74. Las concentraciones para el control de la carga de las siguientes sustancias de interés sanitario, son:

Tabla 7. Sustancias de interés sanitario.

Sustancia	Expresada como	Concentración (mg/L)
Cianuro	CN ⁻	1.0

Fuente: Artículo 74, Decreto 1594 de 1984.



3.2 RESOLUCIÓN 2115 DE 2007

ARTÍCULO 5. *Características químicas de sustancias que tienen reconocido efecto adverso en la salud humana.* Las características químicas del agua para consumo humano de los elementos, compuestos químicos y mezclas de compuestos químicos diferentes a los plaguicidas y otras sustancias que al sobrepasar los valores máximos aceptables tienen reconocido efecto adverso en la salud humana, deben enmarcarse dentro de los valores máximos aceptables que se señalan a continuación:

Tabla 8. Características químicas que tienen reconocido efecto adverso en la salud humana

Elementos, compuestos químicos y mezclas de compuestos químicos diferentes a los plaguicidas y otras sustancias	Expresados como	Valor máximo aceptable (mg/L)
Cianuro libre y disociable	CN-	0,05

Fuente: Resolución 2115 DE 2007, artículo 5.



4. METODOLOGÍA

A continuación se describe la forma como se realizó el proyecto de investigación, el diseño experimental, como se preparó el agua libre de cloro, como se realizó el mantenimiento de los peces, pruebas de sensibilidad, las pruebas de toxicidad preliminar y definitiva.

4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Este método consiste en la exposición de organismos representativos en la cadena trófica como la “Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*)”, a varias concentraciones de Dicromato de potasio; para determinar la sensibilidad del organismo vivo, concentraciones de cianuro (CN⁻) y concentraciones del vertimiento de la industria aurífera con contenido de cianuro para un periodo de 96 horas en las condiciones que mas adelante nombraremos en forma detallada.

Este método determina el efecto agudo en la trucha arco Iris ante la presencia de la sustancia tóxica (CN⁻), contenidas en las aguas industriales de la industria aurífera y permite obtener un límite o cantidad máxima CL₅₀₋₉₆ de CN⁻ en la prueba; que pueden soportar dichos organismos.

Para ello tendremos en cuenta las siguientes variables:

- **Variable independiente:** La variable que se manejo como independiente durante la realización de las pruebas de toxicidad fue la concentración de las sustancias de interés (Dicromato de potasio), buscando establecer un efecto sobre una determinada población en donde todas las unidades experimentales son homogéneas.
- **Variable dependiente:** Se manejo como variable dependiente la concentración letal media del cianuro en un tiempo de exposición de 96 horas, dado que éste resultado depende de los efectos del ión tóxico del CN⁻ presente en los organismos de prueba.
- **Constantes:** Permanecieron constantes los organismos empleados en cada ensayo (5 alevinos de trucha por pecera), tiempo de exposición (96 horas) y los parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH y oxígeno disuelto). Estos parámetros fueron controlados con el fin de cumplir con los protocolos internacionales, validados para éste tipo de ensayo.



4.2 MÉTODO DE EJECUCIÓN DE LAS PRUEBAS DE TOXICIDAD AGUDA

Los bioensayos se efectúan con muestra única, cuando son realizados con una sustancia química o con una muestra de agua, la cual se utiliza para producir diversas diluciones que se examinan en el ensayo. El tiempo de duración del bioensayo para evaluar la toxicidad aguda no debe exceder de 96 h.

El método esta conformado por dos ensayos tal como se describe a continuación:

Ensayos Preliminares: estos ensayos permiten determinar el intervalo de toxicidad de la muestra o sustancia que se está evaluando. Son por lo regular de corta duración, mínimo 24h y máximo 48h. Todos los montajes deben ser realizados por triplicado, en las siguientes diluciones: 0.01%, 0.1%, 1%, 10% y 100%.

Para este caso, así como para los ensayos definitivos se debe incluir un blanco, en el que se utilice la misma cantidad de organismos pero únicamente en agua de dilución, con el fin de tener una referencia sobre la salud y estado de los organismos evaluados.

Ensayos Definitivos: de los ensayos preliminares se obtiene la CL_{50} preliminar. Una vez establecido el intervalo de la concentración letal, se procede a efectuar el ensayo definitivo, el cual debe ser realizado utilizando diferentes dosis (5 para este caso) dentro del intervalo de concentraciones tóxicas detectadas en los ensayos preliminares.

Este ensayo se evalúa a las 96 h de exposición. Por ningún motivo se debe permitir una mortalidad superior al 10% en los recipientes control o blancos, si esto llega a suceder, el ensayo debe repetirse.

Tanto en las pruebas preliminares como las definitivas, se utilizaron cinco (5) organismos por recipiente, de acuerdo con lo establecido en los protocolos propuestos por CETESB. Así, se usaron baterías de cinco concentraciones más el blanco o control negativo y cuatro réplicas por ensayo con un total de 24 recipientes por prueba toxicológica, 120 organismos por montaje y 20 organismos por concentración, tal como se muestra en la ilustración 20.



Ilustración 20. Montaje del test general de ensayos

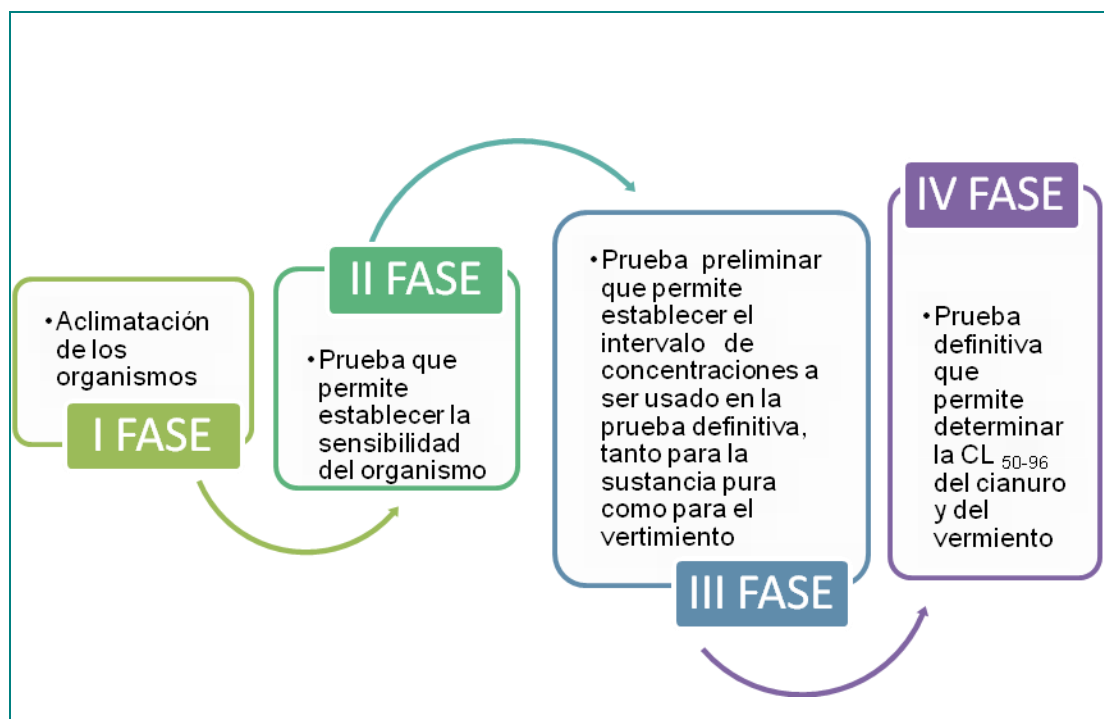


Fuente: Las autoras, 2009.

El método se ejecuta en cuatro fases: Ver ilustración 21.



Ilustración 21. Fases de las pruebas de toxicidad aguda



Fuente: autoras, 2009

Una vez obtenidos los resultados de las pruebas definitivas se realizó el análisis *Probit* para la obtención de la respectiva CL_{50-96} para el cianuro, para las pruebas de sensibilidad, para las de vertimiento crudo y las de vertimiento tratado. Este método se utilizó ya que en el análisis se trabajan con rangos de mortalidad entre el 0 y el 100%. Para la determinación de la CL_{50-96} , se utilizó el protocolo LBP05 “Análisis De Regresión y Análisis *Probit*”; 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; con lo cual es entonces posible ensayar si ciertos factores producen resultados significativos diferentes de las variables ensayadas. En nuestro caso, se realizó para determinar si existían o no, diferencias significativas en las mortalidades de los diferentes tratamientos. Con este fin se desarrollo el protocolo LBP06 “Análisis de Varianza”.



4.2.1 Fase de Aclimatación

Para iniciar la investigación con alevinos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), es necesario contar con unas condiciones óptimas en los acuarios que van a servir de hábitat para los peces durante el periodo de prueba.

Para contar con estas condiciones se deben tener en cuenta parámetros básicos para que los alevinos sobrevivan antes de la realización de las pruebas. Estos parámetros son: pH el cual se debe encontrar en un rango que oscile entre 6.5 y 7.5 unidades, Oxígeno Disuelto (O.D) el cual no debe ser inferior a 6 p.p.m. y manejar una temperatura menor a 18 °C ya que los alevinos son de clima frío. Estos rangos de pH, Temperatura y O.D. son posibles de obtener mediante la aireación y eliminación del cloro del agua en los acuarios en un tiempo mayor a 72 horas (previo a la introducción y aclimatación de los peces). Ver ilustración 22.

Ilustración 22. Acuarios utilizados en la aclimatación de los organismos de prueba



Adecuación de los acuarios. Rangos de pH, Temperatura y O.D. son posibles de obtener mediante la aireación y decoloración del agua en los acuarios en un tiempo mayor a 72 horas (previo a la introducción y aclimatación de los peces).

Fuente: Las autoras, 2009.

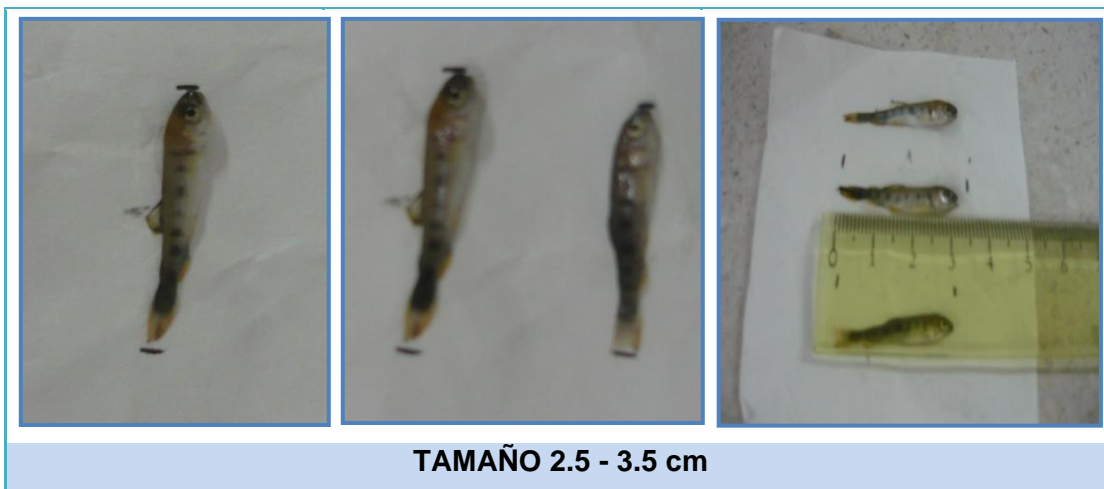
Durante este tiempo se deben monitorear constantemente los parámetros anteriormente mencionados para garantizar las mejores condiciones en el momento de la introducción de los peces en los acuarios. El oxígeno disuelto necesario es obtenido mediante la implementación de aireadores de doble salida ubicados de forma organizada en el acuario y se garantiza



manteniendo bajas temperaturas ya que a menor temperatura, mayor oxígeno disuelto.

Los peces utilizados en las pruebas fueron suministrados por la empresa Acuagranja Ltda. Se traen en bolsas de polietileno calibre tres de 100 x 40 cm a las que se le agregaron un promedio de 250 alevinos por bolsa de 2,5 – 3,5 cm de tamaño y 15 días de nacidos, con oxígeno para transportarlos en adecuado estado de salud. (Ver ilustración 23). Los alevinos se aclimataron en 2 acuarios de 130 litros, éstos se llenaron con ocho días de anticipación, con el fin de bajar las concentraciones de cloro residual presente en el agua, además se emplearon aireadores para lograr la cantidad necesaria de oxígeno disuelto y se llevó un control de la temperatura, oxígeno disuelto y pH del agua, obteniendo los siguientes valores OD: 6.4 mg/l, T: 17 °C y pH: 7.2 Unidades.

Ilustración 23. Tamaño de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* utilizada en los bioensayos.



Fuente: autoras, 2009.

Una vez los peces estén en el lugar donde se realizarán las pruebas (laboratorio de Bioensayos de la Universidad de la Salle, sede centro de Bogotá D.C.), se deben introducir las bolsas donde se trasladaron los alevinos de trucha arcoíris (desde su lugar de compra hasta el laboratorio) al agua previamente aireada. Este paso se realiza con el fin de igualar la temperatura del medio donde vienen (bolsa) con la de las peceras donde serán depositados por un periodo mayor a una hora y media para la aclimatación de los alevinos. (Ver ilustración 24).



Ilustración 24. Aclimatación de los organismos de prueba (Truchas arco iris *Oncorhynchus mykiss*)



Transcurrido el periodo mencionado, se introducen los peces en pequeños grupos sin verter el agua donde vienen en el acuario adecuado para ver su evolución y posteriormente la totalidad de los mismos teniendo en cuenta que no se deben saturar las peceras para evitar que se consuma rápidamente el oxígeno disuelto presente. (Ver ilustración 25).

Según los protocolos internacionales (CETESB), los peces deben permanecer en los acuarios 15 días antes de ser realizadas las pruebas. Deben desecharse los individuos con malformaciones, aceptándose una mortalidad del 5% de la población. Cuando la mortalidad de la porción está entre 5% y 10%, verificar las posibles causas y, si es necesario, someter el pez al tratamiento para el uso subsecuente.

El alimento puede ser obtenido en casas de acuario en forma de pellets siendo importante conocer la proporción de su componente principal. La cantidad recomendada para los peces juveniles es del 5% al 7% de alimento diario respecto del peso corporal. El alimento de los organismos debe interrumpirse 24 horas antes de la prueba para que los procesos digestivos de los peces no alteren los resultados de las pruebas.



Ilustración 25. Introducción de los peces a los acuarios



Fuente: Las autoras, 2009.

Durante el proceso de aclimatación, los acuarios deben ser limpiados por medio de una aspiradora, para remover las eses de los peces y el exceso de comida presente en el agua, esto para evitar que el amonio generado en las eses produzca la muerte de los alevinos de trucha arco iris, es importante anotar que en el caso de que los peces presenten hongos en su cuerpo, se debe aplicar unas gotas de azul de metileno, para prolongar la vida de los organismos. La metodología de esta fase se observa en la figura 1.



4.2.1.1 Preparación agua libre de cloro

Para mantener condiciones de los organismos de prueba en el laboratorio, se prepara agua libre de cloro según metodología CETESB, protocolo (LBP01) y realizar las pruebas de toxicidad bajo condiciones de laboratorio, dando a esta investigación características del medio controladas, para regular la aclimatación sin que se presenten alteraciones.

Mientras dura este proceso de aclimatación de los alevinos, se va preparando el agua de dilución en un tanque de aproximadamente 1 m³ donde se va oxigenando y decolorando agua (mediante bombas) para su previa utilización en las pruebas de sensibilidad y de toxicidad. Esta etapa debe cumplir igualmente con los parámetros indicados anteriormente y el tiempo debe ser mayor a 4 días. Esto se realiza con el fin de llegar a una concentración de oxígeno disuelto por encima de los 6 mg/L y un pH de 6.5 – 7.5 unidades. Ver tabla 10.

El agua de dilución que se prepara en este tanque es utilizada para las pruebas en las 24 peceras de 2,5 L cada una. Se realiza esta operación para garantizar la presencia de Oxígeno en el momento de realizar las pruebas y así garantizar que la mortalidad de los peces se debe exclusivamente a el efecto del tóxico en los alevinos y no por razones distintas. Finalmente, después de cada prueba se debe lavar muy bien cada acuario y las 24 peceras para iniciar nuevamente el proceso para las pruebas que siguen. Esta primera fase será realizada en el Laboratorio de Bioensayos de la Universidad de la Salle, el cual cuenta con las condiciones adecuadas, materiales y el espacio necesario.

Tabla 9. Parámetros de control de las condiciones del agua

Método según el Standard métodos	Parámetros de Control	Rango
Electrodo de membrana	pH	6.5 y 7.5 unidades
Electrométrico	O.D	mayor a 6 mg /L
Laboratorio y de campo	T°C	menor a 18 °C

Fuente: APHA-AWWA-WPCF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Ed 20. 2005.



El agua utilizada para la manutención de los peces y la preparación de las soluciones en los test de toxicidad debe ser aireada por un tiempo de 48 horas hasta alcanzar un 80 % de saturación, el tiempo recomendado para volúmenes de 50 a 100 litros es de 4 días en promedio.

Se verifico el oxigeno disuelto con valores de 5.5 y 7.5 mg/l de O_2 , la temperatura oscilo entre 16 y 18°C y pH entre 6.0 a 8.0 unidades cumpliendo con los parámetros establecidos por los protocolos de CETESB L5.019-I. (Ver ilustración 26).

Ilustración 26. Preparación del agua de solución



Fuente: las autoras, 2009



Figura 1. Fase de aclimatación de los organismos de prueba

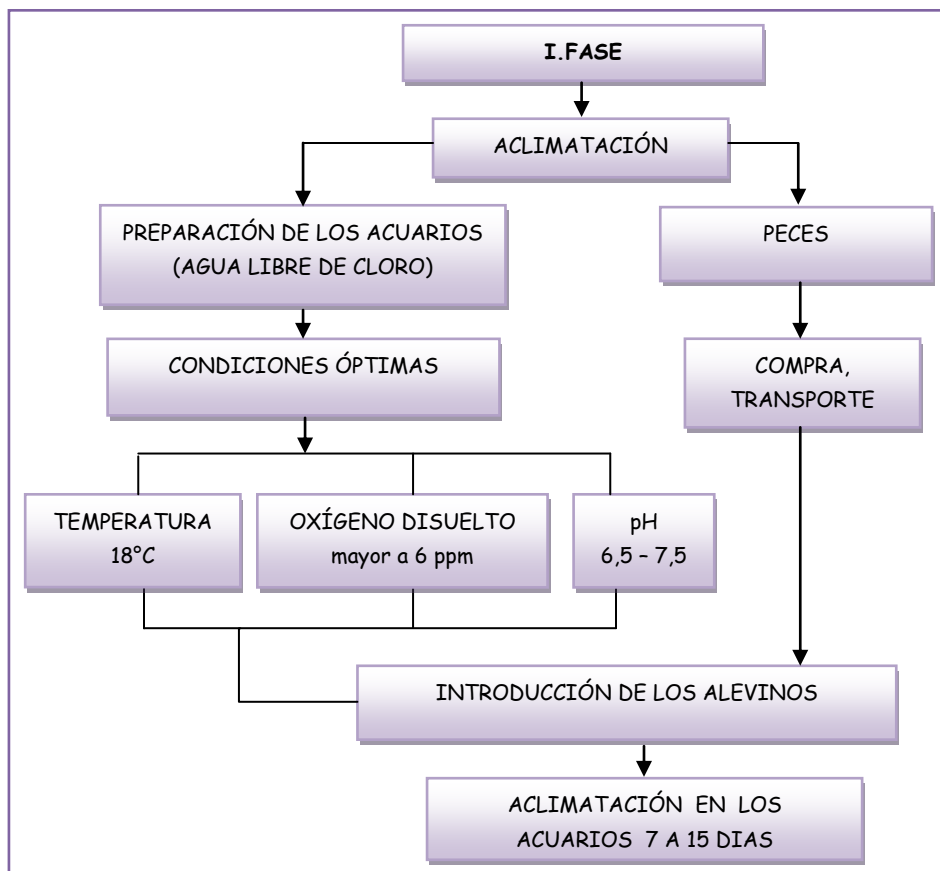


Diagrama elaborado por: Las autoras

4.2.2 Fase de pruebas de toxicidad

En esta fase de la investigación, se da a conocer la preparación de las soluciones, realización de las pruebas de sensibilidad con Dicromato de potasio, se emplea esta sustancia como referencia, ya que es una unidad de prueba en la cual se espera de antemano obtener una respuesta positiva, es decir efectos letales y subletales sobre el organismo, pruebas toxicológicas con cianuro y finalmente las pruebas realizadas con vertimientos industriales con presencia de cianuro.

En las pruebas de toxicidad se emplearon alevinos de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, con un tamaño de 2.5 a 3.5 cm, un peso aproximado de 1 gr. y 15 días de nacidos. Los ensayos fueron montados en baterías, utilizando un diseño experimental de cinco concentraciones por cuadruplicado y un control, dispuestos en estantes de 70 X 30 cm con seis entrepaños, para la realización de la prueba se emplearon 24 peceras de 4L



distribuidas por filas de 4 peceras por cada entrepaño. La primera fila de la batería fue utilizada para la prueba del blanco o control y cada una de las filas restantes representaba una concentración diferente, con el fin de determinar el rango de la (CL_{50-96}). Las concentraciones se disponen de menor a mayor, siendo la menor la que está debajo del blanco y la mayor la última de la fila del estante, tal como se puede observar en el protocolo **LBP03, LBP04** del anexo E.

4.2.2.1 Preparación de soluciones

El laboratorio debe estar dotado de todas las facilidades propias de este tipo de ensayos, es decir, debe tener un sistema de aire acondicionado que permita mantener constante la temperatura en un intervalo de 24 – 26 °C, adicionalmente debe poseer iluminación. El laboratorio debe mantener una disponibilidad permanente de agua libre de cloro y agua destilada.⁵⁶(Ver ilustración 27). Las pruebas de toxicidad se realizaron según la metodología CETESB (L5.019), con el fin de exponer individuos de 15 días de nacidos a diferentes porcentajes de dilución de una sustancia de interés sanitario o de un vertimiento, para determinar la **CL₅₀**, en un tiempo de 96 horas.

Ilustración 27. Materiales



Fuente: autoras, 2009

⁵⁶ ICONTEC. GUÍA TÉCNICA COLOMBIANA. Gestión ambiental. Agua. Guía para la realización de ensayos de toxicidad en organismos acuáticos. Ministerio de Desarrollo Económico.



MATERIALES Y REACTIVOS

- ✦ Balanza analítica
- ✦ Vidrio de reloj
- ✦ Espátula
- ✦ Balón aforado de 1000 ml
- ✦ Balón aforado de 500 ml
- ✦ Balón aforado de 250 ml
- ✦ Pipeta de 10 ml
- ✦ Pipeta de 1 ml
- ✦ Pipeteador
- ✦ Agua destilada
- ✦ Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)
- ✦ Cianuro de sodio (NaCN)

Los reactivos se adquirieron en el laboratorio de ingeniería ambiental de la universidad de la Salle. La ficha técnica del cianuro se puede observar en el anexo A.

Ilustración 28. Reactivos utilizados en las pruebas toxicológicas



Fuente: autoras, 2009

La vidriería a ser utilizada en pruebas de toxicidad debe ser previamente lavada con soluciones adecuadas para la remoción de contaminantes y enjuagar con agua destilada. Para reutilizar la vidriería en las pruebas de



toxicidad debe lavarse con detergente para implementos de laboratorio (en este caso se utilizó extran®) y enjuagarse con agua del grifo.

La preparación de sustancias puras para pruebas de sensibilidad con Dicromato de potasio y de toxicidad Cianuro, se realizó como se describe a continuación.

● **Dicromato de Potasio**

Al implementar los test de toxicidad, se hace necesario efectuar su estandarización que consiste en establecer la sensibilidad de la especie y la reproducibilidad del experimento frente a un tóxico de referencia, en este caso Dicromato de potasio K₂Cr₂O₇.

Para la prueba de sensibilidad se preparó una solución de 1000 ppm del tóxico de referencia, dicromato de potasio, K₂Cr₂O₇. Las diluciones tanto para dicromato como el cianuro se realizaron según la ecuación de dilución.

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

(Química general de whitten) Ecuación de dilución

Donde

V = Volumen

C = Concentración

Una vez conocido el rango de concentraciones determinado por las investigaciones hechas anteriormente en la universidad de la Salle (MATIAS, Carolina, 2008), se prepararon concentraciones de Dicromato de potasio (20, 40, 60, 80, 100 ppm). Las diferentes diluciones de dicromato de potasio se prepararon con agua libre de cloro y con una solución patrón preparada a 1000 ppm, almacenadas y refrigeradas en frascos de 500 ml.



● **Cianuro**

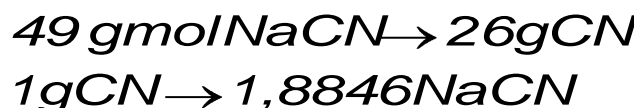
Para la solución patrón del toxico se utilizó cianuro de sodio (NaCN). La cantidad de cianuro presente se determinó de la siguiente manera:

Na=23g-mol

CN=26 g-mol

NaCN=49g-mol

Se determina la cantidad de cianuro de sodio necesario para obtener un 1g de CN en la solución que se va a preparar.



Las soluciones para las pruebas preliminares y definitivas son preparadas, disolviendo una cantidad conocida del agente tóxico, en el volumen definido para la solución, para este caso es de dos (2) litros.

Test preliminar: Para estas diluciones, se toman los siguientes rangos de concentración según metodología CETESB y comparando con la norma Decreto No. 1594 de 1984 según el máximo permisible de esta sustancia:

[0,01ppm]; [0,1ppm]; [1ppm]; [5ppm]; [10ppm].

Test definitivo: se prepararon soluciones dependiendo del rango de concentraciones arrojado por el test preliminar, en donde se presentara de un 35% hasta un 100% de mortalidad.

● **Vertimiento**

Test preliminares y definitivos: Antes de la realización del test preliminar y/o definitivo, al agua del vertimiento se le modificaron algunas características fisicoquímicas como: aumento del oxígeno disuelto, disminución de sólidos y ajuste del pH, esto para corroborar que el efecto tóxico fue producido por un agente químico, en este caso el cianuro, y no por las constantes que se manejan en la prueba toxicológica. Se preparan las soluciones en porcentajes para ser utilizados en las pruebas preliminares y definitivas. Ver ilustración 29.



Ilustración 29. Soluciones de los vertimientos



Fuente: autoras

4.2.2.2 Muestreo del vertimiento⁵⁷

Consideraciones básicas usadas para el muestreo

Selección de la localización del muestreo: En el monitoreo se tomaron muestras en los siguientes puntos:

Punto 1 Entrada sistema de tratamiento

Punto 2 Salida al sistema de tratamiento

Establecimiento del horario representativo de la variabilidad de la muestra: la recolección de la muestra se realizó en las horas de la mañana.

⁵⁷ APHA-AWWA-WPCF. Métodos Normalizados Para El Análisis De Aguas Potables Y Residuales. TOMA Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS. 1992. Pág. 1-42.

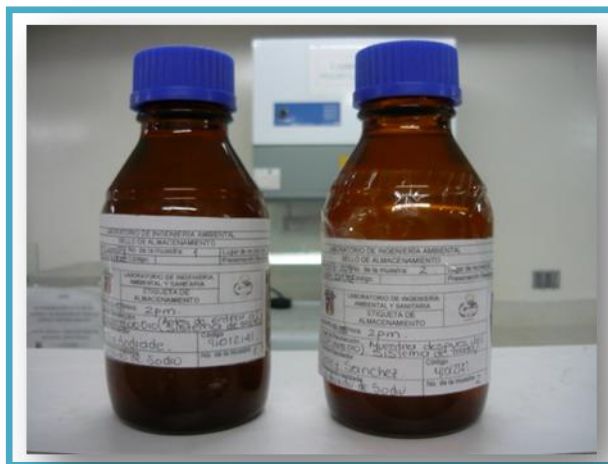


Cantidad de muestra: se recolectaron 20L de muestra en cada punto. Se destinaron 500 ml para las pruebas de cianuro realizadas por el laboratorio de aguas ANALQUIM LTDA. Acreditada por el IDEAM según resolución de acreditación No. 0387 del 30 de marzo de 2009. El volumen restante se utilizó para realizar pruebas de toxicidad y las pruebas fisicoquímicas.

Tiempo de muestreo: 6 horas

Numero de muestreos: 3 muestreos compuestos, realizados en el punto de descarga del vertimiento y en la salida del sistema de tratamiento. Cada una de las muestras se rotuló, especificando la fecha y la hora de muestreo, el nombre de la fuente, el responsable de la muestra, el análisis a realizar y el tipo de preservación que necesitaba la muestra.

Ilustración 30. Muestra para medición de parámetros fisicoquímicos



Fuente: autoras, 2009

Tipo de muestreo: el muestreo que se realizó fue del tipo compuesto, esta clase de muestreo fue obtenido por la mezcla y homogenización de muestras simples recogidas en el mismo punto. La utilización de muestras compuestas se realiza en los casos en que las concentraciones de diferentes sustancias varían con el tiempo, como es el caso del vertimiento del Centro de Desarrollo Productivo CDP.



Preservación de las muestras: la conservación y preservación de las muestras obtenidas del efluente del centro de Desarrollo Productivo CDP para los diferentes parámetros fisicoquímicos se describen en el ANEXO G.

4.2.2.3 Fase de pruebas con Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

Se prepararon cinco concentraciones (20, 40, 60, 80, 100) ppm y un blanco o control (con agua libre de cloro), cada uno de ellos por cuadruplicado, se tomaron éstas concentraciones basándonos en investigaciones realizadas anteriormente (Universidad Nacional de Colombia Laboratorio de la CAR), con el fin de corroborar dichos estudios y comprobar si la sensibilidad de los organismo de prueba es la misma. El fin de ésta prueba es determinar la sensibilidad de los organismos y garantizar la confiabilidad de los datos obtenidos de las pruebas con otras sustancias tóxicas, en relación con la capacidad de respuesta de los organismos de prueba. (Ver registro fotográfico de las pruebas ANEXO H).

Para la ejecución de la prueba toxicológica de sensibilidad se realizó el siguiente procedimiento:

- Aireación de 200 Litros de agua del grifo por un lapso de 15 días dispuestos en un tanque.
- Preparación de la solución tóxica de Dicromato de potasio
- Llenar las peceras a un litro, agregar la solución preparada en las concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100 ppm y llevar con el agua preparada a 2 litros.
- Agregar 5 peces en cada pecera
- Realizar las lecturas de acuerdo a las horas establecidas en la hoja de resultados.
- Al terminar la prueba lavar las peceras cuidadosamente, de tal manera de no dejar ningún tipo de residuos que pueda afectar futuras pruebas.

La prueba se inicio en el momento de adicionar 5 alevinos en cada una de las peceras de la batería de ensayo, utilizando un total de 120 alevinos por prueba, en un tiempo de exposición de 96 horas.

Se realizaron 14 pruebas de sensibilidad, las 10 primeras se realizaron para encontrar la CL_{50-96} de sensibilidad, las otras cinco se realizaron durante las pruebas toxicológicas de la sustancia pura y el vertimiento, esto con el fin de corroborar que los peces aun se encontraban sensibles dentro del mismo rango. La lectura de la prueba se realiza a las 3 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y finalmente a las 96 horas, determinando así el porcentaje



de mortalidad de los alevinos, expuestos al tóxico. Los datos observados en la lectura son registrados en la tabla que se observa en el ANEXO B.

Una vez obtenidos los datos se ingresan en el programa PROBIT y ANOVA, para su posterior evaluación.⁵⁸ Utilizando el protocolo **LBP05**, análisis de regresión y análisis Probit, donde se da a conocer el procedimiento para la obtención de la misma; los datos obtenidos a partir del experimento diseñado estadísticamente, fueron analizados por el método conocido como Análisis de Varianza (ANOVA). Ésta es una técnica que consiste en aislar y estimar las varianzas separadas que contribuyen a la varianza total de un experimento; es entonces posible, ensayar si ciertos factores producen resultados significativos diferentes de las variables ensayadas.

Figura 2. Determinación de la sensibilidad del (*Oncorhynchus mykiss*).

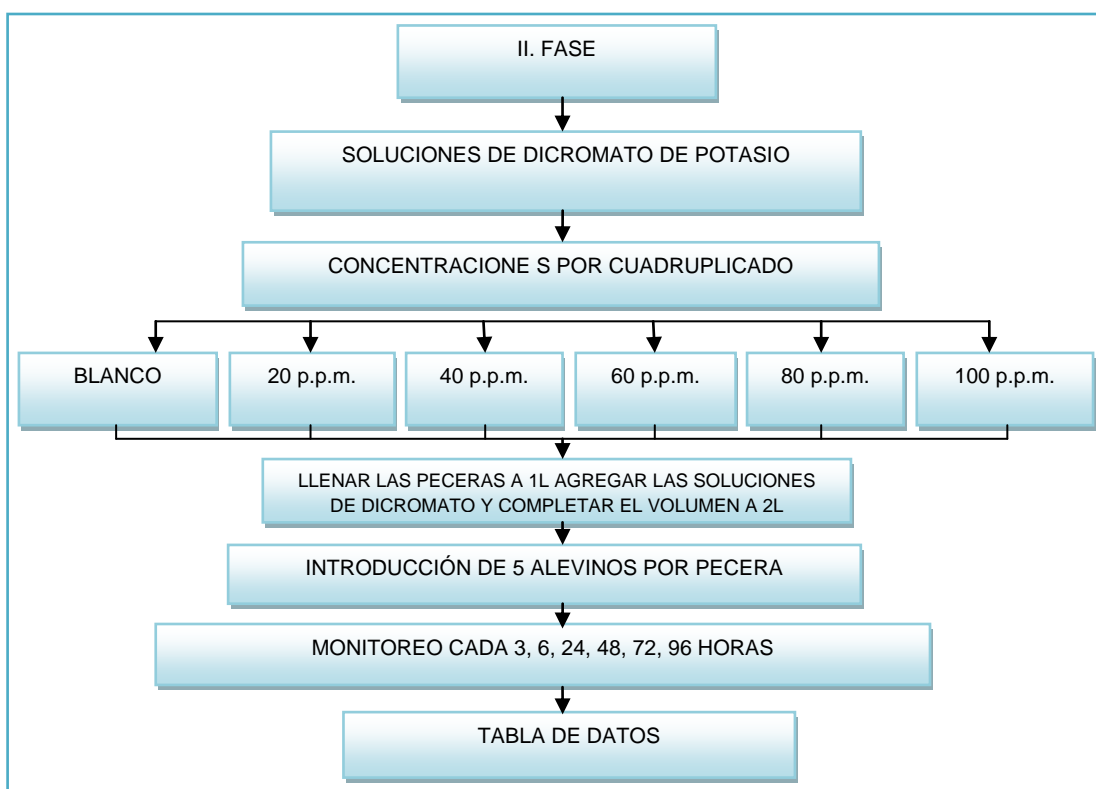


Diagrama elaborado por: las autoras, 2009

⁵⁸ NBR 10.006, 2004, ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. CETESB, Água: Teste de toxicidade aguda com peixes – parte I – sistema estático, L5.019, 1990.



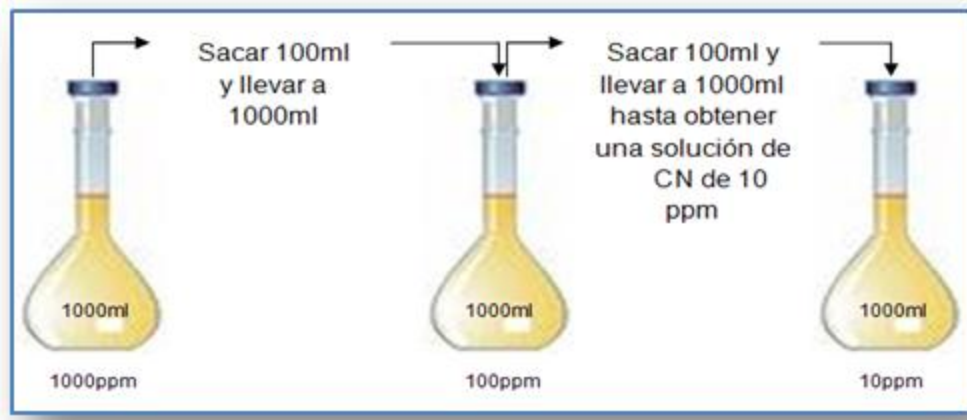
4.2.2.4 Fase de pruebas preliminares del cianuro (CN) y del vertimiento

➤ Pruebas preliminares con el cianuro

En esta etapa de la investigación se realizaron tres pruebas preliminares para determinar el 0 y el 100% de la mortalidad de los alevinos. Inicialmente se empezaron las pruebas con concentraciones que variaban desde 0,01 hasta 10 ppm, donde los valores más altos representaban una mortalidad del 100%. Por esta razón se empezaron a bajar los valores de las concentraciones (ensayo y error), hasta encontrar el rango donde la concentración mas baja representara el 0% de mortalidad y la concentración más alta el 100% con la sustancia pura.

La solución madre, es decir la solución base para la realización de las demás soluciones, fue preparada a partir del cianuro de sodio (NaCN), a una concentración de 10 ppm, como se ilustra en la figura 3.

Figura 3. Preparación solución madre de CN.



Fuente: autoras, 2009

Se prepararon cinco (5) concentraciones iniciales, basándose en la concentración letal media del cianuro (CN-) establecida en el decreto 1594 de 1984, Art. 74 que es de 1 ppm, se realizó la prueba por cuadruplicado y se observó el comportamiento de la misma para saber si era necesario disminuir o aumentar los valores de las concentraciones. Las concentraciones iniciales utilizadas fueron 0.01, 0.1, 1, 5 y 10 ppm, estos valores se tomaron con base a los proporcionados en la metodología CETESB L5.019 I, donde se indica tomar valores aleatorios en base 10.



Primero se realizó una prueba preliminar utilizando rangos entre 0.01 - 10 ppm para la sustancia pura cianuro de sodio (NaCN), observando los resultados obtenidos en la prueba anterior se realizaron dos pruebas preliminares con rangos entre 0.1- 0.5ppm y 0.1- 0.3 ppm.

➤ **Pruebas preliminares con el vertimiento**

El agua con la que se realizaron las pruebas proviene del Centro de Desarrollo Productivo, en donde se da el beneficio del oro la muestra de agua se tomó en dos puntos; en el punto 1 (antes de la entrada al sistema de tratamiento) y en el punto 2 (después del sistema de tratamiento).

✿ **Ensayos preliminares con el vertimiento antes de entrar al sistema de tratamiento**

Los ensayos se ejecutaron utilizando las concentraciones en porcentaje de volumen de la muestra sin tratar, ya que la metodología CETESB, por la cual se basan estos bioensayos, indican la forma de presentación de resultados (% de volumen de la muestra).

Se realizaron dos pruebas preliminares, los rangos inicialmente utilizados fueron (10, 20, 30, 40, 50) de la muestra inicial, estos valores se tomaron con base a los proporcionados en la metodología CETESB, donde se indica tomar valores aleatorios en base 10 (ensayo y error), los resultados de esta prueba preliminar arrojó datos de mortalidad del 90-100% de la población.

La segunda prueba preliminar se realizó con los rangos de (1%, 5%, 10%, 15% y 20%), de la muestra, obteniendo así el rango al que muere el 100% y el 0% de la población.

✿ **Ensayos preliminares con el vertimiento a la salida del sistema de tratamiento.**

Se realizaron dos pruebas preliminares, en la primera se trabajó con rangos de 20, 40, 60, 80 y 100% del volumen de la muestra y en la siguiente 5, 10, 20, 40 y 60%. En esta última se obtuvo el rango al que muere el 100% y el 0% de la población.



Figura 4. Fase de pruebas preliminares

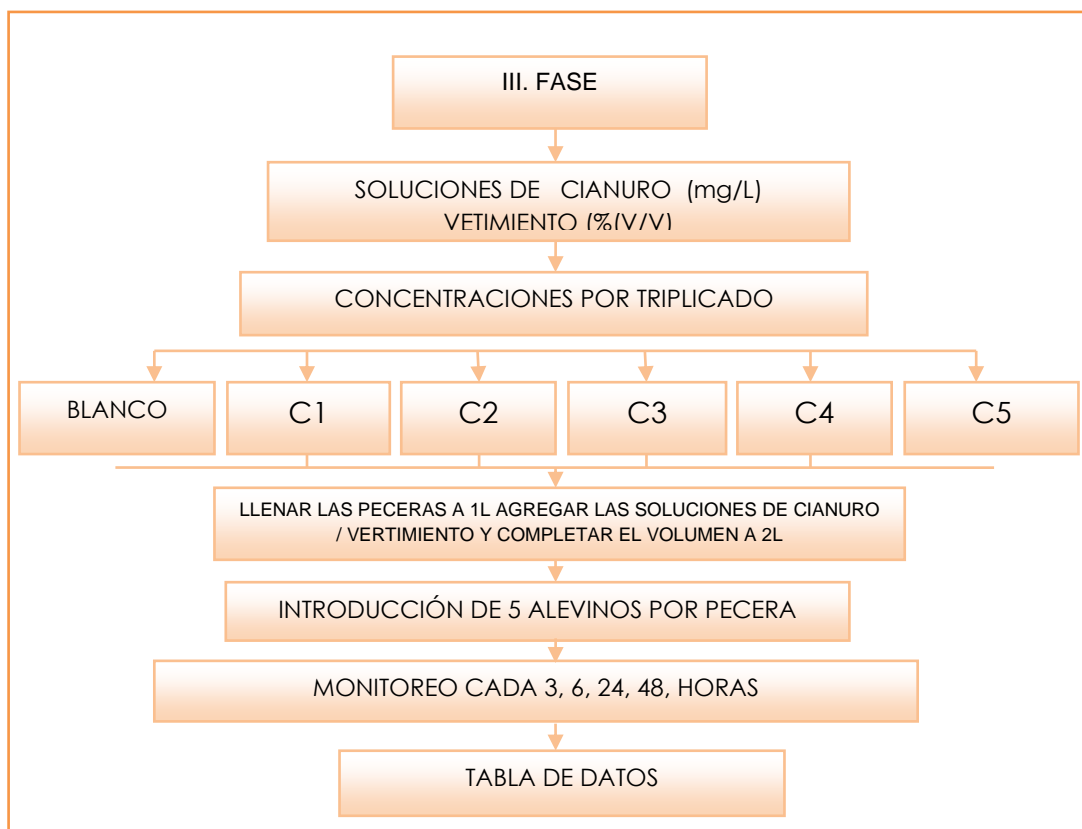


Diagrama elaborado por: las autoras, 2009

En la ilustración 31 se observan los pasos para la realización de los bioensayos.

4.2.2.5 Fase de pruebas definitivas del cianuro (CN) y del vertimiento

➤ Fase de prueba definitiva que permite obtener la CL_{50-96} del cianuro

Para el desarrollo de las pruebas de toxicidad de la sustancia pura se emplearon alevinos de trucha arco iris de 3 – 3,5 cm y 15 días de nacidos expuestos a diferentes concentraciones por un periodo de 96 horas. El resultado de esta exposición es la concentración letal media del cianuro de sodio (CL_{50-96}), la cual produce la mortalidad del 50% de la población expuesta. Al obtener los datos de la última prueba preliminar, se realizaron 10 repeticiones con el fin de corroborar los mismos, así como la homogeneidad de los resultados. De igual manera se cumplió con los



protocolos internacionales, que exigen un mínimo de 10 pruebas con la sustancia pura.

Las diez (10) pruebas definitivas se realizaron con concentraciones de 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3; empleando 5 alevinos de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* por pecera, baterías de cinco concentraciones más el control y cuatro réplicas por ensayo con un total de 24 peceras por prueba toxicológica, 120 organismos por montaje, todo teniendo en cuenta la metodología CETESB.

Esta etapa se estableció mediante la metodología descrita en el protocolo LBP04 “Pruebas de Toxicidad sustancia pura” obteniendo la concentración letal media (CL_{50-96}) del cianuro (CN⁻) con sus límites de confianza, manejando la metodología descrita en el protocolo LBP05 Análisis de Regresión y Análisis Probit y validando los resultados por medio de análisis de varianza (ANOVA), cuya metodología esta descrita en el protocolo LBP06 Análisis de varianza (ver anexo E).

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.

Los registros de las pruebas realizadas en esta investigación se pueden observar en el anexo B.

➤ **Fase de pruebas de toxicidad definitivas con el vertimiento del beneficio del oro en el Centro de Desarrollo Productivo CDP (Suárez-Cauca) que permite obtener la CL_{50-96} del vertimiento**

Para el desarrollo de las pruebas de toxicidad del vertimiento industrial se emplearon alevinos de trucha arco iris de igual forma que en las anteriores pruebas. Estos fueron expuestos a diferentes porcentajes de concentraciones (V/V) por un periodo de 96 horas. El resultado de esta exposición es la concentración letal media del vertimiento (CL_{50-96}) expresada en (%V/V), la cual produce la mortalidad del 50% de la población expuesta.



✿ Ensayos definitivos con el vertimiento antes de entrar al sistema de tratamiento

Las pruebas definitivas con el vertimiento antes de ingresar al sistema de tratamiento se realizaron teniendo en cuenta los datos arrojados por las pruebas preliminares, en estos ensayos definitivos se realizaron 5 repeticiones en concentraciones de (1%, 5%, 10%, 15% y 20%).

✿ Ensayos definitivos con el vertimiento a la salida del sistema de tratamiento.

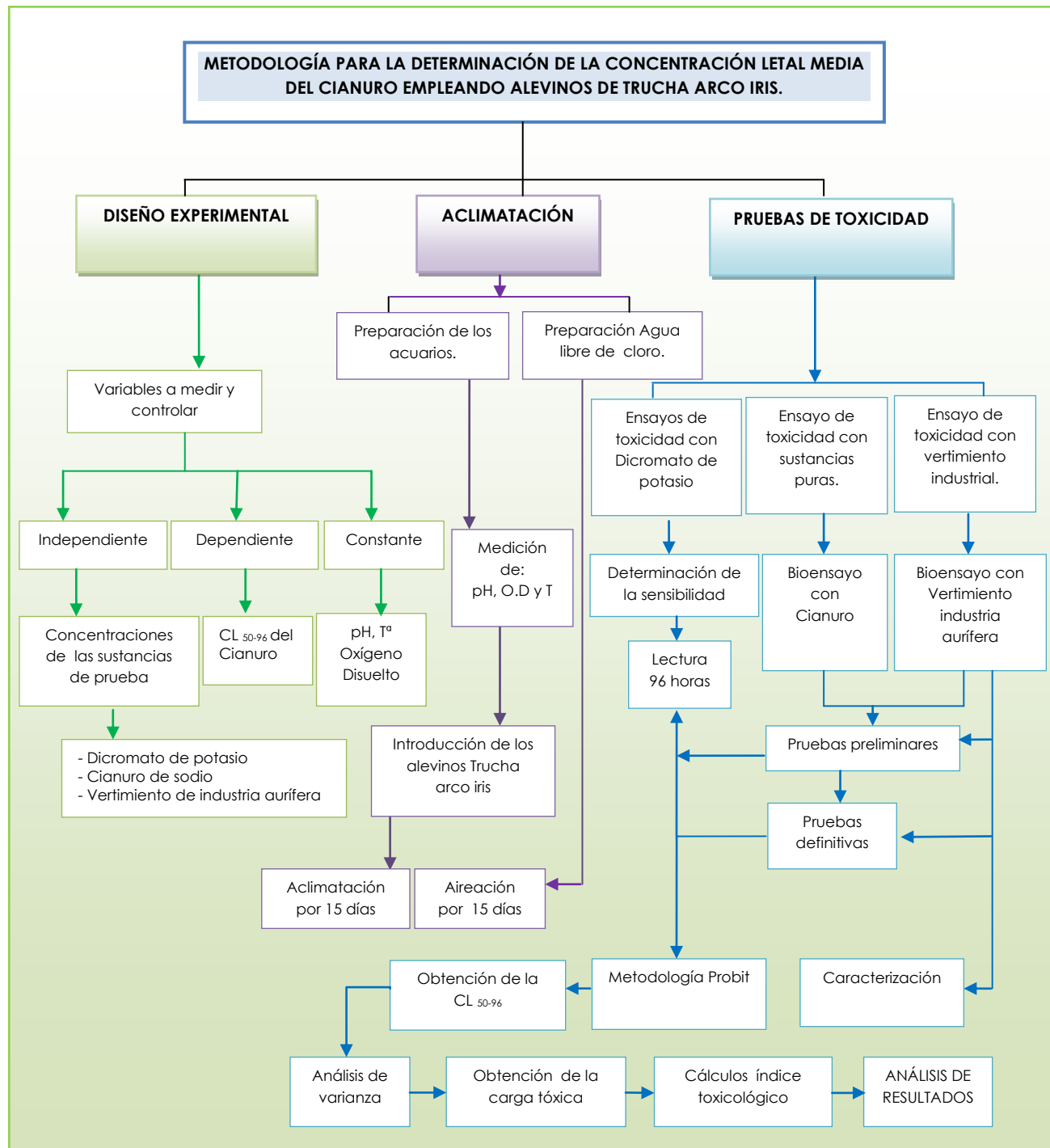
Después de realizar las pruebas de toxicidad con el vertimiento sin tratar, se procedió a llevar a cabo los bioensayos con el vertimiento tratado, para comparar la concentración letal media obtenida con cada una de las muestras. Las pruebas definitivas con el vertimiento después de pasar por el sistema de tratamiento se realizaron teniendo en cuenta los datos arrojados por las pruebas preliminares, en estos ensayos definitivos se realizaron 5 repeticiones en concentraciones de (5, 10, 20, 40 y 60%) para la obtención de la (CL_{50-96}).

En estas dos etapas se establecieron mediante la metodología descrita en el protocolo **LBP03** “Pruebas de Toxicidad” obteniendo la concentración letal media (CL_{50-96}) del vertimiento con sus límites de confianza, manejando la metodología descrita en el protocolo **LBP04** Análisis de Regresión y Análisis Probit y validando los resultados por medio de análisis de varianza (ANOVA), cuya metodología esta descrita en el protocolo **LBP05** Análisis de varianza (ver anexo E).

Los registros de las pruebas toxicológicas realizadas en este estudio se pueden observar en el anexo B. En la figura 5 se observa la metodología general de las cuatro fases.



Figura 5. Diagrama general de la metodología para la determinación de la concentración letal media CL₅₀₋₉₆ del cianuro



Fuente: CETESB, Brasil 1990. (Norma L5.019). Modificado por las autoras, 2009



Ilustración 31. Pasos para la realización de un ensayo

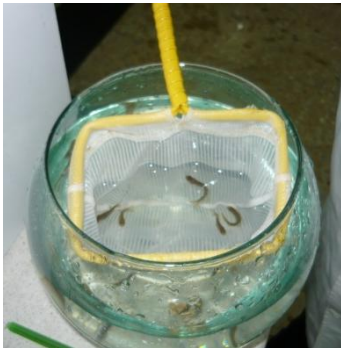
1) se prepara soluciones para prueba



2) se adiciona la cantidad de solución necesaria en cada recipiente según concentración deseada.



3) Se colocan 5 organismos por recipiente con la ayuda de la malla.





4) se ubicó la batería de ensayos en los estantes



5) se tapan los estantes con plástico para evitar contaminantes externos



6) Se toman lecturas a las 3, 6, 24, 48, 72, 96 horas y se registran los datos en la hoja de registros



7) Se sacan los peces muertos y se les da una adecuada disposición, se llevan al congelador en bolsas plásticas y al finalizar la pruebas se incineran.



Fuente: autoras, 2009



5. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para el desarrollo y análisis de las pruebas de toxicidad con cianuro de sodio y el tóxico de referencia, se adoptó la metodología ya establecida CETESB (Brasil), donde se identifican los pasos para obtener pruebas exitosas y comparativas con otros bioensayos regidos por la misma metodología.

El valor de los resultados se calcula con una confiabilidad del 95%. La estimación de este valor sigue un modelo matemático que asume relación continua entre dosis y respuesta. Este valor se obtiene por medio del método Probit, obteniéndose la CL_{50-96} con sus respectivos límites de confianza, para ello se realizó el protocolo **LBP05** “Análisis de regresión y Análisis Probit”.

Después de tener este resultado se procede a realizar el análisis de varianza según el protocolo **LBP06** “Análisis de varianza” para comprobar que a diferentes concentraciones de la sustancia pura o vertimiento, se produce un diferente efecto en todos los organismos.

5.1 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LAS PRUEBAS TOXICOLÓGICAS.⁵⁹

Para lograr un análisis de varianza adecuado se siguió el protocolo LBP06 “Análisis de varianza”, el cual se encuentra en el laboratorio de bioensayos de la facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria de la Universidad de la Salle.

Se inicia postulando una hipótesis nula y una hipótesis de alternativas para la realización de la ANOVA, como se muestra a continuación:

H_0 : Las diferentes concentraciones producen el mismo efecto en todos los organismos.

H_1 : 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.

⁵⁹ WALPOLE, Ronald. E. MYERS, Raymond H. Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. 8ed. Apéndice A. Tabla A.6. Valores críticos de la distribución F.



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

Para determinar si dos variables difieren o no significativamente una de la otra, debemos hacer uso de la distribución F, ésta distribución fue escrita por primera vez por el estadístico R.A. Fisher. Inicialmente se deberá comenzar buscando el número de grados de libertad del grupo al que corresponda la varianza más pequeña. Una vez hallada y moviéndonos por la columna determinaremos la entrada del número de grados de libertad del grupo al que corresponda la varianza mas grande.

En este punto establecido, podremos concretar el valor crítico de F, el cual es necesario para rechazar la hipótesis nula, punto en el cual se plantea si no hay diferencias entre la varianza. La F, por si misma, se define como:

$$F = \frac{S^2(\text{varianza más grande})}{S^2(\text{varianza más pequeña})}$$

Según la Tabla de Valores Críticos de la Distribución F para un Nivel de Significancia 5% tenemos:

$n=24$ (numero total de datos)

$k=6$ (numero de concentraciones incluyendo el blanco)

Grado de Libertad del numerador: $k-1 = 6-1 = 5$

Grado de Libertad del denominador: $n-k = 24-6 = 18$

Donde se obtiene de la Tabla de Valores Críticos de la Distribución F para un Nivel de confiabilidad del 95%. Ver anexo A del LBP.

$$F(5,18) = 2.77$$

Para el estudio encontramos el valor crítico para $F = 2.77$, por ello si F_c (calculado) es mayor que F_t (teórico), se rechaza la hipótesis nula.



5.2 RESULTADOS PRUEBAS DE TOXICIDAD

A continuación se expresan los resultados obtenidos por este proyecto de investigación, de acuerdo a la metodología anteriormente descrita.

5.2.1 Resultados ensayos de sensibilidad con Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇).

La concentración letal media del Dicromato de Potasio (K₂Cr₂O₇) se determinó con las concentraciones definitivas, en las cuales se tuvo un porcentaje de mortalidad de 0% al 100%, estos resultados se calcularon con el programa estadístico Probit, en el cual se suministraron los datos de los ensayos, determinándola con sus respectivos límites de confianza al 95%; con ellos se construyó la carta de control con el valor promedio, la desviación estándar, donde se presentan los resultados obtenidos de la evaluación.

Tabla 10. Carta de control de Sensibilidad con Dicromato de Potasio (K₂Cr₂O₇).

NÚMERO DE PRUEBA	FECHA	CL50-96 mg/L	LÍMITE INFERIOR mg/L	LÍMITE SUPERIOR mg/L
1	17/03/2009	52,0763	45,1948	58,8872
2	17/03/2009	54,4433	43,6822	67,1031
3	10/03/2009	49,0708	37,7291	61,3881
4	10/03/2009	58,6036	47,5596	72,5788
5	24/03/2009	49,5163	38,8068	61,0455
6	24/03/2009	51,4289	41,8277	61,6628
7	31/03/2009	57,2063	45,0477	73,2345
8	31/03/2009	50,7281	39,8871	62,6989
9	14/04/2009	61,2239	50,1793	75,7933
10	14/03/2009	50,1948	38,3716	63,5089
11	27/04/2009	49,1048	42,2209	56,1792
12	05/05/2009	50,3830	34,063	49,5344
13	19/05/2009	48,9646	32,5406	48,1059
14	02/06/2009	50,5332	42,6695	59,2472
PROMEDIO (<i>Media \bar{X}</i>)		52,3913	41,4129	62,2120
VARIANZA (<i>S²</i>)		15,5338		
DESVIACION ESTANDAR(S)		3,9413		

Fuente: las autoras, 2009.



Como resultado de la concentración letal media para la obtención de la sensibilidad de los organismos frente al tóxico de referencia en la investigación se tiene:

Tabla 11. Resultados CL_{50-96} de sensibilidad

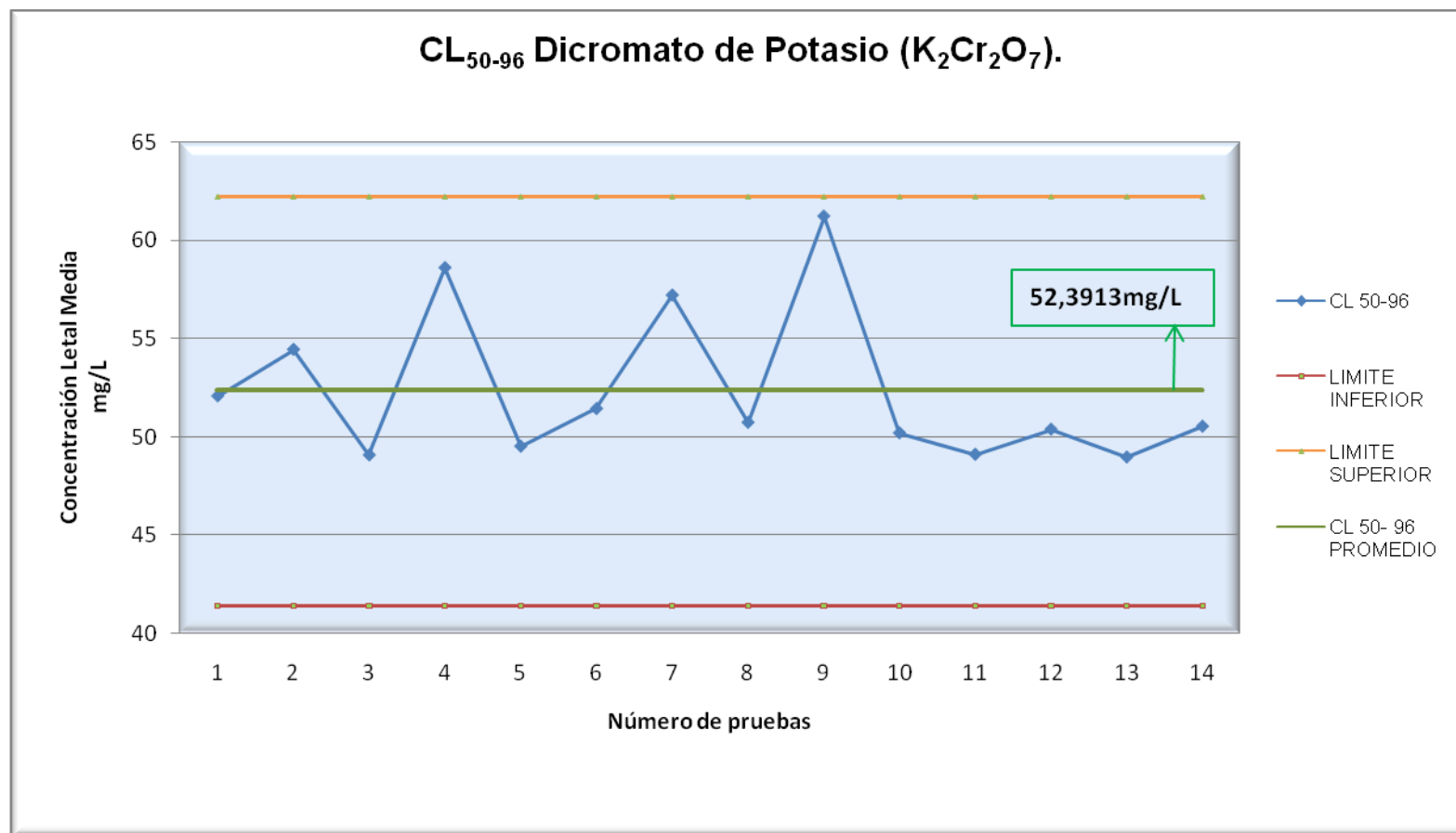
Límite inferior	41,4129 mg/L
CL_{50-96} Sensibilidad ($K_2Cr_2O_7$)	52,3913mg/L
Límite superior	62,2120 mg/L

La Gráfica 1, muestra la distribución de los datos de sensibilidad obtenidos durante el tiempo de las pruebas, así mismo, el promedio obtenido y sus respectivos límites. Los datos de las diferentes pruebas se encuentran dentro de los límites de confianza, por lo tanto los datos hallados se validan. Con lo que se concluye que la concentración letal media (CL_{50-96}) del Dicromato de potasio es de 52,3913 mg/L, con una tendencia a variar por debajo o por encima de dicha concentración en 3,9413 mg/L.

Estos ensayos 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 ensayo. 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 exposición. Es necesario dejar establecida la sensibilidad de los organismos de prueba a un tóxico de referencia en este caso el Dicromato de Potasio ($K_2CR_2O_7$), ya que los bioensayos con esta especie son la base fundamental en la evaluación ecotoxicológica de los vertimientos.



Gráfica 1. Concentración letal media (CL_{50-96}) de la sensibilidad con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$).



Fuente: autoras, 2009.



5.2.1.1 Análisis de varianza de las pruebas definitivas de sensibilidad Dicromato de Potasio $K_2Cr_2O_7$.

Tabla 12. F calculado vs F teórico. Prueba de sensibilidad Dicromato de Potasio

FECHA	F Calculado	F Teórico
17/03/2009	105	2,77
17/03/2009	40,9428	
10/03/2009	38,8857	
10/03/2009	39,48	
24/03/2009	18,7866	
24/03/2009	14,1454	
31/03/2009	10,3739	
31/03/2009	19,4857	
14/04/2009	26,8	
14/03/2009	25,84	
27/04/2009	76,8	
05/05/2009	54,6	
19/05/2009	88,2	
02/06/2009	31,7657	
PROMEDIO	42,2218	

Fuente: autoras, 2009.

En la tabla 13 se observa que $F_c > F_t$, lo cual significa que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna; por lo tanto, se concluye, que las diferentes concentraciones producen efectos diferentes en los organismos de prueba, esto quiere decir que; al aumentar las concentraciones de Dicromato de potasio, aumenta la mortalidad de los peces.

5.2.2 Resultados de los ensayos de toxicidad con la sustancia pura de cianuro a partir del cianuro de sodio (NaCN).

La concentración letal media del cianuro (CN^-) se determinó con las concentraciones definitivas, en las cuales se tuvo un porcentaje de mortalidad de 0% al 100%, estos resultados se calcularon con el programa estadístico Probit, en el cual se suministraron los datos de los ensayos, determinándola con sus respectivos límites de confianza al 95%; con ellos se construyó la carta de control con el valor promedio, la desviación estándar, donde se presentan los resultados



obtenidos de la evaluación. En la siguiente tabla, se observa la (CL_{50-96}) y sus límites de confianza inferior (LCI) y superior (LCS) estimados para cada uno de los diez (10) ensayos de toxicidad aguda con ***Oncorhynchus mykiss***, realizados con cianuro de sodio como tóxico de referencia. De las 10 pruebas de toxicidad que se realizaron, se obtuvo la (CL_{50-96}) con sus límites de confianza inferior y superior, utilizando el software de la metodología Probit; para hallar la concentración letal media definitiva del cianuro, se promediaron los resultados, como se muestra a continuación en la tabla 14.

Tabla 13. Carta de control del cianuro (CN')

NÚMERO	FECHA	CL50-96 mg/L	LÍMITE INFERIOR mg/L	LÍMITE SUPERIOR mg/L
1	21/04/2009	0,1842	0,1813	0,4225
2	21/04/2009	0,2197	0,1315	0,1975
3	27/04/2009	0,2120	0,1712	0,3015
4	27/04/2009	0,1998	0,179	0,217
5	05/05/2009	0,1875	0,1724	0,2017
6	05/05/2009	0,2294	0,1937	0,2848
7	12/05/2009	0,2193	0,202	0,237
8	12/062009	0,2047	0,1824	0,2302
9	19/05/2009	0,1869	0,1694	0,2039
10	19/05/2009	0,1961	0,1791	0,2132
PROMEDIO ($Media \bar{x}$)		0,20396	0,1733	0,2519
VARIANZA (S^2)		0,0002		
DESVIACION ESTANDAR(S)		0,0157		

Fuente: Autoras, 2009

La tabla 14 muestra la distribución de los datos de sensibilidad obtenidos durante el tiempo de las pruebas, así mismo, el promedio obtenido y sus respectivos límites de confianza. Como resultado de la concentración letal media del cianuro en la investigación y sus límites de confianza, se tiene:



Tabla 14. Resultados CL_{50-96} del cianuro de sodio

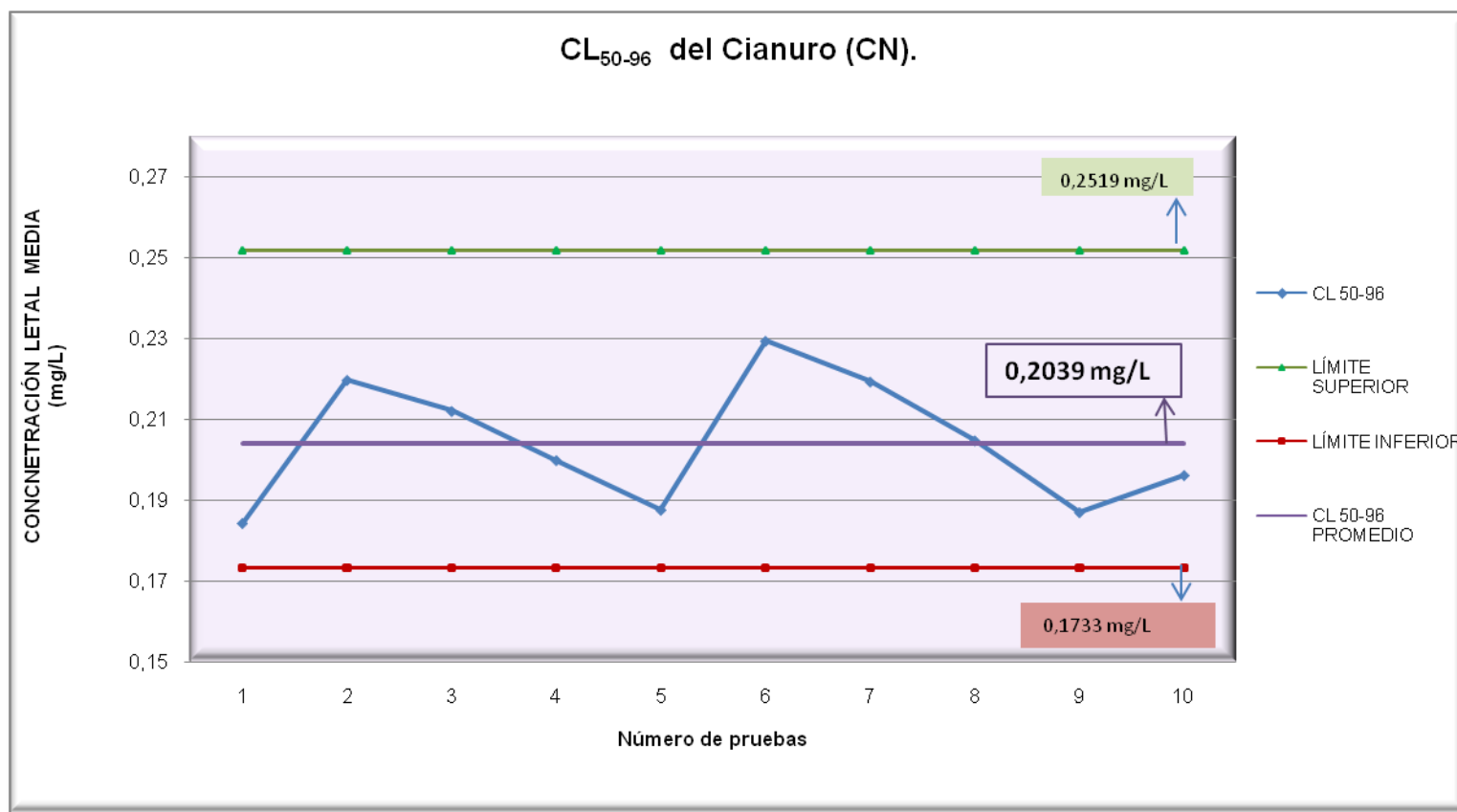
Límite superior	0,2519 mg/L
CL_{50-96} cianuro (CN)	0,2039 mg/L
Límite inferior	0,1733 mg/L

La gráfica 2, muestra la distribución de los datos de toxicidad del cianuro (CN⁻) obtenidos durante el tiempo de las pruebas, así mismo, el promedio obtenido y sus respectivos límites. Los datos de las diferentes pruebas se encuentran dentro de los límites de confianza, por lo tanto los datos hallados se validan. Con lo que se concluye que la concentración letal media (CL_{50-96}) del Cianuro es de 0,2039mg/L, con una tendencia a variar por debajo o por encima de dicha concentración en 0,0157mg/L.

Como se observa en el análisis de la concentración letal (CL_{50-96}) del cianuro los valores de toxicidad oscilan entre un rango de 0,1733 – 0,2519 mg/l y un promedio de 0,2136 mg/L demostrando que este valor se encuentra por encima de lo establecido en el decreto 1594 de 1984 expresada en el artículo 45 para la preservación de flora y fauna cuyo valor es 0.05 mg/L de cianuro expresado como CN⁻.



Gráfica 2. Concentración Letal media (CL_{50-96}) Del cianuro (CN).



Fuente: Las autoras, 2009



5.2.2.1 Análisis de varianza de la prueba definitiva con cianuro.

Tabla 15. F calculado vs. F teórico. Prueba definitiva de cianuro de sodio.

Nº DE PRUEBA	FECHA	F CALCULADO	F TEORICO
1	21/04/2009	240	2.77
2	21/04/2009	121	
3	27/04/2009	135,9518	
4	27/04/2009	435	
5	5/05/2009	129	
6	5/05/2009	42	
7	12/05/2009	46,9846	
8	12/05/2009	38,33	
9	19/05/2009	74,2666	
10	19/05/2009	81,8	
PROMEDIO		134,4333	

Fuente: Las autoras, 2009

Como lo muestra el tabla 16, se observa que $F_c > F_t$, esto quiere decir, que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna; por lo tanto, se concluye que las diferentes concentraciones producen efectos diferentes en los organismos de prueba.

5.2.3 Resultados de los ensayos de toxicidad del vertimiento de la industria de beneficio del oro el cual contiene cianuro (CN^-).

5.2.3.1 Resultados de los ensayos con el vertimiento antes de entrar al sistema de tratamiento

Los resultados de los ensayos para las pruebas de toxicidad del vertimiento se obtuvieron de los datos que arrojaron las pruebas definitivas. Los resultados de la



CL_{50-96} se calcularon con el programa estadístico Probit, en el cual se suministraron los datos de los ensayos, determinándola con sus respectivos límites de confianza al 95%. Con estos datos se construyó la carta de control con el valor promedio, la desviación estándar, donde se presentan los resultados obtenidos de la evaluación, tal como se observa en la tabla 17.

Tabla 16. Resultados de las pruebas toxicológicas con el vertimiento sin tratar

NÚMERO	FECHA	CL_{50-96} %(V/V)	LÍMITE INFERIOR %(V/V)	LÍMITE SUPERIOR %(V/V)
1	2/06/2009	5,4831	4,3117	6,48
2	2/06/2009	6,2206	4,649	7,5486
3	9/06/2009	5,3474	3,9399	6,4617
4	9/06/2009	5,7728	4,2957	7,2676
5	16/06/2009	5,4814	3,9229	7,096
PROMEDIO (<i>Media</i> \bar{x})		5,66106	4,22384	6,97078
VARIANZA (S^2)		0,122		
DESVIACION ESTANDAR(S)		0,349		

Fuente: autoras, 2009

La tabla 17 muestra la distribución de los datos de concentración letal media obtenidos durante el tiempo de las pruebas del vertimiento, igualmente se determinó el promedio y sus respectivos límites de confianza. Con lo que se concluye que la concentración letal media (CL_{50-96}) del vertimiento de la industria evaluada es de 5,66106 %(V/V).

Como resultado de la concentración letal media del cianuro en la investigación y sus límites de confianza, se tiene:



Tabla 17. Resultados CL_{50-96} del vertimiento con presencia de NaCN

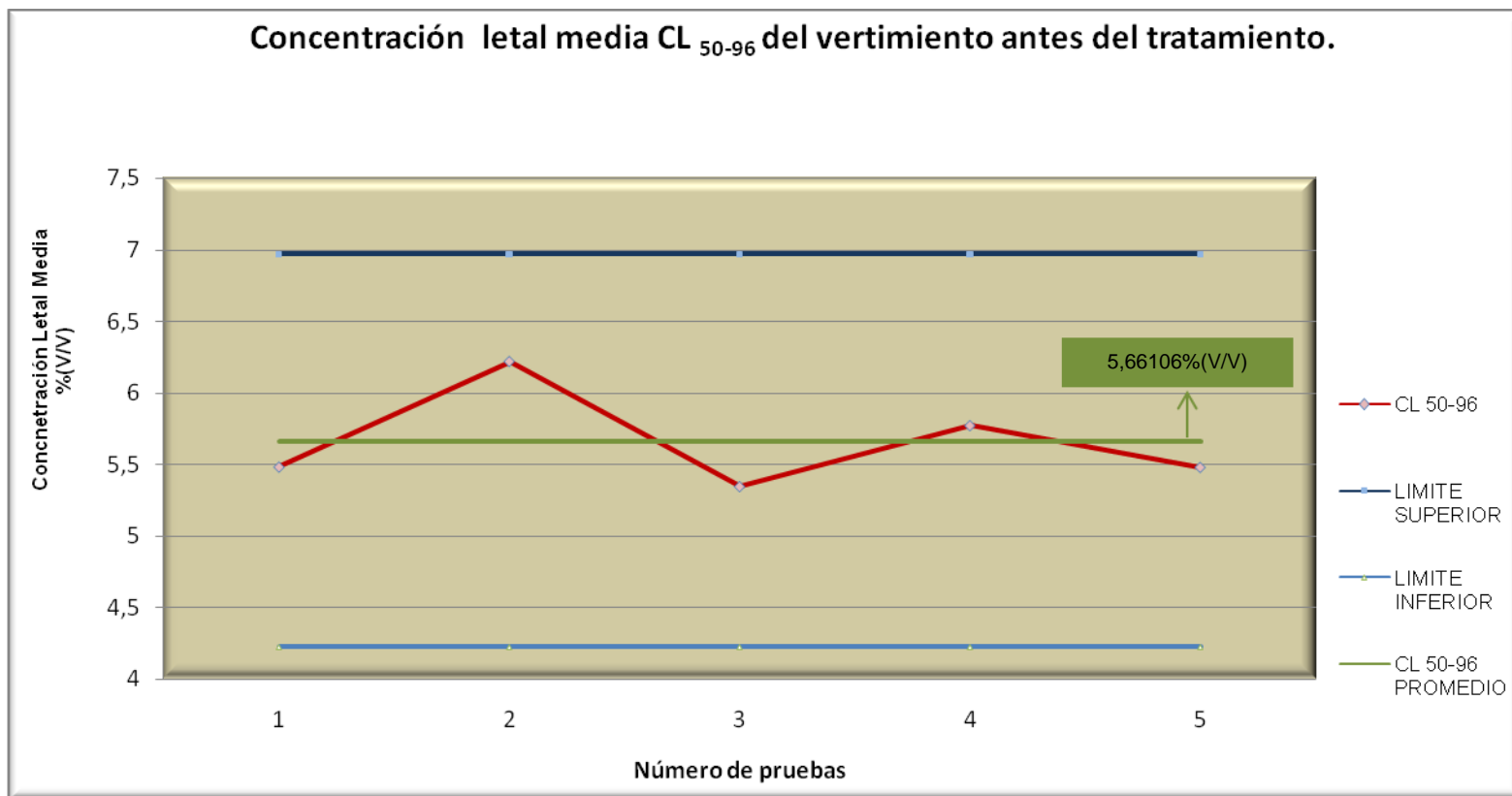
Límite inferior	4,22384%
CL_{50-96} vertimiento %(V/V)	5,66106%
Límite superior	6,97078%

La Gráfica 3, muestra la distribución de los datos de toxicidad del vertimiento antes de entrar al sistema de tratamiento, obtenidos durante el tiempo de las pruebas, así mismo, el promedio obtenido y sus respectivos límites.

Los datos de las diferentes pruebas se encuentran dentro de los límites de confianza, por lo tanto los datos hallados se validan. Con lo que se concluye que la concentración letal media (CL_{50-96}) del vertimiento en el punto 1 es de 5,66106%, con una tendencia a variar por debajo o por encima de dicha concentración en 0,349%. Los valores de toxicidad oscilan entre un rango de 4,22384 - 6,97078 % (V/V).



Gráfica 3. Concentración letal media (CL_{50-96}) del vertimiento antes del tratamiento.



Fuente: autoras, 2009



5.2.3.1 Análisis de varianza de las pruebas definitivas del vertimiento sin tratamiento.

Tabla 18. F calculado vs F teórico de la prueba definitiva con el vertimiento sin tratar.

Nº DE PRUEBA	FECHA	F CALCULADO	F TEORICO
1	2/06/2009	156,0545	2.77
2	2/06/2009	109,3714	
3	9/06/2009	234,9428	
4	9/06/2009	197,9142	
5	16/06/2009	28,5764	
PROMEDIO		145,37186	

Fuente: autoras, 2009

Como lo muestra el tabla 19, $F_c > F_t$, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula.

5.2.3.2 Resultados de los ensayos con el vertimiento a la salida del sistema de tratamiento

Los resultados de Cl_{50-96} para este vertimiento se obtuvieron con los valores de las pruebas definitivas. Después de realizar las cinco (5) pruebas con el vertimiento que contiene cianuro y después del tratamiento, se observó que la concentración donde el 100% de los organismos no logran sobrevivir y mueren al contacto con el vertimiento es de 60% y la concentración donde los organismos no mueren al tener contacto con el vertimiento es del 5% V/V. Se considera que el tratamiento realizado para el vertimiento con presencia de cianuro se sodio, es efectivo ya que remueve un gran porcentaje de este constituyente inorgánico no metálico.

La carta de control se realiza con el fin de determinar si el valor de la CL_{50} está dentro de los límites definidos por el programa Probit, para identificar si el valor para el tóxico se encuentra cerca del valor aceptado o verdadero para el mismo. Como resultado de la concentración letal media del vertimiento después del tratamiento en la investigación, sus límites de confianza son:



Tabla 19. Resultados definitivos del vertimiento tratado.

NÚMERO	FECHA	CL_{50-96} %(V/V)	LÍMITE INFERIOR %(V/V)	LÍMITE SUPERIOR %(V/V)
1	16/06/2009	30,0601	24,54	37,1516
2	23/06/2009	26,4773	21,6334	32,3722
3	23/06/2009	24,7367	19,8378	31,1021
4	30/06/2009	27,3198	22,2521	33,6954
5	30/06/2009	25,5574	20,539	32,0898
PROMEDIO (<i>Media</i> \bar{x})		26,83026	21,76046	33,28222
VARIANZA (S^2)		4,1998		
DESVIACION ESTANDAR(S)		2,0493		

Fuente: las autoras.

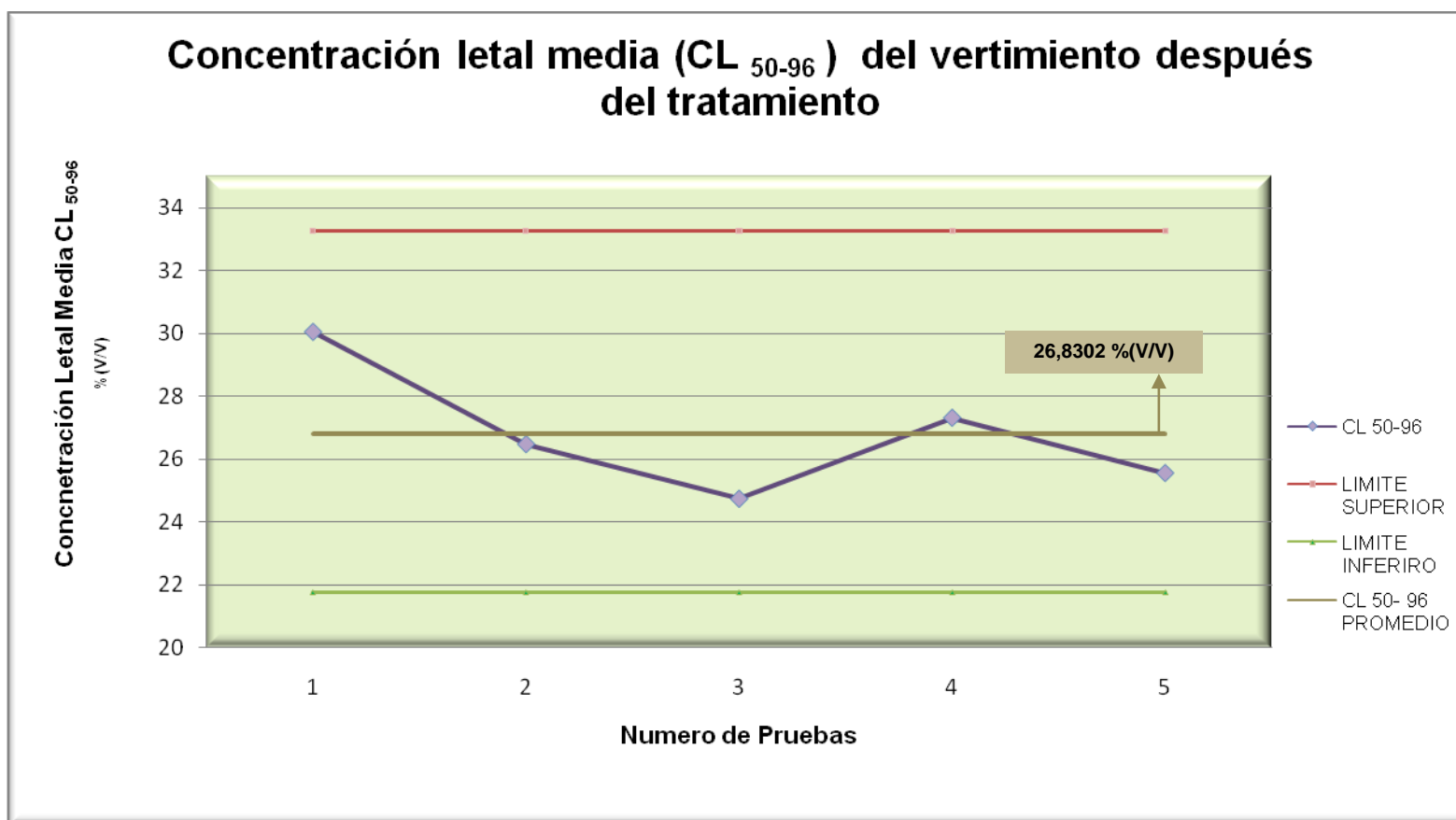
Tabla 20. Resultados CL_{50-96} del vertimiento después del tratamiento

Límite inferior %(V/V)	21,7604
CL_{50-96} vertimiento %(V/V)	26,8302
Límite superior %(V/V)	33,2822

En la gráfica 5, se representan las distribuciones de las diferentes concentraciones halladas en las pruebas toxicológicas (CL_{50-96}) del vertimiento tratado, así como su promedio y límites superior e inferior.



Gráfica 4. Concentración letal media (CL_{50-96}) del vertimiento después del tratamiento



Fuente: atoras, 2009



Como puede observarse en la gráfica todos los valores de las concentraciones letales obtenidas durante las pruebas de toxicidad con el vertimiento tratado, se encuentran dentro de los límites de confianza, indicando la aprobación de las pruebas realizadas. Por lo tanto, se concluye que la concentración letal media (CL_{50-96}) del vertimiento en el punto 2 es de 26,8302%, con una tendencia a variar por debajo o por encima de dicha concentración en 2,0493%. Los valores de toxicidad oscilan entre un rango de 21,7604 - 33,2822 % (V/V).

5.2.3.3 Análisis de varianza del vertimiento tratado.

Tabla 21. F calculado vs F teórico. Prueba definitiva con el vertimiento tratado

Nº DE PRUEBA	FECHA	F CALCULADO	F TEORICO
1	16/06/2009	101,0727	2.77
2	23/06/2009	107,6181	
3	23/06/2009	45,626	
4	30/06/2009	82,1142	
5	30/06/2009	43,2	
PROMEDIO		75,9262	

Como lo muestra el tabla 22, se observa que $F_c > F_t$, esto quiere decir, que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna; por lo tanto, se concluye, que las diferentes concentraciones producen efectos diferentes en los organismos de prueba. Se acepta la hipótesis alterna a un nivel de significación de 0,05. La prueba fue significativa.

5.3 PARAMETROS FISICOQUÍMICOS DEL VERTIMIENTO

5.3.1 Análisis fisicoquímico del vertimiento evaluado

En el monitoreo se tomaron muestras en los siguientes puntos:

- (1) Entrada sistema de tratamiento
- (2) salida al sistema de tratamiento



Tabla 22. Parámetros de campo. Aguas del proceso de extracción de oro, entrada y salida.

Punto de Muestreo	pH	T°C	C mS/cm	OD %	OD mg/L
1	2.76	25.8	4.44	-	-
2	7.9		209.22	58.43	4.8

Tabla 23. Aforo de Caudal.

Punto de Muestreo	Caudal (L/s)
1	0.12
2	0.085

Tabla 24. Resultados Fisicoquímicos, Aguas Residuales Industriales de Extracción de Oro.

Parámetros	Unidades	Punto 1	Punto 2	Norma
Sulfuros	mg/L	<0.02	0.06	1.0
Cianuros		0.40	0.06	1.0
DBO ₅		6.1	1.3	
DQO		29	<4	
SST		44687	110	
Grasas y Aceites		<10	<10	
Hierro		4.72	0.64	
Manganeso		5.11	0.33	
Plomo		<0.05	<0.05	0.5
Zinc		22.0	0.80	
Cadmio		0.29	<0.002	0.1
Coliformes totales	NMP Microorganismos/100ml	*	>2419.6	
Coliformes fecales	NMP Microorganismos/100ml	*	44.1	

Fuente: Resultados Laboratorio Ambiental, Corporación Regional de Cauca - CRC. Caracterización Aguas residuales industriales, Centro de Desarrollo Productivo-CDP-.Enero 2009. Suarez (Cauca). Datos suministrados en la primera visita técnica. Febrero 2009.



De acuerdo con las concentraciones obtenidas de DBO₅, DQO, SST y Grasas y Aceites (G y A); y a las caudales aforados en la entrada y la salida del tratamiento, se calculan las cargas contaminantes y eficiencias de remoción.

Tabla 25. Cargas Contaminantes Entrada y Salida de la PTARI.

Punto de Muestreo	Concentraciones (mg/L)				Cargas contaminantes (Kg/d)			
	Q (L/s)	DBO ₅	DQO	SST	Tiempo de descarga (horas)	DBO ₅	DQO	SST
1	0.12	6.1	29	44687	12	0.03	0.15	6949.72
2	0.085	1.3	4	110	12	0.0048	0.01	0.40

Fuente: Resultados Laboratorio Ambiental, Corporación Regional de Cauca - CRC. Caracterización Aguas residuales industriales, Centro de Desarrollo Productivo-CDP- Suarez (Cauca)

Tabla 26. Eficiencias de remoción del sistema de tratamiento

Punto de Muestreo	Eficiencias de Remoción (% R)		
1	DBO ₅	DQO	SST
2	84.9	90.2	100.0

Fuente: Resultados Laboratorio Ambiental, Corporación Regional de Cauca - CRC. Caracterización Aguas residuales industriales, Centro de Desarrollo Productivo-CDP- Suarez (Cauca)

Para el parámetro de Grasas y Aceites, a razón de que presenta las mínimas concentraciones, no se analiza la carga ni la remoción respectiva.

5.3.2 Análisis de los resultados de la caracterización

Las aguas residuales generadas en el proceso corresponden en su mayoría a los procesos de lavado y molienda, alterándose de manera significativa las características físicas del agua. Los procesos de lavado de tanques donde se



realiza la cianuración se realiza cada seis meses según información del Ingeniero de Minas.

Teniendo presente que dichas aguas residuales, por su gran cantidad de minerales; influirá en la acidez y turbiedad, la empresa realiza un tratamiento, que consiste en pozos o tanques, que hacen la función de sedimentadores. El agua debido a la combinación de minerales de suelo, manifiesta gran cantidad de sólidos que pueden sedimentarse, siempre y cuando su tiempo de retención sea el indicado. Durante el proceso se observó que la empresa adiciona cal viva a los tanques de sedimentación con el fin de mantener reculado el pH.

La empresa maneja procesos de recirculación en los tanques donde se realiza la adición de Cianuro, por lo que se busca recuperarse y no desperdiciarse por los altos costos de este compuesto.

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, el monitoreo realizado presenta el siguiente análisis de resultados del monitoreo.

- ✿ La eficiencia de remoción del sistema de sedimentadores que presenta CDP, realiza eficiencias mayores del 80 % en parámetros como DBO, DQO y SST, indicando cumplimiento con lo exigido en el D.1594/84 art 73.
- ✿ Las concentraciones de DBO y DQO de la entrada y la salida son muy bajas indicando que la contaminación aportada es muy pequeña.
- ✿ La cantidad de SST en la entrada del tratamiento, se encuentra en concentraciones muy grandes (6949 mg/L), sin embargo la baja concentración encontrada luego del proceso de tratamiento de sedimentación, indica las eficiencias del sistema de tratamiento para este parámetro, y que el vertimiento inicial corresponde en su mayoría a sólidos suspendidos con una densidad que permite fácil sedimentación.
- ✿ La concentración de cianuro en la salida es de 0.06 mg/L, indicando que según lo exigido en el D.1594/84 art 74, se encuentra en niveles permisibles menores a 1.0 mg/L y su descarga hacia un cuerpo de agua no causaría un grave impacto ambiental.
- ✿ La concentración de Cadmio en la entrada de los sedimentadores es de 0.29 mg/L, concentración mayor a lo exigido de 0.1 mg/L como sustancia de interés sanitario, sin embargo, en la salida se encontró que la concentración de este parámetro se redujo a menos de 0.002,



comprobando que el sistema funciona adecuadamente para la reducción de este compuesto.

- ✿ Las concentraciones de plomo son mínimas por lo tanto no existe riesgo alguno con este compuesto.
- ✿ Las concentraciones de sulfuro fueron de 0.06 mg/L en la salida, indica baja concentración, y menor que 1.0 mg/L límite permisible.
- ✿ No se descargan grasas y aceites durante el proceso.

Los datos suministrados por la empresa por el laboratorio de aguas del laboratorio de aguas de ANALQUIM LTDA acreditado por el IDEAM según resolución de acreditación No 0387 del 30 de marzo de 2009 son:

PARÁMETRO	REF.	VALOR punto 1 mg/L	VALOR punto 2 mg/L	NORMA DECRETO 1074/84 (mg/L)
CIANUROS	SM 4500-CN ⁻ C E	0,38	0,05	1.0

5.4 OBTENCIÓN DE LA CARGA TÓXICA E ÍNDICE TOXICOLÓGICO

La carga e índice toxicológico se realizó con el fin de evaluar y clasificar el vertimiento que contiene cianuro de sodio. Para el cálculo del índice toxicológico se contó con la información del nivel trófico afectado (*Oncorhynchus mykiss*), caudal del vertimiento industrial, concentración letal media del vertimiento y carga tóxica del efluente.

Una vez conocida la toxicidad de los efluentes, es posible la estimación de su carga tóxica. Por lo tanto, se puede estimar la contribución de cada una de las muestras del efluente con respecto a su cuerpo receptor. Esta evaluación es una herramienta útil para establecer prioridades para el control y tratamiento de los efluentes y, por tanto, la adopción de estrategias y decisiones sobre las acciones de control en el vertimiento.



Para el cálculo de la carga tóxica se utilizó la siguiente ecuación: expresada en unidades tóxicas (UT).⁶⁰

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

En donde:

CL 50: Concentración letal media (Concentración del efluente que produjo la mortalidad del 50% de los organismos expuestos en un período de 96 horas).

\bar{Q} : Caudal promedio del efluente, el cual varía según la producción de la empresa evaluada.

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

$$IETP = \text{Log}(1 + UT)_{61}$$

5.4.1 Obtención Carga Tóxica e índice toxicológico de la muestra del vertimiento industrial antes y después del tratamiento.

5.4.1.1 Carga tóxica del vertimiento antes del tratamiento

El caudal promedio que maneja la industria del beneficio del oro es de: 10,368m³/d

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

$$CargaTóxica(UT) = \frac{100}{5,66106} * 10,368m^3 / d = 183,146$$

5.4.1.2 Índice toxicológico del vertimiento antes del tratamiento

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

$$IT = \text{Log}(1 + 183,146)$$

$$IT = 2,27$$

⁶⁰ ESCOBAR, MALAVER; Pedro Miguel. Implementación de un sistema de alerta de riesgo toxicológico utilizando Daphnia Pulex para la evaluación de muestras ambientales. 1997

⁶¹ Ibid.



5.4.2 Obtención Carga Tóxica e índice toxicológico de la muestra del vertimiento industrial después del tratamiento.

5.4.2.1 Carga tóxica del vertimiento después del tratamiento

$$CargaTóxica(UT) = \frac{100}{CL_{50}} \times \bar{Q}$$

$$CargaTóxica(UT) = \frac{100}{26,8302} * 7,344m^3 / d = 27,372$$

Por lo tanto la carga tóxica asociada a este efluente considerando los efectos agudos producidos sobre las especies estudiada sería 27, 372 UT

5.4.2.2 Índice toxicológico del vertimiento después del tratamiento

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

$$IT = \text{Log}(1+27,372)$$

$$IT = 1,453$$

Con estos datos 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 7:

Tabla 27. 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

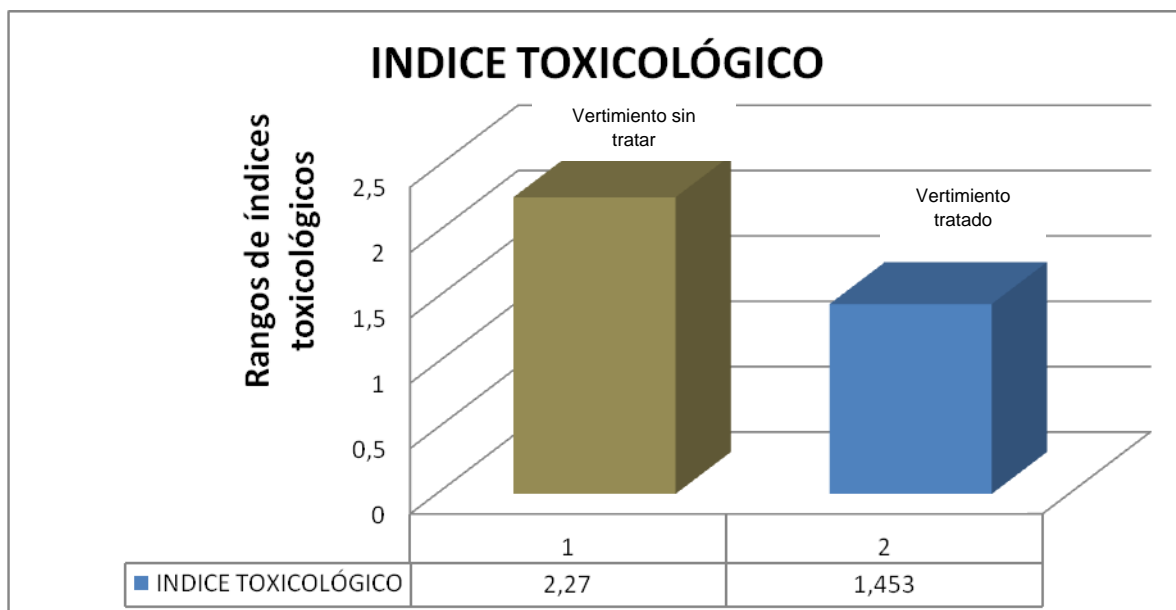
Fuente: Escobar, 2007



Comparando los resultados obtenidos de la carga tóxica con los rangos del índice toxicológico que se presentaban en la tabla 7, el vertimiento industrial sin tratar para la empresa del beneficio del oro (Centro de desarrollo productivo), presenta un riesgo reducido en los vertimientos que realiza con el cianuro en el punto 1 (antes del sistema de tratamiento). Mientras que el vertimiento industrial tratado, presenta un riesgo despreciable en los vertimientos.

Según los resultados obtenidos en el índice toxicológico para la muestra tratada es $IT= 1,453$ y para la muestra no tratada es $IT=2,27$ tal como se observa en la siguiente gráfica:

Gráfica 5. Comparación Índice Toxicológico Vertimiento Tratado y Sin tratar



Fuente: autoras, 2009

Según BASSOI, y TREMAROLI NIETO (1990), en cuanto menor es el valor de la CL_{50-96} encontrada en los test de toxicidad aguda, mayor será la toxicidad del medio.⁶²

⁶² CETESB, 1990. Pruebas de toxicidad aguda mediante bioensayos en el extracto soluble de los residuos de Clase II - no inertes y de clase II B - inerte NÉBORA LIZ VENDRAMIN RODRIGUES Brasil. 2005 Universidad Federal de Paraná.



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

Para validar los resultados obtenidos con Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) durante la investigación, se compararon con datos logrados en otras investigaciones realizadas en el exterior y en Colombia. Las concentraciones letales medias del cianuro y el Dicromato de potasio, obtenidas en la presente investigación, fueron comparadas con otros resultados conseguidos en laboratorios de investigación en Colombia y en el exterior, para validar los resultados obtenidos. Los valores consultados en diferentes bibliografías se observan a continuación:

Tabla 28. Datos de sensibilidad

ORGANISMO EMPLEADO	CL ₅₀ mg/L SENSIBILIDAD	Tiempo de exposición (h)	Estado	Referencia
<i>Trucha arco iris</i>	83.08	96	alevinos	MELGAREJO, J. 1999
<i>Trucha arco iris</i>	35 - 75	96	alevinos	FAO CORPORATEDOCUMENT REPOSITORY.
<i>Diplodon chilensis</i>	20,4	96	alevinos	Universidad de Concepción, Chile. 2006
<i>Trucha arco iris</i>	56,43	96	alevinos	Universidad de la Salle, MATIAS, Carolina, 2008
<i>Trucha arco iris</i>	54,07	96	alevinos	Universidad de la Salle, BARROS Y GAMEZ, 2008
<i>Daphnia pulex</i>	0,097	48	neonatos	Universidad de la Salle OROZCO Y TORO, 2007
<i>Trucha arco iris</i>	52,39	96	alevinos	SANCHEZ-ANDRADE, 2009



Tabla 29. Datos Cianuro

ORGANISMO EMPLEADO	CL ₅₀ mg/L CN	Tiempo de exposición (h)	Estado	Referencia
<i>P. promelas</i>	0,111	96	alevinos	Hartmann, C. 2004
<i>leporis macrochirus</i>	0,15	96	alevinos	CETESB
<i>pitú</i>	0,25	48	alevinos	CETESB
<i>Trucha arco iris</i>	0,27	96	alevinos	CCME, 1996
Invertebrado	0,096 a 2,490	48	alevinos	CCME, 1996
<i>Daphnia</i>	0,330	48	alevinos	CCME, 1996
<i>Daphnia</i>	0,180	48	alevinos	CCME, 1996
<i>Pimephales promelas</i>	0,128	72	alevinos	Broderius et al., 1977
<i>Pomoxis nigromaculatus</i>	0,102	72	alevinos	Smith et al., 1979
<i>Salvelinus fontinalis</i>	0,143	72	alevinos	Smith et al., 1978
Salmo trutta	0,26	96	alevinos	Costa, H.H.1965
Phoxinus phoxinus	0,18	96	alevinos	Wuhrmann, K., and H. Woker1953
<i>Daphnia pulex</i>	0,0903	48	neonatos	Universidad de la Salle, JIMENEZ, GONZALEZ, 2009
<i>Trucha arco iris</i>	0,2039	96	alevinos	SANCHEZ- ANDRADE, 2009



CONCLUSIONES

- ⊕ La sensibilidad de la especie *Oncorhynchus mykiss* al tóxico de referencia (dicromato de potasio) expresada como el promedio de la CL_{50-96} de 14 bioensayos consecutivos es 52,3913 mg/L con una desviación estándar de 3,9413 mg/L. El límite de control superior (LCS) e inferior (LCI) de la CL_{50-96} del $K_2Cr_2O_7$ es 62,212 y 41,4129 mg/L, respectivamente. Lo anterior indica que al alterar las características de un cuerpo de agua se alteraría todo el ecosistema llegando a causar impactos negativos en toda la cadena trófica.
- ⊕ Los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad fueron homogéneos y constantes, dando una viabilidad al momento de hacer los ensayos preliminares y definitivos con las sustancias puras, estableciendo el buen estado fisiológico de los alevinos de trucha arco iris, para garantizar la confiabilidad de los resultados.
- ⊕ La concentración letal media (CL_{50-96}) del Cianuro, hallada mediante los bioensayos sobre alevinos de Trucha arco iris, es de 0.2039 mg/L con una desviación estándar de 0,0157 mg/L. El límite de control superior (LCS) e inferior (LCI) de la CL_{50-96} del cianuro es 0,2519 y 0,1733 mg/L, respectivamente. sin embargo los efectos tóxicos y nocivos para esta especie de organismos vivos son fácilmente observables a concentraciones hasta de 0.15 mg/L de Cianuro.
- ⊕ Se realizó el análisis toxicológico del vertimiento industrial del Centro de Desarrollo Productivo –CDP- (Beneficio De Oro), obteniéndose una concentración letal media (CL_{50-96}) para el punto de ingreso del vertimiento a la planta de tratamiento (punto 1) de 5.66 %V/V y a la salida de la misma (punto 2) de 26.83 %V/V. El límite de control superior (LCS) e inferior (LCI) de la CL_{50-96} del vertimiento en el punto 1 es 6,970 y 4,223 %(V/V), y para el punto 2 son 33,282 y 21,760 %(V/V) respectivamente.
- ⊕ El Índice Toxicológico para el punto 1 es de 2.27; es despreciable y 1.453 reducido para el punto 2, demostrando así que en cuanto menor es el valor de la concentración letal media, mayor será la toxicidad del medio.
- ⊕ Las pruebas de toxicidad aguda mostraron que las muestras obtenidas del vertimiento con contenido de cianuro en el punto 1 presentan efecto agudo o daño a los organismos acuáticos en un porcentaje de 5,66%(V/V) por lo tanto, el índice



toxicológico de este vertimiento es reducido ya que la industria del beneficio del oro cuenta con un sistema de recirculación del cianuro para su total aprovechamiento, evitando así altas descargas del mismo.

⊕ El índice toxicológico encontrado en el punto 2 es despreciable lo cual muestra la eficiencia del sistema de tratamiento y el adecuado manejo de la recirculación del cianuro de sodio; lo que es altamente beneficioso para el cuerpo de agua que esta recibiendo la descarga del vertimiento industrial.

⊕ Los resultados obtenidos al realizar el análisis de varianza con una confiabilidad del 95%, nos muestra por medio de la estadística el rechazo de la hipótesis nula, mostrando que las diferentes concentraciones producen efectos distintos en los organismos prueba.

⊕ El control constante de los parámetros de calidad durante la realización de las pruebas de toxicidad, permite verificar que la muerte de los organismos se genera por el constituyente inorgánico no metálico-Cianuro- y no por otro factor, como se puede ver en los resultados presentados en este documento.

⊕ Durante la realización de las pruebas toxicológicas se observó que existe una pérdida de cianuro (CN-) con el tiempo, (esto es determinado por análisis) debido a las reacciones químicas que el cianuro presenta con el agua, la disolución de cianuro de hidrógeno en agua, llamado ácido cianhídrico el cuál es altamente volátil, sin embargo se conserva el 80% de la concentración designada en cada uno de los montajes.

⊕ Las patologías observadas en los peces inducidas por el cianuro, incluyen hemorragia subcutánea, concentraciones bajas de Cianuro libre como 0.15 mg/L puede afectar con rapidez e irreversiblemente la capacidad de nadar de los salmónidos. Estos resultados sugieren que la exposición a CN a concentraciones de más de 0.1mg/L puede causar graves daños a la fisiología de los peces trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* y por lo tanto al ecosistema acuático.

⊕ El organismo de prueba (*Oncorhynchus mykiss*) al contacto con la sustancia de interés sanitario (Cianuro) pierde la estabilidad; incursionando movimientos natatorios de forma irregular sin posibilidad de recuperar su control mientras permanezcan en el medio contaminado.



- ⊕ Los datos de este estudio, muestran que los sistemas de tratamiento de aguas residuales utilizadas para la industria minera, fueron construidos y operados con un enfoque en la adecuación de parámetros físicos y químicos y la legislación vigente, mostraron una alta eficiencia debido a los resultados obtenidos de carga toxica.
- ⊕ La toxicidad de los efluentes industriales, en correlación con las condiciones de los organismos receptores, se utilizó como una herramienta de trabajo para la evaluación de impacto en el ecosistema acuático en donde se realiza el vertimiento industrial del Centro de Desarrollo Productivo.
- ⊕ El sistema de tratamiento empleado en el CDP para la remoción de sólidos suspendidos y Cianuro de sodio por sedimentación y aplicación de solución, es satisfactorio ya que presenta eficiencias de más del 80% de remoción de los contaminantes evaluados los cuales arrojaron valores en el efluente por debajo de la normatividad vigente.
- ⊕ 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 ensayos de toxicidad con *Oncorhynchus mykiss* son una herramienta esencial para prever el impacto que el efluente industrial puede causar a la biota de los órganos receptores de agua y para indicar el nivel de toxicidad admisible para que tal efecto no ocurra.



RECOMENDACIONES

- ✱ Es importante seguir realizando pruebas de toxicidad con organismos nativos, empleando las sustancias de interés sanitario descritas en el Decreto 1594 de 1984, obteniendo así la mayor cantidad de referencias que puedan complementar los datos que allí se encuentran para que posteriormente sean aplicados en los diferentes climas, especies y ecosistemas del territorio nacional teniendo en cuenta la gran variedad y las diferencias entre cada uno de ellos.
- ✱ Es recomendable realizar una prueba de sensibilidad en forma simultánea a las pruebas con la sustancia tóxica de interés para corroborar que los organismos se encuentran sensibles dentro de los rangos hallados en las pruebas iniciales.
- ✱ 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.
- ✱ Se deben garantizar un 80% de las concentraciones iniciales en los ensayos toxicológicos, ya que debido a diferentes reacciones del cianuro con el agua y la materia orgánica presente en las peceras.
- ✱ 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.
- ✱ Se sugiere una caracterización de los lodos o residuos provenientes de la cianuración con objeto de verificarse que no se encuentran metales pesados y que en épocas de lluvia puedan afectar los suelos por infiltración para evitar riesgos por contaminación por metales pesado en épocas de lluvia, es conveniente realizar un entechado donde se depositaran los lodos residuales o en su defecto taparse con plásticos. La impermeabilización se exigiría en caso de que la caracterización de los lodos presentara dichos metales.
- ✱ Realizar estudio taxonómico para observar los efectos tóxicos de cianuro de sodio y la consiguiente acumulación de peróxido de hidrógeno resultante de las reacciones del cianuro con el agua en los diferentes tejidos funcionalmente a saber, el hígado, las branquias, los músculos y el cerebro.
- ✱ Dentro de los análisis fisicoquímicos de un vertimiento se hace necesario realizar un análisis ecotoxicológico específico para cada ecosistema intervenido teniendo en cuenta los componentes del vertimiento como instrumento de gestión



de las aguas residuales industriales hacia un organismo receptor para la vigilancia, el establecimiento de normatividad, la evaluación del impacto y la conservación de la vida acuática.

☀ Debido al contenido de otros contaminantes tales como zinc, cadmio, plomo, hierro y manganeso en el vertimiento de estudio se recomienda evaluar el grado de bioconcentración de estos contaminantes en los peces.

☀ 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.



BIBLIOGRAFÍA

ALCAZAR, F. Documento guía del curso Regional CPPS/PNUMA/COI, Sobre Bioensayos y pruebas de toxicidad en organismos marinos del pacífico Sudeste.

AMAYA, Rafael. ANZOLA, E. Generalidades sobre el cultivo de la trucha. INDERENA. Bucaramanga: 1988. P. 7-10.

ATSDR. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. 2006. Reseña Toxicológica de Cianuro (versión actualizada) (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública. [en línea]. [Atlanta, USA]: julio 2006; [citado septiembre de 2008]. Cianuro. Disponible en World Wide Web:
http://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/137911-CIANURO_DE_SODIO.pdf

BAPTISTE M. P., FRANCO A. M. 2007. *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792. Catálogo de la Biodiversidad de Colombia. Actualización: 13 agosto de 2007 Disponible en internet desde:
<http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=582&method=displayAAT>. Consultada en junio 2009.

BARRICK GOLD CORPORATION. Hoja de datos de seguridad de materiales. cianuro de sodio. 2006. [documento en línea].disponible en internet desde:
http://www.barrick.cl/operaciones/rrpp/terceros_creibles/MSDS%20CIANURO%20DE%20SODIO.pdf.consultada enero 2009.

BUIKEMA, A.L.; NEIDERLEHNER, B.B. y CAIRNS, J. Jr. 1982. Biological monitoring. Part IV - Toxicity testing. Water Research, Vol. 16, pp. 239-262.

BULUS ROSSINI, Gustavo Daniel; DÍAZ BAEZ, María Consuelo; PICA GRANADOS, Yolanda, Ensayos Toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas, intercalibración, resultados y aplicaciones. Capítulo 5. Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad. En línea. Diciembre de 2006 < http://www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html. 2004>

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



CACERES, I & RAMIREZ, Y. Estudio para la Formulación de un Plan Nacional de Desarrollo Minero. Informe Interno. Bogotá, Instituto de Estudios Colombianos. Ministerio de Minas y Energía. INGEOMINAS. 1987. Disponible en: www.ideam.gov.co

CAMARA ARGENTINA DE EMPRENSARIOS MINEROS. Efectos del cianuro en la salud humana y en el medio ambiente”, [en línea]. Consultado en septiembre 2008. Disponible desde: <http://mineriasudaca.blogspot.com/2007/02/efectos-del-cianuro-en-la-salud-humana.html>

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

VALLEJO, María. BAENA, Carlos. Toxicología Ambiental. Capitulo 2. Conceptos básicos de toxicología ambiental. Pág. 154.

CEPIS, Publicaciones. Manual de evaluación y manejo de sustancias toxicas en aguas superficiales. Anexo 5.A.I. Recomendaciones concernientes a la selección de organismos para bioensayos acuáticos. (Documento en línea). Consultado en junio 2009. Actualizado: 08/09/2001 09:47:00. Disponible en internet desde: <http://www.cepis.ops-oms.org/eswww/fulltext/publica/orimuest/omnanx51.html#organ>.

CETESB, 1990. Pruebas de toxicidad aguda mediante bioensayos en el extracto soluble de los residuos de Clase II - no inertes y de clase II B - inerte NÉBORA LIZ VENDRAMIN RODRIGUES Brasil. 2005 Universidad Federal de Paraná.

CETESB, 1992, L50.17, *Análise estatística de resultados de testes de Toxicidade Aguda*, Sao Paulo, Brasil.

CETESB. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 10.006, 2004, ABNT – Água: Teste de toxicidade aguda com peixes – parte I – sistema estático, L5.019, 1990.

Ciencias Naturales y educación ambiental. Los ecosistemas de Colombia. Disponible en internet desde: http://4.bp.blogspot.com/_ZyogGTcmolo/SKRQAEqFj8I/AAAAAAAAAAc/gjuDH91-Uk4/s320/ecosistema+acuatico+2.jpg

Colaboradores de Wikipedia. *Oncorhynchus mykiss* [en línea]. Wikipedia, La enciclopedia libre, 2009 [fecha de consulta: 13 de mayo del 2009]. Disponible en <http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Oncorhynchus_mykiss=>.



Colaboradores de Wikipedia. *Cianuro* [en línea]. Wikipedia, La enciclopedia libre, 2008 [fecha de consulta: 13 de junio del 2009]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Cianuro>

Control de la Contaminación. Curso dictado para estudiantes de Ingeniería en Materiales del Instituto Tecnológico de Saltillo, Coahuila, México. Imagen tomada del libro Industrial pollution in Japan (Imagen en línea) disponible en internet desde: <http://www.unu.edu/unupress/unupbooks/uu35ie/uu35ie00.htm#Contents>

DISCOVERY CHANEL. Video Piscicultura de la Trucha arco iris. Derechos Reservados. Consultado en junio 2009. (Video en línea). Disponible en internet desde:

http://video.google.com/videosearch?hl=es&q=trucha+arco+iris&um=1&ie=UTF-8&ei=KalpSuHzJcGktgex3pHECA&sa=X&oi=video_result_group&resnum=9&ct=title#.

ERASO K, Andrés. Et al. Fundamentos de agricultura continental. Bogotá: Horacio Rodríguez Gómez, 1993. P. 223, 229, 233, 239.

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

EPA (U.S. Environmental Protection Agency) Technical Resource Document, Extraction and Beneficiation of Ores and Minerals, vol.2, GOLD, 1994.

ESCLAPÉS, M. 1999. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas y terrestres. Versión 2.0. PDVSA. INTEVEP. 213pp

FAO. 1981. Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 4^a. Bases para la elección de ensayos biológicos para evaluar la contaminación marina. FAO, Doc. Tec. Pesca. (164): 34pp.

GÓMEZ CARDENAS, Jeremías. Riesgo potencial de alteración de la calidad ambiental derivado de actividades de extracción y beneficio de oro en la cuenca magdalena – cauca. Universidad Nacional de Colombia. Consultado en junio 2009. (Documento en línea). Disponible en internet desde:

<http://www.ideam.gov.co/biblio/paginaabierta/Proyecto%20Miner%EDa.pdf>

GONZALEZ, L.M. & PRIETO G. Diagnóstico del Impacto Ambiental Ocasionado por la Minería del Oro en Colombia. INGEOMINAS. 1993.



GONZÁLEZ, Silvia. Impactos ambientales y en la salud humana de la minería a cielo abierto para la extracción de oro utilizando lixiviación con soluciones de cianuro. 2005. Disponible en www.sospatagonia.netfirms.com

GUERRERO, José J. CIANURO. Toxicidad y Destrucción Biológica. Consultoría en Biotecnología Minera y Ambiental Minera. [online]. Consultado septiembre 2008. Disponible en internet desde:
<http://www.ilustrados.com/documentos/cianurotoxdestrucbiologica.pdf>

ICONTEC. GUÍA TÉCNICA COLOMBIANA. Gestión ambiental. Agua. Guía para la realización de ensayos de toxicidad en organismos acuáticos. Ministerio de Desarrollo Económico.

INGEOMINAS. Atlas Nacional de Efectos ambientales Generados por la Actividad Minera con Énfasis en el Medio Físico. Bogotá, 1999.

LEYVA, Pablo. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, IDEAM. EL MEDIO AMBIENTE EN COLOMBIA. CAP. 7 Los Ecosistemas. pág. 278. 2a edición, Bogotá, agosto de 2001. (Libro en línea). Consultado mayo de 2008. Disponible en internet desde:
<http://www.ideam.gov.co/publica/medioamb/cap7.pdf>

LOGSDON, Mark J. HAGELSTEIN, Karen y MUDDER, Terry I. El Manejo del Cianuro en la Extracción de Oro. Traducido de la publicación en inglés titulada The Management of Cyanide in Gold Extraction. Traducción al español: Ana María Paonessa. Disponible en Web:
http://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/137911-CIANURO_DE_SODIO.pdf.

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 mayo de 2008. Disponible en Internet <http://www.jmarcano.com/nociones/fresh2.html>>

MINISTERIO DE ENERGÍA Y MINAS DEL PERÚ. Guía ambiental para el manejo del cianuro en relaves mineros. [en línea].consultado en mayo de 2009. Disponible en internet desde:
<http://www.minem.gob.pe/archivos/dgaam/legislacion/guias/cianuro.pdf>. pág. 4-13.

MONTENEGRO, Raúl A. Efectos de sustancias empleadas en el método de lixiviación con cianuro. Fundación para la defensa del ambiente. 2006.
OROZCO. Muestreo y conservación de muestras. Ed. Thomson, 2003. Em línea desde:



http://iq.ua.es/MedioAmbiente/paginaprincipalagua_archivos/1Aguas%20naturales/5parametros.swf. Consultado en marzo 2009.

PEREZ, Julio. HIGUERA, Oscar. COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DEL CIANURO. Grupo CP2-ECP ECOPETROL. REVISTA, Ingeniería y Desarrollo. Número 24. Julio-diciembre, 2008 ISSN: 0122-3461. Consultado junio 2009. (En línea desde):

http://ciruelo.uninorte.edu.co/pdf/ingenieria_desarrollo/24/5_Comportamiento%20electroquimico.pdf.

PIÑEROS, Renán y CALA, Plutarco. Motilidad, Morfología, concentración y número de espermatozoides en reproductores de trucha arco Iris *Oncorhynchus mykiss*. En: Revista de la Academia Colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales. Vol.18, N68 (mayo, 1991); p.1.

PRIESTER, M. Heavy Metals Contents of Stream Sediments in a Gold Mining Area Near Los Andes, Southern Colombia. Technical and Ecological Perspectives. Pasto, CORPONARIÑO. 1992.

ROLDÁN, G. 1992. Fundamentos de limnología tropical. 1.ª ed. Edit. Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia, 529 pp.

ROMERO ROJAS, Jairo Alberto. Tratamiento de aguas residuales por lagunas de estabilización. Primera Edición. Bogotá. Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería. 1999.

SCOTT, J. S., Status of Gold Mill Waste Effluent Treatment, Informe para CANMET, Recursos Naturales Canadá, Marzo de 1993.

SMITH, A. C. S. y T. I. MUDDER, 1991. The Chemistry and Treatment of Cyanidation Wastes. [Química y tratamiento de residuos de la cianuración], Mining Journal Books, Londres, Reino Unido. El manejo del cianuro en la extracción del oro.

VALLEJO ROSERO, María del Carmen. Toxicología Ambiental. Fondo Nacional Universitario. Santafé de Bogotá. 1997. P15. CAMPO MARTI, Miguel. Principios de ecotoxicología. Diagnostico tratamiento y gestión del medio ambiente. Mcgraw Hill. Interamericana de España. Barcelona; 2002. p 2, 152, 185.

WALPOLE, Ronald. E. MYERS, Raymond H. Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. 8ed. Apéndice A. Tabla A.6. Valores críticos de la distribución F.



BIBLIOGRAFÍAS ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

LE QUANG DUNG, NGUYEN DUC CU. VISTA (VIETNAM INFORMATION FOR SCIENCE AND TECHNOLOGY ADVANCE). National center for scientific and technological information. Partial toxicity tests of copper (Cu²⁺), zinc (Zn²⁺) and cyanide (CN) for young cobia fishes (*Rachycentron canadum*) with 45 day-old. TC Biología. -2007. -Vol 29. -No 2. -p. 78-83. -(vie). -ISSN 0866-7160. [online].
http://english.vista.gov.vn/english/st_documents_abstract/200502176317656768/200706233708435811/200706233928287363/200802289789846576/200802281090007937.

PARLO F.; STAUBER J. L.; BUCKNEY R. T. Toxicity of cyanide and cyanide complexes to the marine diatom *Nitzschia closterium*. Science Direct. *Water Research, Volume 31, Issue 10, October 1997, Pages 2435-2442F*. [online].
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6V73-3T7CF35-6&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=951909281&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=01a2d0e5c9a0aabe2c6f2847f5d7fa6.

MUNISWAMY DAVID, VADINGADU MUNASWAMY, RAMESH HALAPPA Y SHAMBANGUDA R. MARIGOUDAR. Impact of sodium cyanide on catalase activity in the freshwater exotic carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). Science Direct. Volume 92, Issue 1, September 2008, Received 13 August 2007; accepted 31 March 2008. Available online 29 April 2008. Pages 15-18. [online].
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WP8-4SD29KP-3&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=5cd80a8e2bc6bee00318b59b03b50be4

BY D. W. M. HERBERT AND J. C. MERKENS. THE TOXICITY OF POTASSIUM CYANIDE TO TROUT THE TOXICITY OF POTASSIUM CYANIDE TO TROUT. *The Journal of Experimental Biology. The Water Pollution Research Laboratory, Watford, Herts* 29 (4): 632. 1952. [online].
<http://jeb.biologists.org/cgi/reprint/29/4/632>

WAN SOO KIM, JONG WOOK KIM, JAE HAK LEE AND SUNG HOE HUH. Effects of sodium cyanide (NaCN) on the endogenous rhythm of the oxygen consumption rate in the black rockfish *sebastes schlegeli*. Ocean Science Journal.



Volume 43, Number 2 / junio de 2008.pag. 107-113. ISSN. 1738-5261 (Print) 2005-7172 (Online). <http://www.springerlink.com/content/7128606t166w0486>.

SANDI M. MCGEACHY AND GÉRARD LEDUC. The influence of season and exercise on the lethal toxicity of cyanide to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology. Volume 17, Number 3 / mayo de 1988. ISSN. 0090-4341 (Print) 1432-0703. Pag. 313-318. Received: 16 September 1986 Revised: 20 August 1987 (Online). <http://www.springerlink.com/content/t3154v4n30816666/>.

J. S. ALABASTER, D. G. SHURBEN , M. J. MALLETT. The acute lethal toxicity of mixtures of cyanide and ammonia to smolts of salmon, *Salmo salar* L. at low concentrations of dissolved oxygen. Journal of Fish Biology. Volume 22 Issue 2, Pages 215 – 222. Published Online: 24 Jan 2006. Journal compilation © 2009 The Fisheries Society of the British Isles. The official journal of the Fisheries Society of the British Isles. (online). <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119540959/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>

TIBOR G. KOVACS AND GÉRARD LEDUC. Acute Toxicity of Cyanide to Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Acclimated at Different Temperatures. Canadian Journal of Fisheries and aquatic sciences. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **39**(10): 1426–1429 (1982) doi:10.1139/f82-192 © 1982 NRC Canada. Date modified: 2009-07-20. (Online). <http://rparticle.web-p.cisti.nrc.ca/rparticle/AbstractTemplateServlet?journal=cjfas&volume=39&year=&issue=&msno=f82-192&calyLang=eng>.

CARBALLO, M., MUÑOZ, M.J., CUELLAR, M. AND TARAZONA, J.V. 1995. Effects of water-borne copper, cyanide, ammonia and nitrite on stress parameters and changes in susceptibility to saprolegniosis on *Oncorhynchus mykiss*. Applied and Environmental Microbiology. 61:2108-2112.

CARBALLO, M., TORROBA, M., MUÑOZ, M.J., SANCHEZ, C., TARAZONA, J.V. AND DOMINGUEZ, J. (1992). Effect of copper and cyanide on some immunological parameters and stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology 2:121-129.

ORTIZ, J.A., CARBALLO, M. AND TARAZONA, J.V. (1992) Influencia de una exposición subletal a cobre y cianuro en la excreción de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Inves. Agra. Prod. San. Animal. 7: 9-20.



NOVILLO, M. LLORENTE, A. CASTAÑO. Evaluación de la toxicidad aguda de 15 sustancias puras utilizando dos métodos alternativos. AETOX. (Asociación española de Toxicología). Toxicología Ambiental. CISA-INIA. Valdeolmos 28130-Madrid. XIII Congreso Español de Toxicología. Granada, 22-24 de Septiembre, 1999. Rev. Toxicol. 16: 168-169 (1999). ECO- 11. (Online).
<http://www.uv.es/aetoxweb/revista/revtox.16/revtox.16.granada.16.html>



ANEXOS



ANEXO A. FICHA DE SEGURIDAD CIANURO DE SODIO

Fuente: BARRICK GOLD CORPORATION, 2006

	Hoja de Datos de Seguridad de Materiales (M S D S)			MBM-PQ-015 F. Elaboración: 10 Enero 2002 F. Revisión: 15 Abril 2006.
Nombre del Producto CIANURO DE SODIO	U N 1689	GR 157		
Sección 1. Identificación del Producto Químico y Compañía.				
Fórmula Química: NaCN Numero CAS : 143-33-9 Sinónimos: Cianuro de Sodio, Prusiato de Soda. Usos: Extracción de oro y metalurgia, pilas de Lixiviación. Fabricante / Manufacturero: DUPONT – COMPANY. Teléfono: 1 (800) 441-7515				
Sección 2. Composición / Información de Ingredientes				
Ingredientes: +Cianuro de Sodio, otras sales de Sodio Proporción: 99% típico, 1% - 4% máximo. Compañía: DUPONT - COMPANY.				
Sección 3 Identificación de Peligros				
Clasificación de Riesgos: Agudo: Si Crónico: No Fuego: No Reactividad: Si Presión: No Lista de elementos Químicos Peligrosos. SARA Sustancia Extremadamente Peligrosa: Si CERCLA Sustancia Peligrosa: Si SARA Elemento Químico Tóxico: Si Inhalación: Puede ser fatal si se inhala, se traga o se absorbe a través de la piel. El contacto con ácidos, agua o álcalis débiles libera gas cianuro hidrógeno Venenoso. Puede causar quemaduras a los ojos. Puede irritar la piel y causar quemaduras alcalinas y los síntomas son: Enrojecimiento en los ojos, irritación en la garganta, palpitaciones, dificultad para respirar, salivación, desorientación, náuseas, dolor de cabeza, debilidad de extremidades, vértigo, colapso, convulsiones. Piel: El contacto con la piel puede causar irritación con molestias y sarpullidos; soluciones fuertes pueden causar quemaduras en la piel o ulceraciones. La evidencia				



sugiere una permeabilidad significativa en la piel puede ocurrir. No existen registros de sensibilización en humanos.

Ojos: Puede causar irritación, lagrimeo, o dificultades para ver. Prolongadas exposiciones pueden causar corrosión con ulceración corneal y/o conjuntivitis.

Efectos Crónicos: Inhalación, ingestión o contacto con la piel con cianuro de sodio puede causar molestias no específicas tales como náuseas, dolor de cabeza, y desfallecimiento, tanto como vómitos, baja en la presión sanguínea, debilitamiento, hemorragia nasal y pérdida de la conciencia. Estimulación del sistema nervioso central seguido por una depresión puede ocurrir con convulsiones, hipoxia y muerte debido a la interrupción de la respiración. Altas exposiciones pueden acelerar la respiración y el pulso, cianosis, acidosis y algunos efectos en la tiroides (observados en individuos con deficiencia nutricionales, síntomas asociados con el síndrome de Parkinson o edema pulmonar y muerte en grandes exposiciones). En algunos casos con problemas en la visión o daño en el nervio óptico o retina, atribuibles al cianuro de sodio, el daño en el nervio óptico o de incremento en el insomnio, sueño agitado, temblores, dermatitis y hemorragia nasal en trabajadores de electrogalvanizado. Personas con enfermedades preexistentes al sistema nervioso central pueden aumentar su susceptibilidad a la toxicidad en exposiciones excesivas.

Sección 4 Medidas de Primeros Auxilios.

Inhalación: Si hay pérdida de conciencia, se debe administrar oxígeno y nitrato de amilo. Traslade al paciente a una atmósfera no contaminada, mantenga al paciente abrigado y tranquilo. Llame al médico.

Contacto con la piel: Si el trabajador está inconsciente, se debe administrar oxígeno y nitrato de amilo. Lave inmediatamente con grandes cantidades de agua durante por lo menos 5 minutos después del contacto o sospecha de contacto, saque completamente toda la ropa contaminada. (incluyendo los zapatos y botas). Lave con agua por lo menos 5 minutos para sacar el cianuro de la piel del paciente. Llame al médico.

Contacto con los ojos: Lave inmediatamente los ojos con grandes cantidades de agua durante por lo menos 5 minutos manteniendo los ojos abiertos. No trate de neutralizar con ácidos o álcalis. El contacto con los ojos va a requerir una evaluación en más profundidad y posiblemente un tratamiento. Continúe lavando los ojos durante el traslado al hospital. Consulte con el médico.

Ingestión: Si hay pérdida de conciencia, el oxígeno y el nitrato de amilo deberá administrarse. Si el paciente está inconsciente, suministre de inmediato un preparado de agua con carbón. No haga tragar nada por la boca si el paciente está inconsciente. Llame al médico continúe administrando oxígeno. No suministre JARABES ni otros inductores del vómito ya que esto podría interferir con el uso de resucitador.

Sección 5. Medidas para Combatir Incendios.

Fuego/Explosión: No se quema. El cianuro puede no destruirse completamente en un fuego normal que comprometa a materiales combustibles tales como papel o madera. Como el cianuro no induce la combustión se puede oxidar en un incendio. Respete los códigos de la Asociación Nacional de Protección contra Incendios (NFPA).

Elementos de extinción: Use agua en los incendios cercanos al cianuro pero reduzca la cantidad de agua si los contenedores están abiertos o quemados, para evitar la fuga de cianuro. NO USE Dióxido de carbono (CO₂) con el cianuro húmedo ya que el ácido carbónico (H₂O + CO₂) podría liberar cianuro.



Instrucciones para el combate de incendios: El cianuro de sodio se disuelve rápidamente con el agua; por lo tanto puede haber fuga de solución de cianuro si el contenedor se quema se abre o se quema. La fuga debe ser controlada para evitar problemas de seguridad y de medio ambiente. La solución de cianuro de sodio. En algunos casos podría ser aconsejable dejar que el fuego se consuma solo ya que el cianuro de sodio normalmente no se verá afectado por el fuego.

Sección 6 Medidas para Derrames Accidentales.

Limpieza de derrame: Usando palas y escobas, limpie el área derramada y dejando el material recuperado en un contenedor cerrado y en bolsa plástica para ser eliminado. Cubra y seque el área derramada. Lave el área derramada con una solución diluida de hipoclorito de sodio o hipoclorito de calcio. Para destruir el cianuro. Llame a DUPONT COMPANY para obtener asesoría.

Sección 7 Manejo y Almacenamiento.

Manipulación: La planificación de emergencia y el entrenamiento son necesarios antes de comenzar a trabajar con el cianuro ya que el tratamiento inmediato es esencial en casos de envenenamiento con cianuro. Mantenga siempre los Kits de Antídoto de Cianuro a mano. No respire el polvo, el rocío ni el gas de cianuro. Evite que entre a los ojos. Evite el contacto con la piel y la ropa. No lleve alimentos, bebidas ni tabaco cuando sea posible la contaminación con cianuro. Lave completamente después de manipular. Lave la ropa contaminada antes de volver a usarla.

Almacenado: Almacene en contenedores bien etiquetados en áreas secas, bien ventiladas y seguras. Mantenga los contenedores cerrados y secos. No almacene con ácidos o sales ácidas contenedores con agua o álcalis débiles o agentes oxidantes. No manipule ni almacene comida, bebidas ni tabaco en las áreas con cianuro o almacene cerca de combustibles ni inflamables ya que el consecuente procedimiento para apagar incendios con agua puede llevar a fugas de cianuro. No almacene bajo sistemas de sprinklers.

Sección 8 Control de Exposición / Protección del Personal.

Controles de Ingeniería: Use la suficiente ventilación como para mantener la exposición de los empleados bajo los límites recomendados.

Equipo de Protección Personal: Use protección ocular contra sustancias químicas y Guantes de goma. Cuando existan exposiciones en el aire potencialmente mayores a los límites aplicables, use el equipo de protección respiratorio aprobado por NIOSH, incluyendo el sistema autónomo. Tenga a mano y use: protección para el rostro, ropa de goma, delantales y botas; aparatos de respiración desechable para el polvo y rocío tóxico, equipos de respiración autónomo (en caso de emergencia); detector de cianuro de hidrógeno, elementos de Primeros Auxilios y de Tratamiento Médico, incluyendo resucitadores de oxígeno.

Sección 9 Propiedades Físicas y Químicas.

Forma: Sólido, granulado, briquetas.

PH: 11.3 – 11.7

Color: Blanco.

Olor: leve olor a amoníaco.

Punto de Ebullición: 1496°C(2725F)
760 mm.Hg

Gravedad Específica: 1.6

Presión de Vapor: Mínimo.

Punto de Fusión: 564C (1047F).

Solubilidad en agua: -37 WT% @ 20 C (68F)



Densidad en bruto (embalado): 50-55lbs/pies3.

Sección 10 Estabilidad y Reactividad.

Estabilidad: Muy estable cuando esta seco.

Proliferación / Polimerización: No habrá polimerización.

Incompatibilidades Químicas: Grandes cantidades de gas cianuro de hidrógeno inflamable y venenoso (HCN) se producirá por el contacto con ácidos, reacciona violentamente con agentes oxidantes fuertes cuando se calienta. El agua o las soluciones alcalinas débiles pueden producir cantidades peligrosas de cianuro de hidrógeno en áreas confinadas.

Descomposición: La humedad causara una lenta descomposición, liberando cianuro hidrógeno venenoso y gases de amoníaco.

Sección 11 Información Toxicológica.

Oral LD₅₀: 15 mg/kg en ratas.

Dérmico LD₅₀: 11.28 – 14.63 mg/kg en conejos.

Inhalación LC₅₀: Información no disponible pero se considera altamente tóxico como CN por inhalación.

Sección 12 Información Ecotoxicológica.

Toxicidad Acuática: Cianuro de Sodio.

96 horas LC₅₀ – Fathead minnows: 0.43 – 0.66 mg/L.

96 horas LC₅₀ – Trucha arcoiris: 0.46 – 0.75 mg/L.

96 horas LC₅₀ – Bluegill sunfish: 0.28 mg/L.

Sección 13 Consideraciones Relativas a la Eliminación.

Eliminación de desperdicios: Este material puede ser un desecho peligroso. No vacíe cianuro en alcantarillas que puedan contener un ácido. Desintoxique usando hipoclorito de sodio diluido, peróxido de hidrogeno o hipoclorito de calcio, cumpla con la legislación que establece el método de eliminación.

Sección 14 Información para el Transporte.

DOT

Nombre del producto de embarque: CIANURO DE SODIO.

Clase de Riesgo: 6.1

No I.D UN/NA: UN1689

Rotulo DOT: TOXICO

Información Especial: Contaminante Marino.

Grupo Del Embalaje: I

DOT/ IMO

Nombre del producto de embarque: CIANURO DE SODIO SOLIDO.

Clase de Riesgo: 6.1

No I.D UN/NA: UN1689

Rotulo DOT: TOXICO

Información Especial: Contaminante Marino.

Grupo Del Embalaje: I

Cantidad Reportable: 10 lb (4.54 kg.)



ANEXO B. TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).

PRUEBA DE SENSIBILIDAD

PRUEBA No. 1					Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)																INICIO: 17/03/2009 11horas						
3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS							
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 21/03/2009 11horas		
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	2	0	0	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	2	6	20	30
60	1	2	3	1	1	2	3	1	1	2	3	2	2	3	4	3	2	3	4	3	2	3	4	3	12	20	60
80	2	2	3	3	2	2	3	3	2	2	3	3	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	16	20	80
100	2	2	2	3	3	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 58,8872 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 52,0764 mg/L								Límite inferior: 45,1948 mg/L						

				PRUEBA No. 2				Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)																									
				3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS				INICIO:		17/03/2009		11horas	
Concentración				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN:		21/03/2009		11horas	
Nominal ppm				1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos		Nº Total		% Mortalidad					
BLANCO				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
20				0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	3	20	15			
40				1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	6	20	30			
60				1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	2	2	1	0	3	2	1	2	3	2	1	2	8	20	40			
80				2	0	1	1	3	1	2	1	4	1	3	1	4	2	3	2	4	3	3	3	4	3	3	3	13	20	65			
100				3	2	2	2	4	3	2	2	4	3	3	3	4	4	4	3	5	5	5	4	5	5	5	4	19	20	95			
RESULTADOS				Límite superior: 67,1031 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 54,4433 mg/L								Límite inferior: 43,6822mg/L													

RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade



**TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).
PRUEBA DE SENSIBILIDAD**

PRUEBA No. 3				Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)																				INICIO: 10/03/2009 10horas			
3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS							
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 14/03/2009 10horas		
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	4	20	20
40	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	2	0	2	1	2	1	2	2	7	20	35
60	1	1	0	0	2	1	0	1	2	1	0	1	3	1	1	1	3	2	2	2	3	2	3	2	10	20	50
80	0	1	0	0	1	1	1	1	2	1	2	1	3	3	3	3	4	3	3	3	4	3	3	3	13	20	65
100	2	2	1	1	2	3	1	2	2	3	2	3	4	4	3	4	5	5	4	5	5	5	4	5	19	20	95
RESULTADOS				Límite superior: 61,3881 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 49,0708 mg/L								Límite inferior: 37,7291 mg/L							

				PRUEBA No. 4				Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)																								
				3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS				INICIO:		10/03/2009		10horas
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN:		14/03/2009		10horas			
	Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	Nº Total	% Mortalidad				
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0				
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	2	20	10				
40	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	1	6	20	30					
60	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	2	1	2	1	2	2	3	1	2	2	3	1	8	20	40					
80	2	1	1	0	2	1	1	0	3	2	1	0	3	3	1	1	3	3	2	2	3	3	3	3	12	20	60					
100	3	1	1	1	4	2	2	1	4	3	3	3	5	4	4	4	5	4	4	4	5	4	4	5	18	20	90					
RESULTADOS					Límite superior: 58,8872 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 52,0764 mg/L								Límite inferior: 45,1948 mg/L											

RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade

LENNY SÁNCHEZ – PAOLA ANDRADE



**TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).
PRUEBA DE SENSIBILIDAD**

PRUEBA No. 5				Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)																				INICIO: 24/03/2009 12horas				
3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS								
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 28/03/2009 12horas			
	Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3				4
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
20	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	3	20	15	
40	1	0	0	1	1	0	2	2	1	0	3	2	1	0	3	2	2	0	3	3	2	0	3	3	8	20	40	
60	2	1	1	1	3	2	1	1	3	3	1	1	3	3	2	1	3	3	2	2	3	3	2	2	10	20	50	
80	2	2	3	2	2	2	3	2	3	3	3	2	3	4	3	2	4	4	3	2	4	4	3	2	13	20	65	
100	3	3	2	1	3	3	2	2	4	3	3	3	5	4	4	3	5	5	5	4	5	5	5	4	19	20	95	
RESULTADOS					Límite superior: 61,0455 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 49,5163 mg/L								Límite inferior: 38,8068 mg/L							

				PRUEBA No. 6				Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)																							
				3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS				INICIO:		24/03/2009 12horas	
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN:		28/03/2009 12horas				
	Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	Nº Total	% Mortalidad			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0			
20	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	2	20	10				
40	2	0	0	0	2	1	0	0	3	1	0	0	3	2	0	0	4	2	0	1	4	2	0	1	7	20	35				
60	1	2	1	0	1	2	1	1	2	2	2	1	2	3	2	1	3	3	2	1	3	3	2	2	10	20	50				
80	3	2	1	1	3	3	1	1	4	4	1	1	5	4	2	1	5	4	2	1	5	4	3	2	14	20	70				
100	4	1	2	1	5	1	2	2	5	3	3	2	5	4	3	3	5	4	3	3	5	5	4	5	19	20	95				
RESULTADOS					Límite superior: 61,6628 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 51,4289 mg/L								Límite inferior: 41,8277 mg/L										

RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade



**TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).
PRUEBA DE SENSIBILIDAD**

PRUEBA No. 7				Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)																				INICIO: 31/03/2009 10horas				
3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS								
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 4/04/2009 10horas			
	Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3				4
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
20	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	0	1	0	2	0	1	0	2	0	3	20	15	
40	2	0	0	0	2	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	2	2	1	0	3	2	1	0	6	20	30	
60	1	1	0	1	2	2	0	1	2	2	0	2	2	3	1	2	2	3	1	2	2	3	1	2	8	20	40	
80	1	1	2	1	1	1	3	1	1	1	4	2	1	1	4	2	2	1	5	3	3	2	5	3	13	20	65	
100	1	2	2	3	2	3	3	3	1	3	3	4	3	3	3	5	4	3	3	5	5	4	3	5	17	20	85	
RESULTADOS					Límite superior: 73,2345 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 57,2063 mg/L								Límite inferior: 45,0477 mg/L							

PRUEBA No. 8				Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)																				INICIO: 31/03/2009 10horas			
3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS							
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 4/04/2009 10horas		
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
20	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	3	20	15
40	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	2	1	1	2	3	1	1	2	7	20	35
60	2	2	0	1	2	2	0	1	2	2	1	1	2	2	1	1	4	3	2	1	4	3	2	1	10	20	50
80	1	2	1	1	2	2	2	1	2	3	2	1	2	3	2	2	2	3	2	3	3	4	4	3	14	20	70
100	3	3	1	1	4	3	1	1	4	4	2	1	4	4	3	2	4	4	4	4	5	4	5	4	18	20	90
RESULTADOS					Límite superior: 62,6989 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 50,7281 mg/L								Límite inferior: 39,8871 mg/L						

RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade



**TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).
PRUEBA DE SENSIBILIDAD**

PRUEBA No. 9				Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)																				INICIO: 14/04/2009 11horas			
3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS							
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 18/04/2009 11horas		
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	2	20	10
40	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	5	20	25
60	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	2	1	0	1	2	1	0	1	3	2	1	7	20	35
80	0	1	1	0	1	1	1	1	1	2	1	2	1	3	1	3	2	4	2	3	3	4	2	3	12	20	60
100	3	2	1	1	4	3	2	1	4	3	3	4	4	3	4	5	5	4	4	5	5	4	4	5	18	20	90
RESULTADOS				Límite superior: 75,7933 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 61,2239 mg/L								Límite inferior: 50,1793 mg/L							

PRUEBA No. 10				Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)																				INICIO: 14/04/2009 11horas			
3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS							
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 18/04/2009 11horas		
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
20	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	2	4	20	20
40	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	2	7	20	35
60	3	1	0	0	3	1	0	0	3	1	1	1	3	1	1	1	3	2	1	2	3	2	1	3	9	20	45
80	2	3	3	4	2	3	3	4	3	3	4	4	3	3	4	4	3	3	4	4	3	3	4	4	14	20	70
100	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	3	4	5	5	4	4	5	5	4	4	5	5	4	18	20	90
RESULTADOS					Límite superior: 63,5089 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 50,1948 mg/L								Límite inferior: 38,3716 mg/L						

RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade

LENNY SÁNCHEZ – PAOLA ANDRADE



**TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).
PRUEBA DE SENSIBILIDAD**

PRUEBA No. 11				Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)																				INICIO: 27/04/2009 11horas			
3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS							
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 30/04/2009 11horas		
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
40	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	8	20	40
60	1	1	1	2	1	1	3	2	1	2	3	2	1	3	3	2	1	3	3	3	2	4	3	3	12	20	60
80	4	1	3	3	4	2	4	4	4	3	5	4	4	3	5	4	4	3	5	4	4	3	5	4	16	20	80
100	4	3	3	3	4	4	4	4	5	5	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS				Límite superior: 56,1792 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 49,1048 mg/L								Límite inferior: 42,2209 mg/L							

PRUEBA No. 12				Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)																				INICIO: 27/04/2009 11horas			
3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS							
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 30/04/2009 11horas		
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
40	0	0	0	1	2	0	0	1	2	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	8	20	40
60	1	0	0	0	2	0	0	0	2	1	1	0	2	2	2	0	3	3	2	1	3	4	2	1	10	20	50
80	2	2	2	1	3	2	2	2	3	3	3	3	3	4	3	4	4	4	4	5	4	4	4	5	17	20	85
100	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 50,3830 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 57,3952 mg/L								Límite inferior: 4,4974 mg/L						

RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade



**TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).
PRUEBA DE SENSIBILIDAD**

PRUEBA No. 13				Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)																				INICIO: 19/05/2009 11horas			
3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS							
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 23/05/2009 11horas		
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
40	2	1	1	0	2	1	1	0	3	1	1	0	3	2	2	0	3	2	2	0	3	2	2	1	8	20	40
60	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3	3	3	2	11	20	55	
80	2	0	0	1	3	1	1	2	3	2	2	3	3	3	4	3	4	4	4	4	4	5	5	18	20	90	
100	2	1	2	2	3	2	3	3	3	3	4	4	4	4	5	5	4	5	5	5	5	5	5	20	20	100	
RESULTADOS				Límite superior: 55,4765 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 48,9646 mg/L								Límite inferior: 42,3508 mg/L							

PRUEBA No. 14				Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)																				INICIO: 02/06/2009 12horas			
3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS							
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 06/06/2009 12horas		
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
40	2	0	0	0	3	0	0	0	3	1	0	0	3	2	0	0	4	3	1	1	4	3	1	1	9	20	45
60	1	0	1	1	2	0	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3	3	2	2	10	20	50
80	2	1	1	1	3	2	2	2	3	3	3	3	3	3	4	3	3	3	4	3	3	4	4	3	14	20	70
100	2	2	2	1	3	3	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 59,2472 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 50,5332 mg/L								Límite inferior: 42,6695 mg/L						

RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade



**TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).
PRUEBA DE TOXICIDAD CIANURO DE SODIO (NaCN)**

Concentración	PRUEBA No. 1				Sustancia de prueba: Cianuro de sodio (NaCN)																				INICIO: 21/04/2009 11horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS				FINALIZACIÓN: 25/04/2009 11horas		
	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº muertos, Nº Total, % Mortalidad		
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	2	1	0	1	2	1	0	1	2	4	20	20
1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS				Límite superior: 0,2866 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 0,1842 mg/L								Límite inferior: 0,1210 mg/L							

Concentración	PRUEBA No. 2				Sustancia de prueba: Cianuro de sodio (NaCN)																				INICIO: 21/04/2009 11horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS				FINALIZACIÓN: 25/04/2009 11horas		
	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº muertos, Nº Total, % Mortalidad		
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	2	0	0	1	2	0	1	1	2	0	1	1	2	0	1	4	20	20
0,3	2	0	0	0	3	0	1	0	3	1	2	1	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2	10	20	50
0,5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
0,7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS				Límite superior: 0,2800 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 0,2197 mg/L								Límite inferior: 0,1545 mg/L							

RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade



**TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).
PRUEBA DE TOXICIDAD CIANURO DE SODIO (NaCN)**

	PRUEBA No. 3								Sustancia de prueba: Cianuro de sodio (NaCN)																INICIO: 27/04/2009 11horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 30/04/2009 11horas		
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
0,1	0	2	0	1	0	2	0	1	0	2	0	1	0	2	0	1	0	2	0	1	0	2	0	1	3	20	15
0,3	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	12	20	60
0,5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
0,7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 0,2629 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 0,2120 mg/L								Límite inferior: 0,1579 mg/L						

	PRUEBA No. 4								Sustancia de prueba: Cianuro de sodio (NaCN)																INICIO: 27/04/2009 11horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 30/04/2009 11horas		
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	Nº Total	% Mortalidad
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
0,2	1	1	0	2	1	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3	3	2	2	3	3	2	2	3	10	20	50
0,3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
0,4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
0,5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 0,2174 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 0,1998 mg/L								Límite inferior: 0,1749 mg/L						

RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade



**TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).
PRUEBA DE TOXICIDAD CIANURO DE SODIO (NaCN)**

	PRUEBA No. 5								Sustancia de prueba: Cianuro de sodio (NaCN)																INICIO: 5/05/2009 10horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 9/05/2009 10horas		
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	Nº Total	% Mortalidad
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
0,10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
0,15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	2	1	1	0	2	1	4	20	20
0,20	2	0	0	0	2	1	1	0	3	2	1	0	3	2	1	1	3	2	2	2	3	2	2	2	10	20	50
0,25	1	0	1	0	2	2	2	3	3	4	3	5	4	5	3	5	4	5	4	5	5	5	5	5	20	20	100
0,30	3	2	2	2	3	3	4	5	4	4	5	5	4	4	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 0,2017 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 0,1875 mg/L								Límite inferior: 0,1724 mg/L						

	PRUEBA No. 6								Sustancia de prueba: Cianuro de sodio (NaCN)																INICIO:		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN:		
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
0,10	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	20	5
0,15	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	2	20	10
0,20	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2	1	0	0	2	1	0	0	2	3	20	15
0,25	2	2	2	3	3	2	3	3	3	2	3	3	3	2	3	3	3	2	3	3	3	2	3	3	11	20	55
0,30	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	4	19	20	95
RESULTADOS					Límite superior: 0,2848 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 0,2294 mg/L								Límite inferior: 0,1937 mg/L						

RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade

LENNY SÁNCHEZ – PAOLA ANDRADE



**TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).
PRUEBA DE TOXICIDAD CIANURO DE SODIO (NaCN)**

	PRUEBA No. 7								Sustancia de prueba: Cianuro de sodio (NaCN)																INICIO: 12/05/2009 10horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 16/05/2009 10horas		
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	Nº Total	% Mortalidad
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	
0,10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	
0,15	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	20	
0,20	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	2	4	20	
0,25	2	4	2	2	3	4	2	2	3	5	3	3	3	5	3	4	3	5	3	4	3	5	3	4	15	20	
0,30	4	4	4	3	4	4	4	3	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	4	19	20	
RESULTADOS					Límite superior: 0,2370 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 0,2193 mg/L								Límite inferior: 0,2020 mg/L						

	PRUEBA No. 8								Sustancia de prueba: Cianuro de sodio (NaCN)																INICIO: 12/05/2009 11horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 16/05/2009 11horas		
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
0,10	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	20	10
0,15	2	1	0	0	2	1	0	0	2	1	0	0	2	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	4	20	20
0,20	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	6	20	30
0,25	2	1	3	3	2	1	3	3	3	2	4	3	3	2	4	4	3	2	4	4	3	2	4	4	13	20	65
0,30	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 0,2302 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 0,2047 mg/L								Límite inferior: 0,1824 mg/L						

RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade



**TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).
PRUEBA DE TOXICIDAD CIANURO DE SODIO (NaCN)**

	PRUEBA No. 9								Sustancia de prueba: Cianuro de sodio (NaCN)																INICIO: 19/05/2009 10horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 23/05/2009 11horas		
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,10	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	20	5
0,15	2	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	2	1	1	0	4	20	20
0,20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	3	2	2	2	3	2	2	9	20	45
0,25	3	3	3	3	3	4	4	4	3	5	4	4	4	5	5	4	4	5	5	4	4	5	5	4	18	20	90
0,30	4	4	4	4	5	4	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 0,2039 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 0,1869 mg/L								Límite inferior: 0,1694 mg/L						

	PRUEBA No. 10								Sustancia de prueba: Cianuro de sodio (NaCN)																INICIO: 19/05/2009 10horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 23/05/2009 11horas		
Nominal ppm	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	Nº Total	% Mortalidad
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
0,10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
0,15	2	1	0	1	2	1	0	1	2	1	0	1	2	1	0	1	2	1	0	1	2	1	0	1	4	20	20
0,20	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	3	3	2	2	3	3	2	2	3	10	20	50
0,25	2	2	1	1	2	2	2	1	3	3	2	1	3	3	3	3	4	4	3	3	4	4	3	3	15	20	75
0,30	3	3	3	3	3	4	3	4	3	4	4	5	4	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 0,2132 mg/L								CL ₅₀₋₉₆ : 0,1961 mg/L								Límite inferior: 0,1791 mg/L						



RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade

**TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).
PRUEBA DE TOXICIDAD VERTIMIENTO PUNTO 1**

	PRUEBA No. 1								Sustancia de prueba: vertimiento punto 1																INICIO: 2/06/2009 10horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 6/06/2009 10horas		
Nominal % (V/V)	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
5	1	1	0	1	1	1	1	1	2	1	2	1	3	2	2	1	3	2	2	1	3	2	2	1	8	20	40
10	2	2	2	2	3	2	3	2	4	4	4	4	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	4	19	20	95
15	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
20	4	4	3	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 6,4800% (V/V)								CL ₅₀₋₉₆ : 5,4831% (V/V)								Límite inferior: 4,3117 % (V/V)						

	PRUEBA No. 2								Sustancia de prueba: vertimiento punto 1																INICIO: 2/06/2009 10horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 6/06/2009 10horas		
Nominal % (V/V)	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	Nº Total	% Mortalidad
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
5	2	1	0	0	2	1	1	0	2	1	1	0	2	2	1	1	2	2	1	1	3	2	1	1	7	20	35
10	3	3	2	2	4	3	3	3	4	3	3	3	4	3	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	16	20	80
15	4	4	4	4	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	4	19	20	95
20	4	4	3	3	5	4	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 7,5486%(V/V)								CL ₅₀₋₉₆ : 6,2206%(V/V)								Límite inferior: 4,6490%(V/V)						

RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade



**TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).
PRUEBA DE TOXICIDAD VERTIMIENTO PUNTO 1**

	PRUEBA No. 3								Sustancia de prueba: vertimiento punto 1																INICIO: 9/06/2009 10horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 13/06/2009 10 horas		
Nominal % (V/V)	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
5	3	0	0	0	3	1	0	1	3	1	1	1	3	2	2	1	3	2	2	2	3	2	2	2	9	20	45
10	1	2	2	1	2	3	2	2	2	4	2	2	3	4	3	3	4	4	4	3	4	5	4	5	18	20	90
15	2	2	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
20	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 6,4617%(V/V)								CL ₅₀₋₉₆ : 5,3474%(V/V)								Límite inferior: 3,9399 %(V/V)						

	PRUEBA No. 4								Sustancia de prueba: vertimiento punto 1																INICIO: 9/06/2009 10horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 13/06/2009 10 horas		
Nominal % (V/V)	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	Nº muertos	Nº Total	% Mortalidad
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
5	2	1	2	0	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	3	2	10	20	50
10	2	1	0	1	2	1	0	1	2	1	1	1	3	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	12	20	60
15	3	2	2	2	3	3	2	3	3	4	2	3	4	5	3	4	4	5	4	5	4	5	5	5	19	20	95
20	3	3	2	2	4	4	4	4	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 7,2676%(V/V)								CL ₅₀₋₉₆ : 5,7728%(V/V)								Límite inferior: 4,2957 %(V/V)						

RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade



**TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).
PRUEBA DE TOXICIDAD VERTIMIENTO**

PRUEBA No. 5				Sustancia de prueba: vertimiento punto 1																				INICIO: 16/06/2009 10horas					
3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS									
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 20/06/2009 10horas				
	Nominal % (V/V)	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3				4	Nº muertos
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	
1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	2	2	20	10	
5	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	2	1	0	1	2	1	0	2	5	5	20	25	
10	0	1	0	0	1	1	1	1	2	2	2	1	2	4	3	2	2	4	4	2	2	5	5	2	14	14	20	70	
15	3	1	1	1	4	2	2	1	5	2	2	2	5	3	3	3	5	4	4	4	5	5	5	5	20	20	20	100	
20	3	2	2	2	4	3	4	4	5	4	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	20	100	
RESULTADOS					RESULTADOS										Límite superior: 7,0996% (V/V)										CL ₅₀₋₉₆ : 5,4814% (V/V)				

	PRUEBA No. 1								Sustancia de prueba: vertimiento punto 2																INICIO: 16/06/2009 10horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 20/06/2009 10horas		
Nominal % (V/V)	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	20	5
20	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	6	20	30
40	0	1	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3	3	2	2	3	10	20	50
60	4	4	4	4	5	4	5	4	5	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 37,1516%(V/V)								CL ₅₀₋₉₆ : 30,0601%(V/V)								Límite inferior: 24,5400%(V/V)						



RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade

**TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).
PRUEBA DE TOXICIDAD VERTIMIENTO PUNTO 2**

	PRUEBA No. 2								Sustancia de prueba: vertimiento punto 2																INICIO: 23/06/2009 10 horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 27/06/2009 10 horas		
Nominal % (V/V)	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
10	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	20	5
20	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	8	20	40
40	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	3	3	4	2	12	20	60
60	2	2	2	2	3	2	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 21,6334%(V/V)								CL ₅₀₋₉₆ : 26,4773%(V/V)								Límite inferior: 32,3722 %(V/V)						

	PRUEBA No. 3								Sustancia de prueba: vertimiento punto 2																INICIO: 23/06/2009 10 horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 27/06/2009 10 horas		
Nominal % (V/V)	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
10	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	2	20	10
20	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	2	2	3	3	2	2	10	20	50
40	1	0	0	0	1	1	0	0	2	2	2	2	3	3	3	2	3	3	3	2	3	3	3	2	11	20	55
60	2	2	2	3	3	3	2	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior 31,1021%(V/V)								CL ₅₀₋₉₆ : 24,7367%(V/V)								Límite inferior: 19,8378 %(V/V)						

RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade



**TABLAS DE REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*).
PRUEBA DE TOXICIDAD VERTIMIENTO PUNTO 2**

	PRUEBA No. 4								Sustancia de prueba: vertimiento punto 2																INICIO: 30/06/2009 10 horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 4/06/2009 10 horas		
Nominal % (V/V)	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
10	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	20	5
20	2	2	0	1	3	2	0	1	3	2	0	1	3	2	1	2	3	2	1	2	3	2	1	2	8	20	40
40	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	3	3	2	3	3	3	11	20	55
60	4	4	4	4	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 33,6954%(V/V)								CL ₅₀₋₉₆ : 27,3198%(V/V)								Límite inferior: 22,2521 %(V/V)						

	PRUEBA No. 5								Sustancia de prueba: vertimiento punto 2																INICIO: 30/06/2009 10 horas		
	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS				72 HORAS				96 HORAS						
Concentración	Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				Nº de organismos por pecera				FINALIZACIÓN: 4/06/2009 10 horas		
Nominal % (V/V)	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
10	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	2	20	10
20	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1	3	2	3	1	3	2	3	1	3	2	3	1	9	20	45
40	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	3	3	2	2	4	3	2	2	11	20	55
60	2	3	3	2	3	3	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	20	20	100
RESULTADOS					Límite superior: 32,0898%(V/V)								CL ₅₀₋₉₆ : 25,5574%(V/V)								Límite inferior: 20,5390 %(V/V)						

RESPONSABLE: Lenny Sánchez, Paola Andrade



ANEXO C. ANÁLISIS PROBIT

OBTENCION DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA DE SENSIBILIDAD 1 Y 2

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇).

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	0.	0.53
40.00	1.6021	20.	6.	5.87
60.00	1.7782	20.	12.	12.12
80.00	1.9031	20.	16.	16.02
100.00	2.0000	20.	20.	18.04
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) = -4.5862
Pendenza (b) = 5.5843 es = 0.8172
Media delle X = 1.7622
Media delle Y = 5.2545
CHI quadro = 1.1673

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti = 5
Gradi di libert... = 3
Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
Numero di cicli = 1

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	19.9554	12.7007	25.9079
LC50	52.0764	45.1948	58.8872

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	3.	1.98
40.00	1.6021	20.	6.	6.75
60.00	1.7782	20.	8.	10.71
80.00	1.9031	20.	13.	13.47
100.00	2.0000	20.	19.	15.34
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) = -0.4225
Pendenza (b) = 3.1237 es = 0.6234
Media delle X = 1.7494
Media delle Y = 5.0419
CHI quadro = 5.7692

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti = 5
Gradi di libert... = 3
Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
Numero di cicli = 1

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	9.7996	3.1046	16.4634
LC50	54.4433	43.6822	67.1031

Fuente: autoras, 2009



OBTENCION DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA DE SENSIBILIDAD 1 Y 2

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇).

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI		CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi				osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	4.	2.99	20.00	1.3010	20.	2.	1.42
40.00	1.6021	20.	7.	7.98	40.00	1.6021	20.	6.	5.95
60.00	1.7782	20.	10.	11.59	60.00	1.7782	20.	8.	10.14
80.00	1.9031	20.	13.	14.01	80.00	1.9031	20.	12.	13.16
100.00	2.0000	20.	19.	15.63	100.00	2.0000	20.	18.	15.22
Controllo		20.	0.	0.00	Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:					PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)					(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	0.2767				Intercetta (a) =	-0.6941			
Pendenza (b) =	2.7935	es = 0.5886			Pendenza (b) =	3.2208	es = 0.6565		
Media delle X =	1.7319				Media delle X =	1.7621			
Media delle Y =	5.1147				Media delle Y =	4.9813			
CHI quadro =	4.5145				CHI quadro =	3.5682			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:					ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5				Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3				Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001			Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1				Numero di cicli =	1			
END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)			END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)		
		inferiore		superiore			inferiore		superiore
LC1	7.2121	1.7025		13.3553	LC1	11.1082	3.6040		18.2945
LC50	49.0708	37.7291		61.3881	LC50	58.6036	47.5596		72.5788

Fuente: autoras, 2009



OBTENCION DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA DE SENSIBILIDAD 1 Y 2

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇).

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	3.	2.52
40.00	1.6021	20.	8.	7.73
60.00	1.7782	20.	10.	11.69
80.00	1.9031	20.	13.	14.31
100.00	2.0000	20.	19.	16.02
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	-0.1078			
Pendenza (b) =	3.0139	es = 0.6070		
Media delle X =	1.7352			
Media delle Y =	5.1219			
CHI quadro =	3.7857			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	8.3731	2.4048	14.6168
LC50	49.5163	38.8068	61.0465

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	2.	1.53
40.00	1.6021	20.	7.	6.95
60.00	1.7782	20.	10.	11.69
80.00	1.9031	20.	14.	14.80
100.00	2.0000	20.	19.	16.71
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	-1.1228			
Pendenza (b) =	3.5780	es = 0.6641		
Media delle X =	1.7470			
Media delle Y =	5.1282			
CHI quadro =	2.7454			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	11.5092	4.5405	18.0196
LC50	51.4289	41.8277	61.6628

Fuente: autoras, 2009



OBTENCION DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA DE SENSIBILIDAD 7 Y 8

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇).

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	3.	2.10
40.00	1.6021	20.	6.	6.68
60.00	1.7782	20.	8.	10.43
80.00	1.9031	20.	13.	13.08
100.00	2.0000	20.	17.	14.92
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	0.0955			
Pendenza (b) =	2.7907	es = 0.6145		
Media delle X =	1.7498			
Media delle Y =	4.9787			
CHI quadro =	2.8554			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	8.3918	1.9238	15.3241
LC50	57.2063	45.0477	73.2345

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	3.	2.28
40.00	1.6021	20.	7.	7.55
60.00	1.7782	20.	10.	11.68
80.00	1.9031	20.	14.	14.40
100.00	2.0000	20.	18.	16.16
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	-0.1637			
Pendenza (b) =	3.0281	es = 0.6180		
Media delle X =	1.7378			
Media delle Y =	5.0986			
CHI quadro =	2.0210			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	8.6501	2.4607	15.0644
LC50	50.7281	39.8871	62.6989

Fuente: autoras, 2009



OBTENCION DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA DE SENSIBILIDAD 9 Y 10

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇).

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	2.	1.18
40.00	1.6021	20.	5.	5.46
60.00	1.7782	20.	7.	9.66
80.00	1.9031	20.	12.	12.77
100.00	2.0000	20.	18.	14.93
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	-0.9424			
Pendenza (b) =	3.3255	es = 0.6742		
Media delle X =	1.7701			
Media delle Y =	4.9440			
CHI quadro =	4.6354			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	4.	2.90
40.00	1.6021	20.	7.	7.90
60.00	1.7782	20.	9.	11.56
80.00	1.9031	20.	14.	14.01
100.00	2.0000	20.	18.	15.65
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	0.3994			
Pendenza (b) =	2.7052	es = 0.5913		
Media delle X =	1.7329			
Media delle Y =	5.0871			
CHI quadro =	3.6053			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	12.2288	4.2184	19.6623
LC50	61.2239	50.1793	75.7933

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	6.9296	1.4447	13.2006
LC50	50.1948	38.3716	63.5089

Fuente: autoras, 2009



OBTENCIÓN DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA DE SENSIBILIDAD 11 Y 12

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇).

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	0.	1.61
40.00	1.6021	20.	8.	7.62
60.00	1.7782	20.	12.	12.66
80.00	1.9031	20.	16.	15.74
100.00	2.0000	20.	20.	17.49
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	-3.1691			
Pendenza (b) =	4.8306	es = 0.6732		
Media delle X =	1.7354			
Media delle Y =	5.2140			
CHI quadro =	1.6316			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			
END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)		
		inferiore	superiore	
LC1	16.2011	10.0116	21.5670	
LC50	49.1048	42.2209	56.1792	

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	0.	1.14
40.00	1.6021	20.	8.	6.94
60.00	1.7782	20.	10.	12.37
80.00	1.9031	20.	17.	15.73
100.00	2.0000	20.	20.	17.60
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	-3.6274			
Pendenza (b) =	5.0681	es = 0.7137		
Media delle X =	1.7461			
Media delle Y =	5.2222			
CHI quadro =	3.2603			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			
END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)		
		inferiore	superiore	
LC1	17.5097	10.9777	23.0743	
LC50	50.3830	43.4974	57.3952	

Fuente: autoras, 2009



OBTENCIÓN DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA DE SENSIBILIDAD 13 Y 14

Sustancia de prueba: Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇).

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	0.	0.78
40.00	1.6021	20.	8.	6.98
60.00	1.7782	20.	11.	13.24
80.00	1.9031	20.	18.	16.77
100.00	2.0000	20.	20.	18.48
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	-4.3730			
Pendenza (b) =	5.5465	es = 0.7889		
Media delle X =	1.7421			
Media delle Y =	5.2894			
CHI quadro =	2.7750			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
20.00	1.3010	20.	0.	3.91
40.00	1.6021	20.	9.	8.32
60.00	1.7782	20.	10.	11.32
80.00	1.9031	20.	14.	13.36
100.00	2.0000	20.	20.	14.80
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	-1.4822			
Pendenza (b) =	3.8050	es = 0.5616		
Media delle X =	1.7275			
Media delle Y =	5.0910			
CHI quadro =	3.6564			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	18.6409	11.9509	24.2132
LC50	48.9646	42.3508	55.4765

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	12.3653	6.6297	17.6560
LC50	50.5332	42.6695	59.2472

Fuente: autoras, 2009



OBTENCION DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA 1 Y 2 Sustancia de prueba: Cianuro de sodio (NaCN)

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
0.01	-2.0000	20.	0.	0.00
0.10	-1.0000	20.	4.	4.01
1.00	0.0000	20.	20.	19.42
5.00	0.6990	20.	20.	20.00
10.00	1.0000	20.	20.	20.00
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	7.3245			
Pendenza (b) =	3.1635	es = 0.6334		
Media delle X =	-0.7615			
Media delle Y =	4.9156			
CHI quadro =	0.0074			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			
END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)		
		inferiore	superiore	
LC1	0.0339	0.0105	0.0601	
LC50	0.1842	0.1210	0.2866	

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
0.10	-1.0000	20.	4.	3.88
0.30	-0.5229	20.	10.	10.31
0.50	-0.3010	20.	20.	13.53
0.70	-0.1549	20.	20.	15.37
1.00	0.0000	20.	20.	16.96
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	6.8401			
Pendenza (b) =	2.7954	es = 0.4157		
Media delle X =	-0.4037			
Media delle Y =	5.7115			
CHI quadro =	3.7923			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			
END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)		
		inferiore	superiore	
LC1	0.0323	0.0112	0.0588	
LC50	0.2197	0.1545	0.2800	

Fuente: autoras, 2009



OBTENCION DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA 3 Y 4

Sustancia de prueba: Cianuro de sodio (NaCN).

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
0.10	-1.0000	20.	3.	2.91
0.30	-0.5229	20.	12.	12.24
0.50	-0.3010	20.	20.	16.36
0.70	-0.1549	20.	20.	18.13
1.00	0.0000	20.	20.	19.20
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	7.3654			
Pendenza (b) =	3.5108	es = 0.4901		
Media delle X =	-0.4609			
Media delle Y =	5.7474			
CHI quadro =	1.9287			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			
END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)		
		inferiore	superiore	
LC1	0.0461	0.0208	0.0737	
LC50	0.2120	0.1579	0.2629	

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
0.10	-1.0000	20.	0.	0.00
0.20	-0.6990	20.	10.	10.01
0.30	-0.5229	20.	20.	19.62
0.40	-0.3979	20.	20.	20.00
0.50	-0.3010	20.	20.	20.00
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	14.7373			
Pendenza (b) =	13.9229	es = 3.7720		
Media delle X =	-0.6723			
Media delle Y =	5.3762			
CHI quadro =	0.0185			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			
END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)		
		inferiore	superiore	
LC1	0.1360	0.0808	0.1611	
LC50	0.1998	0.1749	0.2174	

Fuente: autoras, 2009



OBTENCION DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA 5 Y 6

Sustancia de prueba: Cianuro de sodio (NaCN).

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
0.10	-1.0000	20.	0.	0.32
0.15	-0.8239	20.	4.	3.83
0.20	-0.6990	20.	10.	10.26
0.25	-0.6021	20.	20.	15.37
0.30	-0.5229	20.	20.	18.09
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) = 12.0244
Pendenza (b) = 9.6634 es = 1.2550
Media delle X = -0.6899
Media delle Y = 5.3573
CHI quadro = 1.9641

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti = 5
Gradi di libert... = 3
Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
Numero di cicli = 1

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	0.1077	0.0853	0.1246
LC50	0.1875	0.1724	0.2017

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
0.10	-1.0000	20.	1.	0.25
0.15	-0.8239	20.	2.	2.45
0.20	-0.6990	20.	3.	6.87
0.25	-0.6021	20.	11.	11.49
0.30	-0.5229	20.	19.	14.97
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) = 9.4804
Pendenza (b) = 7.0075 es = 1.2238
Media delle X = -0.6622
Media delle Y = 4.8400
CHI quadro = 9.4193

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti = 5
Gradi di libert... = 3
Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
Numero di cicli = 1

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	0.1068	0.0426	0.1420
LC50	0.2294	0.1937	0.2848

Fuente: autoras, 2009



OBTENCIÓN DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA 7 Y 8

Sustancia de prueba: Cianuro de sodio (NaCN).

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
0.10	-1.0000	20.	0.	0.01
0.15	-0.8239	20.	2.	1.02
0.20	-0.6990	20.	4.	7.02
0.25	-0.6021	20.	15.	14.44
0.30	-0.5229	20.	19.	18.33
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX :				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	11.8116			
Pendenza (b) =	10.3361	es = 1.8173		
Media delle X =	-0.6527			
Media delle Y =	5.0651			
CHI quadro =	3.3269			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			
END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)		
		inferiore	superiore	
LC1	0.1306	0.0972	0.1519	
LC50	0.2193	0.2020	0.2370	

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
0.10	-1.0000	20.	2.	1.41
0.15	-0.8239	20.	4.	4.52
0.20	-0.6990	20.	6.	8.11
0.25	-0.6021	20.	13.	11.25
0.30	-0.5229	20.	20.	13.70
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	8.8948			
Pendenza (b) =	5.6540	es = 0.9349		
Media delle X =	-0.6929			
Media delle Y =	4.9769			
CHI quadro =	6.3712			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			
END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)		
		Inferiore	superiore	
LC1	0.0794	0.0497	0.1018	
LC50	0.2047	0.1824	0.2302	

Fuente: autoras, 2009



OBTENCION DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA 9 Y 10

Sustancia de prueba: Cianuro de sodio (NaCN).

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
0.10	-1.0000	20.	1.	0.48
0.15	-0.8239	20.	4.	4.65
0.20	-0.6990	20.	9.	11.21
0.25	-0.6021	20.	18.	15.97
0.30	-0.5229	20.	20.	18.37
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) = 10.8759
Pendenza (b) = 8.0680 es = 1.2027
Media delle X = -0.7016
Media delle Y = 5.2155
CHI quadro = 3.7465

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti = 5
Gradi di libert... = 3
Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
Numero di cicli = 1

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	0.0962	0.0701	0.1153
LC50	0.1869	0.1694	0.2039

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
0.10	-1.0000	20.	0.	0.37
0.15	-0.8239	20.	4.	3.90
0.20	-0.6990	20.	10.	10.07
0.25	-0.6021	20.	15.	15.05
0.30	-0.5229	20.	20.	17.82
Controllo		20.	0.	0.00

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:

(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)

Intercetta (a) = 10.9149
Pendenza (b) = 8.3604 es = 1.2149
Media delle X = -0.6894
Media delle Y = 5.1515
CHI quadro = 1.2283

ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti = 5
Gradi di libert... = 3
Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
Numero di cicli = 1

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	0.1033	0.0774	0.1223
LC50	0.1961	0.1791	0.2132

Fuente: autoras, 2009



OBTENCION DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA 1 Y 2

Sustancia de prueba: Vertimiento antes de entrar al sistema de tratamiento

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
1.00	0.0000	20.	0.	0.00
5.00	0.6990	20.	8.	8.05
10.00	1.0000	20.	19.	19.00
15.00	1.1761	20.	20.	19.94
20.00	1.3010	20.	20.	20.00
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	0.1985			
Pendenza (b) =	6.4970	es = 1.5819		
Media delle X =	0.7930			
Media delle Y =	5.3507			
CHI quadro =	0.0449			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
1.00	0.0000	20.	0.	0.01
5.00	0.6990	20.	7.	6.91
10.00	1.0000	20.	16.	16.18
15.00	1.1761	20.	19.	18.94
20.00	1.3010	20.	20.	19.68
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	1.4625			
Pendenza (b) =	4.4563	es = 0.8651		
Media delle X =	0.9192			
Media delle Y =	5.5586			
CHI quadro =	0.2568			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	2.4042	0.9817	3.3647
LC50	5.4831	4.3117	6.4800

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	1.8698	0.7256	2.9090
LC50	6.2206	4.6490	7.5486

Fuente: autoras, 2009



OBTENCION DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA 3 Y 4

Sustancia de prueba: Vertimiento antes de entrar al sistema de tratamiento

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
1.00	0.0000	20.	0.	0.01
5.00	0.6990	20.	9.	8.95
10.00	1.0000	20.	18.	18.08
15.00	1.1761	20.	20.	19.68
20.00	1.3010	20.	20.	19.94
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	1.2310			
Pendenza (b) =	5.1762	es = 1.1024		
Media delle X =	0.8477			
Media delle Y =	5.6188			
CHI quadro =	0.2245			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
1.00	0.0000	20.	0.	0.58
5.00	0.6990	20.	10.	8.87
10.00	1.0000	20.	12.	14.60
15.00	1.1761	20.	19.	17.08
20.00	1.3010	20.	20.	18.28
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	2.6561			
Pendenza (b) =	3.0784	es = 0.4572		
Media delle X =	0.9144			
Media delle Y =	5.4711			
CHI quadro =	4.1388			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	1.8999	0.7205	2.8819
LC50	5.3474	3.9399	6.4617

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	1.0132	0.4118	1.6923
LC50	5.7728	4.2957	7.2676

Fuente: autoras, 2009



OBTENCION DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA 5 Sustancia de prueba: Vertimiento antes de entrar al sistema de tratamiento

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
1.00	0.0000	20.	2.	1.37
5.00	0.6990	20.	5.	7.97
10.00	1.0000	20.	14.	12.14
15.00	1.1761	20.	20.	14.39
20.00	1.3010	20.	20.	15.77
Controllo		20.	0.	0.00
=====				
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =		3.1776		
Pendenza (b) =		2.4663	es = 0.3648	
Media delle X =		0.9184		
Media delle Y =		5.4428		
CHI quadro =		7.1624		
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =		5		
Gradi di libert... =		3		
Mortalit... naturale =		0.0000	es = 0.0001	
Numero di cicli =		1		
=====				
END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)		
		inferiore	superiore	
LC1	0.6247	0.2084	1.1650	
LC50	5.4814	3.9229	7.0996	

Fuente: autoras, 2009



OBTENCION DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA 1 Y 2

Sustancia de prueba: Vertimiento después del sistema de tratamiento

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
5.00	0.6990	20.	0.	0.26
10.00	1.0000	20.	1.	1.45
20.00	1.3010	20.	6.	4.92
40.00	1.6021	20.	10.	10.68
60.00	1.7782	20.	20.	14.09
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	-0.1763			
Pendenza (b) =	3.5023	es = 0.5073		
Media delle X =	1.4559			
Media delle Y =	4.9227			
CHI quadro =	3.8905			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			
END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)		
		inferiore	superiore	
LC1	6.5127	3.4659	9.4435	
LC50	30.0601	24.5400	37.1516	

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
5.00	0.6990	20.	0.	0.27
10.00	1.0000	20.	1.	1.78
20.00	1.3010	20.	8.	6.29
40.00	1.6021	20.	12.	12.96
60.00	1.7782	20.	20.	16.23
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	-0.1459			
Pendenza (b) =	3.6165	es = 0.5093		
Media delle X =	1.4256			
Media delle Y =	5.0098			
CHI quadro =	3.2319			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			
END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)		
		inferiore	superiore	
LC1	6.0205	3.2690	8.6754	
LC50	26.4773	21.6334	32.3722	

Fuente: autoras, 2009



OBTENCIÓN DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA 3 Y 4

Sustancia de prueba: Vertimiento después del sistema de tratamiento

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
5.00	0.6990	20.	0.	1.03
10.00	1.0000	20.	2.	3.25
20.00	1.3010	20.	10.	7.35
40.00	1.6021	20.	11.	12.42
60.00	1.7782	20.	20.	15.07
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	0.8235			
Pendenza (b) =	2.9975	es = 0.4162		
Media delle X =	1.3708			
Media delle Y =	4.9326			
CHI quadro =	5.2460			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
5.00	0.6990	20.	0.	0.37
10.00	1.0000	20.	1.	1.93
20.00	1.3010	20.	8.	6.05
40.00	1.6021	20.	11.	12.10
60.00	1.7782	20.	20.	15.32
Controllo		20.	0.	0.00
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	0.0625			
Pendenza (b) =	3.4372	es = 0.4833		
Media delle X =	1.4244			
Media delle Y =	4.9585			
CHI quadro =	4.1398			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	4.1425	2.0653	6.2945
LC50	24.7367	19.8378	31.1021

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	5.7502	3.0711	8.3712
LC50	27.3198	22.2521	33.6954

Fuente: autoras, 2009



OBTENCION DE CL₅₀₋₉₆ DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON TRUCHAS ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) UTILIZANDO EL MÉTODO PROBIT

PRUEBA 5 Sustancia de prueba: Vertimiento después del sistema de tratamiento

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI	N.MORTI	
			osservati	attesi
5.00	0.6990	20.	0.	0.86
10.00	1.0000	20.	2.	2.92
20.00	1.3010	20.	9.	6.96
40.00	1.6021	20.	11.	12.13
60.00	1.7782	20.	20.	14.89
Controllo		20.	0.	0.00
=====				
PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE Y=a+bX:				
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)				
Intercetta (a) =	0.7056			
Pendenza (b) =	3.0511	es = 0.4261		
Media delle X =	1.3834			
Media delle Y =	4.9263			
CHI quadro =	4.4007			
ALTRI PARAMETRI STATISTICI:				
Numero di punti =	5			
Gradi di libert... =	3			
Mortalit... naturale =	0.0000	es = 0.0001		
Numero di cicli =	1			
=====				
END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)		
		inferiore	superiore	
LC1	4.4163	2.2202	6.6702	
LC50	25.5574	20.5390	32.0898	

Fuente: autoras, 2009



ANEXO D. REGISTROS PROGRAMA ANOVA

1. PRUEBA TOXICOLOGICA TOXICO DE REFERENCIA DICROMATO DE POTASIO

PRUEBA No. 1

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	5	20	5
80	4	4	4	4	16	4
60	2	3	4	3	12	3
40	1	1	2	2	6	1,5
20	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					54	13,5

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	87,5	5	17,5	105	2,77
Dentro de Grupos	3	18	0,166666667		
Total	90,5	23			

PRUEBA No.2

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	4	19	4,75
80	4	3	3	3	13	3,25
60	3	2	1	2	8	2
40	2	1	2	1	6	1,5
20	1	0	1	1	3	0,75
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					49	12,25

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	59,70833333	5	11,94166667	40,94285714	2,77
Dentro de Grupos	5,25	18	0,291666667		
Total	64,95833333	23			



PRUEBA No.3

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	4	5	19	4,75
80	4	3	3	3	13	3,25
60	3	2	3	2	10	2,5
40	2	1	2	2	7	1,75
20	2	1	1	0	4	1
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					53	13,25

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	56,71	5	11,34166667	38,88571429	2,77
Dentro de Grupos	5,25	18	0,291666667		
Total	61,958	23			

PRUEBA No.4

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	4	4	5	18	4,5
80	3	3	3	3	12	3
60	2	2	3	1	8	2
40	1	2	2	1	6	1,5
20	0	1	1	0	2	0,5
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					46	11,5

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	54,83333333	5	10,96666667	39,48	2,77
Dentro de Grupos	5	18	0,28		
Total	59,83333333	23			



PRUEBA No.5

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	4	19	4,75
80	4	4	3	2	13	3,25
60	3	3	2	2	10	2,5
40	2	0	3	3	8	2
20	0	1	1	1	3	0,75
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					53	13,25

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	58,70833333	5	11,74166667		
Dentro de Grupos	11,25	18	0,625	18,78666667	2,77
Total	69,95833333	23			

PRUEBA No.6

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	4	5	19	4,75
80	5	4	3	2	14	3,5
60	3	3	2	2	10	2,5
40	4	2	0	1	7	1,75
20	1	1	0	0	2	0,5
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					52	13

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	64,83333333	5	12,96666667		
Dentro de Grupos	16,5	18	0,916666667	14,14545455	2,77
Total	81,33333333	23			



PRUEBA No.7

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	4	3	5	17	4,25
80	3	2	5	3	13	3,25
60	2	3	1	2	8	2
40	3	2	1	0	6	1,5
20	1	0	2	0	3	0,75
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					47	11,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	49,70833333	5	9,941666667	10,37391304	2,77
Dentro de Grupos	17,25	18	0,958333333		
Total	66,95833333	23			

PRUEBA No.8

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	4	5	4	18	4,5
80	3	4	4	3	14	3,5
60	4	3	2	1	10	2,5
40	3	1	1	2	7	1,75
20	1	1	1	0	3	0,75
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					52	13

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	56,83333333	5	11,36666667	19,48571429	2,77
Dentro de Grupos	10,5	18	0,583333333		
Total	67,33333333	23			



PRUEBA No.9

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	4	4	5	18	4,5
80	3	4	2	3	12	3
60	1	3	2	1	7	1,75
40	2	1	1	1	5	1,25
20	0	1	0	1	2	0,5
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					44	11

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	55,83333333	5	11,16666667	26,8	2,77
Dentro de Grupos	7,5	18	0,416666667		
Total	63,33333333	23			

PRUEBA No.10

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	4	5	5	4	18	4,5
80	3	3	4	4	14	3,5
60	3	2	1	3	9	2,25
40	2	2	1	2	7	1,75
20	1	1	0	2	4	1
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					52	13

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	53,83333333	5	10,76666667	25,84	2,77
Dentro de Grupos	7,5	18	0,416666667		
Total	61,33333333	23			



PRUEBA No.11

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	5	20	5
80	4	3	5	4	16	4
60	2	4	3	3	12	3
40	2	2	2	2	8	2
20	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					56	14

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	85,33333333	5	17,06666667	76,8	2,77
Dentro de Grupos	4	18	0,22222222		
Total	89,33333333	23			

PRUEBA No.12

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	5	20	5
80	4	4	4	5	17	4,25
60	3	4	2	1	10	2,5
40	2	2	2	2	8	2
20	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					55	13,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	87,20833333	5	17,44166667	54,6	2,77
Dentro de Grupos	5,75	18	0,31944444		
Total	92,95833333	23			



PRUEBA No.13

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	5	20	5
80	4	4	5	5	18	4,5
60	3	3	3	2	11	2,75
40	3	2	2	1	8	2
20	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					57	14,25

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	91,875	5	18,375	88,2	2,77
Dentro de Grupos	3,75	18	0,208333333		
Total	95,625	23			

PRUEBA No.14

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
100	5	5	5	5	20	5
80	3	4	4	3	14	3,5
60	3	3	2	2	10	2,5
40	4	3	1	1	9	2,25
20	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					53	13,25

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	77,20833333	5	15,44166667	31,76571429	2,77
Dentro de Grupos	8,75	18	0,486111111		
Total	85,95833333	23			



2. REGISTROS PRUEBA DE TOXICIDAD CIANURO DE SODIO

PRUEBA No.1

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
10	5	5	5	5	20	5
5	5	5	5	5	20	5
1	5	5	5	5	20	5
0,1	1	0	1	2	4	1
0,01	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					64	16

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	133,333333	5	26,6666667	240	2,77
Dentro de Grupos	2	18	0,11111111		
Total	135,333333	23			

PRUEBA No.2

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
1	5	5	5	5	20	5
0,7	5	5	5	5	20	5
0,5	5	5	5	5	20	5
0,3	3	2	3	2	10	2,5
0,1	1	2	0	1	4	1
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					74	18,5

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	100,833333	5	20,1666667	121	2,77
Dentro de Grupos	3	18	0,16666667		
Total	103,833333	23			



PRUEBA No.3

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
1	5	5	5	5	20	5
0,7	5	5	5	5	20	5
0,5	5	5	5	5	20	5
0,3	3	3	3	3	12	3
0,1	0	2	0	1	3	0,75
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					75	18,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	103,88	5	20,775	135,981818	2,77
Dentro de Grupos	2,75	18	0,15277778		
Total	106,625	23			

PRUEBA No.4

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
0,5	5	5	5	5	20	5
0,4	5	5	5	5	20	5
0,3	5	5	5	5	20	5
0,2	3	2	3	2	10	2,5
0,1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					70	17,5

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	120,833333	5	24,1666667	435	2,77
Dentro de Grupos	1	18	0,06		
Total	121,833333	23			



PRUEBA No.5

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
0,3	5	5	5	5	20	5
0,25	5	5	5	5	20	5
0,2	3	2	2	3	10	2,5
0,15	1	0	2	1	4	1
0,1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					54	13,5

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	107,5	5	21,5	129	2,77
Dentro de Grupos	3	18	0,16666667		
Total	110,5	23			

PRUEBA No.6

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
0,3	5	5	5	4	19	4,75
0,25	3	2	3	3	11	2,75
0,2	1	0	0	2	3	0,75
0,15	1	0	0	1	2	0,5
0,1	1	0	0	0	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					36	9

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	70	5	14	42	2,77
Dentro de Grupos	6	18	0,33333333		
Total	76	23			



PRUEBA No.7

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
0,3	5	5	5	4	19	4,75
0,25	3	5	3	4	15	2,375
0,2	1	1	0	2	4	1
0,15	1	0	1	0	2	0,5
0,1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					40	8,625

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	84,8333333	5	16,9666667	46,9846154	2,77
Dentro de Grupos	6,5	18	0,36111111		
Total	91,3333333	23			

PRUEBA No.8

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
0,3	5	5	5	5	20	5
0,25	3	2	4	4	13	2,375
0,2	2	1	2	1	6	1,5
0,15	2	1	1	0	4	1
0,1	1	0	1	0	2	0,5
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					45	10,375

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	71,88	5	14,375	38,3333333	2,77
Dentro de Grupos	6,75	18	0,375		
Total	78,625	23			



PRUEBA No.8

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
0,3	5	5	5	5	20	5
0,25	4	5	5	4	18	2,75
0,2	2	3	2	2	9	2,25
0,15	2	1	1	0	4	1
0,1	0	1	0	0	1	0,25
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					52	11,25

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	92,8333333	5	18,5666667	74,2666667	2,77
Dentro de Grupos	4,5	18	0,25		
Total	97,3333333	23			

PRUEBA No.9

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
0,3	5	5	5	5	20	5
0,25	4	4	3	4	15	3,75
0,2	3	2	2	3	10	2,5
0,15	2	1	0	1	4	1
0,1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					49	12,25

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	85,2083333	5	17,0416667	81,8	2,77
Dentro de Grupos	3,75	18	0,20833333		
Total	88,9583333	23			



3. REGISTROS PRUEBA DE TOXICIDAD VERTIMIENTO PUNTO 1

PRUEBA No.1

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
20	5	5	5	5	20	5
15	5	5	5	5	20	5
10	5	5	5	4	19	4,75
5	3	2	2	1	8	2
1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					67	16,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	119,208333	5	23,8416667	156,054545	2,77
Dentro de Grupos	2,75	18	0,15277778		
Total	121,958333	23			

PRUEBA No.2

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
20	5	5	5	5	20	5
15	5	5	5	4	19	4,75
10	4	4	4	4	16	4
5	3	2	1	1	7	1,75
1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					62	15,5

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	106,333333	5	21,2666667	109,371429	2,77
Dentro de Grupos	3,5	18	0,19		
Total	109,833333	23			



PRUEBA No.3

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
20	5	5	5	5	20	5
15	5	5	5	5	20	5
10	4	5	4	5	18	4,5
5	3	2	2	2	9	2,25
1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					67	16,75

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	114,208333	5	22,8416667	234,942857	2,77
Dentro de Grupos	1,75	18	0,09722222		
Total	115,958333	23			

PRUEBA No.4

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
20	5	5	5	5	20	5
15	4	5	5	5	19	4,75
10	3	3	3	3	12	3
5	3	2	3	2	10	2,5
1	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					61	15,25

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	96,2083333	5	19,2416667	197,914286	2,77
Dentro de Grupos	1,75	18	0,09722222		
Total	97,9583333	23			



PRUEBA No.5

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
20	5	5	5	5	20	5
15	5	5	5	5	20	5
10	2	5	5	2	14	3,5
5	2	1	0	2	5	1,25
1	1	0	0	1	2	0,5
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					61	15,25

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	101,208333	5	20,2416667	28,5764706	2,77
Dentro de Grupos	12,75	18	0,70833333		
Total	113,958333	23			

4. REGISTROS PRUEBA DE TOXICIDAD VERTIMIENTO PUNTO 2

PRUEBA No.1

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
60	5	5	5	5	20	5
40	3	2	2	3	10	2,5
20	1	2	1	2	6	1,5
10	1	0	0	0	1	0,25
5	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					37	9,25

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	77,20833333	5	15,4416667	101,072727	2,77
Dentro de Grupos	2,75	18	0,15277778		
Total	79,95833333	23			



PRUEBA No.2

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
60	5	5	5	5	20	5
40	3	3	4	2	12	3
20	2	2	2	2	8	2
10	0	0	1	0	1	0,25
5	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					41	10,25

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	82,20833333	5	16,4416667	107,618182	2,77
Dentro de Grupos	2,75	18	0,15277778		
Total	84,95833333	23			

PRUEBA No.3

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
60	5	5	5	5	20	5
40	3	3	3	2	11	2,75
20	3	3	2	2	10	2,5
10	1	0	0	1	2	0,5
5	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	2	0	0	2	0,5
total					45	11,25

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	72,88	5	14,575	45,626087	2,77
Dentro de Grupos	5,75	18	0,31944444		
Total	78,625	23			



PRUEBA No.4

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
60	5	5	5	5	20	5
40	2	3	3	3	11	2,75
20	3	2	1	2	8	2
10	0	0	1	0	1	0,25
5	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					40	10

ANALISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	79,83333333	5	15,9666667	82,1142857	2,77
Dentro de Grupos	3,5	18	0,19		
Total	83,33333333	23			

PRUEBA No.5

concentración	Número de réplicas				total	promedio
	R1	R2	R3	R4		
60	5	5	5	5	20	5
40	4	3	2	2	11	2,75
20	3	2	3	1	9	2,25
10	0	1	1	0	2	0,5
5	0	0	0	0	0	0
Blanco	0	0	0	0	0	0
total					42	10,5



ANALISIS DE VARIANZA



Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F Calculado	F Teórico
Entre grupos	78	5	15,6	43,2	2,77
Dentro de Grupos	6,5	18	0,36111111		
Total	84,5	23			

Fuente: autoras, 2009



**ANEXO E. PROTOCOLOS PRUEBAS TOXICOLÓGICAS: *LBP01*, *LBP02*, *LBP03*, *LBP04*,
Y *LBP05***

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PREPARACION DEL AGUA PROTOCOLO LBP01	Pág. 1 de 4
		Versión 0
CONTENIDO <div><div>1. Objetivo</div><div>2. Materiales</div><div>3. Reactivos</div><div>4. Principio del método</div><div>5. Definiciones</div><div>6. Procedimiento</div><div>7. Bibliografía</div><div>8. Anexos</div></div> <div>Anexo A1: Formato <i>FLBP01</i>: Parámetros de control del agua libre de cloro</div>		
1. OBJETIVO Preparar el agua libre de cloro para la aclimatación del organismo de prueba y realización de ensayos de toxicidad, con el fin de mantener condiciones óptimas del ecosistema en el laboratorio.		
2. MATERIALES <div><div>• Acuarios de 100 o 50 litros</div><div>• Bomba sumergible</div><div>• Oxímetro HI 8043 – 422987 (Hanna)</div><div>• pH metro SG 2 – ELK (Mettler Toledo)</div><div>• Tanque de 250 Litros de capacidad</div><div>• Agua clorada</div></div>		
3. PRINCIPIO DEL MÉTODO El agua libre de cloro, según metodología de la CETESB L5.019, se prepara con el fin de aclimatar, mantener los organismos de prueba y realizar las pruebas de toxicidad bajo condiciones de laboratorio. Esto supone que a la investigación se incorpora un ecosistema artificial, en el cual, las características del medio (pH,		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div> <div></div>	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PREPARACION DEL AGUA PROTOCOLO LBP01	Pág. 2 de 4
		Versión 0

temperatura y oxígeno disuelto) se deben mantener controladas, con el fin de evitar alteraciones que puedan llevar a la muerte de los peces.

5. DEFINICIONES

Constantes de laboratorio: 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 se encuentran: temperatura, oxígeno disuelto y pH.

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Llenar el acuario de agua clorada tomada directamente de llave.

6.2 Introducir suficientes aireadores para oxigenar el agua y desplazar el cloro que pueda afectar a los organismos vivos.

6.3 llenar el tanque de 205 L con agua de la llave e introducir la bomba sumergible



6.4 Aumentar el oxígeno disuelto aireando el agua de manera continua por espacio de 48 horas, con el fin de llegar a la saturación.

6.5 Realizar la lectura de los parámetros de control siguiendo los protocolos del Standard Methods, los cuales se deben encontrar en los siguientes rangos:, la temperatura oscilo entre 16 y 18°C y pH entre cumpliendo con los parámetros



Parámetros de Control	Método según el Standard Mhetods	Rango
Oxígeno Disuelto	4500-0 G. Electrodo de membrana	5.5 y 7.5 mg/l de O ₂
pH	4500-H ⁺ B Electrométrico	6.0 a 8.0 unidades
Temperatura	2550 B Laboratorio y de campo	16 y 18°C

6.6 Consignar esta información en el formato *FLBP01 del Anexo 1*

6.7 Antes de utilizar el agua libre de cloro se debe realizar nuevamente la medición del oxígeno disuelto, para verificar que sus valores se encuentren en los siguientes rangos:

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PREPARACION DEL AGUA PROTOCOLO LBP01	Pág. 3 de 4
		Versión 0
<p>6.8 Cuando alguno de estos parámetros de control se encuentre por fuera de los intervalos señalados en el numeral 6.7, el agua debe ser descartada.</p> <p>7. BIBLIOGRAFIA</p> <p>ESCOBAR MALAVER, PEDRO MIGUEL; GARCIA, EDUARDO. Determinación de la toxicidad agua de los detergentes mediante sistemas estáticos, utilizando <i>Daphnia Magna</i>. Universidad de la Salle; Facultad de ciencias de la educación; departamento de Química y Biología. Bogotá D.C., 1993. Anexo 4</p> <p>COMPANHIA DE TECNOLOGIA Y SANEAMIENTO AMBIENTAL DE SAO PAULO, BRASIL - CETESB. Pruebas de Toxicidad aguda. Protocolos L5.019</p> <p>PROYECTO CAR – BID – CONTRATO 298–94. Estudio de evaluación de toxicidad relativa de sustancias tóxicas en vertimientos y cuerpos receptores. Bogotá, D.C., 1994.</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia													
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PREPARACION DEL AGUA PROTOCOLO LBP01	Pág. 4 de 4												
		Versión 0												
Elabore: Aura Paola Andrade Ayala 41041702 Lenny Johana Sánchez Sarmiento 41012141														
Revisó: Pedro Miguel Escobar Malaver														
<div data-bbox="779 951 958 982" style="text-align: center;">8. Anexos</div> <div data-bbox="339 1018 1354 1054" style="text-align: center;">Anexo 1. Formato FLBP01: Parámetros de control del agua libre de cloro</div> <table border="1" data-bbox="300 1087 1388 1906" style="width: 100%;"> <tr> <td data-bbox="300 1087 976 1220">  UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia </td> <td data-bbox="976 1087 1388 1220" style="text-align: center; vertical-align: middle;">FLBP01</td> </tr> <tr> <td colspan="2" data-bbox="300 1220 1388 1367" style="text-align: center;"> FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA LABORATORIO DE BIOENSAYOS REGISTRO DE DATOS PARÁMETROS DE CONTROL DEL AGUA LIBRE DE CLORO </td> </tr> <tr> <td colspan="2" data-bbox="300 1367 1388 1465"> Fecha de preparación: </td> </tr> <tr> <td data-bbox="300 1465 862 1709"> OD Inicial: _____ OD 48 horas: _____ </td> <td data-bbox="862 1465 1388 1709"> pH: _____ Temperatura: _____ </td> </tr> <tr> <td colspan="2" data-bbox="300 1709 1388 1856"> Observaciones: </td> </tr> <tr> <td colspan="2" data-bbox="300 1856 1388 1906"> Elaboró: </td> </tr> </table>			 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	FLBP01	FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA LABORATORIO DE BIOENSAYOS REGISTRO DE DATOS PARÁMETROS DE CONTROL DEL AGUA LIBRE DE CLORO		Fecha de preparación:		OD Inicial: _____ OD 48 horas: _____	pH: _____ Temperatura: _____	Observaciones:		Elaboró:	
 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	FLBP01													
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA LABORATORIO DE BIOENSAYOS REGISTRO DE DATOS PARÁMETROS DE CONTROL DEL AGUA LIBRE DE CLORO														
Fecha de preparación:														
OD Inicial: _____ OD 48 horas: _____	pH: _____ Temperatura: _____													
Observaciones:														
Elaboró:														

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ACLIMATACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) PROTOCOLO LBP02	Pág. 1 de 6
		Versión 0

CONTENIDO

1. Objetivo

2. Materiales

3. Definiciones

4. Principio del método

5. Procedimiento

6. Bibliografía

7. Anexos

Anexo A: Formato *FLB01*

1. OBJETIVO

Realizar la aclimatación de los organismos de prueba *Trucha arco iris* (*Oncorhynchus mykiss*), a nivel de laboratorio, para posteriores pruebas de ensayo.

2. MATERIALES

• Acuarios

• Aireadores

• Filtros

• Difusores



• Oxímetro



• Alimento para peces

• Agua libre de cloro

3. DEFINICIONES

• *Oncorhynchus mykiss*: Salmónido que se caracteriza por presentar cuerpo alargado, fusiforme y cabeza relativamente pequeña que termina en una boca grande, puntiaguda, hendida hacia el nivel de los ojos y con una fila de dientes fuertes en cada una de las mandíbulas, que les permite aprisionar las presas capturadas. Son característicos de agua dulce.

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ACLIMATACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) PROTOCOLO LBP02	Pág. 2 de 6
		Versión 0
<ul style="list-style-type: none">• Acuario: Recipiente de vidrio acondicionado para mantener a los peces vivos.• Aireador: Equipo empleado para oxigenar el agua de los acuarios.• Oxímetro: Monitores empleados para medir la cantidad de oxígeno presente en el agua.• Agua libre de cloro: Es aquella que, mediante aireación constante, le es removido el cloro residual presente en la misma y a la cual se le garantiza un rango de pH y condiciones adecuadas para el bioensayo.• Aclimatación: es el proceso por el cual un organismo se adapta fisiológicamente a los cambios en su medio ambiente, que en general tienen relación directa con el clima. Se suele usar este término para referirse a procesos que ocurren durante un período de tiempo corto, como la vida de un organismo individual o grupo.• Alevino: Cría de ciertos peces de agua dulce que se emplea para repoblamiento de ríos y lagos.		
4. PRINCIPIO DEL MÉTODO		
<p>La aclimatación de los alevinos de trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), se realiza según la metodología CETESB L5.019, con el fin de adaptar los organismos a un nuevo ambiente para la posterior realización de las pruebas de toxicidad a nivel de laboratorio.</p>		
5. PROCEDIMIENTO		
5.1. ACLIMATACIÓN		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div><div>LABORATORIO DE BIOENSAYOS</div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ACLIMATACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) PROTOCOLO LBP02	Pág. 3 de 6
		Versión 0

5.1.1. Los alevinos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), se aclimatan en acuarios de 100 L o 50 L dependiendo de la cantidad de organismos que se vayan a aclimatar para la realización de las pruebas. Se debe tener en cuenta que el requerimiento de agua por pez es de 400 ml, esto con el fin de optimizar el proceso de aclimatación de los organismos vivos.

5.1.2. El agua de los acuarios debe ser aireada durante ocho (8) días, antes de introducir los alevinos, con el fin de remover el cloro residual presente en el agua y evitar así la muerte de los peces.







Imagen 1. Acuario con motores para la aireación

5.1.3. Se deben registrar en el formato *FLB01* (Anexo A), los siguientes parámetros, según lo establecido en los protocolos de la CETESB

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div><div>LABORATORIO DE ACUICULTURA</div><div>INSTITUTO DE CIENCIAS AMBIENTALES Y SANITARIAS</div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ACLIMATACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) PROTOCOLO LBP02	Pág. 4 de 6
		Versión 0

L5.019 para evitar la muerte de los alevinos: Oxígeno Disuelto: 6 – 8 mg/l, Temperatura: 15-18 °C, pH: 6.5-7.5 unidades y % de mortalidad.

5.1.4. En el momento de la llegada de los alevinos, se debe introducir la bolsa donde vienen en el acuario durante dos horas como se observa en la imagen 1, con el fin de contrarrestar la diferencia de temperatura entre el agua de la bolsa y el agua del acuario.






Imagen 2. Disposición de los alevinos para la aclimatación

5.1.5 Después de las dos horas se empiezan a sacar los peces de la bolsa cuidadosamente y se distribuyen de manera uniforme dentro del acuario como se observa en la imagen 2, lo anterior para facilitar la aclimatación de los alevinos y evitar su muerte.



FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ACLIMATACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA TRUCHA ARCO IRIS <i>(Oncorhynchus mykiss)</i> PROTOCOLO LBP02	Pág. 5 de 6
		Versión 0





Imagen 3. Disposición de los alevinos para la aclimatación

- 5.1.6** Los alevinos son aclimatados durante 15 días aproximadamente según lo establecido por la CETESB L5.019, para un mejor desempeño de los mismos en las pruebas de toxicidad.



FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ACLIMATACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA TRUCHA ARCO IRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) PROTOCOLO LBP02	Pág. 6 de 6
		Versión 0
<p>Imagen 4. Peces en proceso de aclimatación</p> <p>5.1.7 Durante el proceso de aclimatación, los acuarios deben ser limpiados por medio de una aspiradora, para remover las eses de los peces y el exceso de comida presente en el agua, esto para evitar que el amonio generado en las eses produzca la muerte de los alevinos, es importante anotar que en el caso de que los peces presenten hongos en su cuerpo, se debe aplicar unas gotas de azul de metileno, para prolongar la vida de los organismos.</p> <p>6. BIBLIOGRAFÍA</p> <p>COMPAÑÍA DE TECNOLOGÍA Y SANEAMIENTO AMBIENTAL DE SAO PAULO, BRASIL - CETESB. Pruebas de Toxicidad aguda. Protocolos L5.019, 1992.</p> <p>PROYECTO CAR – BID – CONTRATO 298–94. Estudio de evaluación de toxicidad relativa de sustancias tóxicas en vertimientos y cuerpos receptores. Bogotá, D.C., 1994.</p> <p>VILLEGAS, G. Protocolos analíticos para agua. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca, Subdirección Científica. Bogotá D.C., 1999.</p>		
Elaboro:	Aura Paola Andrade Ayala 41041702 Lenny Johana Sánchez Sarmiento 41012141	
Reviso:	Pedro Miguel Escobar Malaver	

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE SENSIBILIDAD TOXICOLÓGICA PROTOCOLO LBP03	Pág. 1 de 12
		Versión 0

CONTENIDO



- Objetivos
- Definiciones
- Materiales
- Principio del método
- Procedimiento
- Bibliografía
- Anexos

1. OBJETIVO

Determinar la concentración letal media (CL50 -96) de una sustancia pura mediante pruebas estáticas sin renovación de la sustancia pura, que produce la muerte al 50% de los organismos expuestos en un tiempo de 96 horas.

2. DEFINICIONES

- Prueba Estática: Ensayo toxicológico en el cual no existe renovación de las soluciones test a lo largo de toda la prueba (corto tiempo de duración no más de 96 horas).
- Condiciones de la Prueba: Medición de parámetros de control después de cada una de las pruebas, con el fin de demostrar que la manifestación de los organismos expuestos se debe al efecto de las sustancias puras o vertimientos y no a alteraciones de las características fisicoquímicas de las mismas. Para ello se verifica el pH, el oxígeno disuelto.
- Concentración Letal (CL50-96): Concentración del compuesto tóxico que afecta al 50 % de la población de la especie modelo, causando su muerte, bajo condiciones de prueba en un tiempo de 96 horas.
- Pruebas de Sensibilidad: Estandarización de pruebas de toxicidad, cuyo propósito es establecer la sensibilidad de las especies y su secuencia de efecto frente a un tóxico de referencia, según las repeticiones de las mismas;

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE SENSIBILIDAD TOXICOLÓGICA PROTOCOLO LBP03	Pág. 2 de 12
		Versión 0



con esto se garantiza y certifica la confiabilidad de los datos en relación con la capacidad de respuesta de los organismos.

Con las pruebas se determina el rango de sensibilidad frente al tiempo de exposición y, de igual manera, se comprueba que la manifestación de los organismos expuestos se debe al efecto del tóxico de referencia y no a fallas operacionales en la aplicación del método, elaborando así cartas de control, teniendo en cuenta la precisión y exactitud con que se deben y pueden obtener los resultados generados por un determinado bioensayo. Los tóxicos de referencia a utilizar en estas pruebas pueden ser: NaCl, KCl, CdCl, CuSO4 ó K₂Cr₂O₇.

- Pruebas Preliminares (Screening Test): Pruebas de toxicidad donde se establece el rango de concentraciones de sustancias problema o vertimientos, en las cuales hay efectos observables en los organismos de prueba sin que se presente alta mortalidad.
- Pruebas Definitivas: Pruebas de toxicidad que se realizan a partir de los resultados de las pruebas preliminares. En ellas se determinan si se pueden mantener las mismas concentraciones, o si es necesario cambiar el factor de dilución en algún intervalo u otro aspecto que resulte relevante.
- Pruebas de Toxicidad Aguda: El principio de estas pruebas es determinar bajo condiciones específicas de una sustancia pura, o efluente, su letalidad al 50% de la población expuesta después de un período de exposición de 24, 48, 72 o 96 horas. Esta determinación se designa como la concentración letal media en el tiempo de exposición.

3. MATERIALES

1. 24 peceras de 2 L
2. Pipeteadores
3. Balones aforados de 1000 ml 7
4. Mallas de recolección
5. Pipeta aforada de 25 ml y 10 ml
6. probeta de 1000 ml
7. Estante de 6 entrepaños

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div><div>LABORATORIO AMBIENTAL</div><div>SECTOR DE LA PRODUCCIÓN Y SUMINISTROS</div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE SENSIBILIDAD TOXICOLÓGICA PROTOCOLO LBP03	Pág. 3 de 12
		Versión 0


4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Las pruebas de toxicidad se realizan según la metodología CETESB L5.019, con el fin de poner individuos de 15 días de nacidos a diferentes porcentajes de dilución de una sustancia de interés sanitario o de un vertimiento, determinándose la concentración que afecta al 50% de la población del organismo de prueba *Trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss)*, causando su muerte, en un tiempo determinado.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 Preparación de sustancias puras para pruebas de toxicidad Aguda.

5.1.1 Preparar la cantidad de tóxico requerido, según los datos obtenidos estequiométricamente en 1L de agua destilada en un balón aforado de 1000 ml, a partir de esto realizar 5 diluciones siguiendo un factor de 10. Como se observa en las siguientes imágenes.



FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE SENSIBILIDAD TOXICOLÓGICA PROTOCOLO LBP03	Pág. 4 de 12
		Versión 0

Imagen 1. Pesaje del Dicromato de tasio Imagen





Imagen 2. Preparación de las diluciones



Imagen 3. Balones con las soluciones madre

Ejemplo: para obtener la solución madre de Dicromato de potasio se pesa 1g de este compuesto y lleva a 1000mL en un balón aforado. La concentración que se

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE SENSIBILIDAD TOXICOLÓGICA PROTOCOLO LBP03	Pág. 5 de 12
		Versión 0
<p>obtiene es de 1000 ppm; a partir de esta solución madre se determinan los volúmenes de la anterior solución que se deben agregar a las peceras para obtener las concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm.</p> <p>Para obtener la concentración de 20 ppm se utiliza la ecuación:</p> $V_1 C_1= V_2 \cdot C_2 \quad (1)$ <p>Donde;</p> <p>V_1= Volumen de solución madre a agregar en la pecera (incógnita)</p> <p>V_2 = Volumen de agua que debe contener cada pecera (2L)</p> <p>C_1 = Concentración de la solución madre (1000 ppm)</p> <p>C_2= concentración a la que debe estar la solución en la pecera (20 ppm)</p> <p>Despejando V_1 la ecuación (1) se obtiene:</p> $V_1 = V_2 \cdot C_2 / C_1$ $V_1 = 2L \cdot 20 \text{ ppm} / 1000 \text{ ppm} = 0.04 L = 40 \text{ mL}$ <p>De lo anterior se tiene que se deben agregar 40 mL de solución madre de Dicromato de potasio y 1960 mL de agua libre de cloro para obtener finalmente la concentración deseada de 20 ppm.</p> <p>5.2.1. Montaje de las pruebas toxicológicas. Ubicar en un estante 24 peceras, los cuales, deben estar distribuidos en cinco (5) concentraciones de las respectivas soluciones, pruebas de sensibilidad y sustancia pura, y en un control de agua libre de cloro. Ver Imagen 4.</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE SENSIBILIDAD TOXICOLÓGICA PROTOCOLO LBP03	Pág. 6 de 12
		Versión 0



Imagen 4. Estante para disponer las diferentes concentraciones

5.2.2. Adicionar la cantidad indicada al realizar los cálculos de los diferentes porcentajes de concentración con ayuda de una pipeta graduada en las peceras mencionadas anteriormente, siendo preparadas cuatro (4) replicas por concentración, cada una con su respectivo control (blanco).

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE SENSIBILIDAD TOXICOLÓGICA PROTOCOLO LBP03	Pág. 7 de 12
		Versión 0



Imagen 5. Adición de la solución a cada pecera

5.2.3. Transferir a cada pecera 5 alevinos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), de 15 días de nacidos con ayuda de una malla, aclimatados 15 días previos a la prueba. Cada concentración necesita 20 organismos y en cada batería de ensayo se utilizan 120 organismos.



Imagen 6. Conteo de los peces para agregarlos al montaje



FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE SENSIBILIDAD TOXICOLÓGICA PROTOCOLO LBP03	Pág. 8 de 12
		Versión 0

5.2.4. Observar y tomar la lectura durante las 3, 24, 48,72 y 96 horas de los peces muertos en cada pecera, reportando los datos en el formato *FLBP02*. Reporte de datos de Bioensayos.



Imagen 7. Formato para tomar lectora del avance del bioensayo

5.2.5. Realizar la medición de parámetros de control el pH y OD después de cada prueba, tomando de manera aleatoria cualquier concentración, con el fin de demostrar que la manifestación de los organismos expuestos se debe al efecto de las sustancias puras o vertimientos y no a alteraciones de las características fisicoquímicas de las mismas, reportando estos datos en el Formato *FLBP02*; mostrado a continuación:

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE SENSIBILIDAD TOXICOLÓGICA PROTOCOLO LBP03	Pág. 9 de 12
		Versión 0

Formato *FLBP02*.
Reporte de Datos de Bioensayos

Concentración	Replicas				Total muertos	Porcentaje de mortalidad	Tº	pH	OD
	1	2	3	N					

Fuente: Guía para la realización de ensayos de toxicidad (Bioensayos) en organismos acuáticos

5.2.6 Este procedimiento se realiza hasta encontrar los rangos de concentraciones que reduce la muerte al 50% de los organismos, tanto para la realización de las pruebas definitivas de sensibilidad como para sustancias puras y vertimientos.



5.3 Pruebas de Sensibilidad



5.3.1 Realizar las pruebas definitivas de sensibilidad con un patrón primario como es el Dicromato de potasio, siguiendo la metodología descrita en los pasos 5.2.1., hasta 5.2.6 utilizando los rangos establecidos según los resultados en las pruebas preliminares.

5.3.2 Los rangos de dicromato de potasio que producen la muerte al 50% de los organismos están entre 20 y 100 mg/L de dicromato de potasio.

5.3.3 Con los resultados obtenidos entre este rango determinar la concentración letal media CL50-96 de cada prueba de sensibilidad por medio del *ANÁLISIS DE RESULTADOS, MEDIANTE EL METODO DE PROBIT* (Protocolo LBP05):

5.3.4. Realizar la carta de control con los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad y determinar la concentración letal media (CL50-96) promedio para el dicromato de potasio, así como la desviación estándar (σ) de la CL50-96, sus límites superior (promedio +2(σ)), e inferior (promedio - 2(σ))


FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE SENSIBILIDAD TOXICOLÓGICA PROTOCOLO LBP03	Pág. 10 de12
		Versión 0
<p>5.3.5. Estos resultados corresponden al intervalo de la concentración en el cual varía la respuesta de los organismos al tóxico de referencia, con una confiabilidad del 95%.</p> <p>5.3.6. La carta de control se debe realizar como mínimo con 20 pruebas de sensibilidad con el Dicromato de potasio.</p> <p>5.4. Pruebas Definitivas</p> <p>5.4.1. Realizar las pruebas definitivas siguiendo la metodología descrita en los pasos 5.2.1. hasta 5.2.6. utilizando los rangos establecidos según los resultados en las pruebas preliminares.</p> <p>5.4.2. Reportar estos resultados en el Formato <i>FLBP02</i></p> <p>5.4.3. Obtener la concentración letal media (CL50-96) con su respectivo límite superior e inferior con una confiabilidad del 95% por medio del “Método Probit” (Protocolo LB06): “Análisis de Regresión y Análisis Probit”.</p> <p>5.4.4. Realizar el análisis de varianza (ANOVA) del resultado, con el procedimiento descrito en el Protocolo LB07: “Análisis de Varianza”.</p> <p>5.4.5. Notas:</p> <p>1. La mortalidad en los controles no debe ser mayor que el 10% y, preferiblemente, no más que el 5%.</p> <p>2. Si la mortalidad en el control sobrepasa el 10%, esta prueba se considera no representativa y se requiere la repetición de la misma.</p> <p>3. La concentración de oxígeno medida en el bioensayo después de 96 horas debe ser mayor de 2 mg/l.</p> <p>4. Se debe realizar semanalmente una prueba de sensibilidad con los rangos establecidos del Dicromato de potasio; el resultado de la concentración letal media (CL50-96) del tóxico de referencia debe estar dentro de los límites superiores e inferiores establecidos en la carta de control.</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div><div>LABORATORIO AMBIENTAL</div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE SENSIBILIDAD TOXICOLÓGICA	Pág. 11 de12
	PROTOCOLO LBP03	Versión 0
<div>6. BIBLIOGRAFÍA</div> <div>ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Ed 20. 2005.</div> <div>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.</div> <div>CETESB L5.019. Pruebas de Toxicidad aguda. Guía para la realización de ensayos de toxicidad (Bioensayos) en organismos Acuáticos</div>		
Elaboro:	Aura Paola Andrade Ayala 41041702 Lenny Johana Sánchez Sarmiento 41012141	
Reviso:	Pedro Miguel Escobar Malaver	

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBA DE SENSIBILIDAD TOXICOLÓGICA PROTOCOLO LBP03	Pág. 12 de 12
		Versión 0

7. Anexos

TOXICIDAD ACUÁTICA


UNIVERSIDAD DE LA SALLE
 Bogotá - Colombia

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON Trucha Arco iris (*Oncorhynchus Mykiss*)

PRUEBA NUMERO: _____ SUSTANCIA DE PRUEBA: _____
 INICIO: ____/____/____ HORAS FINALIZACIÓN: ____/____/____ HORAS



CONCENTRACIÓN (ppm)	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS			
	NO. DE ORGANISMOS POR PECERA				NO. DE ORGANISMOS POR PECERA				NO. DE ORGANISMOS POR PECERA				NO. DE ORGANISMOS POR PECERA			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
BLANCO																

CONCENTRACIÓN (ppm)	72 HORAS				96 HORAS				No. De muertes		% mortal.
	NO. DE ORGANISMOS POR PECERA				NO. DE ORGANISMOS POR PECERA				No. muertos	No. total	
	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO											

RESPONSABLE: _____

LÍMITE SUPERIOR: _____
 CLSO: _____
 LÍMITE INFERIOR: _____

Anexo A: Tabla de registro para las pruebas toxicológicas

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBAS DE TOXICIDAD CON SUSTANCIAS PURAS O VERTIMIENTOS INDUSTRIALES PROTOCOLO LBP04	Pág. 1 de 9
		Versión 0

CONTENIDO

1. Objetivos

2. Definiciones

3. Procedimiento

4. Bibliografía

5. Anexos

1. OBJETIVO

Determinar la concentración letal media (CL50 -96) de una sustancia pura o de un vertimiento industrial, mediante pruebas estáticas sin renovación de la sustancia pura o efluente, que produce la muerte al 50% de los organismos expuestos en un tiempo de 96 horas.

2. DEFINICIONES



• Prueba Estática: Ensayo toxicológico en el cual no existe renovación de las soluciones test a lo largo de toda la prueba (corto tiempo de duración no más de 96 horas).

• Condiciones de la Prueba: Medición de parámetros de control después de cada una de las pruebas, con el fin de demostrar que la manifestación de los organismos expuestos se debe al efecto de las sustancias puras o vertimientos y no a alteraciones de las características fisicoquímicas de las mismas. Para ello se verifica el pH, el oxígeno disuelto y la dureza.

• Concentración Letal (CL50-96): Concentración del compuesto tóxico que afecta al 50 % de la población de la especie modelo, causando su muerte, bajo condiciones de prueba en un tiempo de 96 horas.

3. PROCEDIMIENTO

3.1 Preparación de la solución madre de sustancias puras pruebas de toxicidad Y preparación de solución madre para vertimientos industriales (Ver imagen 1);

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBAS DE TOXICIDAD CON SUSTANCIAS PURAS O VERTIMIENTOS INDUSTRIALES PROTOCOLO LBP04	Pág. 2 de 9
		Versión 0

calculando la cantidad de sustancia toxica como se observa en los ejemplos a continuación:

Ejemplo para soluciones puras: para obtener la solución madre de de Cianuro se debe tener en cuenta la fórmula el peso molecular de la sustancia en n el caso del NaCN pesa 49 g-mol de los cuales 26 g-mol son CN por lo tanto para preparar una solución de 1000 ppm de CN se necesitan 1.8846 g de NaCN los cuales llevan a 1000mL en un balón aforado. La concentración que se obtiene es de 1000 ppm; a partir de esta solución madre se determinan los volúmenes de la anterior solución que se deben agregar a las peceras para obtener las concentraciones de 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 y 3.0 ppm.

Para obtener la concentración de 0.1 ppm se utiliza la ecuación:

$$V_1 C_1= V_2 C_2 \quad (1)$$

Donde;

V_1 = Volumen de solución madre a agregar en la pecera (incógnita)

V_2 = Volumen de agua que debe contener cada pecera (2L)



C_1 = Concentración de la solución madre (100 ppm)



C_2 = concentración a la que debe estar la solución en la pecera (0.1 ppm)

Despejando V_1 la ecuación (1) se obtiene:

$$V_1 = V_2 \cdot C_2 / C_1$$
$$V_1 = 2L \cdot 0.1 ppm / 100 ppm = 0.002 L = 2.0 mL$$

De lo anterior se tiene que se deben agregar 2.0 mL de solución madre de Cianuro y 1998 mL de agua libre de cloro para obtener finalmente la concentración deseada de 0.1 ppm.

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBAS DE TOXICIDAD CON SUSTANCIAS PURAS O VERTIMIENTOS INDUSTRIALES PROTOCOLO LBP04	Pág. 3 de 9
		Versión 0
<p>Ejemplo para vertimientos industriales: En este caso se trabaja concentraciones dadas en %V/V. Para obtener concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 60 % V/V se deben hacer diluciones, en balón aforado, hasta llegar al porcentaje deseado partiendo de la concentración inicial del vertimiento (en %).</p> <p>Para obtener la concentración de 5 %V/V se utiliza la ecuación:</p> $V_1 C_1= V_2 C_2 \quad (1)$ <p>Donde;</p> <p>V₁= Volumen de solución madre a agregar en la pecera (incógnita)</p> <p>V₂ = Volumen de agua que debe contener cada pecera (2L)</p> <p>C₁ = Concentración de la solución madre (100 % V/V)</p> <p>C₂= concentración a la que debe estar la solución en la pecera (5 % V/V)</p> <p>Despejando V₁ la ecuación (1) se obtiene:</p> $V_1 = V_2 \cdot C_2 \ / C_1$ $V_1 = 2L \cdot 5\%V/V \ / 100 \%V/V = 0.1L = 100 mL$ <p>De lo anterior se tiene que se deben agregar 100 mL de solución madre del vertimiento y 1900 mL de agua libre de cloro para obtener finalmente la concentración deseada de 5 %V/V.</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBAS DE TOXICIDAD CON SUSTANCIAS PURAS O VERTIMIENTOS INDUSTRIALES PROTOCOLO LBP04	Pág. 4 de 9
		Versión 0




Imagen 1. Preparación de las diluciones

3.2 Preparar la cantidad de tóxico requerido, según los datos obtenidos estequiométricamente.

3.3 Vertimientos

Se conoce por vertimiento cualquier descarga líquida hecha a un cuerpo de agua o a un alcantarillado derivada de un proceso industrial.

3.2.1 Determinar el sitio de muestreo en la industria

Se deben realizar los muestreos en puntos representativos del proceso, por ejemplo, antes y después del tratamiento presente en la empresa para determinar si el tratamiento presenta una eficiencia que se ajuste a la legislación vigente.

3.2.2 Mantener refrigerada la muestra por un tiempo no mayor a 12 horas.

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div><div>LABORATORIO AMBIENTAL</div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	<div>PRUEBAS DE TOXICIDAD CON SUSTANCIAS PURAS O VERTIMIENTOS INDUSTRIALES</div> <div>PROTOCOLO LBP04</div>	Pág. 5 de 9
		Versión 0

3.3.3 Realizar la caracterización fisicoquímica del agua residual, siguiendo los lineamientos del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Ed 20. 2005. (DQO, O.D, pH, conductividad, sólidos suspendidos). Ver Imagen 2.





Imagen 2. Evaluación del vertimiento industrial. Muestra antes y después del tratamiento

3.3.4 Establecer si es necesario efectuar un tratamiento a la muestra (filtración, precipitación, centrifugación) para facilitar el montaje de las pruebas de toxicidad.

3.3.5 Preparar diluciones partiendo del 100% del efluente y a partir de ella preparar soluciones de 20, 40, 60, 80 y 100% del efluente, diluyendo con agua libre de cloro a un volumen final de 2000 ml.

3.3.6 Realizar las pruebas toxicológicas en un tiempo no mayor a 24 horas.

3.4. Montaje de las pruebas toxicológicas

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div><div>LABORATORIO AMBIENTAL</div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBAS DE TOXICIDAD CON SUSTANCIAS PURAS O VERTIMIENTOS INDUSTRIALES PROTOCOLO LBP04	Pág. 6 de 9
		Versión 0

3.4.1. Colocar en un estante 24 peceras, los cuales, deben estar distribuidos en cinco (5) concentraciones de las respectivas soluciones (pruebas de sensibilidad, sustancia pura y muestra analítica) y en un control de agua libre de cloro. Imagen 3.

3.4.2 Adicionar la cantidad indicada al realizar los cálculos de los diferentes porcentajes de concentración con ayuda de una pipeta graduada en las peceras mencionadas anteriormente, siendo preparadas cuatro (4) replicas por concentración, cada una con su respectivo control (blanco). Como se muestra en la imagen 4.

3.4.3 Transferir a cada pecera 5 alevinos de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*), de 15 días de nacidos con ayuda de una malla, aclimatados 15 días previos a la prueba. Ver imagen 5.



Imagen 3
Adecuación de las peceras



Imagen 4
Adición del Vertimiento



Imagen 5
Transferencia de los peces

Cada concentración necesita 20 organismos y en cada batería de ensayo se utilizan 120 organismos.

3.4.5 Observar y tomar la lectura durante las 3, 24, 48,72 y 96 horas de los peces muertos en cada pecera, reportando los datos en el formato *FLBP03* “Registro de resultados por muestra analizada”.

3.4.6 Realizar la medición de parámetros de control el pH y OD después de cada prueba, tomando de manera aleatoria cualquier concentración, con el fin de

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBAS DE TOXICIDAD CON SUSTANCIAS PURAS O VERTIMIENTOS INDUSTRIALES PROTOCOLO LBP04	Pág. 7 de 9
		Versión 0

demostrar que la manifestación de los organismos expuestos se debe al efecto de las sustancias puras o vertimientos y no a alteraciones de las características fisicoquímicas de las mismas, reportando estos datos en el Formato *FLBP03*.





Imagen 6. Control de las condiciones Óptimas para el bioensayo

3.4.7 Registrar y reportar los datos en la siguiente tabla:

Formato FLBP 03. Reporte de datos de bioensayos

Concentración	Replicas				Total muertos	Porcentaje de mortalidad	Tº	pH	OD	Dureza
	1	2	3	N						

Fuente: Guía para la realización de ensayos de toxicidad (Bioensayos) en Organismos Acuáticos


FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBAS DE TOXICIDAD CON SUSTANCIAS PURAS O VERTIMIENTOS INDUSTRIALES PROTOCOLO LBP04	Pág. 8 de 9
		Versión 0
4. BIBLIOGRAFIA APHA-AWWA-WPCF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Ed 20. 2005. 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 L5.019. Pruebas de Toxicidad aguda. Guía para la realización de ensayos de toxicidad (Bioensayos) en organismos Acuáticos		
Elaboro:	Aura Paola Andrade Ayala 41041702 Lenny Johana Sánchez Sarmiento 41012141	
Reviso:	Pedro Miguel Escobar Malaver	

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	PRUEBAS DE TOXICIDAD CON SUSTANCIAS PURAS O VERTIMIENTOS INDUSTRIALES PROTOCOLO LBP04	Pág. 9 de 9
		Versión 0

7. Anexos

Anexo A: Tabla de registro para las pruebas toxicológicas

TOXICIDAD ACUÁTICA

 **UNIVERSIDAD DE LA SALLE**
Bogotá - Colombia

REGISTRO DE DATOS DE LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA CON Trucha Arco iris (*Oncorhynchus Mykiss*)

PRUEBA NUMERO: _____ SUSTANCIA DE PRUEBA: _____

INICIO: ____/____/____ HORAS FINALIZACIÓN: ____/____/____ HORAS

CONCENTRACIÓN (ppm)	3 HORAS				6 HORAS				24 HORAS				48 HORAS			
	NO. DE ORGANISMOS POR PECERA				NO. DE ORGANISMOS POR PECERA				NO. DE ORGANISMOS POR PECERA				NO. DE ORGANISMOS POR PECERA			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
BLANCO																



CONCENTRACIÓN (ppm)	72 HORAS				96 HORAS				No. De muertes		% mortal.
	NO. DE ORGANISMOS POR PECERA				NO. DE ORGANISMOS POR PECERA				No. muertos	No. total	
	1	2	3	4	1	2	3	4			
BLANCO											

RESPONSABLE: _____

LÍMITE SUPERIOR: _____

CL50: _____

LÍMITE INFERIOR: _____

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 1 de 22
		Versión 0

CONTENIDO

1. Objetivo

2. Definiciones

3. Principio del modelo matemático

4. Procedimiento

5. Bibliografía

6. Anexos

Anexo A Relación entre el Probit empírico y el porcentaje de mortalidad

Anexo B Representación gráfica del cálculo de la CL50

Anexo C Determinación del Chi-cuadrado (X²).

Anexo D Factor (p) para el Probit calculado (Y).

1. OBJETIVO

Evaluar los resultados de los ensayos por medio de un modelo estadístico



2. DEFINICIONES

• Concentración: La concentración es la magnitud física que expresa la cantidad de un elemento o un compuesto por unidad de volumen.

• Dosis: Contenido de principio activo, expresado en cantidad por unidad de toma, por unidad de volumen o de peso en función de la presentación, que se administrará de una vez.

• Efecto: Consecuencia positiva o negativa, de la ocurrencia de un evento.

• Modelo: Conceptualización de un evento, un proyecto, una hipótesis, el estado de una cuestión, que se representa como un esquema con símbolos descriptivos de características y relaciones más importantes con un fin: ser sometido a modelización como un diseño flexible, que emerge y se desarrolla durante el inicio de la investigación como una evaluación de su relevancia.

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 2 de 22
		Versión 0
<ul style="list-style-type: none">• Toxicidad aguda: La toxicidad aguda tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50, que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50% de los animales.• Probit: Modelo estadístico que analiza las pruebas de toxicidad. 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. <h3>3. PRINCIPIO DEL MODELO MATEMATICO</h3> <p>En un experimento típico de pruebas de toxicidad se tiene la siguiente situación:</p> <ul style="list-style-type: none">• Concentración de la sustancia o dosis (<i>d</i>).• Número de individuos (<i>n</i>).• Número de organismos muertos o afectados (<i>r</i>).• Porcentaje de efecto (<i>p</i>). $p = \left(\frac{r}{n} \right) \times 100$ <p>La representación gráfica de <i>p</i> vs. <i>d</i>, o relación dosis-respuesta, genera una curva parabólica que muchas veces presenta dificultades en la construcción de un modelo lineal.</p> <p>Una forma de abordar este problema es transformando <i>d</i> a una escala logarítmica (<i>X</i> = log10 (<i>d</i>)), lo cual mostrará una relación dosis-respuesta de forma S o sigmoidea normal, como se muestra en la figura 1; de esta manera la distribución de <i>p</i> vs. <i>X</i> será de tipo normal</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 3 de 22
		Versión 0

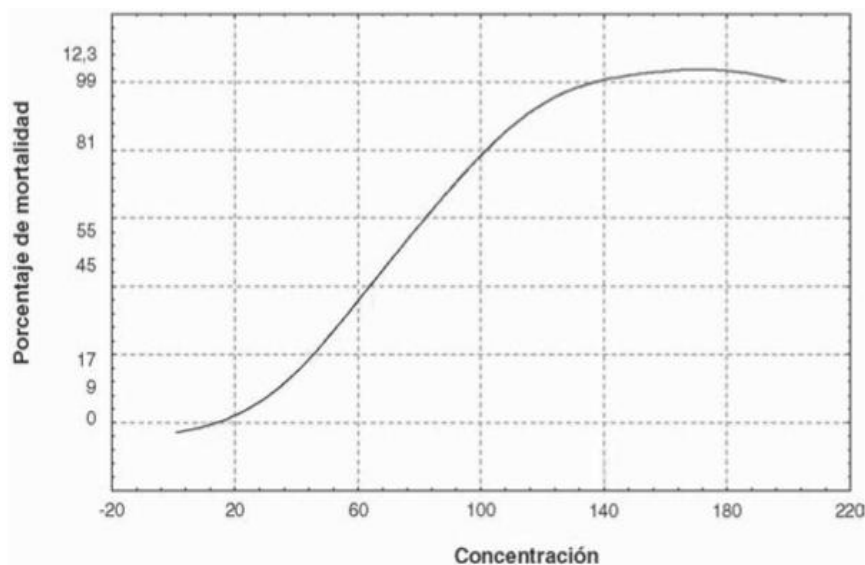


Figura 1. Relación dosis-respuesta

Posteriormente, mediante las tablas de Probit se transforma p (porcentaje de efecto) a unidades Probit (buscando en una tabla de distribución normal el valor de z correspondiente a una probabilidad acumulada igual a p y sumándole a continuación cinco unidades), se obtiene una distribución de puntos en un sistema bivariado de tipo lineal, los cuales se procesan según un análisis de regresión típico. Vale la pena enfatizar que el Probit es una transformación sobre la tasa de efecto (p), y la ecuación generada es de la forma:

$$y = a + bx$$

Donde:

y (expresado en unidades Probit) = $z + 5$

z = Variable normal estándar = z_0 tal que la $\text{Prob}(z \leq z_0) = p$

a y b son los estimadores de los parámetros de la recta de regresión

Así, cuando $p = 50\%$ entonces $y = 5$, por lo tanto:

$$X_5 = \log_{10} CL_{50}, \text{ entonces } CL_{50} = 10^5$$

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 4 de 22
		Versión 0

Para facilitar los cálculos, simplemente se puede usar un *software* como el suministrado por la *US Environmental Protection Agency* (US EPA): *Probit Analysis Program*, El procedimiento Probit permite encontrar estimadores *m*-verosímiles de parámetros de regresión y de tasas naturales (por ejemplo, tasas de mortalidad) de respuesta para ensayos biológicos, analizando porcentajes de efecto vs. dosis dentro del marco de la regresión.

4. PROCEDIMIENTO



Para el cálculo de la CL50 por este método es necesario contar, por lo menos, con dos porcentajes intermedios del efecto esperado (valores entre 0 y 100%). Con el resultado obtenido en los ensayos de toxicidad aguda con *Oncorhynchus mykiss* se debe construir una tabla que contenga los siguientes datos:



- Concentración de la sustancia ensayada en %
- Logaritmo en base 10 de las concentraciones (x)
- Numero de organismos en cada concentración
- Número de organismos muertos en cada concentración (r).
- Porcentaje de mortalidad en cada concentración (P).
- Probit empírico (PE).
- Probit esperado o calculado (Y).

Los cinco primeros resultados corresponden a datos experimentales; el Probit empírico se obtiene de la tabla del anexo A con el porcentaje de mortalidad observada en cada una de las concentraciones.

Tabla 1: Cálculo de la CL50 por el método Probit						
Concentración del agente tóxico (%)	Log10 de la concentración (X)	Núm. de organismos (N)	Núm. de muertos (r)	Porcentaje de mortalidad (P)	Probit empírico (PE)	Probit calculado (Y)

A partir de estos datos se elabora una gráfica en papel cuadriculado, colocando en el eje x el logaritmo de las concentraciones y en el eje Y el Probit empírico (figura 1

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO <i>LBP05</i>	Pág. 5 de 22
		Versión 0
<p>Anexo B), y se ajusta la recta a través de estos puntos. En el gráfico se traza una línea a partir del Probit 5,0 hasta cortar la línea trazada; el valor correspondiente en el eje x se denomina <i>m</i> y el antilogaritmo de este valor corresponderá a la CE50 o CL50.</p> <p>Para el cálculo del Probit esperado o calculado, debe hallarse el valor de S correspondiente a la tasa de incremento del log de la concentración (x) por unidad de incremento del Probit.</p> <p>Para el cálculo del Probit esperado o calculado, debe hallarse el valor de S correspondiente a la tasa de incremento del log de la concentración (x) por unidad de incremento del Probit</p> <p>En la recta trazada se calcula la pendiente, tomando el porcentaje donde se halló el mayor y el menor efecto, así como los probits correspondientes a estos valores, remplazando en la siguiente formula:</p> $S = (X - x) / (PE - Pe)$ <p>Donde: X: Mayor concentración x: Menor concentración PE: Probit empírico correspondiente a la mayor concentración Pe: Probit empírico correspondiente a la menor concentración</p> <p>A partir de estos datos se elabora una gráfica en papel cuadriculado, colocando en el eje x el logaritmo de las concentraciones y en el eje Y el Probit empírico (figura 1 Anexo B), y se ajusta la recta a través de estos puntos. En el gráfico se traza una línea a partir del Probit 5,0 hasta cortar la línea trazada; el valor correspondiente en el eje x se denomina <i>m</i> y el antilogaritmo de este valor corresponderá a la CE50 o CL50.</p> <p>Para el cálculo del Probit esperado o calculado, debe hallarse el valor de S correspondiente a la tasa de incremento del log de la concentración (x) por unidad de incremento del Probit.</p> <p>Para el cálculo del Probit esperado o calculado, debe hallarse el valor de S correspondiente a la tasa de incremento del log de la concentración (x) por unidad de incremento del Probit</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div><div>LABORATORIO DE BIOENSAYOS</div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 6 de 22
		Versión 0

En la recta trazada se calcula la pendiente, tomando el porcentaje donde se halló el mayor y el menor efecto, así como los probits correspondientes a estos valores, remplazando en la siguiente formula:

$$S = (X - x) / (PE - Pe)$$

Donde:

X: Mayor concentración
x: Menor concentración
PE: Probit empírico correspondiente a la mayor concentración
Pe: Probit empírico correspondiente a la menor concentración



Así, los valores del Probit esperado o calculado (Y) para cada concentración podrán ser calculados utilizando la siguiente expresión:

$$Y = 5 + \frac{c - m}{S}$$

Una vez calculados se colocan en la columna correspondiente de la tabla 1. La prueba de hipótesis utilizada para establecer la asociación entre la concentración de la sustancia tóxica y la respuesta en unidades probit es la prueba de CHI-cuadrado (X²). Los datos para el cálculo de este valor se colocan en una tabla 2 (anexo C) de la siguiente forma:

- Concentración de la sustancia estudiada en %
- Logaritmo decimal de la concentración (x).
- Probit calculado o esperado (Y).
- Numero de organismos (N)
- Mortalidad observada (r)
- Porcentaje de efecto esperado (P).

La mortalidad esperada (NP') se calcula multiplicando (N) por (P'). El cálculo de la desviación de la mortalidad se obtiene hallando la diferencia entre la mortalidad observada y la esperada. La contribución al Chi cuadrado de cada uno de los valores se calcula:

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 7 de 22
		Versión 0

$$(r - NP)^2 / NP(1 - P)$$

Y para el cálculo de los grados de libertad (n):

$$n = K - 2$$

Donde K es el número de concentraciones utilizadas

Con los datos obtenidos se realiza la siguiente tabla 3 para el cálculo del intervalo de confianza:

Valores de X^2 para una $P=0.05$



Grados de libertad(n)	X^2

Para el cálculo de los límites es necesario establecer el error estándar. El error estándar del log de la concentración letal para el 50% de los organismos se obtiene a través de la siguiente expresión:

$$EE_{\log_{10} CL_{50}} = \sqrt{\frac{1}{SNp} + \frac{(m - x)^2}{SNp(x - x^2)}}$$

4.17. Inicialmente, se construye una tabla en la cual se incorporen los siguientes datos:

- Logaritmo decimal de las concentraciones (x).
- Numero de organismos por concentración (N).
- Probit esperado o calculado (Y).
- Factor p , el cual se obtiene de la tabla 4 del Anexo C con el valor Y .
- Productos Np , Npx y Npx^2 , obtenidos de los datos de la misma tabla

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 8 de 22
		Versión 0

- Sumatoria de los productos correspondientes a los valores SNp , $SNpx$ y $S Npx^2$
- Factor p debe ser obtenido en la tabla entrando el valor de Probit calculado
- Producto Np resultante de la multiplicación de los valores de número de organismos por el factor p y su respectiva sumatoria.
- Producto Npx resultante de la multiplicación del producto anterior por el logaritmo de las concentraciones con su respectiva sumatoria.

Producto Npx^2 resultante de la multiplicación del producto anterior por el logaritmo de la concentración con su respectiva sumatoria.

Con todos los datos se obtiene la siguiente tabla:

Cálculo del error estándar del $\log_{10} CL_{50}$



Log 10 de la concentración (x)	Núm. De organismos (N)	Probit calculado (Y)	Factor (p)	Producto (Np)	Producto (Npx)	Producto (Npx^2)

Al tener la CL_{50} y no olvidando que el intervalo de confianza es 95% tendremos la concentración letal con sus limites inferior y superior respectivamente.

Para el desarrollo de esta investigación se adquirió el Software de Probit, el cual determinar la CL_{50-48} y los límites de confianza más rápido, y su procedimiento es el siguiente:

Se instala el programa en un computador que cuente con un software de Windows 98 en adelante, creándose una carpeta de Probit en el escritorio.

Dentro de esta carpeta quedaran registrados varios archivos; se dirige al archivo con nombre PROBFIS2 y se da doble clic donde se abre una ventana de la siguiente manera:

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 9 de 22
		Versión 0

ANALISI DE PROBIT USATA PER CALCULARE LA LC
NUMERO MASSIMO DI PUNTI = 20
A. Puddu, Istituto di Ricerca Sulle Acque - CNR
Via Reno 1-00198 Roma, Tel. 06/8841451
Marzo 1989



Inserimento dei dati da TASTIERA (1) o da FILE (2) ?
Battere 1, 2 oppure CTRL+C per abbandonare >
===== >

Da dos opciones para manejar el programa, la (1) es para introducir los datos con el teclado, la (2) para introducirlos en fila. Es este paso se escribe (1), y sale:

ANALISI DE PROBIT USATA PER CALCULARE LA LC
NUMERO MASSIMO DI PUNTI = 20
A. Puddu, Istituto di Ricerca Sulle Acque - CNR
Via Reno 1-00198 Roma, Tel. 06/8841451
Marzo 1989

Inserimento dei dati da TASTIERA (1) o da FILE (2) ?
Battere 1, 2 oppure CTRL+C per abbandonare >
===== > 1
Risultati su SCHERMO (1), STAMPANTE (2), oppure FILE (3) ?
===== > 3

Ahora se le da un nombre al archivo que se crea con los resultados que determina el programa, así:

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 10 de 22
		Versión 0

```

ANALISI DEI PROBIT USATA PER CALCOLARE LA LC
NUMERO MASSIMO DI PUNTI = 20.

A.Puddu, Istituto di Ricerca Sulle Acque - CNR
Via Reno 1 - 00198 Roma, Tel. 06/8841451
Marzo 1989

Inserimento dei dati da TASTIERA <1> o da FILE <2> ?
battere 1, 2 oppure CTRL+C per abbandonare>

===>      1

Risultati su SCHERMO <1>, STAMPANTE <2> oppure FILE <3> ?

===>      3

Inserisci il nome <NAME2> del file per i risultati

===>      PS1

```



Ahora el programa pide que se inserten el número de concentraciones, sin el control, numero de muertes en el control, numero de organismos en el control, así:

```

Risultati su SCHERMO (1), STAMPANTE (2), oppure FILE (3) ?
===== > 3
Inserisci il nome (NAME2) del file per i risultati
===== > B
NUMERO DI CONCENTRAZIONI (escluso el controllo)=5
NUMERO MORTI NEL CONTROLLO=0
NUMERO ORGANISMI NEL CONTROLLO=20

```

Ahora se procede a insertar los datos de las concentraciones comenzando por la concentración menor, el número de muertes en cada una y el número de tratamientos, así:

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 11 de 22
		Versión 0

Risultati su SCHERMO (1), STAMPANTE (2), oppure FILE (3) ?

===== > 3

Inserisci il nome (NAME2) del file per i risultati

===== > B

NUMERO DI CONCENTRAZIONI (escluso el controllo)=5

NUMERO MORTI NEL CONTROLLO=0

NUMERO ORGANISMI NEL CONTROLLO=20

== > INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE

CONCENTRACIONE= 0.1

NUMERO MORTI= 0



NUMERO TRATTATI=20

Así, sucesivamente hasta completar los datos de las 5 concentraciones. Al terminar este paso se da enter y se cierra esta ventana, en la carpeta de probit aparece un archivo con el nombre que se le designo a esa batería donde dará los resultaos de la CL50 son los limites de confianza

Este procedimiento se debe realizar para cada batería de ensayo, quedaran registrados los resultados en su respectivo archivo.

5. EJEMPLO

Se realizo una prueba de toxicidad, de la cual se obtuvieron los siguientes porcentajes de mortalidad:

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 12 de 22
		Versión 0

Ejemplo de cálculo de la CL50 por el método Probit.

Concentración del agente tóxico (%)	Log10 de la concentración (X)	Núm. de organismos (N)	Núm. de muertos (r)	Porcentaje de mortalidad (P)	Probit empírico (PE)	Probit calculado (Y)
100	2,0	20	15	75	5,67	5,53
50	1,7	20	9	45	4,87	4,96
25	1,4	20	5	25	4,33	4,40
12,5	1,1	20	2	10	3,72	3,84
6,25	0,8	20	1	5	3,36	3,27

No se debe olvidar que los cinco primeros resultados corresponden a datos experimentales; el Probit empírico se obtiene de la tabla de anexo A con el porcentaje de mortalidad observada en cada una de las concentraciones.

A partir de estos datos se elabora una gráfica en papel cuadrulado, colocando en el eje x el logaritmo de las concentraciones y en el eje Y el Probit empírico (figura 1 Anexo B), y se ajusta la recta a través de estos puntos. En el gráfico se traza una línea a partir del Probit 5,0 hasta cortar la línea trazada; el valor correspondiente en el eje x se denomina m y el antilogaritmo de este valor corresponderá a la CL50.

Teniendo en este caso un $m = 1.72$, por lo tanto la $CL50 = 52.5$ mg/l.

En la recta trazada se calcula la pendiente, tomando el porcentaje donde se halló el mayor y el menor efecto, así como los probits correspondientes a estos valores:

$$x_m = 0.8 \quad PE = 3.30$$

$$x_M = 2.0 \quad PE = 5.55$$



Si:

$$S = (X - x)/(PE - PE)$$

Siendo:

x_M = Mayor concentración.

x_m = Menor concentración.

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 13 de 22
		Versión 0

PE= Probit empírico correspondiente a la mayor concentración.

PE= Probit empírico correspondiente a la menor concentración.

Tendremos:

$$S = (2.0 - 0.8)/(5.55 - 3.30)$$
$$S = 0.533$$

Obteniendo así la tabla del Chi-cuadrado (X²) como se observa en al Anexo E. Se reemplaza en la ecuación los valores:

$$n = K - 2$$
$$n = 5 - 2 = 3$$



En la tabla 4 se determina el valor de X2 para tres grados de libertad, el valor obtenido es 7,82; al compararlo con el valor obtenido en la tabla, se observa que:

$$7.82 > 0.482$$

Por lo tanto, la recta está bien ajustada; en caso contrario, trazar nuevamente la recta y volver a calcular el Chi cuadrado.

Tabla 5.7. Valores de X2 para una P=0.05.	
Grados de libertad(n)	x2
1	3,34
2	5,99
3	7,82
4	9,49
5	11,4
6	12,6
7	14,4
8	15,5
9	16,9
10	18,8

Cálculo del intervalo de confianza

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div><div>LABORATORIO DE BIOENSAYOS</div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT	Pág. 14 de 22
	PROTOCOLO LBP05	Versión 0

Para el cálculo de los límites es necesario establecer el error estándar. El error estándar del log de la concentración letal para el 50% de los organismos se obtiene a través de la siguiente expresión:

$$EE\log_{10} CL_{50} = \frac{S^2}{\sum Np + (m - x)^2 / \sum Np(x - x^2)}$$

Así se construye la grafica:

Cálculo del error estándar del log10 CL50

Log 10 de la concentración (x)	Núm. de organismos (N)	Probit calculado (Y)	Factor (p)	Producto (Np)	Producto (Npx)	Producto (Npx2)
2,0	20	5,53	0,569	11,38	22,76	45,52
1,7	20	4,96	0,635	12,70	21,50	36,70
1,4	20	4,40	0,558	11,16	15,63	21,82
1,1	20	3,84	0,388	7,76	9,54	9,39
0,8	20	3,27	0,194	3,88	3,10	2,48
			(Σ)'	46,88	71,61	115,96

En este caso sería:

S= 0.533

x= ΣNpx / ΣNp= 1.527



m= 1.72



ΣNp= 46.88 ΣNpx= 71.61 ΣNpx²=115.96

ΣNp(x-x²) = Npx2 - {(ΣNpx) 2/ΣNp} = 6.574

Sustituyendo estos valores en la expresión:

$$EE\log_{10} CL_{50} = 0.0875$$

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 15 de 22
		Versión 0
<p>Así, el EE de CL50 será:</p> $EECL_{50} = \log 10 \times EE \log_{10} CL_{50} \times 10^m$ <p>Donde:</p> $\log 10 = 2.3026$ $EE \log_{10} CL_{50} = 0.0875$ $10^m = 51.97$ <p>Sustituyendo los valores en la expresión:</p> $EECL_{50} = 32.96$ <p>Como la:</p> $CL_{50} = 51.97$ $Intervalo\ de\ confianza = m \pm EECL_{50}$ $al\ 95\% = 51.97 + 32.46 = 84.43$ $51.97 - 32.46 = 37.14$ <p>Por tanto, la CL50 con los respectivos límites será:</p>		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá • Colombia</div></div>	<div><div>LABORATORIO AMBIENTAL</div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 16 de 22
		Versión 0

- Limite inferior: 41.9 ppm
- CL 50: 52.5 ppm
- Limite Superior: 63.1 ppm

Utilizando el Software con los datos del ejemplo anterior seria:

NUMERO DI CONCENTRACIONI (escluso el controllo)=5
NUMERO MORTI NEL CONTROLLO=0
NUMERO ORGANISMI NEL CONTROLLO=20



== >INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE
CONCENTRACIONE= 6.25
NUMERO MORTI= 1
NUMERO TRATTATI=20

== >INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE
CONCENTRACIONE= 12.50
NUMERO MORTI= 2
NUMERO TRATTATI=20

== >INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE
CONCENTRACIONE= 25
NUMERO MORTI= 5
NUMERO TRATTATI=20

== >INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE
CONCENTRACIONE= 50
NUMERO MORTI= 9
NUMERO TRATTATI=20

== >INIZIA A INSERIRE I DATI DALLA CONC. IFERIORE
CONCENTRACIONE= 100
NUMERO MORTI= 15
NUMERO TRATTATI=20

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div><div>LABORATORIO DE BIOENSAYOS</div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 17 de 22
		Versión 0

Al terminar de digitar los datos en el programa, se cierra esta ventana y al abrir el archivo de nombre B los datos salen registrados de la siguiente manera:

CONCENTRAZIONE	LOG (CONC)	N.TRATTATI		N.MORTI
		osservati	attesi	
6.25	0.7959	20.	1.	0.68
12.50	1.0969	20.	2.	2.20
25.00	1.3979	20.	5.	5.28
50.00	1.6990	20.	9.	9.73
100.00	2.0000	20.	15.	14.27
Controllo		20.	0.	0.00

=====

PARAMETRI STATISTICI DELLA REGRESSIONE $Y=a+bX$:
(Y= probits ponderati; X= log (conc) ponderati)



Intercetta (a) = 1.5801
Pendenza (b) = 1.9932 es = 0.3991
Media delle X = 1.5377
Media delle Y = 4.6451
CHI quadro = 0.4327



ALTRI PARAMETRI STATISTICI:

Numero di punti = 5
Gradi di libert... = 3
Mortalit... naturale = 0.0000 es = 0.0001
Numero di cicli = 1

=====

END POINT	CONCENTRAZIONE	LIMITI FIDUCIALI (95%)	
		inferiore	superiore
LC1	3.5373	0.7646	7.1428
LC50	51.9726	37.1407	84.4326

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 18 de 22
		Versión 0
<p>Como se observa tanto el método manual como con el Software, los resultados de la CL 50 y los límites de confianza son iguales.</p> <p>6. BIBLIOGRAFÍA</p> <p><u>http://www.estadistico.com/arts.html?20011022</u> COMPAÑÍA DE TECNOLOGÍA Y SANEAMIENTO AMBIENTAL DE SAO PAULO, BRASIL - CETESB. Pruebas de Toxicidad aguda. Protocolos L5.017/ 92 PROYECTO CAR – BID – CONTRATO 298–94. Estudio de evaluación de toxicidad relativa de sustancias tóxicas en vertimientos y cuerpos receptores. Bogotá, D.C., 1994.</p> <p>VILLEGAS, G. Protocolos analíticos para agua. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca, Subdirección Científica. Bogotá D.C., 1999.1ª edición</p>		
Elaboro:	Aura Paola Andrade Ayala Lenny Johana Sánchez Sarmiento	41041702 41012141
Reviso:	Pedro Miguel Escobar Malaver	

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 19 de 22
		Versión 0

1. ANEXOS

ANEXO A

Relación entre el Probit empírico y el porcentaje de mortalidad

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99a	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	9,09

A Valores entre 99, 0 y 99, 9.

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 20 de 22
		Versión 0

ANEXO B

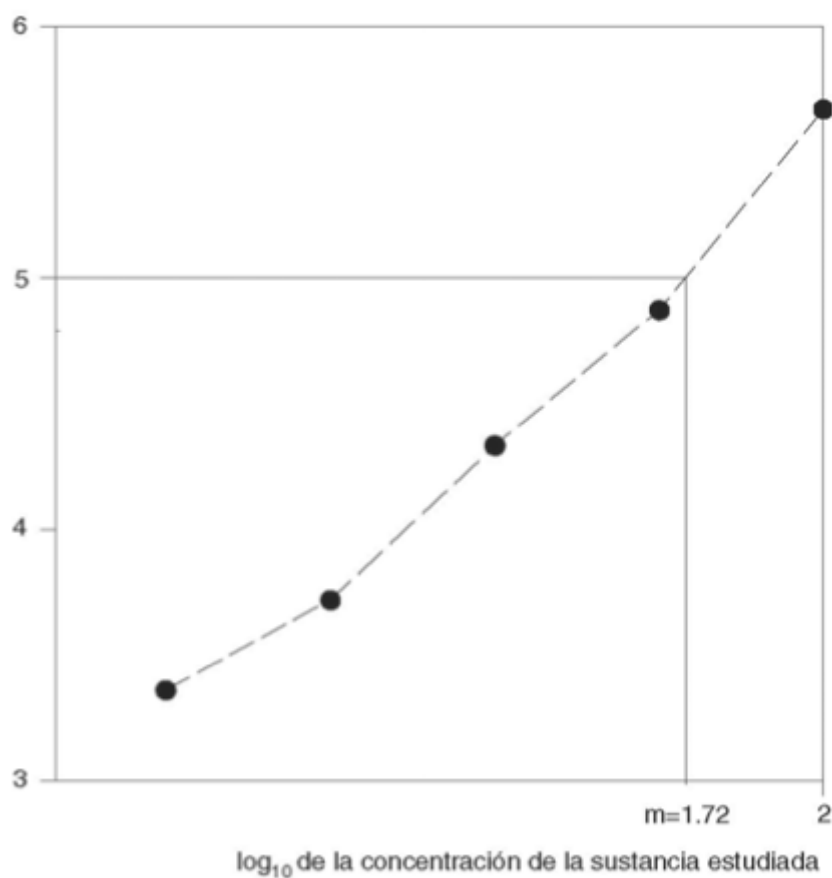


Figura 1. Representación gráfica del cálculo de la CL50

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 21 de 22
		Versión 0

ANEXO C



Determinación del Chi-cuadrado(X²)

Concentración de la sustancia tóxica (%)	Log10 de la Concentración (X)	Probit calculado (Y)	% de efecto esperado (P')	Núm.de organismos (N)	Núm.de muertos (r)	Mortalidad esperada (NP')	Desviación (r-NP')	Contribución al X ² (r-NP') ² NP'(1-P')

ANEXO D



Factor (p) para el Probit calculado (Y)

Y	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
1	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	0,005	0,006	0,008	0,011
2	0,015	0,019	0,025	0,031	0,040	0,069	0,062	0,076	0,092	0,110
3	0,131	0,154	0,180	0,208	0,238	0,264	0,302	0,336	0,370	0,406
4	0,439	0,471	0,503	0,532	0,558	0,583	0,601	0,616	0,627	0,634
5	0,637	0,634	0,627	0,616	0,601	0,589	0,558	0,532	0,503	0,471
6	0,439	0,405	0,370	0,336	0,302	0,269	0,238	0,208	0,180	0,154
7	0,131	0,110	0,092	0,076	0,062	0,059	0,050	0,031	0,025	0,019
8	0,015	0,011	0,008	0,006	0,005	0,003	0,002	0,002	0,001	0,001

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO DE PROBIT PROTOCOLO LBP05	Pág. 22 de 22
		Versión 0

ANEXO E
Determinación del Chi-cuadrado(X2)

Concentración de la sustancia tóxica (%)	Log10 de la Concentración (X)	Probit calculado (Y)	Porcentaje de efecto esperado (P')	Núm.de organismos (N)	Núm.de muertos (r)	Mortalidad esperada (NP')	Desviación (r-NP')	Contribución al X2 (r-NP') ² <div>NP'(1-P')</div>
100	2.0	5.53	0.705	20	15	14.1	0.9	0.19
50	1.7	4.96	0.485	20	9	9.7	-0.7	0.09
25	1.4	4.40	0.275	20	5	5.5	-0.5	0.06
12.5	1.1	3.84	0.125	20	2	2.5	-0.5	0.11
6.25	0.8	3.27	0.045	20	1	0.9	0.1	0.01
								0.48

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div><div>LABORATORIO DE BIOENSAYOS</div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO ANOVA PROTOCOLO LBP06	Pág. 1 de 7
		Versión 0

CONTENIDO

1. Objetivo

2. Definiciones

3. Principio del modelo

4. Procedimiento

5. Ejemplo

6. Bibliografía

7. Anexos

Anexo A: Valores Críticos de la Distribución F

1. OBJETIVO

Comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos.



2. DEFINICIONES



Variable: conceptos que forman enunciados de un tipo particular denominado hipótesis. Las variables se refieren a propiedades de la realidad que varían, es decir, su idea contraria son las propiedades constantes de cierto fenómeno.

Variable Dependiente: características de la realidad que se ven determinadas o que dependen del valor que asuman otros fenómenos o variables independientes.

Variables independientes: Los cambios en los valores de este tipo de variables determinan cambios en los valores de otra (variable dependiente).

Grados de libertad: número efectivo de observaciones que contribuyen a la suma de cuadrados en un ANOVA, es decir, el número total de observaciones menos el número de datos que sean combinación lineal de otros.

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO ANOVA PROTOCOLO LBP06	Pág. 2 de 7
		Versión 0
<p>Hipótesis: Las hipótesis son proposiciones provisionales y exploratorias sobre la veracidad o falsedad de un <u>concepto</u>, una <u>teoría</u> o un <u>modelo</u> con un alcance de trabajo de investigación por simulación y con métodos de campo o de laboratorio</p> <p>3. PRINCIPIO DEL MODELO</p> <p>El análisis de varianza parte de algunos supuestos que han de cumplirse:</p> <ul style="list-style-type: none"> • La <u>variable dependiente</u> debe medirse al menos a nivel de intervalo. • Independencia de las observaciones. • La distribución de la variable dependiente debe ser <u>normal</u>. • Homogeneidad de las varianzas <p>Los modelos de <i>efectos aleatorios</i> asumen que en un factor se ha considerado tan sólo una muestra de los posibles valores que éste puede tomar, estos modelos se usan para describir situaciones en que ocurren diferencias incomparables en el material o grupo experimental. El ejemplo más simple es el de estimar la media desconocida de una población compuesta de individuos diferentes y en el que esas diferencias se mezclan con los errores del instrumento de medición.</p> <p>La técnica fundamental consiste en la separación de la suma de cuadrados (SS, 'sum of squares') en componentes relativos a los factores contemplados en el modelo. Como ejemplo, mostramos el modelo para un ANOVA simplificado con un tipo de factores en diferentes niveles. (Si los niveles son cuantitativos y los efectos son lineales, puede resultar apropiado un análisis de regresión lineal).</p> $SS_{\text{Total}} = SS_{\text{Error}} + SS_{\text{Factores}}$ <p>El número de <u>grados de libertad</u> (gl) puede separarse de forma similar y se corresponde con la forma en que la <u>distribución chi-cuadrado</u> describe la suma de cuadrados asociada.</p> $gl_{\text{Total}} = gl_{\text{Error}} + gl_{\text{Factores}}$		

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO ANOVA PROTOCOLO LBP06	Pág. 3 de 7
		Versión 0

4. PROCEDIMIENTO

Al realizar una prueba de toxicidad, se pasan los datos correspondientes a la siguiente tabla.

Tabla 1. Formato de Datos de Prueba de Toxicidad

Tratamientos	Observaciones				Yi	Yi Promedio
	1	2	3	4		

4.1. Se plantea la hipótesis nula y la hipótesis alterna

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_n$
H₁: $\mu_1 \neq \mu_2$, para algún par



4.2. El tratamiento de análisis de varianza seria mediante la siguiente tabla:

Tabla 2. Análisis de Varianza

FV	SS	GL	Ms	Fc	Ft
Tratamiento	SS _{TTO}	a – 1	$\frac{SS_{TTO}}{a - 1}$	$\frac{SS_{TTO}/a - 1}{SS_E/N - a}$	F α (V ₁ V ₂)
Error	SS _E	N – a	$\frac{SS_E}{N - a}$		
Total	SS _T	N – 1			

Donde:

- N: Número total de observaciones; N: a * n
- n: número de observaciones en cada grupo

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	<div><div>UNIVERSIDAD DE LA SALLE</div><div>Bogotá - Colombia</div></div>	<div><div>LABORATORIO DE BIOENSAYOS</div></div>
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO ANOVA PROTOCOLO LBP06	Pág. 4 de 7
		Versión 0

- a: numero de tratamientos
- FV : Fuente de varianza
- SS: Suma de cuadrados
- GL: Grados de libertad
- Ms: Cuadrados medios
- Fc: F calculado
- Ft: F tabulado
- V₁: a – 1
- V₂: N – a

4.3. Para obtener el SS_{TTO}, se debe reemplazar la siguiente formula:

$$SS_{TTO} = \sum_{i=1}^{a=5} \frac{Y_i^2}{n} - \frac{Y^2}{N}$$

4.4. Para obtener el SS_T, se debe reemplazar la siguiente formula:

$$SS_T = \sum_{i=1}^{a=5} \times \sum_{j=1}^{n=5} Y_{ij}^2 \times \frac{Y^2}{N}$$

4.5. Para obtener el SS_E:

$$SS_E = SS_T - SS_{TTO}$$

4.6. Al obtener el Fc lo comparamos el Ft, el cual se encuentra en el libro Diseño y análisis de experimentos Douglas C. Montgomery (anexo A), para refutar o aceptar alguna hipótesis, esto se hace así:

Fc > Ft Se rechaza la Ho

Fc < Ft Se acepta la Ho

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO ANOVA PROTOCOLO LBP06	Pág. 5 de 7
		Versión 0

5. EJEMPLO:

De una prueba de toxicidad que se realizó en el laboratorio, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 2. Formato de Datos de Prueba de Toxicidad

Tratamientos	Observaciones				Total	Porcentaje de mortalidad
	1	2	3	4		
10	5	5	5	5	20	100
5	5	5	5	5	20	100
1	4	3	4	3	14	70
0,5	1	2	1	0	4	20
0,1	0	1	0	1	2	10
Control	0	0	0	0	0	0

De la cual partimos de dos hipótesis así:

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

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

Teniendo en cuenta que tenemos:

Tratamientos:	6
Observaciones:	4
Total:	24

Podemos construir la tabla 3 del análisis de varianza de la siguiente forma:



FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO ANOVA PROTOCOLO LBP06	Pág. 6 de 7
		Versión 0

Tabla 3. Análisis de Varianza

FV	SS	GL	Ms	Fc	Ft
Tratamiento	101,83	5	20,37	244,40	2.77
Error	1,5	18	0,08		
Total	103,33	23			

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

5. BIBLIOGRAFÍA

<http://www.estadistico.com/arts.html?20011022>

http://www.udc.es/dep/mate/estadistica2/sec3_7.html



http://es.wikipedia.org/wiki/An%C3%A1lisis_de_varianza

COMPAÑÍA DE TECNOLOGÍA Y SANEAMIENTO AMBIENTAL DE SAO PAULO, BRASIL - CETESB. Pruebas de Toxicidad aguda. Protocolos L5.017

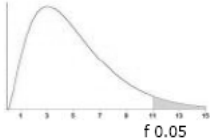
PROYECTO CAR – BID – CONTRATO 298–94. Estudio de evaluación de toxicidad relativa de sustancias tóxicas en vertimientos y cuerpos receptores. Bogotá, D.C., 1994.

VILLEGAS, G. Protocolos analíticos para agua. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca, Subdirección Científica. Bogotá D.C., 1999.1ª edición

Elaboro:	Aura Paola Andrade Ayala	41041702
	Lenny Johana Sánchez Sarmiento	41012141
Reviso:	Pedro Miguel Escobar Malaver	

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA	 UNIVERSIDAD DE LA SALLE Bogotá - Colombia	
LABORATORIO DE BIOENSAYOS	ANÁLISIS DE RESULTADOS MEDIANTE EL METODO ANOVA PROTOCOLO LBP06	Pág. 7 de 7
		Versión 0

6. ANEXOS



Anexo A: Valores Críticos de la Distribución F

v_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04
120	3.92	3.07	2.66	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88

*Reproducida de la tabla 18 de *Biometrika Tables for Statisticians*, vol. 1, con autorización de E.S. Pearson y Biometrika Trustees.



ANEXO F. REGISTRO FOTOGRÁFICO PRUEBAS DE TOXICIDAD

Cuadro 1. Procedimiento prueba toxicológica de sensibilidad

 	 	
<p>Preparación de los acuarios, aireación previa para introducir los peces.</p>	<p>Aclimatación de los organismos para las pruebas toxicológicas</p>	
		
<p>Aireación previa del agua del grifo para eliminar el cloro y ser utilizada en las pruebas toxicológicas.</p>	<p>Pesar el dicromato de potasio necesario para la prueba toxicológica (1g) en este caso.</p>	<p>Preparación de la solución madre (tóxico) para adicionar a las peceras.</p>



<p>Soluciones de dicromato de potasio necesarias para el montaje de la prueba.</p>	<p>Llenar las peceras a un litro, agregar la solución preparada en las concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100 ppm y llevar con el agua preparada a 2 litros.</p>	
<p>Agregar 5 peces en cada pecera</p>	<p>Agregar La solución de dicromato de potasio en las concentraciones establecidas anteriormente.</p>	<p>Inicia el tiempo para tomar lecturas a las 3, 6, 24, 48, 72, y 96 horas.</p>

Fuente: autoras, 2009



		
<p>Toma de la lectura.</p>	<p>Se observa la mortalidad de los peces.</p>	<p>Los peces muertos se sacan de las peceras y se toma la lectura correspondiente</p>
		
<p>Se observa a que concentración muere la mitad de la población, los datos se analizan en el programa probit y anova.</p>	<p>Los peces se disponen en una bolsa plástica, como residuo tóxico, se almacenan en el congelador y se eliminan a través de la incineración.</p>	<p>Se lavan los acuarios para adecuar el agua para los peces de la siguiente prueba.</p>

Fuente: las autoras, 2009



Cuadro 2. Montaje prueba toxicológica con cianuro de sodio.

<p>Se preparan los peces para la realización de la prueba (aclimatación)</p>	<p>Aireación del agua del grifo con una bomba sumegible para eliminar el cloro residual.</p>	<p>Se preparan las soluciones madre de cianuro para obtener las concentraciones deseadas</p>
<p>Se llenan las peceras con el volumen de agua de clorada para obtener la concentración de cianuro deseada.</p>	<p>Se agregan los volúmenes precisos de cianuro para obtener la concentración requerida en cada fila del montaje de la prueba.</p>	<p>Se agregan 5 peces por cada pecera.</p>



Una vez realizado el montaje se toman los registros hasta las 96 horas, y se realiza el lavado de las peceras para la siguiente prueba hasta completar el número de pruebas necesario para obtener el dato de la CL_{50-96} del cianuro.

Fuente: autoras, 2009



Cuadro 3. Metodología y realización de la prueba toxicológica del vertimiento antes del tratamiento.

<p>El vertimiento es traído en recipientes plásticos.</p>	<p>Se miden los volúmenes necesarios del vertimiento para las pruebas, se realizan los ajustes de OD, pH, necesarios para los ensayos.</p>
<p>Luego se realizan las disoluciones para las pruebas preliminares y definitivas; se toman 100ml de la muestra y se llevan a un volumen de 1000ml con agua destilada en un balón aforado, esto para poder realizar las pruebas preliminares en los rangos de 10, 20, 30, 40, 50%. Para garantizar los volúmenes se deben utilizar pipetas graduadas.</p>	



Previamente se adecuan los acuarios para la aclimatación de los peces, se realiza la aireación del agua a utilizar en las peceras. Este procedimiento se realiza de igual manera como se describe en las ilustraciones anteriores; (aireación previa del agua, aclimatación de los peces y preparación de las peceras para el montaje).



Se llenan las peceras con 1L de agua libre de cloro, luego se agrega el volumen del vertimiento y se completa el volumen a 2L, se agregan los peces (cinco por cada pecera).



Se realiza el montaje de las pruebas preliminares en los rangos establecidos anteriormente, se toman las lecturas, se disponen los peces muertos en bolsas plásticas en el congelador y se determinan nuevos rangos de porcentaje (V/V) para las pruebas definitivas.



Se agregan los peces (5 para cada pecera) y se termina el montaje de la prueba.



Luego de transcurridas las tres horas se comienza a tomar lectura hasta las 96h, se sacan los peces muertos y se toman los datos en la hoja de registro.



Los peces se envuelven en papel periódico y se disponen en bolsas plásticas, se llevan al congelador hasta completar la cantidad necesaria para su debida incineración. Se lavan los acuarios para disponerlos en la siguiente prueba.

Fuente: autoras, 2009

Cuadro 4. Procedimiento pruebas toxicológicas con el vertimiento después del sistema de tratamiento.



Se debe contar con previa disposición de los materiales; los peces con la debida aclimatación y el agua libre de cloro debe estar preparada



Las condiciones óptimas de (pH 6.5-7.5 y OD por encima de 6mg/L) se controlan debidamente antes del montaje de las pruebas.



La muestra del vertimiento es traída al laboratorio, esta debe estar refrigerada constantemente, se procede entonces a realizarse las pruebas preliminares en los rangos de 20, 40, 60, 80 y 100% del volumen de la muestra, para ello se debe contar con material de laboratorio (probetas y pipetas graduadas).



Se adiciona a las peceras el vertimiento y luego se completa el volumen hasta obtener el porcentaje (V/V) necesario en cada fila del montaje.



Se agregan los peces a las peceras y se prosigue a tomar la lectura a las 3, 6, 24, 48 y 96 horas.



Después de realizadas las pruebas preliminares, se determinan los rangos para las pruebas definitivas, el procedimiento a seguir para el montaje es el mismo que en las pruebas anteriores.

Fuente: autoras, 2009



ANEXO G. PRESERVACION DE MUESTRAS

Tabla 1. Requerimientos del muestreo de campo*

Parámetro	Envase	Tamaño mínimo de muestra mL	Tipo de muestra	Preservación	Tiempo máximo de almacenamiento Recomendado / regulado
Análisis Físico-Químico:					
Temperatura	P		p	No requerido	análisis inmediato
pH	P	50	p	Análisis inmediato	Análisis inmediato
Conductividad	P	500	p,c	4°C	28 días
Color	P, V	500	p,c	4°C	2 días
Alcalinidad	P, V	200	p	4°C	1-14 días
Dureza	P, V	100	p,c	HNO ₃ a pH<2	6 meses
Olor	V	500	p	4°C	6 horas / no especificado
Oxígeno Disuelto	V, P	300	p	Análisis inmediato	Análisis inmediato
Sólidos totales	P	200	p,c	4°C	7 días
Sólidos suspendidos	P	200	p,c	4°C	2 días
Sólidos totales disueltos	P	200	p,c	4°C	7 días
Sólidos sedimentables	P	200	p,c	4°C	2 días
Turbidez	P	100	p,c	4°C, oscuridad por 24 horas	1 a 2 días
Parámetros orgánicos:					
Aceites y grasas	VB	1000	p,c	HCl a pH<2, 4°C	28 días
Hidrocarburos totales de petróleo	VB	1000	p,c	HCl a pH<2, 4°C	7 días hasta la extracción, 40 días después de extracción
Hidr.Aromáticos Policíclicos	VB	1000	p,c	Ninguno	7 días hasta la extracción, 40 días después de extracción
Carbón orgánico total	VB	100	p,c	H ₃ PO ₄ o H ₂ SO ₄ a pH<2, 4°C	7 a 28 días
DBO	P, V	1000	p,c	4°C	6 a 48 horas
DQO	VB	100	p,c	H ₂ SO ₄ a pH<2, 4°C	7 a 28 días
Fenoles	VB	500	p,c	H ₃ PO ₄ a pH<2, 4°C*	28 días
Pesticidas	VS	1000	p,c	4°C, 1000mg/L de ác.ascórbico si hay cloro residual	7 días hasta la extracción, 40 días después de extracción
Compuestos orgánicos volátiles	VOA	40	p	HCl a pH<2, 4°C	14 días / 7días

* Para la preservación de fenoles, se tomaron las consideraciones del EPA



Metales y elementos:					
Boro	P	100	p,c	No requerido	28 días a 6 meses
Bromo	P, V	100	p,c	No requerido	28 días
Cadmio	PA, VA	500	p	HNO ₃ a pH<2	6 meses
Calcio	PA, VA	500	p	HNO ₃ a pH<3	7 días
Cobre	PA, VA	500	p	HNO ₃ a pH<2	6 meses
Cromo total	PA, VA	300	p	4°C	1 día
Fósforo total	P, V			H ₂ SO ₄ a pH<2, 4°C	28 días
Hierro	PA, VA	500	p	HNO ₃ a pH<2	6 meses
Magnesio	PA, VA	500	p	HNO ₃ a pH<2	7 días
Maganeso	PA, VA	500	p	HNO ₃ a pH<2	6 meses
Mercurio	PA, VA	500	p,c	HNO ₃ a pH<3, 4°C	28 días
Aniones y no metales:					
Cloruro	P	50	p,c	No requerido	28 días
Cloro residual	P	500	p	Análisis inmediato	Análisis inmediato a 0,5 horas
Cianuro total	P	500	p,c	NaOH a pH>12, 4°C en oscuridad	1 a 14 días
Fluoruro	P	300	p,c	No requerido	28 días
Fosfato	VA	100	p	filtrar inmediatamente y 4°C	2 días
Ioduro	P	500	p	HNO ₃ a pH<2	no hay regulación
Nitrato	P	100	p,c	4°C	2 a 28 días para muestras clorinadas
Nitrato-nitrito	P	200	p,c	H ₂ SO ₄ a pH<2, 4°C	ninguna a 28 días
Nitrito	P	100	p,c	4°C	ninguna a 2 días
Nitrógeno amoniacal	P	500	p,c	H ₂ SO ₄ a pH<2, 4°C	7 a 28 días
Nitrógeno orgánico, Kjeldahl	P	500	p,c	H ₂ SO ₄ a pH<2, 4°C	7 a 28 días
Sulfato	P	100	p,c	4°C	28 días
Sulfuro	P	100	p,c	4°C	7 a 28 días



Tabla 1. Requerimientos del muestreo de campo*

Parámetro	Envase	Tamaño mínimo de muestra mL	Tipo de muestra	Preservación	Tiempo máximo de almacenamiento Recomendado / regulado
Níquel	PA, VA	500	p	HNO ₃ a pH<2	6 meses
Plomo	PA, VA	500	p	HNO ₃ a pH<2	6 meses
Potasio	PA, VA	500	p	HNO ₃ a pH<2	6 meses
Selenio	P	500		4°C	6 meses
Silica	P	500	p,c	HNO ₃ a pH<2	28 días
Sodio	PA, VA	500	p	HNO ₃ a pH<2	7 días
Zinc	PA, VA	500	p	HNO ₃ a pH<2	6 meses

Análisis Microbiológico:

Coliformes fecales y totales	P	125		4°C, 0,008% Na ₂ S ₂ O ₃	6 horas
Estreptococos fecal	P	125		4°C, 0,008% Na ₂ S ₂ O ₃	6 horas

* Tabla tomada de Standard Methods for Examination of Water and Wastewaters, tabla 1060:1, pág 1-22

<p>P - plástico</p> <p>V - vidrio</p> <p>PA, VA - enjuagar 1+1 HNO₃</p> <p>VB - vidrio borosilicato</p> <p>VS - vidrio enjuagado con solventes orgánicos</p> <p>VOA - Vial de vidrio de 40 mL</p>	<p>p - puntual</p> <p>c - compuesta</p>
--	---

Refrigerar = almacenar a 4° C en ausencia de luz.

La preservación de la muestra debe realizarse en el momento de la toma de muestra. Para muestras compuestas, cada alícuota debe preservarse en el momento de su recolección.

Las muestras deben ser analizadas lo más pronto posible después de su recolección.

Algunas muestras pueden no ser estables por el periodo máximo dado en la tabla. Si la muestra está clorada, consultar su pretratamiento en el protocolo o en Standard Methods.

El máximo tiempo de almacenamiento es de 24 h si está presente el sulfuro, el cual se puede detectar mediante papel con acetato de plomo antes de ajustar el pH; si el sulfuro está presente, puede removerse por adición de nitrato de cadmio en polvo hasta que se obtenga prueba negativa; después se filtra la muestra y se adiciona NaOH hasta pH 12. Para metales disueltos las muestras deben filtrarse inmediatamente en el sitio de muestreo, antes de adicionar el ácido.

Fuente: IDEAM, Protocolos para análisis de aguas. Laboratorio de química ambiental. Julio de 1997.